



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA,
MATEMÁTICA E EDUCAÇÃO
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



NATHÁLIA DA ROZ D' ALESSANDRE

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS PP2 EM PLANTAS
COM HUANGLONGBING E CUSTOMIZAÇÃO DE UM VETOR DE
CLONAGEM PARA SILENCIAMENTO DO GENE *PP2B10*, POR MEIO
DA TECNOLOGIA DE RNA DE INTERFERÊNCIA**

ARARAS

2021

NATHÁLIA DA ROZ D' ALESSANDRE

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS
PP2 EM PLANTAS COM HUANGLONGBING E
CUSTOMIZAÇÃO DE UM VETOR DE
CLONAGEM PARA SILENCIAMENTO DO GENE
PP2B10, POR MEIO DA TECNOLOGIA DE RNA
DE INTERFERÊNCIA**

Monografia apresentada no Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade Federal de São Carlos para obtenção do título de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientação: Dr. Evandro Henrique Schinor
Co-orientação: Dra. Laís Moreira Granato

ARARAS

2021

NATHÁLIA DA ROZ D' ALESSANDRE

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS PP2 EM PLANTAS COM
HUANGLONGBING E CUSTOMIZAÇÃO DE UM VETOR DE CLONAGEM PARA
SILENCIAMENTO DO GENE *PP2B10*, POR MEIO DA TECNOLOGIA DE RNA DE
INTERFERÊNCIA**

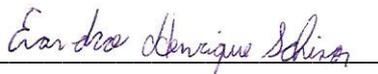
Monografia apresentada no Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade Federal de São Carlos para obtenção do título de Licenciado em Ciências Biológicas.

Data da defesa: 21/01/2021

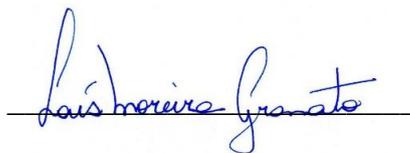
Resultado: Aprovado

BANCA EXAMINADORA

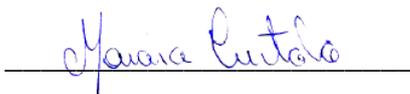
Prof. Dr. Evandro Henrique Schinor
Universidade Federal de São Carlos



Dra. Laís Moreira Granato
Instituto Agronômico de Campinas



Ma. Maiara Curtolo
Universidade Estadual de Campinas



RESUMO

O *Huanglongbing* (HLB) é um dos principais problemas fitossanitários na citricultura atual. As variedades comerciais de laranjas, tangerinas e tangelos são consideradas suscetíveis ao HLB, enquanto *Poncirus trifoliata* e seus híbridos são considerados tolerantes. O HLB é causado pela bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) e os sintomas têm sido relacionados a deposição de calose e ao acúmulo de proteínas de floema (PP2) nos tubos de elementos crivados do floema da planta infectada, provocando a obstrução dos tubos e inibindo o transporte de fotoassimilados ao longo da planta. Em *Arabidopsis thaliana*, as PP2 são codificadas por 30 genes, que são divididas em dois grupos (*AtPP2-A1* a *AtPP2A-15* e *AtPP2-B1* a *AtPP2-B15*). Nesse trabalho, o primeiro objetivo foi avaliar a expressão de seis genes que codificam proteínas do floema (PP2) em *Citrus sinensis* (altamente suscetível) e *Poncirus trifoliata* (tolerante), infectados com CLas. Para os experimentos de RT-PCR, dez plantas de *C. sinensis* e *P. trifoliata* foram inoculadas com borbulhas infectadas com CLas (HLB+) e cinco plantas inoculadas com borbulhas saudáveis. Foi observada uma regulação positiva significativa dos genes avaliados nas plantas HLB+ em comparação com plantas não inoculadas para *C. sinensis*. Para *P. trifoliata*, apenas os genes *pp2B10*, *pp2B13* e *pp2B15* foram regulados positivamente. Também foi observada expressão significativa de regulação positiva de todos os genes avaliados em *C. sinensis* quando comparados a *P. trifoliata*. Com base nesses resultados, o gene *pp2B10* foi selecionado para ser utilizado como alvo de silenciamento por meio da tecnologia de RNA de interferência (RNAi). Dessa maneira, é também mostrado nesse trabalho, o segundo objetivo, que foi customizar um vetor de clonagem, por meio da tecnologia de RNAi, para silenciamento do gene *pp2B10* em laranja doce (*C. sinensis*). Para isso, fragmentos do gene alvo foram clonados em direções opostas no vetor pHANNIBAL, e posteriormente, a construção em *hairpin* sob controle do promotor 35S foi subclonado no vetor pCAMBIA2301. A construção pCAMBIA2301 + *hairpinpp2B10* está sendo utilizado para transformação genética de laranja doce para confirmação da função do gene e obtenção de plantas tolerantes ao HLB.

