UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

RESPOSTAS DE CITRANDARINS (*Poncirus trifoliata* × TANGERINA SUNKI) À INFECÇÃO POR '*Candidatus* Liberibacter asiaticus'

Thaís Magni Cavichioli

Bióloga

2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

RESPOSTAS DE CITRANDARINS (*Poncirus trifoliata* × TANGERINA SUNKI) À INFECÇÃO POR '*Candidatus* Liberibacter asiaticus'

Discente: Thaís Magni Cavichioli

Orientador: Prof. Dr. Helvécio Della Coletta Filho

Coorientadora: Profa. Dra. Mariângela Cristofani-Yaly

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

2021

C382r

Cavichioli, Thaís Magni
Respostas de citrandarins (Poncirus trifoliata × Tangerina Sunki) à infecção por 'Candidatus Liberibacter asiaticus' / Thaís Magni Cavichioli. -- Jaboticabal, 2022
67 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientador: Helvécio Della Coletta Filho
Coorientadora: Mariângela Cristofani-Yaly

1. Genética. 2. Huanglongbing. 3. Porta-enxerto. 4. Resistência a doenças. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: RESPOSTAS DE CITRANDARINS (*Poncirus trifoliata* X TANGERINA SUNKI) À INFECÇÃO POR 'Candidatus Liberibacter asiaticus'

AUTORA: THAÍS MAGNI CAVICHIOLI
ORIENTADOR: HELVÉCIO DELLA COLETTA FILHO
COORIENTADORA: MARIÂNGELA CRISTOFANI-YALY

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

Prof. Dr. HELVÉCIO DELLA COLETTA FILHO (Participaçao Virtual)
Centro APTA Citros Sylvio Moreira / Instituto Agronomico de Campinas – IAC

Prof. Dr. EDUARDO SANCHES STUCHI (Participaçao Virtual)
Estação Experimental de Citricultura-EECB / Bebedouro/SP

Pesquisador Dr. RICARDO HARAKAVA (Participaçao Virtual)
Instituto Biológico, Secretaria de Agricultura e Abastecimento, Laboratorio de Bioquímica Fitopatológica / São Paulo/SP

Jaboticabal, 09 de dezembro de 2021

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Thais Magni Cavichioli – Nascida em 25 de junho de 1996, no município de Matão – SP. Iniciou o curso de graduação em Ciências Biológicas em março de 2014, na Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), campus Araras, concluindo-o em dezembro de 2018. Durante a graduação, foi bolsista de Iniciação à Docência – PIBID e realizou três iniciações científicas vinculadas ao Centro de Citricultura Sylvio Moreira-IAC, sendo duas iniciações com bolsa CNPq e uma com bolsa FAPESP. Em março de 2019, iniciou o curso de mestrado junto ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP – Jaboticabal), com bolsa FAPESP.

Dedico esta dissertação a minha mãe Ana Paula, ao meu pai Fernando, ao Tigre, a minha família, e a todos que estiveram ao meu lado, me apoiando e incentivando durante este mestrado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, a Nossa Senhora e ao meu anjo da guarda, que me deram energias, força de vontade, sabedoria e coragem para superar todos os desafios.

A minha família, principalmente aos meus pais, Ana Paula Magni e José Fernando Cavichioli, por todo apoio, carinho, confiança, paciência, compreensão e incentivo durante todo o mestrado.

Aos meus animais, Bird, Buby, Floquinho e em especial ao Tigre que esteve presente, ao meu lado, dando-me todo apoio, força, motivação, coragem, amor, carinho, e que aguentou firme até a minha qualificação para poder descansar. Estará sempre no meu coração, Tigrão.

Agradeço também ao Dr. Helvécio Della Coletta Filho e Dra. Mariângela Cristofani-Yaly pela orientação, por toda paciência, humildade e pelos ensinamentos, que foram tão importantes na minha vida, acadêmica e pessoal. Sem vocês, nada disso seria possível, muito obrigada.

Agradeço também à FAPESP, pela bolsa-concessão de mestrado. Ao Centro de Citricultura Sylvio Moreira (CCSM/IAC), por permitir o desenvolvimento deste trabalho, cedendo espaço e materiais. Aos funcionários, pesquisadores e estagiários, sou grata por todo auxílio, paciência e amizade durante esses anos.

Meus sinceros agradecimentos às meninas de Araras: Marcela, Juliana, Nayane, Bruna, Aline, Giovana, Amanda, Júlia, Letícia, Carol e Marilia. Às meninas do IAC: Rafa, Maiara, Fernanda, Laura, Vitória, Eduarda, Isis, Maju, Nathalia, Carol, Leticia. E às meninas de Jaboticabal: Thaís, Maria, Carol, Larissa, Ana e Mônica, que foram e sempre serão a minha família de Araras e de Jaboticabal. Muito obrigada pelas alegrias, conselhos, parceria, festas e pelos momentos compartilhados, os quais iluminaram de maneira especial os anos de mestrado.

SUMÁRIO

RESUMO iii
ABSTRACT iv

CAPÍTULO 1 - Considerações gerais 1
1. INTRODUÇÃO 1
2. REVISÃO DE LITERATURA 2
2.1. HLB: agente associado, distribuição e hipóteses de patogenicidade 2
2.2. Fontes de resistência ao HLB 5
3. HIPÓTESE E OBJETIVOS 8
4. REFERÊNCIAS 9

CAPÍTULO 2 – No persistent infection by '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' in citrandarin genotypes exposed to a high titer of the pathogen 17
ABSTRACT 17
1. INTRODUCTION 18
2. MATERIAL AND METHODS 20
2.1. Plant material and CLas infection 20
2.2. Sampling and statistical analysis 20
2.3. DNA extraction and qPCR analysis 20
2.4. Determination of the cycle threshold (C_T) for the detection and quantification of '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' 21
2.5. Extraction and starch quantification 22
2.6. Callose visualization and quantification 22
3. RESULTS 22
3.1. CLas detection and source plants 22
3.2. Temporal infection of CLas in top grafted citrandarin genotypes 23
3.3. Host response of citrandarins to CLas infection based on starch accumulation and callose deposition 25
4. DISCUSSION 26
5. ACKNOWLEDGMENTS 29
6. REFERENCES 30

CAPÍTULO 3 – Respostas de laranja 'Valência' infectadas com CLas sobre o citrandarin H222 utilizado como porta enxerto e interenxerto 41
1. INTRODUÇÃO 42
2. MATERIAL E MÉTODOS 44
2.1. Preparo das plantas-testes, inoculações de CLas e delineamento experimental 44
2.2. Amostragem e análise estatística 46
2.3. Diagnóstico e quantificação de CLas nas folhas e raízes 46
2.4. Determinação do volume, diâmetro, peso seco e úmido do sistema radicular 47
2.5. Determinação do crescimento do sistema radicular 48
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 49
3.1. Infecção de CLas na copa e raízes dos diferentes tratamentos 49
3.2. Efeito de CLas no desenvolvimento do sistema radicular das plantas 51
4. REFERÊNCIAS 55
APÊNDICES 59

CAPÍTULO 4 – Considerações Finais e Conclusões 63
REFERÊNCIAS 65

RESPOSTAS DE CITRANDARINS (*Poncirus trifoliata* × TANGERINA SUNKI) À INFECÇÃO POR '*Candidatus* Liberibacter asiaticus'

RESUMO – Atualmente uma das mais importantes doenças que acometem plantas de citros em todo o mundo, inclusive no Brasil, é o *Huanglongbing* (HLB), o qual apresenta como agente causal a bactéria Gram-negativa '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' de ocorrência restrita aos vasos crivados do floema da planta hospedeira e ao inseto vetor, *Diaphorina citri*. Apesar da ampla susceptibilidade, a multiplicação de CLas é uma característica contrastante entre as espécies de *Citrus*. O *Poncirus trifoliata* e alguns de seus híbridos têm-se mostrado como possível fonte de tolerância à bactéria, além de que estes genótipos têm ganhado uma importância crescente como porta-enxertos cítricos devido às qualidades que conferem aos frutos. Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo desafiar, sob contínua exposição a CLas, 14 genótipos de citrandarins (híbridos de *Citrus sunki* x *P. trifoliata)* que apresentaram resultados negativos para infecção natural com CLas. Um segundo objetivo foi estudar o efeito de CLas em um genótipo de citrandarin quando usado como porta-enxerto e interenxerto para a laranjeira 'Valência' infectada com CLas. Para tanto, dois experimentos foram conduzidos sob condições de casa de vegetação. No experimento I, as gemas (borbulhas) desses híbridos foram sobre-enxertadas na copa de plantas de laranjeira 'Valência' com alto título de CLas. A detecção e quantificação foram realizadas a partir de amostras de DNA total extraído dos pecíolos das folhas seguindo-se do PCR quantitativo em tempo real (qPCR) para detecção e quantificação do patógeno. Também foi quantificado amido e calose. Aos 360 dias de infecção, houve redução no número de plantas infectadas por CLas, chegando à ausência completa de infecção para o genótipo H106 em todas as repetições analisadas. Além disso, baixas concentrações de amido (17 mg/g de tecido) e menor formação de calose (8 unidades de fluorescência/mm^2) foram observadas neste híbrido. No experimento II, o citrandarin H222, pré-selecionado em trabalhos anteriores, foi utilizado como porta-enxerto e interenxerto para a laranja 'Valência', inoculada com CLas via enxertia de tecido infectado. A detecção e quantificação foram realizadas a partir de amostras de DNA total extraído dos pecíolos das folhas e das raízes. Quantificou-se o volume, diâmetro, peso seco e úmido do sistema radicular de plantas infectadas e controle dos tratamentos. Os resultados mostraram que o citrandarin H222 apresentou ausência de infecção por CLas no sistema radicular em três das quatro repetições. Além disso, análise utilizando a técnica multivariada, considerando as diferentes variáveis analisadas (diâmetro do caule acima do solo, volume e peso das raízes e taxa de infecção por CLas) das plantas inoculadas e não inoculadas, possibilitou o agrupamento do H222 no mesmo grupo dos resultados obtidos para as plantas não inoculadas. As plantas inoculadas tendo o citrumelo Swingle como porta-enxerto assim como aquelas com os interenxertos do H222 com 5 e 30 cm agruparam-se em um outro cluster. O porta-enxerto H222 apresentou desempenho superior ao do citrumelo Swingle quanto ao desenvolvimento do sistema radicular, podendo ser, inclusive, comparado ao desenvolvimento do sistema radicular das plantas não inoculadas. No entanto, os interenxertos com este genótipo não trouxeram ganhos às plantas, sendo até deletérios.

Palavras-chave: Genética, *Huanglongbing*, Porta-enxerto, Resistência a doenças

RESPONSES OF CITRANDARINS (*Poncirus trifoliata* x TANGERINE SUNKI) TO INFECTION BY '*Candidatus* Liberibacter asiaticus'

ABSTRACT - Currently, Huanglongbing has been considered one of the most important diseases that affects citrus plants worldwide, including Brazil. The causal agent is the Gram-negative bacterium *'Candidatus* Liberibacter asiaticus', which occurs restricted to the phloem vessels of the host plant. *Diaphorina citri* is the insect vector associated with HLB disease. Despite the wide susceptibility, CLas multiplication is a contrasting characteristic among *Citrus* species. For example, *Poncirus trifoliata* and some of its hybrids have been shown to be a possible source of tolerance to the bacteria. In addition, these genotypes have presented a great importance when used as citrus rootstocks, due to the qualities they confer to the fruits. In this context, the present work aimed to challenge, under continuous exposure to CLas, 14 citrandarins genotypes (*P. trifoliata* × *Citrus sunki*) that showed negative results for natural CLas infection. Therefore, the study also investigated the effect of CLas on one of these genotype when used as a rootstock and intergraft for the CLas-infected 'Valência' orange tree. For that, two experiments were carried out under greenhouse conditions. In experiment I, the buds of the hybrids were overgrafted on the canopy of 'Valência' orange plants with high CLas titer. CLas detection and quantification were performed using total DNA samples extracted from the leaf petioles, followed by quantitative PCR (qPCR). The quantification of starch and the presence of callose was also evaluated. The results indicated, at 360 days of infection, there was a decrease in the number of CLas infected plants, since the complete absence of infection for the H106 genotype in all replicates analyzed was observed. Furthermore, low starch concentrations (17 mg/g tissue) and lower callose deposition (8 fluorescence units/mm2) were observed in H106 hybrids. In experiment II, the citrandarin H222, which was pre-selected in previous studies, was used as rootstock and intergraft for 'Valência' orange,CLas inoculations were performed via grafting of infected tissue. Detection and quantification were performed using samples of total DNA extracted from the petioles of leaves and roots. The volume, diameter, dry and wet weight of the root system of infected plants and control treatments were quantified. The results showed it was not possible to detect CLas in the roots of the plants graft onto H222, this fact occurred in within three to four biological repetitions. The multivariate hierarchical analysis (Ward statistic) considering the mean variables of above-ground stem diameter, root volume and weight, and CLas infection rate, analyzed jointly, grouped H222 in the same group of the uninoculated plants. Plants inoculated, which had Swingle citrumelo as rootstock, and those with 5 and 30 cm H222 intergrafts clustered in another cluster. Therefore, based on the set of variables analyzed, it is concluded that the H222 rootstock, even with the scion infected with CLas, was not significantly affected, on this basis considered similar with the non-inoculated plants. So, we concluded that H222 rootstock presented superior performance when compared to the citrumelo Swingle regarding the development of the root system. However, intergrafts with this genotype did not bring gains to the plants, being even deleterious.

Keywords: Genetics, Huanglongbing, Rootstock, Disease resistance

CAPÍTULO 1 - Considerações gerais

1. INTRODUÇÃO

Atualmente o Brasil responde por mais de 75% das exportações mundiais de suco de laranja (Conab, 2020). Os maiores importadores do suco brasileiro na forma de suco concentrado congelado (FCOJ – frozen concentrate orange juice) e suco integral pasteurizado e resfriado (NFC – not from concentrate) são a Europa, Estados Unidos e Ásia (Asato, 2018).

Apesar de extremamente competitiva, a citricultura brasileira apresenta uma série de problemas de origem biótica, dentre elas o *Huanglongbing* (HLB), considerada uma das doenças cítricas mais importantes em todo o mundo, causadora de enormes prejuízos na produção comercial, onde quer que a doença ocorra (Dagulo et al., 2010).

Segundo o Fundo de Defesa da Citricultura - Fundecitrus (2021), a safra de laranja 2020/21 do cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro foi finalizada em 268,63 milhões de caixas de 40,8 kg. Apresentando uma redução de 30,55% do produzido no ciclo 2019/20. Essa redução é atribuída ao clima extremamente adverso ao longo da safra. Entretanto, a presença de doenças, dentre estas o HLB, é um dos motivos impactantes para a queda da produção. A incidência de HLB no ano de 2021 alcançou o maior patamar, com crescimento de 7,2% em relação ao ano de 2020, estando presente em 22,37% das laranjeiras do cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro (Fundecitrus, 2021; Citrusbr, 2021).

Dentre as variedades comerciais de laranja doce a ‘Valência’ apresenta grande importância econômica, devido à alta qualidade dos frutos e a produtividade. Os frutos podem ser destinados tanto ao mercado interno como ao externo, atendendo ao processamento industrial e ao consumo de fruta fresca. Mas, assim como as demais variedades comerciais, é susceptível à bactéria associada ao HLB e é severamente afetada pela doença (Tazima et al., 2008). Estudos que possibilitem melhores respostas da planta cítrica ao processo de infecção por CLas e que venham a somar ganhos ao manejo do HLB hoje em curso são importantes para a sustentabilidade da produção de frutos de citros.

Os sintomas de HLB são associados às percepções visuais das respostas fisiológicas das plantas afetadas (Coletta-Filho e Carlos, 2010). Apresentam mosqueado irregular nas folhas, frutas deformadas, sementes abortadas, queda de folhas e frutos, podendo até levar à morte da planta (da Graça, 1991). Fisiologicamente ocorrem danos no sistema fotossintético e no floema, desencadeando inúmeras alterações citológicas como acúmulo de amido nas folhas e deposição de calos (calose) nas placas crivadas, levando a danos na funcionalidade do floema (Aritua et al., 2013; Etxeberria et al., 2009; Fan et al., 2010; Kim et al., 2009; Koh et al., 2012).

Ainda que não haja relatos na literatura a respeito da existência de genótipos comerciais completamente resistentes a CLas, trabalhos publicados têm mostrado que a multiplicação desta bactéria é uma característica contrastante dentro das espécies de *Citrus* (Machado et al., 2010; Alves et al., 2021). Dentre os genótipos de maior tolerância, destacam-se o *Poncirus trifoliata* e seleções de híbridos desta espécie com tangerinas (*Citrus sunki* - tangerina Sunki *ou Citrus resnhi* - tangerina Cleópatra) os quais têm apresentado baixa incidência de HLB no campo (Castle et al., 2015). Também variedades comerciais de citros enxertadas no porta-enxerto US-897 (*C. reticulata* × *P. trifoliata*) apresentaram tolerância em ambientes com incidência da doença na Flórida (Albrecht e Bowman, 2011). O grupo de pesquisa do Centro de Citricultura tem trabalhado com seleções de citrandarins derivadas do cruzamento de tangerina Sunki com *P. trifoliata* com resultados muito promissores quanto à resistência ou tolerância ao HLB (Boava et al., 2015 e 2017; Curtolo et al., 2020).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. HLB: agente associado, distribuição e hipóteses de patogenicidade

A nomenclatura de bactérias não cultiváveis em meio de cultura e, portanto, não descritas em suficientes detalhes para estabelecimento de um novo taxon é precedida pela palavra escrita em itálico *Candidatus* (Murray e Schleifer, 1994). Grafias com aspas simples, duplas ou sem aspas referindo-se a *Candidatus* são encontradas na literatura demonstrando falta de consenso na comunidade científica

frente ao assunto (Pallen et al., 2021). Ainda, a utilização de nomenclatura sem o prefixo *Candidatus* para as três espécies de Liberibacter associadas ao HLB; *Candidatus* Liberibacter americanus (Teixeira et al., 2005), *Candidatus* Liberibacter asiaticus (Jagoueix et al., 1996) e *Candidatus* Liberibacter africanus (Jagoueix et al., 1996) foi recentemente sugerida por Oren e colaboradores (Oren et al., 2020) sendo então *Liberibacter americanus*, *Liberibacter asiaticus* e *Liberibacter africanus.* Ainda que o cultivo de Liberibacter associado ao HLB não tenha sido completamente estabelecido (Davis et al., 2008), avanços significativos foram obtidos (Ha et al., 2019), porém ainda não suficientes para uma caracterização detalhada de um novo taxon. Neste trabalho iremos utilizar a denominação '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' (CLas) segundo recomendação da International Code of Nomenclature of Prokaryotes (ICNP) (Oren, 2021).

O HLB está associado a bactérias Gram-negativas *Candidatus Liberibacter* spp. (Garnier et al., 1984), de ocorrência restrita aos vasos crivados do floema. Essa bactéria distribui-se irregularmente na planta cítrica, porém de modo sistêmico podendo ser encontrada nas nervuras centrais de folhas, raízes, tecidos florais (pétalas, pistilos e estames), cascas e tecidos do fruto (Tatineni et al., 2008). Das três espécies de *Liberibacter* citadas acima, a asiática ('*Ca*. Liberibacter asiaticus' - CLas) é a mais prevalente em nível mundial, assim como nos estados brasileiros onde o HLB está oficialmente reportado (São Paulo, Minas Gerias, Paraná e Mato Grosso do Sul), sendo, portanto, a espécie de *Liberibacter* de maior importância. Em adição, é a espécie de maior adaptabilidade às condições ambientais (Gasparoto et al., 2012) e de maior eficiência na transmissão pelos vetores (Lopes et al., 2009).

