

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 09/12/2023.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

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

**Thaís Magni Cavichioli
Bióloga**

**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).**

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 (Participação Virtual)
Centro APTA Citros Sylvio Moreira / Instituto Agronomico de Campinas – IAC

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

Pesquisador Dr. RICARDO HAKAKAVA (Participação 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 (Processo N°:2018/03643-3). 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 (Processo N°: 2019/06412-5).

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 (Processo N°: 2019/06412-5). 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 Marília. 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 ' <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> ' 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 ' <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> '	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/mm²) 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).

Conclusão

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.

Ettxeberria 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* (Citrus 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, Lubyantsov 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.