CLas pode ser disseminada de duas formas: propagação de tecidos de citros infectados e transmissão natural pelo psilídeo (*Diaphorina citri*), inseto vetor (Bové, 2006). Os sintomas visuais incluem clorose (mosqueado) assimétrico nas folhas, sementes abortadas, frutos pequenos e deformados, queda de frutos e folhas, e baixa qualidade do fruto e do suco (Brlansky et al., 2010) (Figura 1).



Figura 1. Sintomas típicos de HLB. A. Mosqueamento foliar (blotchy mottle), B. Declínio da copa - queda de folhas e frutos, C. Columela assimétrica e semente abortada (inferior) comparado a fruto sadio (superior).

A entendimento de como ocorre a distribuição de CLas na planta, a relação da concentração da bactéria e a sintomatologia da doença são fatores importantes para o desenvolvimento de estratégias de controles adequados da doença (Wang et al., 2017). Estudos comprovam que CLas se move através dos poros presentes nas placas crivadas do floema em derivo a forma alongada da bactéria (Achor et al., 2020). A infecção ocorre na direção da translocação da seiva do floema, movendo-se de fontes da infecção para tecidos drenos, como, por exemplo, as raízes (Wang et al., 2017). Por muito tempo, a infecção da raiz por CLas foi ignorada tal como a morte do sistema radicular devido a obstrução do floema, impedindo a translocação de fotossintatos, considerada como um sintoma secundário (Maust et al., 2003; Bertaccini e Duduk, 2009; Etxeberria et al., 2009). Por outro lado, a literatura aponta que as raízes são danificadas pela colonização da bactéria nesses órgãos, mesmo antes do desenvolvimento de sintomas foliares visíveis não estando, portanto, somente associada à obstrução do floema (Johnson et al., 2013).

O declínio das plantas após a infecção por CLas é atribuído a uma série de distúrbios metabólicos, como ruptura drástica na alocação de carboidratos, colapso do floema, e desintegração do sistema radicular (Brodersen et al., 2014). Após a infecção por CLas, o amido se acumula em praticamente todas as células vivas da planta, incluindo as placas crivadas do floema, células epidérmicas da folha e feloderme. Acredita-se que o sequestro de carboidratos na forma de amido resulta na redução da quantidade de fotoassimilados nos tecidos drenos como raízes, órgãos de armazenamentos, frutos em desenvolvimento e folhas imaturas, os quais importam

carboidratos para o seu desenvolvimento normal, podendo gerar até a morte da planta. Os drenos incluem órgãos não fotossintéticos da planta e aqueles que produzem uma quantidade de fotoassimilados insuficiente para o seu crescimento (Pitino et al.,2018; Zheng et al., 2018). As perdas de raízes em plantas susceptíveis ao HLB são substanciais chegando entre 30 a 50% no início do processo da doença mesmo antes dos sintomas foliares visíveis e atingindo até 80% nos estágios de infecção mais avançada (Graham et al., 2013).

Mesmo que nos citros não exista resistência a CLas e aos sintomas de HLB, diferentes graus de susceptibilidade foram observados (Machado et al., 2010). Um dos possíveis mecanismos que podem estar associados à diferença de susceptibilidade da planta cítrica ao HLB é a composição da seiva do floema. A seiva liberiana é uma mistura complexa de substâncias orgânicas e inorgânicas sendo rica em nutrientes, servindo assim como fonte de alimento para muitos insetos sugadores como psilídeos e cigarrinhas, além de possibilitar a multiplicação de bactérias como CLas (Hijaz e Killiny, 2014). Através de análise comparativa da seiva de espécies e variedades cítricas com diferentes graus de tolerância ao HLB, foi possível comprovar a existência de diversidade e/ou quantidades diferentes de nutrientes existentes na seiva destes materiais, podendo estar associada às repostas diferenciais à doença (Killiny, 2016; Valim e Killiny, 2017). Vários estudos a nível transcricional visando à seleção de genes-alvo a serem utilizados pela engenharia genética como estratégia para neutralizar e/ou controlar os efeitos prejudiciais do HLB em citros foram realizados (Mafra et al., 2013; Pitino et al., 2018; Nwugo et al., 2013). Pesquisas mostram que a tolerância está associada à expressão constitutivamente mais elevada de genes relacionados com a defesa ou outros, em vez de uma expressão induzida em resposta à infecção bacteriana (Albrecht e Bowman, 2012).

2.2. Fontes de resistência ao HLB

Não existem formas efetivas de controle de CLas e consequentemente da doença, sendo que o manejo do HLB ainda se dá através dos princípios de; *i*. exclusão - uso de material de propagação (mudas) sadias na implantação do pomar, *ii*. redução do patógeno - remoção da fonte de inóculo, e *iii*. proteção como foco controle do vetor

(psilídeos) através do uso de inseticidas ou agentes biológicos (Bassanezi et al., 2020).

Estudos de monitoramento da população bacteriana por PCR quantitativo (qPCR) possibilitaram constatar resposta diferencial em relação à multiplicação de CLas em genótipos de citros e gêneros afins (Machado et al., 2010). De acordo com Boscariol-Camargo et al. (2010), apesar da multiplicação da bactéria estar presente entre as espécies de citros e gêneros próximos, algumas apresentaram baixa multiplicação de CLas, sugerindo assim uma tolerância à bactéria como ocorreu para *Poncirus trifoliata*, lima da Pérsia (*Citrus limettioides*) e *Atalantia missionis*. Análises de quantificação de CLas por meio de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) mostraram valores de C_T ("*threshold cycle"*) obtidos para estes genótipos ao redor de 30,35 indicando um baixo título de CLas comparado aos genótipos susceptíveis, cuja média para o valor de C_T esteve ao redor de 25,42. A estes últimos, os autores também incluíram *Eremolemon coachella*, *Microcitrus* spp, *Micromellum tephrocarpa, Merope* spp., todos pertencentes a gêneros distintos de citros, porém pertencentes a tribo Citreae.

Com o surgimento e expansão do HLB, novas estratégias de produção estão sendo avaliadas para a citricultura. No Brasil, e em outros países produtores de citros afetados pela doença, os porta-enxertos não eram inicialmente parte da discussão relacionada com os estudos de HLB, mas isso tem mudado, sobretudo tendo em conta evidências de que plantas cítricas em diversos porta-enxertos podem diferir na incidência ou na tolerância à doença (Stover et al., 2016). A partir de estudos do programa de melhoramento de porta-enxertos conduzidos no Centro de Citricultura Sylvio Moreira/IAC, alguns citrandarins foram selecionados como potenciais variedades para porta-enxertos, por induzirem boa produtividade à variedade copa, compatibilidade com a variedade copa laranja Pera e tolerância à seca comparável a do limão Cravo (*C. limonia* Tanaka). Os citrandarins selecionados também conferiram à variedade copa laranja Pera diferentes portes de planta, alguns podendo ser considerados como ananicantes, assim como melhor propriedade organoléptica aos frutos (Blumer e Pompeu Junior, 2005; Cristofani-Yaly et al., 2007; Schinor et al., 2013).

Neste contexto, o *P. trifoliata* e seus híbridos têm chamado atenção. Seleções de híbridos de *P. trifoliata* com tangerinas têm apresentado baixa incidência de HLB no campo (Castle et al., 2015). Um estudo identificou o híbrido de trifoliata US-897 (*C. reticulata* × *P. trifoliata*) como tolerante ao HLB (Albrecht e Bowman, 2011). As plantas de US-897 estabelecidas no campo e naturalmente infectadas, bem como as plântulas estabelecidas em estufa e enxertadas com borbulhas infectadas, exibiram um desempenho superior em resposta à infecção por CLas em comparação com genótipos mais suscetíveis. Segundo os autores, provavelmente, a tolerância não está relacionada à menor infestação com psilídeo ou pela menor preferência alimentar dos insetos, mas possivelmente foi conferida por alguma propriedade relacionada ao genitor Trifoliata.

Em um estudo sobre patossistema HLB realizado pelo grupo de melhoramento de citros do Centro de Citricultura Sylvio Moreira (IAC), foram verificadas diferenças na multiplicação de CLas tanto nos genitores quanto na progênie de citrandarins (Marengo, 2009; Boava et al., 2015). De um total de 275 citrandarins enxertados em limão Cravo (*C. limonia* Osbeck) e mantidos em campo sob alta pressão de inóculo, em apenas 14% destes constatou-se a presença de CLas por qPCR (Boava et al., 2015). Pecíolos e folhas de alguns dos genótipos de citrandarins foram examinados por microscopia e análise enzimática. Verificou-se diferença na quantificação de calose e acúmulo de amido como resposta de diferentes genótipos à infecção (Boava et al., 2017). Dessa forma, os resultados indicam que os genótipos reagem diferentemente à infecção pela bactéria. Sendo assim, os híbridos mais promissores, isto é, aqueles que não apresentaram resultados positivos para CLas ou que não acumularam amido nas folhas, estão sendo fonte de estudo para compreender os prováveis mecanismos de defesa relacionados à tolerância do *P. trifoliata*. É desconhecido se tais materiais podem conferir à variedade copa enxertada sobre eles um menor efeito do HLB, porém é uma estratégia a ser somada ao complexo manejo do HLB.

Além da potencialidade de ganhos do manejo do HLB com o uso de porta-enxertos de maior tolerância ou resistência a CLas, o uso destes materiais como interenxertos merece atenção da pesquisa. O interenxerto, ou filtro, consiste no uso de uma terceira cultivar entre o porta-enxerto e a cultivar-copa. A principal função da

interenxertia é evitar qualquer incompatibilidade entre o porta-enxerto e a copa, permitindo o desenvolvimento da planta. O interenxerto também pode reduzir o vigor da parte aérea das plantas. Em citros, esta técnica vem sendo usada mais como uma ferramenta para superar efeitos adversos de incompatibilidade copa/porta-enxerto. Pelo nosso conhecimento, um único trabalho foi publicado usando interenxertia com objetivo de minimizar o efeito do HLB, porém usando interações entre genótipos suscetíveis, *C. aurantium* e *C. aurantifolia* (Shokrollah et al., 2011). Características como aumento na qualidade, precocidade e produção de frutos têm sido observadas usando interenxertia em citros. Bitters et al. (1981a e 1981b), analisaram o efeito da interenxertia em copa de laranja "Valencia" e porta-enxertos de tangerina 'Cleopatra' e citrange 'Troyer', e observaram que filtros de 'Troyer' com 15 cm, resultaram em plantas mais produtivas, enquanto inserções mais altas dos filtros com 30 cm e 40cm resultaram em menores produção, sendo esta característica correlacionada ao interenxerto. Sampaio (1993), realizou um trabalho utilizando interenxerto de *P. trifoliata* a 5, 10 e 20cm de extensão, e variações nas alturas de enxertia (15-25-35 cm) para a combinação laranjeira Valencia sobre Limão-cravo, as variações nas extensões dos filtros e nas alturas de enxertia não afetaram o desenvolvimento e as produções das plantas. A variação entre esses dois trabalhos é explicada pela pequena variação nos tamanhos dos filtros (5-10-20 cm), assim como na altura máxima empregada (Sampaio,1993). Bitters e colaboradores trabalharam em níveis bem superiores, detectando diferença entre os tratamentos.

3. HIPÓTESE E OBJETIVOS

Em estudos prévios, conduzidos sob condições de campo, 250 genótipos foram avaliados quanto ao comportamento em relação ao HLB determinando-se a presença da bactéria através de qPCR. Alguns híbridos se destacaram, pois em nenhuma das três repetições avaliadas foi constatada a presença de CLas nas plantas após 12 anos de experimentação (Boava et al., 2015 e 2017).

Apoiados nas evidências apresentadas por Boava e colaboradores acima, a hipótese deste trabalho é que existem genótipos de citrandarins com resistência a CLas e que esta característica proporciona menor dano ao sistema radicular do porta-

enxerto quando a variedade copa é infectada pela bactéria. Esta hipótese será testada em dois experimentos independentes, descritos nos capítulos 2 e 3.

Portanto, o presente trabalho tem como objetivo desafiar, em condições de casa de vegetação, 14 genótipos de citrandarins que apresentaram informações prévias de resistência a CLas (ausência de multiplicação) obtidas em condições de campo. Um outro objetivo foi avaliar a ocorrência de danos ao sistema radicular de um genótipo de citrandarin estando este como porta-enxerto da variedade copa 'Valência' infectada por CLas. Portanto, dois experimentos foram conduzidos. No experimento I, foi avaliada a colonização da bactéria em citrandarins sobrenxertados em plantas de laranjeira 'Valência' infectadas com CLas. No experimento II, um dos citrandarins pré-selecionados, o TSxPT H222, foi utilizado como porta-enxerto e interenxerto, com dois tamanhos (5 e 30 cm), para a laranjeira 'Valência'. Além de apresentar ausência de infecção natural por CLas (Boava et al., 2015 e 2017) esse híbrido demonstrou características agronômicas de interesse estando sob a variedade Pera, tais como maior resistência à seca, boa produtividade e qualidade da fruta (Cristofani-yaly et al., 2007; Schinor et al., 2013).

4. REFERÊNCIAS

Achor D, Welker S, Ben-Mahmoud S (2020) Dynamics of *Candidatus* Liberibacter asiaticus Movement and Sieve-Pore Plugging in Citrus Sink Cells. **Plant Physiol** 182(2):882-891.

Albrecht U, Bowman KD (2011) Tolerance of the Trifoliate Citrus Hybrid US897 (*Citrus reticulata* Blanco x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) to Huanglongbing. **Scientia Horticulturae** 46:16-22.

Albrecht U, Bowman KD (2012) Transcriptional response of susceptible and tolerant citrus to infection with *Candidatus Liberibacter asiaticus*. **Plant Science** 185–186:118-130.

Alves MN, Lopes SA, Raiol-Junior LL, Wulff NA, Girardi EA, Ollitrault P, Peña L (2021) Resistance to '*Candidatus* Liberibacter asiaticus,' the Huanglongbing Associated Bacterium, in Sexually and/or Graft-Compatible Citrus Relatives. **Frontiers in Plant Science** 11:617-664.

Aritua V, Achor D, Gmitter FG, Albrigo G, Wang N (2013) Transcriptional and Microscopic Analyses of Citrus Stem and Root Responses to *Candidatus* Liberibacter asiaticus Infection. **PLoS ONE** 8:e73742.

Asato FP (2018) **Eficiência da pulverização de inseticida na borda dos talhões no manejo do *huanglonglbing***. Dissertação (Mestrado em Controle de Doenças e Pragas dos Citros) – Fundo de Defesa da Citricultura, Araraquara – SP.

Bassanezi RB, Lopes SA, de Miranda MP, Wulff NA, Volpe HXL, Ayres AJ (2020) Overview of citrus huanglongbing spread and management strategies in Brazil. **Trop. plant pathol** 45:251-264.

Bertaccini A, Duduk B (2009) Phytoplasma and phytoplasma diseases: a review of recent research. **Phytopathologia Mediterranea** 48:355-378.

Bitters WP, Cole DA. McCarty CD (1981a) Effect of height and length of reciprocal interstock insertion on yield and tree size of Valencia oranges. **Proc. Int. Soc. Citriculture** 110-113.

Bitters WP, Cole DA. McCarty CD (1981b) Effect of budding height on yield and tree size of Valencia orange on two rootstocks. **Proc. Int. Soc. Citriculture** 109-110.

Blumer S, Pompeu Júnior J (2005) Avaliação de citrandarins e outros híbridos de trifoliata como porta-enxertos para citros em São Paulo. **Revista Brasileira de Fruticultura** 27: 264-267.

Boava LP, Sagawa CHD, Cristofani-yaly M, Machado MA (2015) Incidence of '*Candidatus* Liberibacter asiaticus infected plants among citrandarins as rootstock and scion under field conditions. **Phytopathology** 105(4):518-524.

Boava LP, Cristofani-yaly M, Machado MA (2017) Physiologic, Anatomic, and Gene Expression Changes in Citrus sunki, *Poncirus trifoliata*, and Their Hybrids After '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' Infection. **Phytopathology** 107(5):590-599.

Boscariol-camargo RL, Cristofani-yaly M, Malosso A, Coletta-filho HD, Machado MA (2010) Evaluation of different citrus genotypes for *Candidatus* Liberibacter asiaticus infection.**Citrus Research & Technology** 31:85-90.

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

Brlansky RH, Dewdney ME, Rogers ME (2010) **Florida citrus pest management guide: *huanglongbing* (citrus *greening*).** Extension Digital Information Source, Department of Food and Resource Economics, University of Florida, Gainesville, FL.

Brodersen C, Narciso C, Reed M, Etxeberria E (2014) Phloem production in huanglongbing-affected citrus trees. **HortScience** 49:59-64.

Castle B, Grosser J, Bowman K, Stover E (2015) Citrus rootstock: What exactly does that mean? Citrus Industry.

CitrusBr (2021) **Incidência de greening alcança maior patamar desde sua identificação no Brasil.** Disponível em: < https://citrusbr.com/noticias/incidencia-de-greening-alcanca-maior-patamar-desde-sua-identificacao-no-brasil/>. Acesso em:outubro de 2021.

Coletta filho HD, Carlos EF (2010) Ferramentas para diagnóstico de *huanglongbing* e detecção de agentes associados: dos sintomas aos ensaios de laboratório. **Citrus Research & Technology** 31(2):129-143.

Conab (2020) **Laranja - Análise Mensal - Abril-Maio/2020**. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuario-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-de-laranja >. Acesso em: outubro de 2021

Cristofani-yaly M, Bastianel M, Faldoni L, Blumer S, Pompeu junior J, Campos TMP, Santos Júnior JA, Machado MA (2007) Seleção de citrandarins (tangerina Sunki vs. *Poncirus trifoliata*) para porta-enxertos de citros. **Laranja** 28:71-79.

Curtolo M, Granato LM, Soratto TAT, Curtolo M, Gazaffi R, Takita MA, Cristofani-Yaly M, Machado MA (2020) Expression quantitative trait loci (Eqtl) mapping for callose synthases in intergeneric hybrids of citrus challenged with the bacteria *candidatus* liberibacter asiaticus. **Genetics and Molecular Biology** 43(2):1-16.

Curtolo M, de Souza Pacheco I, Boava LP, Takita MA, Granato LM, Galdeano DM, de Souza AA, Cristofani-Yaly M, Machado MA (2020) Wide- ranging transcriptomic analysis of *Poncirus trifoliata*, Citrus sunki, Citrus sinensis and contrasting hybrids reveals HLB tolerance mechanisms. **Science Reports**. 10(1):20865.

da Graça JV (1991) Citrus greening disease. **Annu. Rev. Phytopathol** 29:109-136.

Dagulo L, Danyluk MD, Spann TM, Valim FM, Goodrich-schneider R, Sims C, Rouseff R (2010) Chemical Characterization of Orange Juice from Trees Infected with Citrus *Greening (Huanglongbing).* **Journal of Food Science** 75:199-207.

Davis MJ, Mondal SN, Chen H, Rogers ME, Brlansky RH (2008) Co-cultivation of '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' with actinobacteria from citrus with huanglongbing. **Plant Dis**. 92:1547-1550

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** 74:76-83.

Fan J, Chen C, Brlansky RH, Gmitter Jr FG, Li ZG (2010) Changes in carbohydrate metabolism in *Citrus sinensis* infected with "*Candidatus* Liberibacter asiaticus". **Plant Pathology** 59(6) 1037-1043.

Fundecitrus (2021) **Reestimativa da safra de laranja 2020/2021 do cinturão citrícola de São Paulo e triângulo/sudoeste mineiro** Disponível em: <http://fundecitrus.com.br >. Acesso em: outubro de 2021.

Fundecitrus (2021) **Levantamento anual de greening**– Disponível em: <http://fundecitrus.com.br >. Acesso em: outubro de 2021.

Garnier M, Danel N, Bové JM (1984) The greening organism is a Gram negative bacterium. **Proceedings of 9th Conference of International Organization of Citrus Virologists** 115-124.

Gasparoto MCG, Coletta-Filho HD, Bassanezi RB, Lopes SA, Lourenço SA, Amorim L (2012) Influence of temperature on infection and establishment of '*Candidatus* Liberibacter americanus' and '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' in citrus plants. **Plant Pathology** 61:658-664.

Graham JH, Johnson EG, Gottwald TR, Irey MS (2013) Presymptomatic fibrous root decline in citrus trees caused by huanglongbing and potential interaction with Phytophthora spp. **Plant Dis**. 97:1195-1199.

Ha PT, He R, Killiny N, Brown JK, Omsland A, Gang DR, Beyenal H (2019) Host-free biofilm culture of "*Candidatus* Liberibacter asiaticus," the bacterium associated with Huanglongbing. **Biofilm**. 1:100005.

Hijaz F, Killiny N (2014) Collection and chemical composition of phloem sap from *Citrus sinensis* L. Osbeck (sweet orange). **PLoS ONE** 9(7):10183.

Jagoueix S, Bové JM, Garnier M (1996) PCR detection of the two '*Candidatus*' liberobacter species associated with greening disease of citrus. **Molecular and Cellular Probes**. 10:43-50.

Johnson EG, Wu J, Bright DB, Graham JH (2013) Association of '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' root infection, but not phloem plugging with root loss on huanglongbing-affected trees prior to appearance of foliar symptoms. **Plant Pathol**, 63:290-298.

Killiny N (2016) Metabolomic comparative analysis of the phloem sap of curry leaf tree (Bergera koenegii), orange jasmine (Murraya paniculata), and Valencia sweet orange (*Citrus sinensis*) supports their differential responses to Huanglongbing. **Plant Signaling and Behavior** 11(11):1-6.

Kim JS, Sagaram US, Burns JK, Li JL, Wang N (2009) Response of sweet orange (*Citrus sinensis*) to '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' infection: Microscopy and microarray analyses. **Phytopathology** *99*:50-57.

Koh EJ, Zhou L, Williams DS, Park J, Ding N, Duan YP, Kang BH (2012) Callose deposition in the phloem plasmodesmata and inhibition of phloem transport in citrus leaves infected with "*Candidatus* Liberibacter asiaticus". **Protoplasma** 249(3):687-697.

Lopes SA, Bertolini E, Frare GF, Martins EC, Wulff NA, Teixeira DC, Fernandes NG, Cambra M (2009) Grafttransmission efficiencies and multiplication of '*Candidatus* Liberibacter americanus' and 'Ca. Liberibacter asiaticus' in citrus plants. **Phytopathology** 99:301-306.

Machado MA, Locali-fabris EC, Coletta-filho HD (2010) *Candidatus* Liberibacter spp., agentes do *huanglongbing* dos citros. **Citrus Research & Technology.** 31:25- 35.

Mafra V, Martins PK, Francisco CS, Ribeiro-Alves M, Freitas-Astúa J, Machado MA (2013) *Candidatus* Liberibacter americanus induces significant reprogramming of the transcriptome of the susceptible citrus genotype. **BMC genomics**. 14:247.

Marengo S (2009) **Mapeamento genético de tangerina sunki e *Poncirus trifoliata* para resistência ao *huanglongbing (greening*) dos citros**. Dissertação de mestrado (Agricultura Tropical e Subtropical, Área de Concentração em Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia) IAC 86.

Maust BE, Espadas F, Talavera C, Aguilar M, Santamaría JM, Oropeza C (2003) Changes in carbohydrate metabolism in coconut palms infected with the lethal yellowing phytoplasma. **Phytopathology** 93:976-981.

Murray RGE, Schleifer KH (1994) Taxonomic notes: a proposal for recording the properties of putative taxa of procaryotes. **International Journal of Systematic Bacteriology.** 44:174-176.

Nwugo CC, Lin H, Duan Y, Civerolo EL (2013) 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*: 59.

Oren A, Garrity GM, Parker CT, Chuvochina M, Trujillo ME (2020) Lists of names of prokaryotic Candidatus taxa. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol** 1-87.

Oren A, (2021) Nomenclature of prokaryotic 'Candidatus' taxa: establishing order in the current chaos. **New Microbes and New Infections** 44:100932.

Pallen MJ, Telatin A, Oren A (2021) The Next Million Names for Archaea and Bacteria. ***Trends in microbiology*** *29*:289-298.

Pitino M, Allen V, Duan Y (2018) Las15315 Effector Induces Extreme Starch Accumulation and Chlorosis as *Ca*. Liberibacter asiaticus Infection in Nicotiana benthamiana.Front. **Plant Sci** 9:113

Sampaio VR (1993) Efeitos de filtros de *Poncirus trifoliata* e de alturas de enxertia na laranjeira 'Valencia' enxertada em limão 'Cravo'. **Scientia Agricola**. 5(3):360-364.

Schinor EH, Cristofani-yaly M, Bastianel M, Machado MA (2013) Sunki Mandarin vs *Poncirus trifoliata* Hybrids as Rootstocks for Pera Sweet Orange. **Journal of Agricultural Science** 5:190-200.

Shokrollah H, Abdullah TL, Sijam K, Abdullah SNA (2011) Potential use of selected citrus rootstocks and interstocks against HLB disease in Malaysia. **Crop Protection** 30(5):521–525.

Stover E, Inch S, Richardson M, Hall DG (2016) Conventional citrus of some scion/rootstock combinations show field tolerance under severe huanglongbing disease pressure. **HortScience** 51:127–132.

Tatineni S, Sagaram US, Gowda S, Robertson CJ, Dawson WO, Iwanami T, Wang N (2008) In planta distribution of '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' as revealed by polymerase chain reaction (PCR)and real-time PCR. **Phytopathology** 98:592-599.

Tazima ZH, Auler PAM, Neves CSVJ, Yada IFU, Junior RPL (2008) Comportamento de clones de laranja "Valência" na região norte do Paraná. **Rev. Bras. Frutic.** 30:970-974.

Teixeira DC, Danet JL, Eveillard S, Martins EC, Jesus Junior WC, Yamamoto PT, Lopes SA, Bassanezi RB, Ayres AJ, Saillard C, Bové JM (2005) Citrus huanglongbing in São Paulo State, Brazil: PCR detection of the '*Candidatus*' Liberibacter species associated with the disease. **Molecular And Cellular Probes**19**:**173-179.

Valim MF, Killiny N (2017) Occurrence of free fatty acids in the phloem sap of different citrus varieties. **Plant Signaling and Behavior** 12(6):1-3.

Wang N, Pierson EA, Setubal JC, Xu J, Levy JG, Zhang Y, Li J, Rangel LT, Martins J Jr. (2017) The *Candidatus* Liberibacter-Host Interface: Insights into Pathogenesis Mechanisms and Disease Control. Annu **Rev Phytopathol** 55:451-482.

Zheng Y, Kumar N, Gonzalez P, Etxeberria E (2018) Strigolactones restore vegetative and reproductive developments in Huanglongbing (HLB) affected, greenhouse-grown citrus trees by modulating carbohydrate distribution. **Scientia Horticulturae** 237:89–95.

CAPÍTULO 2 - No persistent infection by *Candidatus* Liberibacter asiaticus in citrandarin genotypes exposed to a high titer of the pathogen[1]

Highlights

Decrease of infection rate of *Candidatus* Liberibacter asiaticus in citrandarins

ABSTRACT

Huanglongbing (HLB) is currently one of the most important diseases in citrus plants worldwide. Resistance against its causal agent, *Candidatus* Liberibacter asiaticus (CLas), in commercial *Citrus* species within the subtribe Citrinae is a challenge, even though the multiplication of CLas differs among *Citrus* species. For this paper, we selected 14 citrandarin hybrids obtained from crosses involving the parents Sunki mandarin and *Poncirus trifoliata* and tested them for CLas infection and disease effects. These selected hybrids were considered potentially resistant to CLas, as demonstrated in 12 years of experimentation under natural infection conditions or challenge by grafting infected buds. In the greenhouse, budwoods of these hybrids were top grafted onto the canopy of potted “Valencia” sweet orange plants with high CLas titers. The results obtained showed that all the tested plants could be infected by CLas in a specific period of time, but the hybrid H106 showed complete inhibition of the systemic colonization of CLas bacteria in all analyzed replicates at 360 days after grafting. Additionally, minor accumulation of starch and callose deposition was observed for this hybrid. There was a quantitative response to infection by CLas, including differences in starch and callose accumulation among the different tested citrandarin genotypes.

Keywords: Huanglongbing, citrus rootstock, disease resistance

[1] Este capítulo corresponde ao manuscrito submetido ao periódico Crop Protection (IF 2.57; Qualis A2 - 2021).

1. INTRODUCTION

Huanglongbing (HLB) has been considered one of the most important diseases occurring in citrus plants worldwide, causing severe losses in commercial production wherever the disease occurs (Dagulo et al., 2010). The Gram-negative bacterium *Candidatus* Liberibacter asiaticus (CLas), which is restricted to phloem vessels in the host plant, as well as the vector insect *Diaphorina citri*, is the main pathogen associated with HLB (Bové, 2006). HLB symptoms include leaf chlorosis (mottled) along the leaf blade, small and deformed fruits, fruit drop, aborted seeds and bitter juice (Brlansky et al., 2010). The decline of plants after infection by CLas is attributed to a series of physiological, cellular, and molecular disorders, such as phloem collapse, disintegration of the root system and drastic disruption in the translocation of carbohydrates (Achor et al., 2010). Starch accumulation on leaves and callose deposition in the phloem are well accepted and deleterious physiological effects of CLas infection in susceptible genotypes (Fan et al., 2012; Koh et al., 2012) that negatively affect the carbohydrate distribution for sink tissues such as roots or novel vegetative flushes (Johnson et al., 2013).

The management of HLB comprises the exclusion of pathogens by the use of healthy citrus plants for planting, eradication of inoculum sources by uprooting infected plants and protection by spraying for the vector (Belasque et al., 2010). Even though this strategy is technically well supported, adoption by growers has decreased over time, probably for economic reasons. Integrated strategies have been discussed for the management of HLB, including the use of less susceptible varieties, such as those used as rootstocks (Stover et al., 2016; Munir et al., 2018).

No CLas-resistant commercial citrus genotypes (canopy and rootstocks) have been reported in the literature thus far. However, published works have shown that the multiplication of CLas differs across *Citrus* species belonging to the Citrea tribe (Machado et al., 2010; Alves et al., 2021). *Poncirus trifoliata* and some of its hybrids have been shown to be a possible source of tolerance or resistance to the bacteria (Albrecht and Bowman, 2011; Boava et al., 2017; Curtolo et al., 2020). In addition, some hybrids of *P. trifoliata* used as citrus rootstocks can increase the quality of fruits produced in the canopy by improving the total soluble solids content and contributing

to plant size, thus attracting the attention of several researchers worldwide (Cristofani-Yaly et al., 2007; Pompeu Junior and Blumer, 2014; Liu et al., 2015).

Previous studies conducted by our research group showed differences in the multiplication of CLas in the progeny of citrandarins, hybrids of *P. trifoliata* and Sunki mandarin [*Citrus sunki* (Hayata) hort. ex Tanaka], as well as the parents (Curtolo et al., 2020; Marengo, 2009; Boava et al., 2015). Field experiments in areas with CLas inoculum pressure using 275 citrandarin genotypes grafted as canopies on Rangpur lime (*C. limonia* Osbeck) showed that some genotypes were not infected by the pathogen by natural transmission, as determined by real-time quantitative PCR-qPCR (Boava et al., 2015), where the failure of inoculation by the vectors could not be excluded. Later, some hybrids selected based on the absence of CLas detection were challenged with CLas via infected buds, with very interesting results regarding the absence of any bacteria being detected even 12 months after grafting (Boava et al., 2017; Curtolo et al., 2020). In addition to differences in the infection rate and CLas titer, the authors also showed differences in the accumulation of starch and callose deposition among the genotypes, indicating differential responses of the genotypes to CLas infection. Despite the evidence of resistance against CLas, the transmission of bacteria by grafting vegetative material taken from HLB-diseased plants still varies based on the irregular distribution of bacteria in the HLB-diseased plants used as source plants (Hilf et al., 2016; Lopes et al., 2017).

However, to exclude the possibility of failure of infection as a consequence of the absence of pathogens in the vegetative tissue and to guarantee the presence of CLas in the tested plants, in the present work, 14 citrandarin hybrids were top grafted onto citrus plants with HLB symptoms and a high CLas content. These genotypes were previously selected as resistant to CLas (Boava et al., 2015; Curtolo et al., 2020) based on no detection of the bacteria in the plant. CLas was determined by qPCR in the top grafted genotypes, and plant physiological responses such as starch accumulation and callose deposition were examined during 12 months of experimentation. No complete resistance was observed in the tested plants based on the detection of CLas, but variable tolerance did include a reduction in the percentage of CLas infection to zero in one of the selected hybrids.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Plant material and CLas infection

Fourteen genotypes of citrandarins identified as hybrids (H68, H75, H106, H109, H126, H157, H158, H181, H199, H222, H254, H282, H283 and H303) were selected based on previous information of no natural infection by CLas under 12 years of field experiments (Boava et al., 2015, and 2017). These hybrids plus the parents “Sunki” and *P. trifoliata* were top grafted onto 22 CLas-infected potted "Valencia" plants (Supplementary Fig. 1). These plants were previously infected with CLas and plotted in 30 L vessels containing commercial PlantMax substrate. A minimum of three repetitions of each hybrid and parents were grafted and randomly distributed in the greenhouse. To randomize biological interference, such as the concentration of the bacteria in source plants, as much as possible, each tested plant was not budded twice on the same source plant.

2.2. Sampling and statistical analysis

The presence of CLas and the accumulation of starch in the leaves were carried out at 90, 180, 270 and 360 days after grafting. The statistical analysis was conducted by the Scott–Knott test for comparison of the means at 5% significance using the R package. For the percentage dataset, the arc-sin transformation was applied before the analysis.

2.3. DNA extraction and qPCR analysis

Leaves were collected from the sprouts (hybrids, parents, and source plants), and 200 mg of petiole slices in small pieces were used for DNA extraction. In summary, the petioles were homogenized in plastic tubes containing two tungsten spheres (5 mm in diameter) using the TissueLyser II (Qiagen) programmed for 2 cycles of 1 min at 30 Hz, followed by DNA extraction by a CTAB-based method (Murray and Thompson, 1980). The total DNA was eluted 200 µL of 1/10 TE + RNAse.

The diagnosis and quantification of CLas were performed using real-time quantitative PCR (qPCR) methodology based on the protocol of Li et al. (2006). The

amplifications were performed in duplex using an ABI Prism 7500 Sequence Detection System thermocycler (Applied Biosystem). The reaction contained 6.25 mL of 1X TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystem), 216 nM of each primer and 135 nM of the CLas (HLBp) probe for a total volume of 14 µL. Primers and probes targeting the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene of citrus were used as internal controls, with 270 nM of each primer and 135 nM of the probe (Boava et al., 2015). Finally, 3 µL of total DNA was added per reaction, for a total of 300 ng. The amplification cycle followed the default settings of the equipment: 95 °C for 5 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 30 s and 58 °C for 45 s.

2.4. Determination of the cycle threshold (C_T) for the detection and quantification of *Candidatus* Liberibacter asiaticus.

To determine the threshold C_T value used to infer whether the plants were positive (CLas infection) or negative (no CLas infection), a standard curve for estimating the bacterial titer based on the 16S rDNA content of CLas (Li et al., 2006) was created. The target fragment was amplified by the primer set used in the qPCR and cloned into the recombinant plasmid using the pGEM – T-Easy Vector System (Promega Corporation). The recombinant plasmid containing the partial 16S insert was extracted with the Pure Yield TM Plasmid Miniprep System (Promega) following the manufacturer's instructions, sequenced by the Sanger method, and blasted against the NCBI database (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/) using BLASTn tools to certify the origin of the amplicon. The plasmid DNA was serially diluted 10-fold from 3.0 $x10^9$ to 0.3 molecules (copy number of the 16S rDNA insert)/µL for CLas. The dilutions were used to generate a standard curve according to Wang et al. (2006). The CLas quantification (number of copies [CN] of 16S rDNA per µL) was estimated according to the formula CN = (M x N)/(L x D). In this formula, M = the minimum concentration of nucleic acids detected (g mL-1); N = Avogadro's number; L = the size of the nucleic acids in kpb compared to the total size of the insertion plasmid (3.05); and D = a conversion factor for transforming 1 kb of nucleic acids to Daltons (6.6 $x10^5$). The standard curve obtained shows a linear regression (y = -3.1828x+40.004) with a correlation between the C_T values and copy number (CN) of the 16S rDNA insert from CLas; the correlation

was very high (R^2 = 0.9994) with an efficiency (E) of 1.06, which is very close to the maximum efficiency of E = 1 (100%) (Suppl Fig. S2).

2.5. Extraction and starch quantification

The quantification of starch in the plants was carried out by the enzymatic method by using 10 mg of dry plant material, according to the methodology described by Amaral et al. (2007). Glucose solution (Sigma) was used to determine the standard curve with concentrations of 0.00, 0.25, 0.50, 1.00, 2.00, 3.00, 4.00, and 6.00 µg/mL for each analyzed plate. The regression equation obtained for the concentrations of glucose (X-axis) and absorbance (Y-axis) obtained, as well as the graph, showed a direct correlation between both variables (R^2 = 0.9956 - Suppl. Fig. 3).

2.6. Callose visualization and quantification

The quantification of callose in the tested plants was carried out using a total of 10 cross sections of 0.02 mm thick leaf petioles obtained by an automatic slide microtome (Leica SM2010R). The plant tissues were analyzed according to Zavaliev and Epel (2015) by staining the samples with blue aniline at a concentration of 0.01% in 0.1 M phosphate buffer (pH 9.0). The stained samples were examined using an Olympus BX61 fluorescence microscope at a magnification of 10x, a 355 to 375 nm excitation filter, a 400 nm dichromatic mirror and a 435 to 490 nm emission filter. The quantification of callose levels from fluorescence images (pixel/mm^2) was performed using ImageJ software.

3. RESULTS

3.1. CLas detection and source plants

Based on interpolation of the C_T value and number of copies of CLas 16S rDNA added to the reaction, the minimum amount of the CLas-16S rDNA insert that was reproducibly amplified was equivalent to approximately 90 copies of the 16S rDNA molecule based on the presence of three copies of 16S rDNA in the CLas genome (Kim and Wang, 2009), which was equivalent to C_T = 31.73 +/- 0.75 (Suppl. Table S1). Amplifications using total DNA from negative controls (micrografted citrus plants kept

in a screenhouse) showed C_T values ranging from 33.29 (average of 34.53 +/- 1.24) to undermined. Based on these data, the threshold for considering positive samples (the presence of CLas) was established as below 32 (C_T<32), and samples with C_T > 32 were considered negative (no CLas detection) under the current experimental conditions. In addition, despite the establishment of this parameter, amplifications with a C_T value close to 32 (+/- 1) were redone, and the results were considered reproducible. The significant correlation between the C_T values obtained and the concentration of the 16S rDNA insert of CLas input in the reactions (R^2 = 0.9994) provided an accurate estimation of the amount of CLas in the samples.

All the "Valencia" plants used as the inoculum for CLas (source plants) were already infected by CLas at the time of the top grafting of tested hybrids and parental plants. Based on the C_T values, the “Valencia” plants formed 4 groups that were significantly different with C_T values ranging from 20.5 to 25.5, on average, and a mean of $3.43x10^4$ to $1.63\ x10^6$ copies of 16S rDNA CLas insert/g of tissue during the whole experiment (Fig. 1, Suppl. Fig. S1). In this paper, we assume that the insert copy is the number of bacterial cells, even though three copies of 16S rDNA are known to be present in the CLas genome (Duan et al., 2009).

3.2. Temporal infection of CLas in top grafted citrandarin genotypes

Sprouts of 14 citrandarins previously selected as resistant to CLas infection by natural transmission were top grafted on HLB-diseased plants and temporally analyzed for the presence of CLas. At the first sampling (90 days after grafting), the majority of the 14 hybrids had over 50% of their replicates with C_T values in the range of positive samples. However, in the subsequent sampling periods, there was a decrease in the number of infected replicates for H106, H109, H126, H157, and H222 and the *P. trifoliata* parent. Additionally, no-CLas infected replicate was observed for H106 at 12 months after top grafting (Table 1). Generally, 4 groups of hybrids that were significantly different from each other based on the frequency of CLas-infected replicates were obtained. H106 formed one group with no CLas infected replicates. A second group with a frequency of positive replicates ranging from 25% (H222) to 60% (H68) was composed of H68, H75, H109, H126, H157, H181, H222, H303, and the *P. trifoliata* parent. A third group with 80% CLas infections was formed by H254 and H283,

while a fourth group with 100% infected replicates contained H158, H199, H282 and the "Sunki" mandarin parent (Table 1, Suppl. Table S2).

Table 1. Number of CLas-infected citrandarin hybrids in relation to the total number of plants top grafted onto HLB-diseased "Valencia" plants during a period of one year analyzed by qPCR.

Genotypes	Days after top grafting			
	90	180	270	360
Hybrids				
H68	4/5[1] b	2/5 c	4/5 b	3/5 c
H75	1/4 c	2/4 c	2/4 b	2/4 c
H106	3/4 b	3/4 b	3/4 b	0/4 d
H109	5/6 b	2/6 c	2/6 b	2/6 c
H126	2/3 b	2/3 b	2/3 b	1/3 c
H157	3/3 a	1/3 c	1/3 b	1/3 c
H158	4/4 a	4/4 a	4/4 a	3/3 a
H181	2/3 b	2/3 b	2/3 b	2/3 c
H199	3/3 a	3/3 a	3/3 a	3/3 a
H222	5/5 a	3/5 b	3/5 b	1/4 c
H254	5/6 b	4/6 b	3/5 b	4/5 b
H282	4/4 a	4/4 a	4/4 a	3/3 a
H283	5/6 b	4/6 b	4/6 b	4/5 b
H303	4/6 b	4/6 b	3/6 b	2/4 c
Parents				
Sunki	5/5 a	5/5 a	5/5 a	5/5 a
P. trifoliata	3/6 c	2/6 c	2/5 b	2/5 c

[1]Number of positive hybrids compared to the total number grafted onto HLB-diseased "Valencia". Reductions in the number of analyzed samples in relation to the previous period are due to dead sprouts.

[2]Percentage of infected replicates 12 months after the top grafting buds of tested genotypes onto “Valencia” plants with high severity HLB infection and a high *Candidatus* Liberibacter asiaticus titer.

Means followed by the same letter do not differ from each other. Scott–Knott test for comparison of the means at 5% significance.

Despite the decrease in the number of infected replicates, the concentration of CLas in the positive replicates of the hybrids, based on C_T values, was also similar to the susceptible parental "Sunki", but with significantly lower bacterial concentrations for H109 and H126 (9.95×10^3 and 3.03×10^4 cell/g tissue, respectively) at 360 days after grafting and no detectable CLas for H106 (Table 2). As mentioned before, throughout the experiment, all tested plants were under a constant CLas inoculum source once they were top grafted onto HLB-diseased “Valencia” plants (Fig. 1, Suppl. Fig. S1).

Table 2. C_T values and concentration of *Candidatus* Liberibacter asiaticus in specific hybrids of citrandarins with a decrease in the number of replicates with a positive diagnosis for the bacteria.

Genotypes	Days after top grafting				
	C_T values				[1] CLas cell/g tissue
	90	180	270	360	at 360 dat_g
Hybrids					
H106	25.96 a	26.62 a	25.42 a	40.00 c	0
H109	29.40 a	25.02 a	26.05 a	27.28 a	9.95×10^3
H126	25.39 a	25.15 a	30.13 a	25.74 a	3.03×10^4
H157	27.71 a	23.64 a	24.18 a	23.10 b	2.05×10^5
H222	27.15 a	25.98 a	24.31 a	24.93 b	5.45×10^4
Parents					
Sunki	27.50 a	25.50 a	24.02 a	23.93 b	1.12×10^5
P. trifoliata	28.93 a	25.69 a	26.31 a	29.99 a	1.40×10^3

[1]*Candidatus* Liberibacter asiaticus cells/g in the tissue of tested plants at 360 days after top grafting.

Means followed by the same letter do not differ from each other. Scott–Knott test for comparison of the means at 5% significance.

3.3. Host response of citrandarins to CLas infection based on starch accumulation and callose deposition

The overall starch quantification in infected plants over a 12-month experimental period was significantly higher in both Sunki mandarin and in H282 (80 and 60 mg

glucose/g of tissue, respectively). In general, for the other 13 tested citrandarins and *P. trifoliata,* the starch content was not significantly different, with starch accumulation ranged from 2.5 times to 5 times less than that present in Sunki mandarin (Fig. 2A). Hybrids with a high frequency of infection, such as H181, or with no infection (H106) after 12 months accumulated similar amounts of starch. Based on the frequency of infection and starch accumulation, some hybrids were selected for the determination of callose deposition in comparison with the parents (Fig. 2B). The parent *P. trifoliata* showed significantly less callose deposition in the petiole, followed by H106. Hybrids with a high frequency of CLas positivity, such as H199 and H282, or a lower frequency of positivity, such as H157, showed similar callose values that were significantly lower than those observed for Sunki mandarin, the susceptible genotype (Fig. 2B).

4. DISCUSSION

There is still no effective method to control CLas and consequently HLB disease. The current strategy of HLB management is based on planting disease-free plants, controlling the vector (psyllids) using insecticides or biological agents, and removing inoculum sources (infected trees) (Albrecht and Bowman, 2011 and 2012; Bassanezi et al., 2020). Management of CLas is carried out due to the lack of long-living resistant cultivars or, as mentioned before, the lack of an effective cure for HLB (Alves et al., 2021). However, strategies aiming to reduce the infection or increase the plant response against the disease by supplying antimicrobial molecules based on plant metabolites, nutrients, and soil-applied biostimulators (Canales et al., 2016; Pitino et al., 2020; Castellano-Hinojosa et al., 2021; Bassanezi et al., 2021) have shown variable beneficial results. Most of those works used commercial scion rootstock combinations with known susceptibility to CLas infection and HLB symptoms.

The citrus genotype response to CLas infection by grafting bacteria-infected buds has been shown to be variable, ranging from sensitive (*C. sinensis*, *C. reticulata*, *C. paradise, C. maxima,* and *C. aurantifolia*) to tolerant (*P. trifoliata*) (Folimonova et al., 2009; Boscariol-Camargo et al., 2010). For citrus relatives such as *Microcitrus* spp. and *Eremocitrus* spp., variable or inconsistent results regarding CLas resistance tested by budding infection were also shown (Boscariol-Camargo et al., 2010; Ramadugu et al., 2016; Alves et al., 2021). Recently published papers reported that *P. trifoliata* and

some hybrids not only showed differential responses against CLas colonization and better performance in HLB symptom expression, such as leaf blotching symptoms and starch and callose deposition, but also found that no immunity was observed for these genotypes (Albrecht and Bowman, 2011 and 2012; Boava et al., 2015 and 2017; Bowman et al., 2016). On the other hand, *P. trifoliata* and its hybrids are genetically closer to cultivated citrus species than *Microcitrus* or *Eremocitrus* (Nicolosi et al., 2000) and are regularly used as commercial rootstocks.

In the present work, 14 citrandarin genotypes previously selected as having potential resistance against CLas according to Boava et al. (2015) and Curtolo et al. (2020), but different from the genotypes tested by Boava et al. (2017), were challenged with CLas infection. Buds of the genotypes were top grafted onto Valencia plants with high HLB severity (Fig. 1, Suppl. Fig. S1) and the presence and concentration of bacteria, as well as the starch and callose content, was analyzed over 12 months. As previously reported, no immunity was observed for these genotypes, but a differential response to CLas infection throughout a period of 12 months was evident (Tables 1 and 2). Regarding starch accumulation and callose content, little variation among the hybrids was observed (Fig. 2), probably as a consequence of the heritability of these characteristics from the *P. trifoliata* parent (Boava et al., 2017). Interestingly, the frequency of CLas-positive replicates for some hybrids (H109, H126, H157, and H222) dropped over time, and zero infection was reached by H106 after 12 months of analysis, which agreed with information from Curtolo et al. (2020) that showed that this hybrid was not infected by CLas. However, unlike Curtolo and coworkers (2020), in the present work, H68 was able to be infected by CLas (Table 1), which can be explained by the different methodologies used for challenging the tested plants with the pathogen. Failure to transmit vascular pathogens such as CLas by grafting transmission methodology could be explained by the irregular distribution of pathogens in the host tissue used as a bacterial source (Lopes et al., 2008). We believe that the experimental setup used here minimizes these failures by making a constant flux of CLas from the Valencia source plants available to the tested plants (Fig. 1, Suppl. Fig. S1); this method supports the high performance of citrandarin H106 against CLas found by Curtolo et al. (2020) and in the present work (Tables 1 and 2).

Explaining the probable mechanism of resistance of some *P. trifoliata*-related genotypes to CLas is still in the early stages. Genes related to bacterial cell lysis, such as *endocytinase B,* were upregulated in the pool of CLas-resistant citrandarins by Curtolo et al. (2020); however, they could be related to the decrease in infection of CLas in citrandarin genotypes such as H109, H126, H157, and H222, including H106. Endocytinases in plants act as pathogenesis-related proteins that are synthesized in response to self-defense against phytopathogenic attack and participate in vital physiological processes of plants, such as embryogenesis and ethylene formation, as well as the response to abiotic stress (Ratore and Gupta, 2015). Additionally, purification of the substrate from the recombinant chitinase *chiS* suggested the presence of lysozyme activity with the capacity to degrade the peptidoglycan component of the cell walls of gram-negative bacteria such as *Xanthomonas*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas* (Ghasemi et al., 2011). Even for the highly studied citrus tristeza virus (CTV) pathosystem in *P. trifoliata*, the molecular mechanism involved in genetic resistance to phloem-limited CTV pathogens (Gmitter et al., 1996) is still unknown. In disagreement with the immunity concept of *P. trifoliata*-CTV resistance, Albiach-Marti et al. (2004) showed that the resistance mechanism affected the virus subsequent to its replication and assembly, i.e., after the host-cell infection. Evidence based on differentially expressed transcripts in *P. trifoliata* that were later infected by CTV suggests a secondary plant response to CTV infection (Cristofani-Yaly et al., 2007).

Starch accumulation in leaves and callose deposition in phloem are positively associated with host susceptibility to CLas (Boava et al., 2017; Curtolo et al., 2020). In the present work, except for the CLas-susceptible parent Sunki and the hybrid H282, there was no clear correlation among callose deposition, starch content and the frequency of CLas-infected citrandarin genotypes. However, the absence of no-infected treatments makes difficult any deeper comparison regarding the starch accumulation. Because the genotypes tested here were previously selected based on their tolerance to CLas (Boava et al., 2015; Curtolo et al., 2020), the characteristics of resistance derived from *P. trifoliata* could segregate in the analyzed hybrids.

The use of more tolerant or resistant rootstock is a well-accepted management strategy against HLB. In this work, we challenged some previously selected CLas-

resistant citrandarins using a strategy based on top grafting buds onto CLas source plants with the goal of optimizing bacterial infection. Even though CLas was detected in all tested hybrids, which suggests a lack of resistance, the data obtained here reinforce the evidence of differential tolerance to CLas, as well as the previous findings by Curtolo et al. (2020) suggesting higher tolerance of citrandarin H106 to CLas. The origin of the characteristics involved in tolerance to CLas in this genotype, even under drastic infection conditions, must be better understood for use in genetic breeding programs aiming at resistance against HLB.

Credit authorship contribution statement

Cavichioli T: Methodology, Investigation, Writing original draft; **Maiara Curtolo**: Formal analysis and Editing; **Mariangela C.-Yaly:** Review and Conceptualization; **Josiane Rodrigues:** Statistical analysis and review and **Helvécio D. Coletta-Filho:** Conceptualization, Writing original draft, Review and editing.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Luis Fernando Carvalho Silva, Derik Festa and Franciel Santos Barbosa for their assistance with the plants grown in the greenhouse.

Funding

This work was financed by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) according to project number 2020/07045-3. T.M. Cavichioli and M. Curtulo received a fellowship from FAPESP (2019/06412-5 and 21/03989-0, respectively). H.D.C.F. and M.C.Y. are recipients of research fellowships from CNPq (proc. no. 313676/2017-8 and 313295/2020-4).

Conflict of competing interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

REFERENCES

D.S. Achor, E. Exteberria, N. Wang, S.Y. Folimonova, K.R. Chung, L.G. Albrigo **Sequence of anatomical symptom observations in citrus affected with huanglongbing diasease**. Plant Pathol. J., 9 (2010), pp. 56-64. DOI: 10.3923 / ppj.2010.56.64.

M.R. Albiach-Marti, J.W. Grosser, S. Gowda, M. Mawassi, T. Satyanarayna, S. M. Garnsey, W.O. Dawson ***Citrus tristeza virus*** **replicates and forms infectious virions in protoplasts of resistant citrus relatives**. Molecular Breeding, 14 (2004)**,** pp. 117–128. DOI: 10.1023/B:MOLB.0000038000.51218.a7

U.Albrecht, K.D. Bowman **Tolerance of the Trifoliate Citrus Hybrid US-897 (*Citrus reticulata* Blanco X *Poncirus trifoliata* L. Raf.) to *Huanglongbing*.** HortScience., 46 (2011), pp. 16-22. DOI: 10.21273/HORTSCI.46.1.16

U. Albrecht, K. D. Bowman **Transcriptional response of susceptible and tolerant citrus to infection with *Candidatus* Liberibacter asiaticus**. Plant Science., 185-186 (2012), pp. 118-130. DOI: 10.1016/j.plantsci.2011.09.008

M.N. Alves, S.A. Lopes, L.L. Raiol-Junior, N.A. Wulff, E.A. Girardi, P. Ollitrault, L. Peña **Resistance to '*Candidatus* Liberibacter asiaticus,' the *Huanglongbing* Associated Bacterium, in Sexually and/or Graft-Compatible *Citrus* Relatives.** Front. Plant Sci., 11 (2021) 617-664. DOI: 10.3389/fpls.2020.617664

L.I.V. Amaral, M. Gaspar, P.M.F. Costa, M.P.M. Aidar, M.S. Buckeridge **New rapid and sensitive enzymatic method for extraction and quantification of starch in plant materials.** Hoehnea., 34 (2007), pp. 425-431. DOI: 10.1590/S2236-89062007000400001

R.B. Bassanezi, S.A. Lopes, M.P. de Miranda, N.A. Wulff, H.X.L. Volpe, A.J Ayres **Overview of citrus huanglongbing spread and management strategies in Brazil.** Trop. plant pathol., 45 (2020), pp. 251–264. DOI: 10.1007/s40858-020-00343-y

J. Belasque Jr, R.B. Bassanezi, P.T. Yamamoto, A.J. Ayres, A. Tachibana, A.R. Violante, A. Tank Jr, F. Di Giorgi, F.E.A. Tersi, G.M. Menezes, J. Dragone, R.H. Jank Jr, J.M. Bové **Lessons from *Huanglongbing* management in São Paulo state, Brazil.** Journal of Plant Pathology., 92 (2010), pp. 285-302. DOI: 10.4454/jpp.v92i2.171

L.P. Boava, C.H.D. Sagawa, M. Cristofani-yaly, M.A. Machado **Incidence of `*Candidatus* Liberibacter asiaticus infected plants among citrandarins as rootstock and scion under field conditions.** Phytopathology., 105 (2015), pp. 518-524. DOI: 10.1094/PHYTO-08-14-0211-R

L.P. Boava, M. Cristofani-yaly, M.A. Machado **Physiologic, Anatomic, and Gene Expression Changes in Citrus sunki, Poncirus trifoliata, and Their Hybrids After 'Candidatus Liberibacter asiaticus' Infection.** Phytopathology., 107 (2017), pp. 590-599. DOI: 10.1094/PHYTO-02-16-0077-R

R.L. Boscariol-Camargo, M. Cristofani-yaly, A. Malosso, H.D. Coletta-Filho, M.A. Machado **Evaluation of different citrus genotypes for *Candidatus* Liberibacter asiaticus infection.** Citrus Research & Technology., 31 (2010), pp. 85-90. DOI: 10.5935/2236-3122.20100008

J.M. Bové ***Huanglongbing*: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus.** J. Plant Pathol., 88 (2006), pp. 7–37. DOI: 10.4454/jpp.v88i1.828

K.D. Bowman, G. Mccollum, U. Albrecht **Performance of 'Valencia' orange (Citrus sinensis [L.] Osbeck) on 17 rootstocks in a trial severely affected by huanglongbing.** Scientia Horticulturae., 201 (2016), pp. 355-361. DOI: 10.1016/j.scienta.2016.01.019

R.H. Brlansky, M.M. Dewdney, M.E. Rogers **Florida citrus pest management guide: *huanglongbing* (citrus *greening*).** Extension Digital Information Source, Department of Food and Resource Economics, University of Florida, Gainesville, FL., 225. (2010).

E. Canales, Y. Coll, I. Hernández, R. Portieles, M.R. García, Y. López, M. Aranguren, E. Alonso, R. Delgado, M. Luis, L. Batista, C. Paredes, M. Rodríguez, M. Pujol, M.E. Ochagavia, V. Falcón, R. Terauchi, H. Matsumura, C. Ayra-Pardo, R. Llauger, M.C. Pérez, M. Núñez, M.S. Borrusch, J.D. Walton, Y. Silva, E. Pimentel, C. Borroto, O. Borrás-Hidalgo **'Candidatus Liberibacter asiaticus', Causal Agent of Citrus Huanglongbing, Is Reduced by Treatment with Brassinosteroids.** PLoS ONE., 11 (2016), e0146223. DOI: 10.1371/journal.pone.0146223

A. Castellano-Hinojosa, B. Meyering, A. Nuzzo, S.L. Strauss, U. Albrecht **Effect of plant biostimulants on root and plant health and the rhizosphere microbiome of citrus trees in huanglongbing-endemic conditions.** Trees., 35 (2021), pp. 1525-1539. DOI: 10.1007/s00468-021-02133-8

M. Cristofani-yaly, M. Bastianel, L. Faldoni, S. Blumer, J. Pompeu Junior, T.M.P. Campos, J.A. Santos Júnior, M.A. Machado **Seleção de citrandarins (tangerina Sunki vs. *Poncirus trifoliata*) para porta-enxertos de citros.** Laranja., 28 (2007), pp.71-79.

M. Curtolo, I. de Souza Pacheco, L.P. Boava, M.A. Takita, L.M. Granato, D.M. Galdeano, A.A. de Souza, M. Cristofani-Yaly, M.A. Machado **Wide-ranging transcriptomic analysis of *Poncirus trifoliata*, *Citrus sunki, Citrus sinensis* and contrasting hybrids reveals HLB tolerance mechanisms.** Science Reports*.,* 10 (2020), pp. 20865. DOI: 10.1038/s41598-020-77840-2

M. Curtolo, L.M. Granato, T.A.T. Soratto, M. Curtolo, R. Gazaffi, M.A. Takita, M. Cristofani-Yaly, M.A. Machado **Expression Quantitative Trait Loci (eQTL) mapping for callose synthases in intergeneric hybrids of Citrus challenged with the bacteria *Candidatus* Liberibacter asiaticus.** Genetics And Molecular Biology., 43 (2020), e20190133. DOI: 10.1590/1678-4685-GMB-2019-0133

L. Dagulo, M.D. Danyluk, T.M. Spann, F.M. Valim, R. Goodrich-schneider, C. Sims, R. Rouseff **Chemical Characterization of Orange Juice from Trees Infected with Citrus *Greening (Huanglongbing).*** Journal of Food Science., 75 (2010), pp. 199-207. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2009.01495.x

Y. Duan, L. Zhou, D.G. Hall, W. Li, H. Doddapaneni, H. Lin, L. Liu, C.M. Vahling, D.W. Gabriel, K.P. Williams, A. Dickerman, Y. Sun, T. Gottwald. **Complete Genome Sequence of Citrus Huanglongbing Bacterium, 'Candidatus Liberibacter asiaticus' Obtained Through Metagenomics.** E-Xtra., 22 (2009), pp. 1011-1020. DOI: 10.1094/MPMI-22-8-1011

J. Fan, C. Chen, Q. Yu, A. Khalaf, D.S. Achor, R.H. Brlansky, G.A. Moore, Z.G. Li, F.G. Gmitter **Comparative transcriptional and anatomical analyses of tolerant rough lemon and susceptible sweet orange in response to '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' infection**. Molecular plant-microbe interactions., 25 (2012), pp. 1396–1407. DOI: 10.1094/MPMI-06-12-0150-R

S.Y. Folimonova, C.J. Robertson, S.M. Garnsey, S. Gowda, W.O. Dawson **Examination of the responses of different genotypes of citrus to *huanglongbing* (Citrs Greening) under different conditions.** Phytopathology*.,* 99 (2009), pp. 1346-1354. DOI: 10.1094/PHYTO-99-12-1346

S. Ghasemi, G. Ahmadian, M. Sadeghi, D.R. Zeigler, H. Rahimian, S. Ghandili, N. Naghibzadeh, A. Dehestani **First report of a bifunctional chitinase/lysozyme produced by *Bacillus pumilus* SG2.** Enzyme and Microbial Technology., 48 (2011), pp. 225-231. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2010.11.001

F.G. Gmitter Jr, S.Y. Xiao, S. Huang, X.L. Hu, S.M. Garnsey, Z. Deng **A localized linkage map of the citrus tristeza virus resistance gene region.** Theoretical And Applied Genetics., 92 (1996), pp. 688-695. DOI: 10.1007/BF00226090

M.E. Hilf, R.S. Lewis **Transmission and propagation of Candidatus Liberibacter asiaticus bt grafting with individual citrus leaves.** Phytopathology., 106 (2016), pp. 452-458. DOI: 10.1094/PHYTO-09-15-0221-R

E.G. Johnson, J. Wu, D.B. Bright, J.H. Graham **Association of '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' root infection, but not phloem plugging with root loss on huanglongbing-affected trees prior to appearance of foliar symptoms.** Plant Pathol., 63 (2013), pp. 290-298. DOI: 10.1111/ppa.12109

Js. Kim, N. Wang **Characterization of copy number of 16S rDNA and 16S rRNA of *Candidatus* Liberibacter asiaticus and the implication in detecção *in planta* using quantitativo PCR.** BMC Res Notes., 2:37 (2009), pp. 1-4. DOI: 10.1186/1756-0500-2-37

E.J. Koh, L. Zhou, D.S. Williams, J. Park, N. Ding, Y.P. Duan, B.H. Kang **Callose deposition in the phloem plasmodesmata and inhibition of phloem transport in citrus leaves infected with "*Candidatus* Liberibacter asiaticus"**. Protoplasma., 249 (2012), pp. 687–697. DOI: 10.1007/s00709-011-0312-3

W. Li, J.S. Hartung, L. Levy **Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus* Liberibacter species associated with citrus *huanglongbing*.** J. Microbiol. Methods., 66 (2006), pp. 104-115. DOI: 10.1016/j.mimet.2005.10.018

X. Liu, J. Li, M. Huang, J. Chen **Mechanisms for the Influence of Citrus Rootstocks on Fruit Size.** Journal Of Agricultural And Food Chemistry., 63 (2015), pp. 2618-2627. DOI: 10.1021/jf505843n

S.A. Lopes, F.Q.B.F. Luiz, H.T. Oliveira, J.C. Cifuentes-Arenas, L.L. Raiol-Junior **Seasonal Variation of 'Candidatus Liberibacter asiaticus' Titers in New Shoots of Citrus in Distinct Environments.** Plant Disease., 10 (2017), pp. 583-590. DOI: 10.1094/PDIS-06-16-0859-RE

S.A. Lopes, R.B. Bassanezi, J.(Jr.) Belasque, P.T. Yamamoto ***Manejo da Citrus Huanglongbing no Estado de São Paulo-Brasil*.** Centro de Tecnologia de Alimentos e Fertilizantes. (2008).

M.A. Machado, E.C. Locali-fabris, H.D. Coletta-filho ***Candidatus* Liberibacter spp., agentes do *huanglongbing* dos citros.** Citrus Research & Technology., 31 (2010), pp. 25- 35.

S. Marengo **Mapeamento genético de tangerina sunki e *Poncirus trifoliata* para resistência ao *huanglongbing (greening*) dos citros.** *Dissertação de mestrado, Agricultura Tropical e Subtropical, Área de Concentração em Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia, IAC*, (2009) 86.

S. Munir, P. He, Y. Wu, P. He, S. Khan, M. Huang, W. Cui, P. He, Y. He ***Huanglongbing* Control: perhaps the end of the beginning.** Microbial Ecology., 76 (2018) pp. 192-204. DOI: 10.1007/s00248-017-1123-7

M.G. Murray, W.F. Thompson **Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA.** Nucleic Acids Research., 8 (1980), pp. 4321–4325. DOI: 10.1093/nar/8.19.4321

E. Nicolosi, Z.N. Deng, A. Gentile, S. La Malfa, G. Continella, E. Tribulato **Citrus phylogenyand genetic origin of important species as investigated by molecular markers.** Theoretical and AppliedGenetics., 100 (2000), pp. 1155–1166. DOI: 10.1007/s001220051419

M. Pitino, K. Sturgeon, C. Dorado, L.M. Cano, J.A. Manthey, R.G. Shatters Jr, L. Rossi **Quercus leaf extracts display curative effects against Candidatus Liberibacter asiaticus that restore leaf physiological parameters in HLB-affected citrus trees**. Plant Physiology and Biochemistry.,148 (2020), pp. 70-79. DOI: 10.1016/j.plaphy.2020.01.013

J. Pompeu Junior, S. Blumer **Híbridos de trifoliata como porta-enxertos para laranjeira Pêra.** Pesq. Agropec. Trop., 44 (2014), pp. 9-14.

C. Ramadugu, M.L. Keremane, S.E. Halbert, Y.P. Duan, M.L. Roose, E. Stover, R.F. Lee **Long-Term Field Evaluation Reveals Huanglongbing Resistance in Citrus Relatives.** Plant Dis., 100 (2016), pp. 1858-1869. DOI: 10.1094/PDIS-03-16-0271-RE

A.S. Rathore, R.D. **Gupta Chitinases from Bacteria to Human: Properties, Applications, and Future Perspectives.** Enzyme Research., (2015).1-8. DOI: 10.1155/2015/791907

E. Stover, S. Inch, M. Richardson, D.G. Hall **Conventional citrus of some scion/rootstock combinations show field tolerance under severe *huanglongbing* disease pressure.** HortScience., 51 (2016), pp. 127–132. DOI: 10.21273/HORTSCI.51.2.127

Z. Wang, Y. Yin, H. Hu, Q. Yuan, G. Peng, Y. Xia **Development and application of molecular-based diagnosis for „*Candidatus* Liberibacter asiaticus", the causal pathogen of citrus *huanglongbing*.** Plant Pathol., 55 (2006), pp. 630-638. DOI: 10.1111/j.1365-3059.2006.01438.x

R. Zavaliev, B.L. Epel **Imaging Callose at Plasmodesmata Using Aniline Blue: Quantitative Confocal Microscopy.** Methods in molecular biology., 1217 (2015), pp. 105-119. DOI: 10.1007/978-1-4939-1523-1_7

Figures

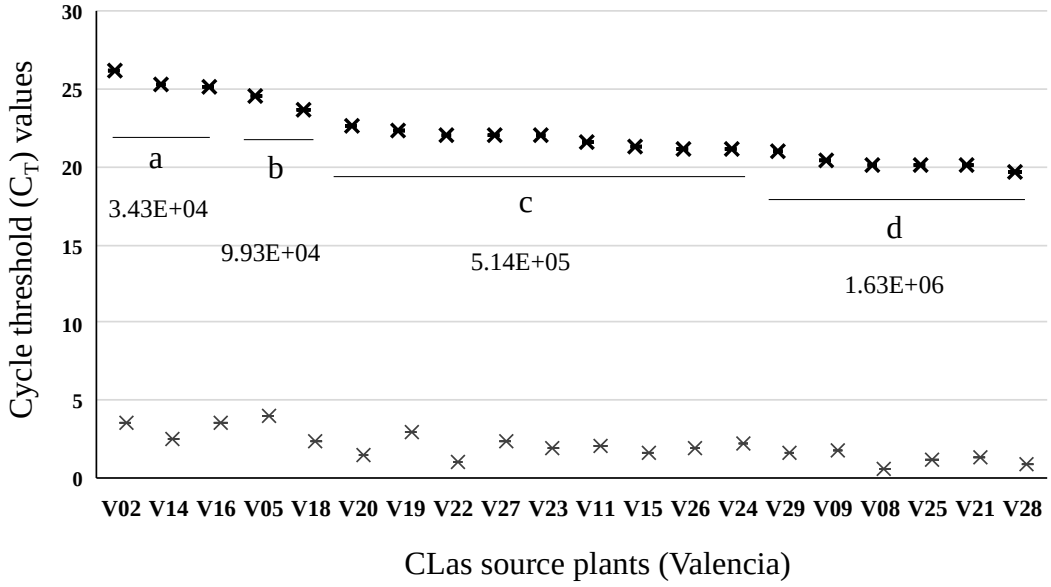


Fig. 1. *Candidatus* Liberibacter asiaticus concentration in “Valencia” sweet orange plants used as the source of bacteria for the top grafted citrandarins and parental genotypes. Mean C_T values for each plant during the whole experiment are represented by bolded asterisks. Nonbolded asterisks are the standard deviations of four measures (90, 180, 270 and 360 days). Numbers indicate the average CLas population per gram of tissue for each group of plants with similar concentrations of bacteria based on C_T values. Letters indicate C_T values that are significantly different (*P<0.05*) based on the Scott–Knott test.

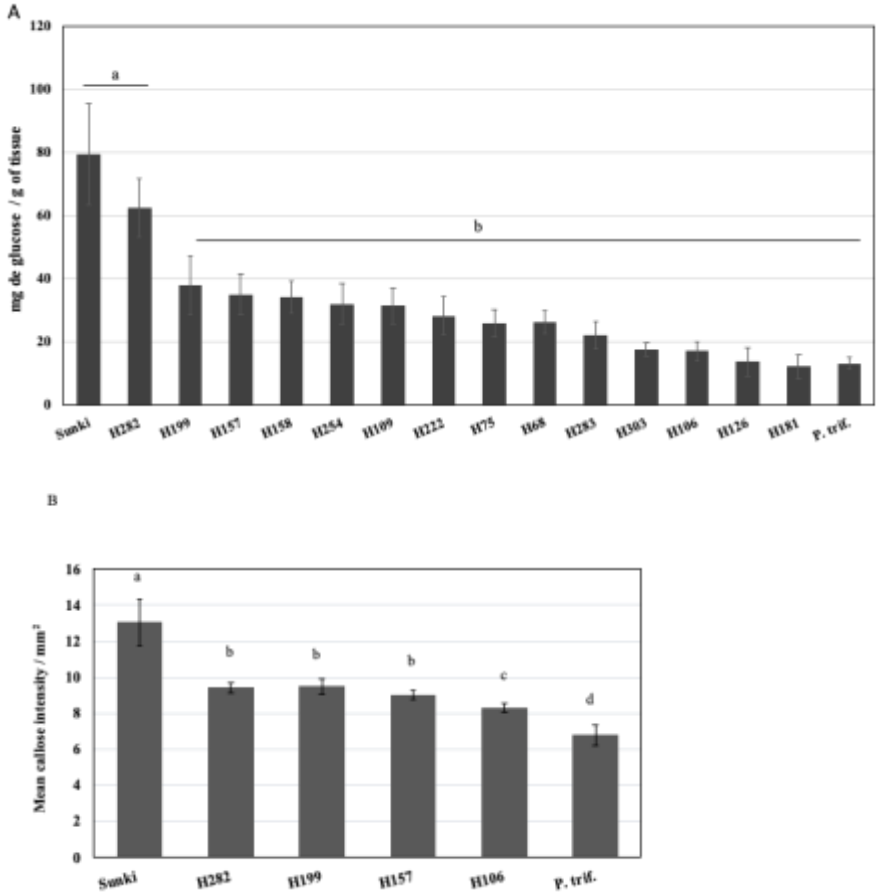


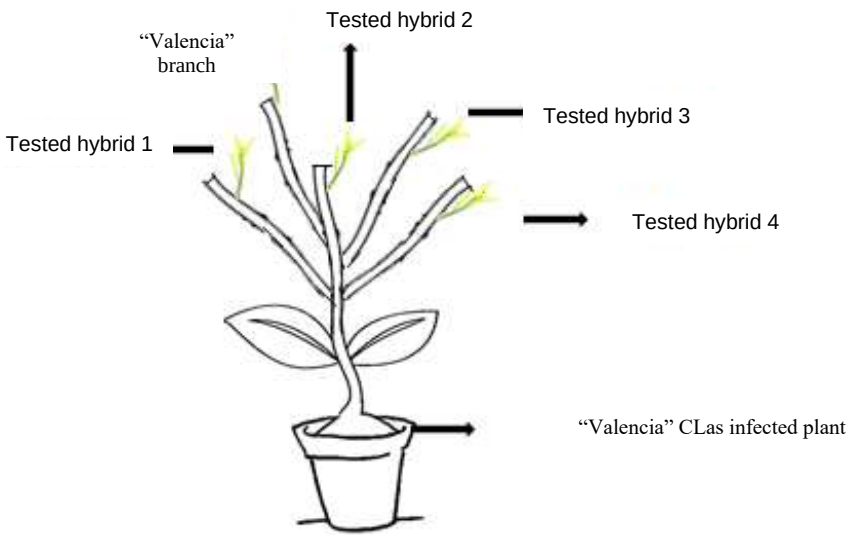
Fig. 2. Response of selected citrandarins and their parental species *C. sunki* and *Poncirus trifoliata* to CLas infection. (a). Starch content as determined by enzymatic quantification of leaf blades. Vertical bars represent standard deviations of replicates for each genotype across sampling dates. (b). Callose quantification in leaf petioles of some selected genotypes. Vertical bars represent standard deviations of 10 cross sections for each genotype sampled 12 months after top grafting. Different letters indicate significantly different values ($P<0.05$) based on the Scott–Knott test.

Supplementary Material

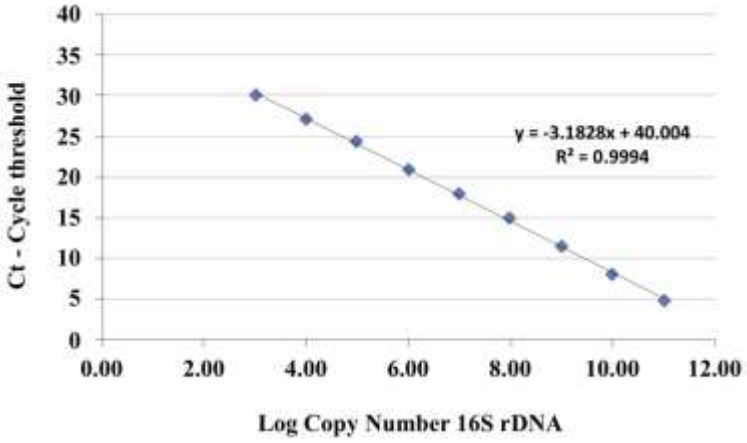
Suppl. TABLE S1. Cycle threshold (C_T) values obtained by qPCR in relation to *Candidatus* Liberibacter asiaticus 16S-rDNA plasmid copy number and the total DNA of negative controls.

Plasmid copy number	Log plasmid copy number	Cycle threshold (C_T values)[a]	SD[b]
3.00E+09	9.48	8.98	0.25
3.00E+08	8.48	8.06	0.41
3.00E+07	7.48	11.50	0.24
3.00E+06	6.48	14.87	0.13
3.00E+05	5.48	17.82	0.27
3.00E+04	4.48	20.87	0.20
3.00E+03	3.48	24.35	0.48
3.00E+02	2.48	27.14	0.19
3.00E+01	1.48	31.73	0.75
3.00	0.48	34.02	0.62
0.30	-0.52	35.53	0.20
Range of C_T values for the negative control[c] - from 33.29 to undetermin			

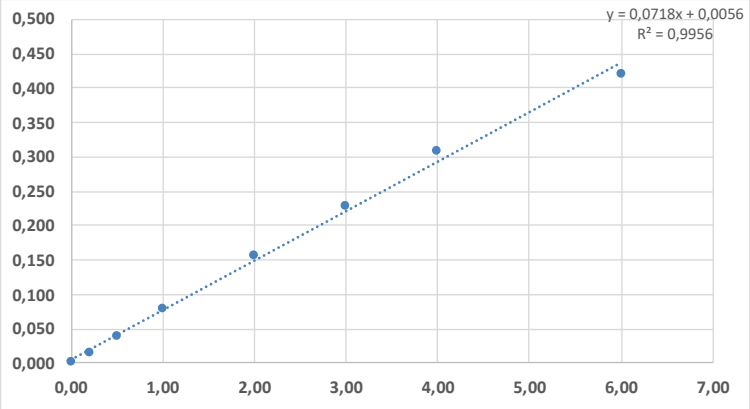
[a]Each value is the mean of three replicates.
[b]Standard deviation
[c]Micrografted plants grown in a greenhouse. A total of 44 DNA extractions and qPCRs from eight different plants are shown.



Supplementary Fig. 1. Ilustration of the experiments set up to test hybrids top grafted onto *Candidatus* Liberibacter asiaticus-infected "Valencia" plants. The numbers (1, 2, 3 and 4) represent different citrandarin genotypes or parents.



Supplementary Fig. S2. Regression equation obtained for the C_T value (Y-axis) and copy numbers of the plasmid containing the 16S rDNA insert of *Candidatus* Liberibacter asiaticus (X-axis).



Supplementary Fig. S3. Regression equations were obtained for the glucose and absorbance values obtained.

CAPÍTULO 3 – Respostas de laranja ‘Valência’ infectadas com CLas sobre o citrandarin H222 utilizado como porta enxerto e interenxerto

Resumo - A muda comercial de planta de citros é composta pela união, por meio do processo de enxertia, do tecido vegetal da variedade copa com o tecido vegetal da variedade porta-enxerto. Alternativamente, entre ambos, pode ser utilizado também um interenxerto, normalmente com função de resolver problemas de incompatibilidade entre a copa e o porta-enxerto. O uso do *Poncirus trifoliata* e alguns híbridos como porta-enxerto em citros vem de longa data. No entanto, recentemente tem-se mostrado que estes genótipos permitem uma menor capacidade de multiplicação de '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' (CLas) assim como menores efeitos da sintomatologia da doença, o *huanglongbing* (HLB), podendo ser uma ferramenta interessante na mitigação da doença. Nesse sentido, este trabalho teve como objetivo estudar a contribuição do citrandarin H222, pré-selecionado em função da maior tolerância a CLas, quando usado como porta-enxerto e interenxerto para a laranjeira ‘Valência’ infectada com CLas. Os tratamentos foram assim realizados; *i*. citrandarin H222 como porta-enxerto; *ii*. citrandarin H222 como interenxerto (5 e 30 cm de comprimento) entre a copa de laranja ‘Valência’ e porta-enxerto de citrumelo Swingle; *iii*. citrumelo Swingle como porta-enxerto. As inoculações de CLas foram realizadas na copa das plantas teste. Foram avaliados, além da quantificação de CLas, o volume, diâmetro, peso seco e úmido do sistema radicular. Os resultados evidenciam um aumento da concentração de CLas nas plantas dos tratamentos com o interenxerto, de 30cm e 5cm, tanto na copa como no sistema radicular. Já o citrandarin H222 como porta-enxerto apresentou valores negativos à infecção por CLas no sistema radicular em três das quatro repetições. Além disso, análise Ward considerando as variáveis médias de diâmetro do caule acima do solo, volume, peso das raízes e taxa de infecção por CLas analisadas conjuntamente, quando comparadas com as obtidas dos tratamentos não inoculados, possibilitou o agrupamento do H222 no mesmo grupo dos resultados obtidos para as plantas não inoculadas. As plantas inoculadas tendo o citrumelo Swingle como porta-enxerto assim como as com os interenxertos do H222 com 5 e 30 cm agruparam-se em um outro cluster. O porta-enxerto H222 apresentou desempenho superior ao do citrumelo Swingle quanto ao desenvolvimento do sistema radicular, podendo ser inclusive comparado ao desenvolvimento do sistema radicular das plantas não inoculadas. Os interenxertos com este genótipo não trouxeram ganhos às plantas, sendo até deletérios.

Palavras-chaves HLB, híbridos, porta-enxerto, resistência genética

1. INTRODUÇÃO

Uma muda comercial cítrica é vista como um dos insumos mais importantes na formação de um pomar. É composta pela união, por meio do processo de enxertia, do tecido vegetal da variedade copa com o tecido vegetal da variedade porta-enxerto. No entanto, entre ambos pode ser utilizado também um interenxerto, normalmente com função de resolver problemas de incompatibilidade entre a copa e o porta-enxerto. A combinação correta dessas partes é fundamental para produtividade e longevidade do pomar, ainda mais em cultura perene (Schäfer et al., 2001). A origem do porta-enxerto e da copa, assim como a sua sanidade e qualidade do sistema radicular são aspectos importantes na composição da muda cítrica (Lima, 1986).

A qualidade e produtividade dos frutos cítricos é intrínseca à combinação das variedades copa/porta-enxerto, podendo ser influenciada por vários fatores (Bastos et al., 2014). O porta-enxerto é fundamental na formação da muda cítrica, exercendo influência importante sobre a copa, como: precocidade de produção, vigor, período de maturação dos frutos, desenvolvimento, quantidade e qualidade da produção, adaptação da planta às condições edafoclimáticas desfavoráveis e resistência a pragas e a doenças (Pompeu Júnior, 2005). Fatos estes que tornam a escolha da variedade porta-enxerto tão importante quanto da copa.

Dentre os principais porta-enxertos utilizados no Brasil está o Swingle, que é um híbrido (*C. paradisi* × *P. trifoliata*) obtido na Flórida, Estados Unidos, no ano de 1907 pelo pesquisador W.T. Swingle. O citrumelo 'Swingle' se mostrou um excelente porta-enxerto na prevenção da tristeza-dos-citros (CTV) (Shaked et al., 1987), sendo difundido no Brasil devido à resistência à tristeza, à gomose, ao nematoide e ao frio (Bastos et al., 2014). Atualmente é um dos porta-enxertos mais utilizados na citricultura devido às qualidades que proporcionam à copa, como plantas maiores e mais produtivas (Pompeu Junior e Blumer, 2011). Outro porta-enxerto utilizado, porém para condições mais restritas, é o *Poncirus trifoliata,* o qual apresenta potencial ananicante que pode ser expresso com maior ou menor intensidade, dependendo de diversos fatores, como: condições climáticas, variedade de copa e tipo de solo (Pompeu Junior e Blumer, 2006).

Do cruzamento entre tangerinas, com *Poncirus trifoliata* surgiram os híbridos denominados citrandarins. Esse cruzamento foi realizado com a intenção de aumentar a diversidade de porta-enxertos, e de tentar reunir em um mesmo material genético as qualidades das mandarinas, tais como a menor suscetibilidade ao declínio, com as qualidades dos trifoliatas, como a imunidade à tristeza, a resistência à gomose de Phytophthora e ao nematoide dos citros (*Tylenchulus semipenetrans*), além da tolerância ao frio, e a indução à formação de plantas com copas compactas e produtivas (Blumer e Pompeu Júnior, 2005).

Com a disseminação do Huanglongbing (HLB) doença associada à bactéria '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' nas principais regiões produtoras de citros no mundo (Brasil e Estados Únidos), estudos determinantes na escolha da combinação copa/porta-enxerto passaram a ser ainda mais importantes. Ainda que não existam relatos na literatura a respeito da existência de genótipos comerciais completamente resistentes a CLas, trabalhos publicados têm mostrado que a multiplicação de CLas é uma característica contrastante dentro das espécies de Citrus sendo observado diferentes graus de susceptibilidade (Machado et al., 2010; Alves et al., 2021). *P. trifoliata* tem demonstrado uma maior tolerância à infecção por CLas, característica essa, transferida para alguns de seus híbridos (Folimonova et al., 2009; Albrecht e Bowman, 2011; Boava et al., 2015; Castle et al., 2015).

A partir de estudos do programa de melhoramento de porta-enxertos conduzidos no Centro de Citricultura Sylvio Moreira/IAC, alguns citrandarins (híbridos de *Citrus sunki* × *P. trifoliata* cv Rubidoux) têm mostrado fortes evidências quanto à resistência a CLas permanecendo não infectados mesmo após 360 dias da tentativa de transmissão por borbulhas infectadas com a bactéria (Boava et al., 2017; Curtolo et al., 2020). Um dos genótipos selecionados foi o híbrido H222 que não apresentou CLas detectável quando usado como copa em condições de campo sob alta pressão de inóculo (Boava et al., 2015), além de ter apresentado um bom desempenho agronômico sob condições de campo quando usado como porta-enxerto (Cristófani-Yaly, comunicação pessoal). Em adição, este híbrido foi um dos destaques em reposta à infecção por CLas segundo resultados apresentados no capítulo 2.

Portanto, este trabalho teve como objetivo estudar as repostas à infecção por CLas do citrandarin H222 utilizado como;

1. Porta-enxerto da laranjeira ‘Valência’
2. Interenxerto entre a laranjeira ‘Valência’ e o porta-enxerto citrumelo Swingle.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi instalado e conduzido em casa de vegetação K no Centro de Citricultura Sylvio Moreira do Instituto Agronômico (IAC), em Cordeirópolis, em fevereiro de 2019. A casa de vegetação manteve temperatura máxima controlada, não permitindo temperatura superior a 30°C, condição não inibitória para o crescimento da bactéria e expressão de sintomas de HLB.

2.1 Preparo das plantas-teste, inoculações de CLas e delineamento experimental

Foram conduzidos quatro tratamentos (T) abaixo descritos:

T1. citrandarin H222 como porta-enxerto para a variedade copa;

T2. citrumelo Swingle como porta-enxerto para a variedade copa;

T3. citrandarin H222 como interenxerto de 5cm entre porta-enxerto citrumelo Swingle e a variedade copa;

T4. citrandarin H222 como interenxerto de 30cm entre porta-enxerto citrumelo Swingle e a variedade copa.

Cada tratamento foi composto por seis repetições, dentre essas, duas foram utilizadas como tratamento controle, não inoculado com CLas e quatro receberam inoculações de CLas, totalizando 24 plantas experimentais (Figura 1 e 2). As inoculações foram realizadas na variedade copa, utilizando-se borbulha infectada com CLas retirada de plantas fonte mantidas em casa de vegetação. As unidades experimentais foram aleatoriamente distribuídas na bancada.

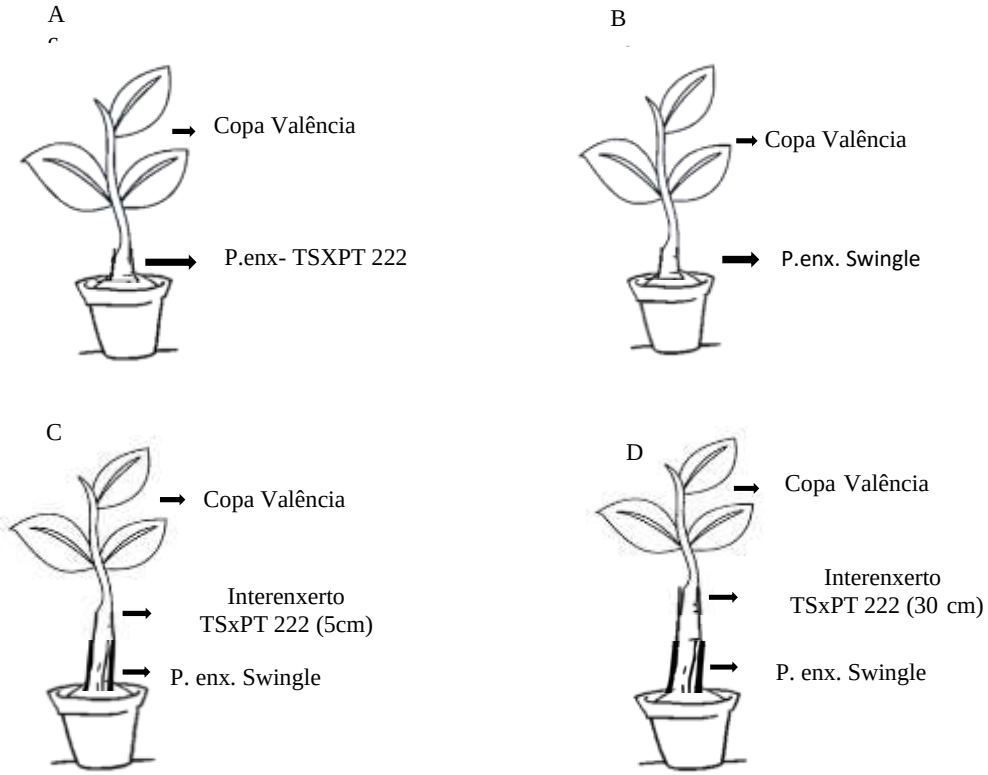


Figura 1. Ilustração dos tratamentos que foram utilizados nesse experimento. A. Citrandarin H222 como porta-enxerto. B. Citrumelo Swingle como porta-enxerto. C. Citrandarin H222 como interenxerto de 5 cm entre o porta-enxerto e a copa. D. Citrandarin H222 como interenxerto de 30 cm entre o porta-enxerto e a copa. Em todos os tratamentos a variedade copa foi a laranjeira 'Valência'.



Figura 2. Plantas de laranjeira 'Valência' em Citrumelo Swingle, com interenxerto de 5 cm (esquerda) e 30cm (direita) do citrandarin H222.

2.2. Amostragem e análise estatística

A presença de CLas nas folhas da variedade copa foram realizadas bimensalmente até a constatação da infecção de CLas. Uma vez constatada a infecção, as plantas foram mantidas em casa de vegetação até a análise final aos 13 meses da enxertia de inoculação. Nesta data foram realizadas análises de CLas na copa e nas raízes do porta-enxerto assim como valores quantitativos do desenvolvimento do sistema radicular como diâmetro do tronco ao nível do solo, volume e massa fresca e seca. Os valores obtidos para cada tratamento foram comparados pela estatística de Scott-Knott, adotando-se o nível de 5% de significância. As análises de valores quantitativos do desenvolvimento do sistema radicular assim como os valores de C_T foram realizadas em conjunto, usando a técnica multivariada da análise hierárquica de agrupamento, sendo que, o critério de agrupamento utilizado foi o proposto por Ward (1963). A distância euclidiana foi usada para medir a similaridade entre os tratamentos. Os resultados da análise de agrupamento foram dispostos hierarquicamente na forma de cluster contendo os tratamentos com resultados similares (Murtagh e Legendre, 2011).

2.3. Diagnóstico e quantificação de CLas nas folhas e raízes

O diagnóstico de CLas e a quantificação da concentração da bactéria nas amostras coletadas foram realizados por meio do PCR quantitativo em tempo real – qPCR. A extração do DNA genômico foi conduzida a partir de 200 mg de material vegetal, os quais foram homogeneizados em tubos plásticos com duas esferas (5 mm de diâmetro) usando o aparelho TissueLyser II (Qiagen) programado para 2 ciclos de 1min a 30 Hz. Após a maceração do tecido vegetal, a extração de DNA total teve início utilizando-se o método de CTAB (Murray e Thompson, 1980). Resumidamente a cada tubo de amostra foi adicionado 800 µL do tampão CTAB (CTAB 5%, NaCl 5M, EDTA 0,5M, Sarcosyl 10%, Mercaptoetanol e água) e incubado por 30 minutos a 65 °C. Seguiram-se duas extrações com clorofórmio: álcool-isoalaminico (24:1) e centrifugação a 12000 rpm/8 min transferindo-se o sobrenadante entre tubos. Na segunda extração o sobrenadante foi transferido para outro tubo de 1,5 mL,

adicionando-se 600 µL de tampão de precipitação (CTAB 5%, Tris HCl 1M pH 7,5, EDTA 0,5M, água), homogeneizado e mantido em temperatura ambiente por uma hora. Seguiu-se centrifugação a 12000rpm por 6 minutos, foi feito o descarte do sobrenadante e adição de 400 µL de TE alto sal, mantendo-se a amostra a 65°C por 10 min. Na sequência, foi adicionado 800 µL de etanol absoluto gelado e mantido a -20 ºC por 1 hora ou a -80 ºC/15min. Após, os tubos foram centrifugados a 12000rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e os tubos, mantidos a 50 ºC para secagem. O DNA total foi eluído em 200 µL de 1/10 TE + RNAse.

As amplificações foram realizadas no termociclador ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystem). Em cada reação foram adicionados 6,25 µL do TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystem), 216 nM de cada um dos iniciadores e 135 nM da sonda para CLas (HLBp) para um volume total de 14 µL (Li et al., 2006). Iniciadores para o gene glyceraldehyde 3-phophate dehydorgenase (GADPH) de citros foram usados como controle interno com 270 nM de cada iniciador e 135 nM da sonda (Boava et al., 2015). Ao final, foram adicionados 3 µL de DNA total padronizados na concentração de 100 ng/ µL. Todas as reações foram realizadas em duplicatas. Cada placa de PCR de 96 poços continha os seguintes controles: negativos - dois poços com água e dois poços com DNA de amostras CLas negativas obtidas de plantas microenxertadas e mantidas em casa de vegetacão; positivos - dois poços contendo DNA de amostras sabidamente infectadas por CLas. Os ciclos de amplificação do equipamento foram 95 °C por 5min, seguido de 40 ciclos de 95 °C/30s e 58 °C/45s. Neste estudo, para definição dos valores de C_T e da infecção das amostras por CLas adotou-se os resultados apresentados no capítulo 2.

2.4. Determinação do volume, diâmetro, peso seco e úmido do sistema radicular

O volume do sistema radicular foi determinado pelo método de deslocamento de água (Bernardi et al., 2000). Foi utilizada uma proveta graduada com um volume de água conhecido, onde as raízes, após serem lavadas, foram mergulhadas, assim o volume de raiz correspondeu ao volume de água deslocado.

Para a obtenção da massa fresca do sistema radicular, ocorreu a separação de ambas as partes com corte na região do colo, descartando-se o interenxerto. As raízes

foram lavadas em água corrente com auxílio de uma peneira até que todo o substrato fosse eliminado, evitando-se ao máximo a perda de raízes, que foram secas com papel absorvente e pesadas diretamente por meio de uma balança digital (precisão 0,01 g), expresso em g/planta.

Para se determinar o peso da matéria seca das raízes, o material foi seco em estufa de 55 ºC até sua secagem total e, posteriormente, pesado em balança digital (precisão 0,01 g), e então obteve-se o peso expresso em g/planta. O diâmetro do caule, foi obtido através da utilização do paquímetro.

2.5. Determinação do crescimento do sistema radicular

Para a determinação do crescimento do sistema radicular foram instalados nos vasos e próximo ao porta-enxerto tubos de acrílico transparentes (*minirhizotron*) (Figura 3). Com a utilização do *scanner* de raiz CI-600, MODELO CI-600-TA66 (Figura 4), foram realizadas imagens trimestralmente a partir da data de inoculação. As imagens foram analisadas no software RootSnap!® (CID BioScience Inc., Camas, WA, EUA).



Figura 3. Tubos de acrílico transparentes (*minirhizotron*) que foram instalados nos vasos, próximo ao porta-enxerto no experimento 2.



Figura 4. Foto do minirhizotron que foi utilizado para a determinação do crescimento das raízes (Root Scanner CI-600®, CID Bio-Science Inc., Camas, WA, EUA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Infecção de CLas na copa e raízes dos diferentes tratamentos

O citrandarin H222, híbrido selecionado com base nos resultados anteriores das avaliações no campo quanto a não infecção por CLas (Boava et al., 2015) e por apresentar vantagens horticulturais como resistência à seca e indução de boas produtividades (Cristofani-Yaly comunicação pessoal), foi utilizado como porta-enxerto e interenxerto (5 e 30 cm) para o porta-enxerto citrumelo Swingle, sendo este genótipo também utilizado como um quarto tratamento. Em todos estes foram utilizados a laranjeira ‘Valência’ como copa onde as enxertias de borbulhas infectadas com CLas foram realizadas para a transmissão da bactéria. Após 6 meses da inoculação, foi constato que, com exceção de duas repetições do tratamento T2, todas as demais copas foram infectadas por CLas com valores de C_T variando de 19.01 a 29.82 (dados não mostrados). As plantas foram mantidas em casa de vegetação até os 13 meses da enxertia de transmissão, quando então foram realizadas as análises finais.

Com base nos valores de C_T aos 13 meses da enxertia de transmissão, as copas inoculadas apresentaram concentrações de CLas similares entre os tratamentos, uma vez que, não houve diferença estatística entre os valores de C_T obtidos (Tabela 1). Porém, mesmo que não diferente estatisticamente, o Tratamento

T3 apresentou valor um valor de C_T 5 ciclos acima dos obtidos para os tratamentos T1 e T2 e 7 acima do tratamento T4, denotando uma menor concentração de CLas (Tabela 1). Interessante que, mesmo com a menor concentração de CLas na copa, o sistema radicular do tratamento T3 (H222 como interenxerto de 5 cm e citrumelo Swingle como porta-enxerto) apresentou o maior título bacteriano, numa situação oposta da vivenciada pelo tratamento T4 (H222 como interenxerto de 30 cm e Swingle como porta-enxeto (Tabela 1). Graham e colaboradores (2013) mostraram não haver uma correlação entre CLas presente na copa da planta com a presente no sistema radicular, porém demonstraram que temporalmente a bactéria coloniza o sistema radicular, servindo de fonte para ramos novos na copa. No presente experimento, em virtude de ter sido feito somente uma amostragem no sistema radicular, tal informação não pode ser constata. As concentrações de CLas na copa de 'Valência' enxertada diretamente no citrandarin H222 ou no citrumelo Swingle foram muito similares com valores de C_T de 19.01 e 19.34, respectivamente. No entanto, CLas foi diagnosticada nas quatro repetições do sistema radicular do citrumelo Swingle (valor médio de C_T = 31.33), enquanto em somente uma repetição do sistema radicular do citrandarin H222 foi detectada a bactéria (Tabela 1). Estes resultados confirmam a menor susceptibilidade do citrandarin H222 a CLas segundo demonstrado por Boava et al. (2015). Porém, este genótipo como interenxerto não contribuiu para ganhos em tolerância a CLas pelo citrumelo Swingle independentemente do tamanho do interenxerto, se 5 cm (T3) ou 30 cm (T4).

Tabela 1. Efeito da infecção de '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' em copa de laranjeira 'Valência' enxertadas nos diferentes tratamentos.

Tratamentos	Diâmetro da haste principal (mm)		Vol. sistema radicular (cm^3)[1]		Peso seco do sistema radicular (g)		Valores de C_T [2]	
	Infected	Health	Infected	Health	Infected	Health	Canopy	Roots[4]
T1 - Porta-enxerto citrandarin H222	19.50 aA	21.0aA	222.5 aB	381.5aA	154.1 aB	238.5aA	19.01 a	37.39 b
T2 - Porta-enxerto citrumelo Swingle	18.13 aB	20.5aA	154.5 bB	509.5aA	86.8 bC	243.0aA	19.34 a	31.33 a
T3 – Interenxerto H222 (5 cm)	16.88 bB	20.5aA	163.7 bB	364.5aA	92.8 bC	218.8aA	22.73 a	27.88 c
T4 - Interenxerto H222 (30 cm)	14.38 bB	16.2bB	106.5 bB	307.0aA	63.2 bC	129.1bB	15.89 a	30.46 a

[1]Estimado segundo o método de deslocamento de água (Bernardi et al., 2000)
[2]Amostras com valores de C_T (Cycle threshold) < 32 foram consideradas como positivas. Todas as amostras dos tratamentos não infectados apresentaram valores de C_T entre 34.75 a 40 (undetermined).
[4]Tratamentos: T1 - média de 4 repetições, sendo uma com valor de C_T (C_T = 29.55); T2, T3 e T4 - médias das 4 repetições com valores de C_T no grupo de amostra positiva (infectada com CLas).
Letras minúsculas comparações entre os tratamentos dentro das condições infectada e sadia. Letras maiúsculas comparações entre as condições infectada e sadia. Comparações de médias pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância onde médias seguidas pela mesma letra não diferem signficativamente.

3.2. Efeito de CLas no desenvolvimento do sistema radicular das plantas

No experimento aqui reportado, CLas foi diagnosticado em altas concentrações na variedade copa e em menor concentração no sistema radicular aos 13 meses da inoculação na copa, com exceção para o interenxerto de 5 cm onde a concentração de CLas nas raízes foi maior (Tabela 1).

Dentre as plantas infectadas, o desenvolvimento do sistema radicular do híbrido H222 (T1) foi significativamente menos impactado quando comparado aos tratamentos com interenxerto (T3 e T4) assim como quando comparado ao citrumelo Swingle (T2) (Tabela 1, Figura S1- material suplementar). No entanto, é notório o efeito deletério da doença no desenvolvimento do sistema radicular das plantas com diferenças significativas entre os tratamentos infectados (infected) e não infectados (health) (Tabela 1).

Exceção é encontrada para o diâmetro da haste principal para os tratamentos T1 e T4. Para T1 o desenvolvimento do diâmetro da haste do H222 não foi afetado pela infecção de CLas, enquanto para T4 a própria interenxertia foi prejudicial, independente da presença de CLas. Efeitos deletérios no desenvolvimento da variedade copa foram observados com os interenxertos de *P. trifoliata* entre o porta-enxerto limão Cravo e a copa de ‘Valência’, independente do comprimento do interenxerto (Sampaio, 1993). Por outro lado, usando a combinação de *C. grandis*

como porta-enxerto e *C. hystrix* como interenxerto, e o contrário também, Shokrollah et al. (2011) não foi visualizado a manifestação de sintomas de HLB em copa de ‘Valência’, porém, as plantas foram analisadas aos 6 meses da inoculação e, portanto, a presença de CLas não foi confirmada por PCR.

O efeito deletério de CLas no desenvolvimento do sistema radicular das plantas infectadas levando ao declínio das mesmas foi muito bem explorado por trabalhos anteriores com reduções no teor de amido (Etxeberria et al., 2009) e na densidade e peso (Graham et al., 2013). Tal fato despertou para o uso de fertilizações foliares e bioestimulantes no sistema radicular procurando dar condições mínimas às plantas para que se mantenham biologicamente ativas e economicamente produtivas. Bioestimulantes foram defenidos por Yakhin et al. (2017) como "produtos formulados de origem biológica que melhora a produtividade da planta como consequência das propriedades novas ou emergentes do complexo de constituintes, e não como uma consequência única da presença de nutrientes essenciais para plantas”, e estão cada vez mais sendo integrados aos sistemas de produção para otimizar a produtividade. Os bioestimulantes de plantas baseados em materiais naturais têm recebido atenção considerável tanto da comunidade científica quanto de empresas comerciais, especialmente na última década (Sharma et al., 2014; Brown e Saa, 2015; Du Jardin, 2015; Yakhin et al., 2017). Sendo vistos como “condicionadores pré-estresse”, manifestando seus efeitos na melhoria da eficiência fotossintética, redução da propagação e intensidade de algumas doenças e em melhores rendimentos (Zhang e Schmidt,1999).

Trabalhos na literatura têm sido bastante contraditórios quanto aos resultados obtidos (Gottwald et al., 2012; Xu et al., 2013; Shen et al., 2013; Castellano-Hinojosa et al., 2021; Bassanezi et al., 2021). Porém, os trabalhos têm em comum a utilização de combinações copa/porta-enxerto já estabelecidas em campo e com alta susceptibilidade do porta-enxerto aos sintomas de HLB, além de que CLas não pode ser eliminada das plantas experimentais. No entanto, combinações de copa em porta-enxerto com maior tolerância a CLas e aos efeitos do HLB ainda não foram comparadas àquelas de maior susceptibilidade quanto as respostas a agentes externos (bioestimulantes e nutriocionais) visando mitigar o efeito deletério do HLB.

Analisando-se conjuntamente os dados de diâmetro do tronco, volume e peso seco do sistema radicular e concentração de CLas (dado pelo valor de C_T) para cada um dos tratamentos infectados com CLas e comparando-os com os obtidos das plantas não infectadas, em conjunto, vê-se que o híbrido H222 apresentou, na média de todas variáveis, resultados semelhantes aos obtidos pelas plantas não infectadas (Figura 5). Isto é denotado pelo agrupamento do H222 no mesmo cluster das plantas não inoculadas e diferente do cluster representado pelos tratamentos T2, T3 e T4. Portanto, o efeito de CLas no híbrido H222, na somatória de todas variáveis, ainda que tenha algum decréscimo nos valores, manteve-os em níveis equiparados aos obtidos pelos tratamentos não inoculados. Vislumbra-se que a mitigação de HLB em combinações copa/porta-enxertos com maior tolerância do HLB (por exemplo o H222) possa ter resultados melhores aos obtidos quando das combinações susceptíveis.

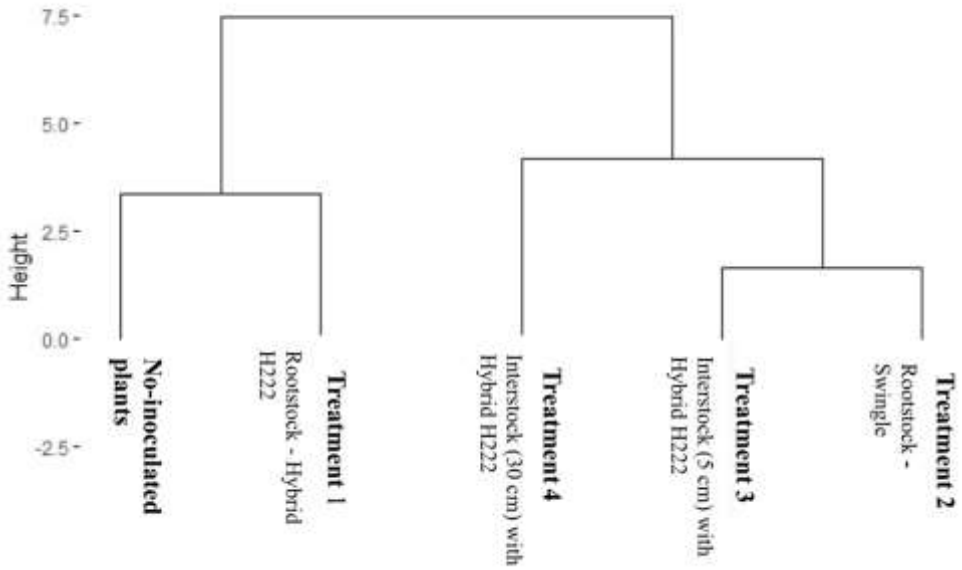


Figura 4. Análise de clusterização das variáveis analisadas (diâmetro do colo da haste principal, volume e peso seco do sistema radicular e valores de C_T - cycle threshold em respostas dos tratamentos T1, T2, T3 e T4 à infecção por CLas.

As variáveis foram analisadas em conjunto, usando a técnica multivariada da análise hierárquica e distância euclidiana para medir a similaridade entre os tratamentos. Os resultados da análise de agrupamento foram dispostos

hierarquicamente em que cada cluster contém os tratamentos com resultados similares (Murtagh e Legendre, 2011).

Em decorrência da ausência de fontes de resistência em plantas de citros geneticamente próximas e que possam ser introduzidas via melhoramento clássico, esforços têm sido empenhados na obtenção de resistência a CLas por meio de estratégias biotecnológicas, porém ainda em fase experimental (Soares et al. 2020). Enquanto isso, trabalhos publicados têm recomendado que a mitigação do HLB seja feita principalmente pelo controle do inseto vetor, assim como pela remoção de plantas infectadas (Bassanezi et al., 2021), e o replantio de novas árvores (Sisterson e Stenger, 2013). Neste trabalho, ficou demonstrado que o citrandarin H222 (híbrido de *P. trifoliata* com tangerina 'Sunki'), quando utilizado como porta-enxerto, foi menos impactado por CLas quando inoculado na copa. Mesmo com altas concentrações de CLas na copa (C_T = 19.01) enxertada no H222, variáveis como diâmetro do colo da haste principal, volume e peso seco do sistema radicular e concentração da bactéria no sistema radicular, quando analisados em conjunto, através da técnica multivariada de análise hierárquica (Murtagh e Legendre, 2011), apresentaram variáveis similares aos obtidos nas plantas não inoculadas (Figura 2). Como demonstrado no Capítulo 2 e também estudados por Boava et al., (2017) e Curtolo et al., (2020), outros genótipos de citrandarins apresentaram resultados similares ou ainda melhores que o H222 quanto à tolerância a CLas. Além de estudos com outros genótipos da progênie como o H-106 e H-109 (vide capítulo 2, por exemplo) estudos visando mitigar o efeito deletério do CLas nestes porta-enxertos por meio de nutrição diferencial e/ou bioestimulantes poderão trazer ainda mais benefícios a estes genótipos.

Em conclusão, o híbrido H222, quando utilizado como porta-enxerto para a laranjeira ‘Valência’, sob as condições testadas e após 13 meses de infecção com CLas, apresentou desempenho superior ao do citrumelo Swingle quanto ao desenvolvimento do sistema radicular, podendo ser inclusive comparado ao desenvolvimento do sistema radicular das plantas não inoculadas. No entanto, os interenxertos com este genótipo não trouxeram ganhos às plantas, sendo até deletérios.

4. REFERÊNCIAS

Albrecht U, Bowman KD (2011) Tolerance of the Trifoliate Citrus Hybrid US897 (*Citrus reticulata* Blanco x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) to *Huanglongbing*. **HortScience horts** 46(1):16–22.

Alves MN, Lopes SA, Raiol-Junior LL, Wulff NA, Girardi EA, Ollitrault P, Peña L (2021) Resistance to '*Candidatus* Liberibacter asiaticus,' the *Huanglongbing* Associated Bacterium, in Sexually and/or Graft-Compatible *Citrus* Relatives. **Frontiers in Plant Science** 11:617-664.

Bassanezi RB, Primiano IV, Vescove HV (2021) Effect of enhanced nutritional programs and exogenous auxin spraying on huanglongbing severity, fruit drop, yield and economic profitability of orange orchards. **Crop Protection** 145:105609.

Bastos DC, Ferreira EA, Passos OS, Sá JF, Ataíde EM, Calgaro M (2014) Cultivares copa e porta-enxertos para a citricultura brasileira. **Informe Agropecuário** 35(281):36-45.

Bernardi ACC, Carmello QAC, Carvalho SA (2000) Development of citrus nursery trees grown in pots in response to NPK fertilization. **Scientia Agricola** 57:733-738.

Blumer S, Pompeu Junior J (2005) Avaliação de citrandarins e outros híbridos de trifoliata como porta-enxertos para citros em São Paulo. **Revista Brasileira de Fruticultura** 27:264-267.

Boava LP, Sagawa CHD, Cristofani-yaly M, Machado MA (2015) Incidence of '*Candidatus* Liberibacter asiaticus infected plants among citrandarins as rootstock and scion under field conditions. **Phytopathology** 105(4):518-524.

Boava LP, Cristofani-yaly M, Machado MA (2017) Physiologic, anatomic, and gene expression changes in citrus sunki, *Poncirus trifoliata*, and their hybrids after "*candidatus* liberibacter asiaticus" infection. **Phytopathology** 107(5):590-599.

Brown P, Saa S (2015). Biostimulants in agriculture. **Front. Plant Sci**. 6.

Castellano-Hinojosa A, Meyering B, Nuzzo A, Strauss SL, Albrecht U (2021) Effect of plant biostimulants on root and plant health and the rhizosphere microbiome of citrus trees in huanglongbing-endemic conditions. **Trees - Structure and Function** 35(5):1525–1539.

Castle B, Grosser J, Bowman K, Stover E (2015) An HLB-tolerant citrus rootstock: What exactly does that mean? **Citrus Industry** 16-19.

Curtolo M, Granato LM, Soratto TAT, Curtolo M, Gazaffi R, Takita MA, Cristofani-Yaly M, Machado MA (2020) Expression Quantitative Trait Loci (eQTL) mapping for callose synthases in intergeneric hybrids of Citrus challenged with the bacteria *Candidatus* Liberibacter asiaticus. **Genetics and Molecular Biology** 43(2):1–16.

Curtolo M, de Souza Pacheco I, Boava LP, Takita MA, Granato LM, Galdeano DM, de Souza AA, Cristofani-Yaly M, Machado MA (2020) Wide- ranging transcriptomic analysis of *Poncirus trifoliata*, Citrus sunki, Citrus sinensis and contrasting hybrids reveals HLB tolerance mechanisms. **Science Reports**. 10(1):20865.

Du Jardin, P (2015). Plant biostimulants: definition, concept, main categories and regulation. **Sci. Hortic**. 196: 3–14.

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** 74:76-83.

Folimonova SY, Robertson CJ, Garnsey SM, Gowda S, Dawson WO (2009) Examination of the responses of different genotypes of citrus to *huanglongbing* (Citrs Greening) under different conditions. **Phytopathology**, 99(12):1346-1354.

Gottwald TR, Graham JH, Irey MS, McCollum TG, Wood BW (2012) Inconsequential effect of nutritional treatments on huanglongbing control, fruit quality, bacterial titer and disease progress. **Crop Protection** 36:73–82.

Graham JH, Johnson EG, Gottwald TR, Irey MS (2013) Presymptomatic fibrous root decline in citrus trees caused by huanglongbing and potential interaction with Phytophthora spp. **Plant Dis** 97:1195-1199.

Li W, Hartung JS, Levy L (2006) Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus* Liberibacter species associated with citrus *huanglongbing*. **J. Microbiol** 66:104-115.

Lima JEO (1986) Novas técnicas de produção de mudas cítricas. **Laranja**. 7:463-468.

Machado MA, Locali-fabris EC, Coletta-filho HD (2010) *Candidatus* Liberibacter spp., agentes do *huanglongbing* dos citros. **Citrus Research & Technology** 31:25-35.

Murray M, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**. 8:4321–4325.

Murtagh F, Legendre P (2011) Ward's Hierarchical Clustering Method: Clustering Criterion and Agglomerative Algorithm.

Pompeu Junior, J (2005) Porta-enxertos In:Mattos Junior, D. et al. (Ed.). **Citros**.Campinas: IAC: FUNDAG 63-104.

Pompeu Junior J, Blumer, S (2006) Comportamento de 17 seleções de trifoliata como porta-enxertos para laranjeiras Valencia. **Laranja** 27:287-295.

Pompeu Junior J, Blumer S (2011) Citrumelos como porta-enxertos para a laranjeira 'Valência'. **Pesquisa Agropecuária Brasileira.** 46:105-107.

Sampaio VR (1993) Efeitos de filtros de *Poncirus trifoliata* e de alturas de enxertias na laranjeira ‘Valencia’ enxertada em limão ‘Cravo’. **Scientia Agricola** 50(3):360-364.

Schäfer G, Bastianel, M, Dornelles ALC (2001) Porta-enxertos utilizados na citricultura. **Ciência Rural** 31(4):723-733.

Shaked A, Cohen A, Hamou M, Hasdai D (1987) Inarching of ‘Swingle’ citrumelo in Israel. **HortScience** 22: 1258-1260.

Sharma HSS, Fleming C, Selby C, Rao JR, Martin T (2014). Plant biostimulants: a review on the processing of macroalgae and use of extracts for crop management to reduce abiotic and biotic stresses. J. **Appl. Phycol**. 26: 465–490.

Shen W, Cevallos-Cevallos JM, da Rocha UN, Arevalo HÁ, Stansly PA, Roberts PD, van Bruggen AHC (2013) Relation between plant nutrition, hormones, insecticide applications, bacterial endophytes, and *Candidatus* Liberibacter Ct values in citrus trees infected with Huanglongbing. **European Journal of Plant Pathology** 137(4):727–742.

Shokrollah H, Abdullah TL, Sijam K, Abdullah SNA (2011) Potential use of selected citrus rootstocks and interstocks against HLB disease in Malaysia. **Crop Protection** 30(5):521-525.

Sisterson MS, Stenger DC (2013) Roguing with replacement in perennial crops: Conditions for successful disease management. **Phytopathology** 103(2):117–128.

Soares JM, Tanwir SE, Grosser JW, Dutt M (2020) Development of genetically modified citrus plants for the control of citrus canker and huanglongbing. **Tropical plant pathology** 45(3):237–250.

Ward Jr, JH (1963) Hierarchical Grouping to Optimize an Objective Function, **Journal of the American Statistical Association** 58:(301): 236-244.

Xu M, Liang M, Chen J, Xia Y, Zheng Z, Zhu Q, Deng X (2013) Preliminary research on soil conditioner mediated citrus Huanglongbing mitigation in the field in Guangdong, China. **European Journal of Plant Pathology** 137(2):283–293.

Yakhin OI, Lubyanov AA, Yakhin IA, Brown PH (2017) Biostimulants in Plant Science: A Global Perspective. **Frontiers in Plant Science**.7

Zhang X, Schmidt R (1999) Biostimulating turfgrasses. **Grounds Maintenance** 34: 14–15.

APÊNDICES

MATERIAL SUPLEMENTAR

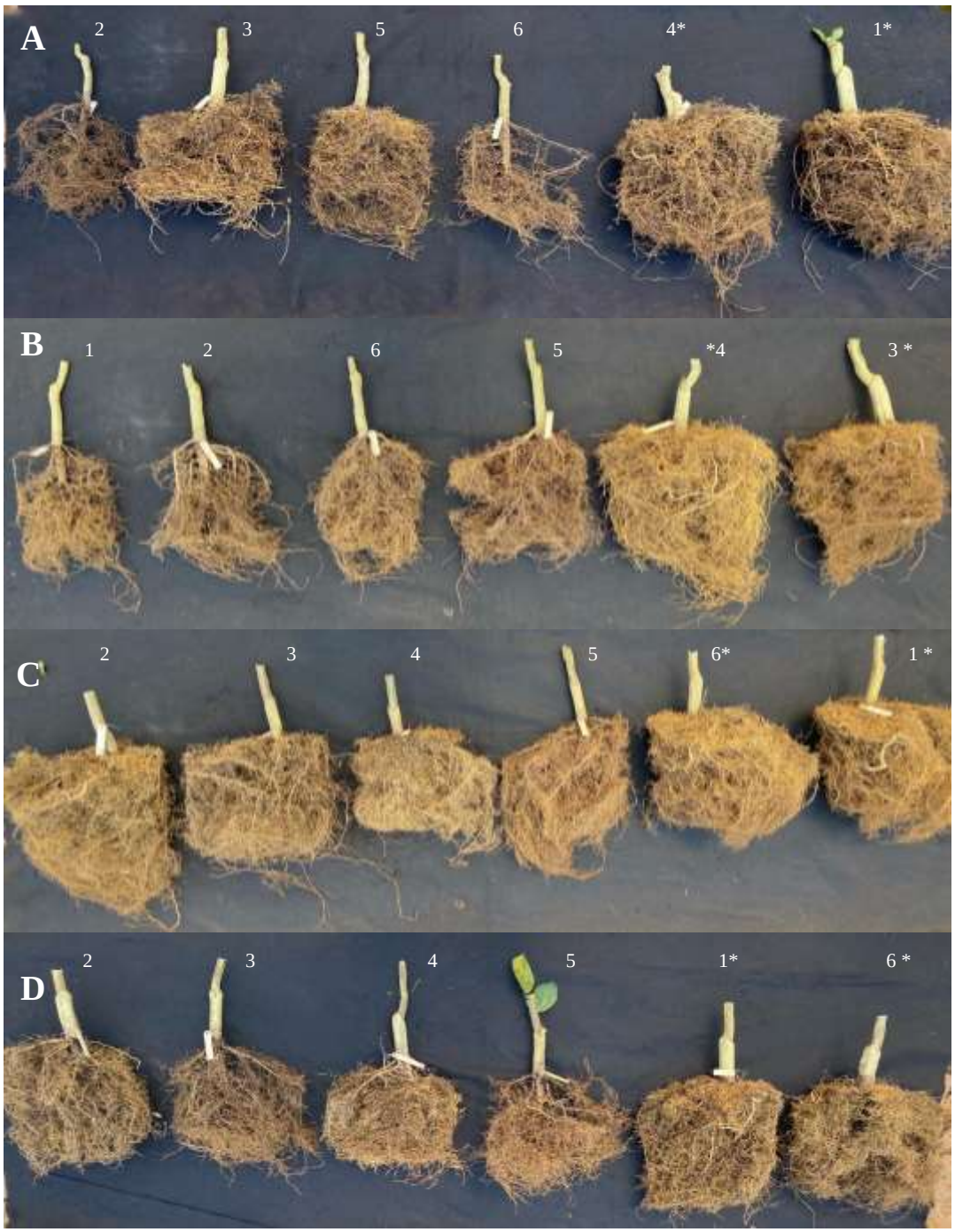


Figura S1. Foto das raízes dos porta-enxertos com enxertia de copa de 'Valência' A e B. Citrandarin H222 como interenxerto de 5 e 30 cm, respectivamente, entre o porta-enxerto citrumelo Swingle e 'Valência'. C. Citrandarin H222 como porta-enxerto. D. Citrumelo Swingle como porta-enxerto. Em todos os tratamentos a variedade copa foi a laranjeira 'Valência'. O número acima das raízes refere-se ao número da repetição. *Plantas não inoculadas com CLas (Controle).

Avaliação do crescimento do sistema radicular com o uso de *minirhizotron*

Serão apresentados os dados do desenvolvimento do sistema radicular por meio das imagens geradas pelo *scanner* CI-600, MODELO CI-600-TA66 (Figura S2). Em virtude de problemas técnicos com o scanner, estes dados não foram analisados para evitar introdução de informações não biológicas nas análises. Estas foram realizadas nos mesmos dias das coletas de confirmação de CLas. Ainda assim, essas imagens quando analisadas e comparadas verificou que ocorreu diferença de crescimento do sistema das plantas infectadas com CLas em relação as plantas controles em cada tratamento (genótipos do porta-enxerto e tamanhos dos interenxerto), e quando comparado também o desenvolvimento do sistema radicular entre os tratamentos (Tabela S1), assim como discutido acima.



Figura S2. Exemplo de imagens geradas através do minirhizotron (Root Scanner CI-600®, CID Bio-Science Inc., Camas, WA, EUA) do sistema radicular de plantas do Experimento II.

Tabela S1. Resultados das avaliações de crescimento do sistema radicular com o uso de *minirhizotron* nos tratamentos testados.

Tratamentos	Repetições	Porcentagem de root por mm2					
		3	5	7	9	11	13
		Outubro -2020	Dezembro - 2020	Fevereiro - 2021	Abril - 2021	Junho - 2021	Agosto - 2021
5cm Inter-enxerto 222	2	x	0,011	0,030	0,021	0,015	0,011
	3	x	0,011	0,074	0,024	0,002	0,017
	5	x	0,011	0,145	0,042	0,029	0,022
	6	x	0,016	0,030	0,022	0,015	0,011
	1*	x	0,017	0,090	0,042	0,035	0,029
	4*	x	0,018	0,110	0,059	0,050	0,038
30cm Inter-enxerto 222	1	x	0,017	0,021	0,018	0,015	0,011
	2	x	0,036	0,034	0,031	0,027	0,018
	5	x	0,056	0,067	0,060	0,052	0,037
	6	x	0,009	0,051	0,034	0,029	0,019
	3*	x	0,016	0,130	0,046	0,037	0,029
	4*	x	0,052	0,091	0,038	0,040	0,036
Porta enxerto 222	2	0,031	0,035	0,090	0,047	0,038	0,030
	3	0,228	0,067	0,043	0,035	0,019	0,010
	4	0,043	0,116	0,074	0,029	0,024	0,014
	5	0,020	0,037	0,033	0,029	0,021	0,016
	1*	0,013	0,014	0,111	0,034	0,024	0,113
	6*	0,032	0,089	0,134	0,064	0,049	0,287
Porta enxerto Swingle	2	0,020	0,024	0,030	0,024	0,019	0,015
	3	0,036	0,034	0,060	0,029	0,020	0,016
	4	0,012	0,026	0,055	0,022	0,022	0,014
	5	0,029	0,036	0,046	0,041	0,027	0,022
	1*	0,030	0,028	0,123	0,064	0,055	0,052
	6*	0,049	0,070	0,108	0,048	0,046	0,041

*Repetições controle: Plantas que não receberam inoculação de CLas.

X: Analise não realizada devido ao atraso dos desenvolvimentos dos interenxertos.

CAPÍTULO 4 – Considerações Finais e Conclusões

É notório que o efeito do HLB está relacionado diretamente ao desbalanço de carboidrato no sistema fonte-dreno (Gonzalez et al., 2012), sendo que o acúmulo de amido nas folhas leva a disfunções no floema e desintegração do cloroplasto (Etxeberria et al., 2009; Folimonova e Achor, 2010) com efeitos significativos no desenvolvimento do sistema radicular (Graham et al., 2013; Johnson et al., 2013). A busca por resistência ou tolerância a CLas e aos efeitos deletérios do HLB seja nos genótipos copa ou porta-enxerto que compõe a planta de citros tem sido objeto de muita pesquisa recentemente, porém ainda sem um produto (Soares et al., 2020). Efetivamente, ações de mitigação baseadas em diminuição da transmissão natural do patógeno por meio de redução da população de vetor e redução da fonte de inóculo (Bassanezi et al., 2020), suplementadas ou não pela utilização de nutrientes ou bioestimuladores, têm possibilitado a produção comercial de frutas de citros. No tocante à estratégia de mitigação por meio de suplementações minerais ou bioestimulantes as respostas têm sido muito controversas mesmo na academia (Gottwald et al., 2012; Xu et al., 2013; Shen et al., 2013; Castellano-Hinojosa et al., 2021; Bassanezi et al., 2021). Porém, os trabalhos até então publicados, na grande totalidade utilizaram-se de pomares já plantados nos quais os porta-enxertos comerciais são susceptíveis.

Neste trabalho, alguns genótipos de citrandarins (híbridos do cruzamento entre *Poncirus trifoliata* e tangerina Sunki) selecionados com base em informações prévias (Boava et al., 2015 e 2017; Curtolo et al., 2020) e sobre enxertados em plantas fontes de laranjeira ‘Valência’ (Fig. S1 - Capítulo 2) contendo altas concentrações de CLas ($3.43x10^4$ to $1.63\ x10^6$ células/g de tecido) foram analisados em 4 períodos distintos durante 12 meses para as variáveis de concentração de CLas e acúmulo de amido. Para alguns genótipos também foi avaliada a presença de calose. Semelhante aos resultados anteriormente obtidos (Boava et al., 2017) classes diferenciais de respostas à infecção por CLas foram obtidas. Notadamente, no presente trabalho, em algum dos quatro períodos analisados, em todos os híbridos foi diagnosticado a presença de CLas o que denota a ausência de imunidade. No entanto, a considerar a condição severa sob a qual os híbridos foram desafiados, para alguns genótipos ao

longo do tempo de análise, houve um decréscimo no número de repetições (plantas) nas quais pode ser constatada a presença de CLas (híbridos H106, H109, H126, H157, e H222), chegando à ausência de infecção para o híbrido H106. Isso denota uma resposta genética da planta à presença do patógeno, porém ocorrendo após a infecção o que, de certo modo, confirma o fato de que as infecções por CLas são "insertas" em *P. trifoliata* (Folimonova et al., 2009; Ramadugo et al., 2016). Esta hipótese tem como fundamento o trabalho de Albiach-Marti et al. (2004) que demonstrou que o mecanismo de resistência de *P. trifoliata* ao CTV afetou os mecanismos de replicação e formação da capa proteica, portanto ocorrendo após o estabelecimento da infecção do vírus. Aqui, abre-se um caminho para a pesquisa sobre o mecanismo de ação de *P. trifoliata* após a infecção por CLas.

Em um outro experimento, o citrandarin H222, selecionado por conferir à copa características agronômicas que atendam a necessidade de produção e apresentar ausência de infecção por CLas por borbulha (Boava et al., 2017), foi usado como porta-enxerto e interenxerto para 'Valência' inoculada com CLas. O citrumelo Swingle foi usado como padrão comparativo. Avaliou-se o desenvolvimento e título de CLas nas raízes dos porta-enxertos. Tal como obtido no Capítulo 3, não foi observado imunidade a CLas deste genótipo como porta-enxerto. No entanto, os efeitos deletérios do HLB no desenvolvimento do sistema radicular foram significativamente menores quando comparados aos sofridos pelo citrumelo Swingle. Análises multivariadas dos dados de desenvolvimento do sistema radicular permitiram compará-los aos resultados obtidos das plantas sadias (Fig.2, Capítulo 3). Tais resultados abrem a possibilidade de uso experimental deste genótipo, e outros já selecionados quanto a tolerância a CLas, como porta-enxertos visando determinar os efeitos de tratamentos com bioestimulantes ou nutrição diferencial na mitigação frente aos efeitos deletérios do HLB.

Com base nos resultados obtidos e nas condições experimentais aqui utilizadas pode-se concluir que;

1. O conceito de imunidade (ausência completa de infecção) não pode ser aplicado a *P. trifoliata* assim como aos 14 genótipos de citrandarins expostos a altas de constante fontes de '*Candidatus* Liberibacter asiaticus';

2. A diminuição na frequência temporal de infecção de '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' nos citrandarins H106, H109, H126, H157, e H222 pode estar relacionada a uma reposta tardia do hospedeiro após-infecção do patógeno.

3. Dentre os genótipos testados, os citrandarins H106, H109, H126, H157, e H222 são os mais promissores em resposta a infecção por '*Candidatus* Liberibacter asiaticus'

4. Efeitos deletérios (massa, volume e concentração de '*Candidatus* Liberibacter asiaticus') da infecção de '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' em copa de laranjeira 'Valência' foram menos acentuados no sistema radicular do porta-enxerto citrandarin H222 quando comparado ao do porta-enxerto citrumelo 'Swingle'.

REFERÊNCIAS

Albiach-Marti MR, Grosser JW, Gowda S, Mawassi M, Satyanarayana T, Garnsey S and Dawson WO (2004) Citrus tristeza virus replicates and forms infectious virions in protoplasts of resistant citrus relatives. **Mol Breed** 14:117-128.

Bassanezi RB, Lopes SA, de Miranda MP, Wulff NA, Volpe HXL, Ayres AJ (2020) Overview of citrus huanglongbing spread and management strategies in Brazil. **Trop. plant pathol** 45:251–264.

Bassanezi RB, Primiano IV, Vescove HV (2021) Effect of enhanced nutritional programs and exogenous auxin spraying on huanglongbing severity, fruit drop, yield and economic profitability of orange orchards. **Crop Protection** 145:105609.

Boava LP, Sagawa CHD, Cristofani-yaly M, Machado MA (2015) Incidence of ’*Candidatus* Liberibacter asiaticus infected plants among citrandarins as rootstock and scion under field conditions. **Phytopathology** 105(4):518-524.

Boava LP, Cristofani-yaly M, Machado MA (2017) Physiologic, anatomic, and gene expression changes in citrus sunki, *Poncirus trifoliata*, and their hybrids after “*candidatus* liberibacter asiaticus” infection. **Phytopathology** 107(5):590-599.

Castellano-Hinojosa A, Meyering B, Nuzzo A, Strauss SL, Albrecht U (2021) Effect of plant biostimulants on root and plant health and the rhizosphere microbiome of citrus trees in huanglongbing-endemic conditions. **Trees - Structure and Function** 35(5):1525–1539.

Curtolo M, Granato LM, Soratto TAT, Curtolo M, Gazaffi R, Takita MA, Cristofani-Yaly M, Machado MA (2020) Expression Quantitative Trait Loci (eQTL) mapping for callose synthases in intergeneric hybrids of Citrus challenged with the bacteria *Candidatus* Liberibacter asiaticus. **Genetics and Molecular Biology** 43(2):1–16.

Curtolo M, de Souza Pacheco I, Boava LP, Takita MA, Granato LM, Galdeano DM, de Souza AA, Cristofani-Yaly M, Machado MA (2020) Wide- ranging transcriptomic analysis of *Poncirus trifoliata*, Citrus sunki, Citrus sinensis and contrasting hybrids reveals HLB tolerance mechanisms. **Science Reports**. 10(1):20865.

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** 74:76-83.

Folimonova SY, Robertson CJ, Garnsey SM, Gowda S, Dawson WO (2009) Examination of the responses of different genotypes of citrus to *huanglongbing* (Citrs Greening) under different conditions. **Phytopathology**, 99(12):1346-1354.

Folimonova SY, Achor DS (2010) Early events of citrus greening (Huanglongbing) disease development at the ultrastructural level. **Phytopathology**. *100*(9): 949–958.

Gonzalez P, Reyes-De-Corcuera J, Etxeberria E (2012) Characterization of leaf starch from HLB-affected and unaffected-girdled citrus trees. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. 79: 71-78,

Gottwald TR, Graham JH, Irey MS, McCollum TG, Wood BW (2012) Inconsequential effect of nutritional treatments on huanglongbing control, fruit quality, bacterial titer and disease progress. **Crop Protection** 36:73–82.

Graham JH, Johnson EG, Gottwald TR, Irey MS (2013) Presymptomatic fibrous root decline in citrus trees caused by huanglongbing and potential interaction with Phytophthora spp. **Plant Dis** 97:1195-1199.

Johnson EG, Wu J, Bright DB, Graham JH (2013) Association of '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' root infection, but not phloem plugging with root loss on huanglongbing-affected trees prior to appearance of foliar symptoms. **Plant Pathol**, 63:290-298

Ramadugu C, Keremane ML, Halbert SE, Duan YP, Roose ML, Stover E, Lee RF (2016). Long-Term Field Evaluation Reveals Huanglongbing Resistance in Citrus Relatives. **Plant Dis.** 100(9):1858-1869.

Shen W, Cevallos-Cevallos JM, da Rocha UN, Arevalo HÁ, Stansly PA, Roberts PD, van Bruggen AHC (2013) Relation between plant nutrition, hormones, insecticide applications, bacterial endophytes, and *Candidatus* Liberibacter Ct values in citrus trees infected with Huanglongbing. **European Journal of Plant Pathology** 137(4):727–742.

Soares JM, Tanwir SE, Grosser JW, Dutt M (2020) Development of genetically modified citrus plants for the control of citrus canker and huanglongbing. **Tropical plant pathology** 45(3):237–250.

Xu M, Liang M, Chen J, Xia Y, Zheng Z, Zhu Q, Deng X (2013) Preliminary research on soil conditioner mediated citrus Huanglongbing mitigation in the field in Guangdong, China. **European Journal of Plant Pathology** 137(2):283–293.