ABSTRACT

Huanglongbing (HLB) is one of the major phytosanitary problems in today's citrus culture. The commercial varieties of oranges, tangerines and tangelos are considered susceptible to HLB, while *Poncirus trifoliata* and some of its hybrids are considered tolerant. HLB is caused by the bacterium *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) and the symptoms have been related to callose deposition and the accumulation of phloem proteins (PP2) in the phloem-stained element tubes of the infected plant, causing the obstruction of the tubes and inhibiting the transport of photoassimilated throughout the plant. In *Arabidopsis thaliana*, as PP2 are encoded by 30 genes, which are divided into two groups (*AtPP2-A1* to *AtPP2-A15* and *AtPP2-B1* to *AtPP2-B15*). In this work, the first objective was to evaluate an expression of six genes that code phloem proteins (PP2) in *Citrus sinensis* (highly susceptible) and *Poncirus trifoliata* (tolerant), infected with CLas. For the RT-PCR experiments, ten plants of *C. sinensis* and *P. trifoliata* are inoculated with bubbles infected with CLas (HLB+) and five plants inoculated with healthy bubbles. A positive reduction in the genes obtained in HLB+ plants was observed in comparison with plants not inoculated for *C. sinensis*. For *P. trifoliata*, only the *pp2B10*, *pp2B13* and *pp2B15* genes were regulated positively. Positive expression of all genes obtained in *C. sinensis* was also observed when compared to *P. trifoliata*. Based on the results, the *pp2B10* gene was selected to be used as a target for silencing by means of interference RNA (RNAi) technology. Thus, the second objective also exists in this work, which has been customized a cloning vector, using RNAi technology, for silencing the *pp2B10* gene in sweet orange (*C. sinensis*). For this, fragments of the target gene were cloned in opposite escorts in the vector pHANNIBAL, and later, the *hairpin* construction under the control of the 35S promoter was subcloned into the vector pCAMBIA2301. The construction pCAMBIA2301 + *hairpinpp2B10* is being used for genetic transformation of sweet orange to confirm the function of the gene and obtain plants tolerant to HLB.

AGRADECIMENTOS

O desenvolvimento deste trabalho de conclusão de curso contou com a colaboração de diversas pessoas, dentre as quais agradeço:

À minha família, em especial meus pais Moacir e Denise, meu irmão Luciano e meu namorado Helder por todo o apoio incondicional, incentivo e amor;

Aos meus professores, que durante todos esses anos de curso me acompanharam e através de seus ensinamentos permitiram que eu pudesse hoje estar concluindo este trabalho;

Aos meus orientadores por todos os ensinamentos, em especial a Laís, pela amizade, apoio, paciência e por possibilitar a realização deste trabalho;

Aos meus amigos, que sempre estiveram ao meu lado durante esta jornada, especialmente, Ana, Laís, Thaís e Victor, que são um verdadeiro presente que a universidade me proporcionou, pela amizade, carinho e companhia em todas as aulas. E também minhas companheiras de laboratório, Vitória e Maiara, as quais tive prazer de compartilhar essa experiência;

A todos presentes do Centro de Citricultura Sylvio Moreira, Instituto Agrônomo de Campinas e as agências de fomento CNPq e FAPESP, os quais possibilitaram e auxiliaram na realização deste trabalho;

Ao meu cachorro Luck, por sempre estar ao meu lado e tanto me ouvir.

Muitíssimo obrigada!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
1.1. A Citricultura e o <i>Huanglongbing</i>	01
1.2. Proteínas PP2	03
1.3. Tecnologia de RNA de interferência	05
2. OBJETIVOS	07
2.1. Objetivos gerais	07
2.2. Objetivos específicos	07
3. MATERIAL E MÉTODOS	08
3.1. Análise filogenética das proteínas PP2	08
3.2. Material biológico e coleta	08
3.3. Extração de DNA e detecção de CLas	09
3.4. Extração de RNA e síntese de cDNA	10
3.5. PCR quantitativo em tempo real (RT-PCR)	10
3.6. Construção do vetor	11
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	23
REFERÊNCIAS	24

1. INTRODUÇÃO

1.1. A Citricultura e o *Huanglongbing*

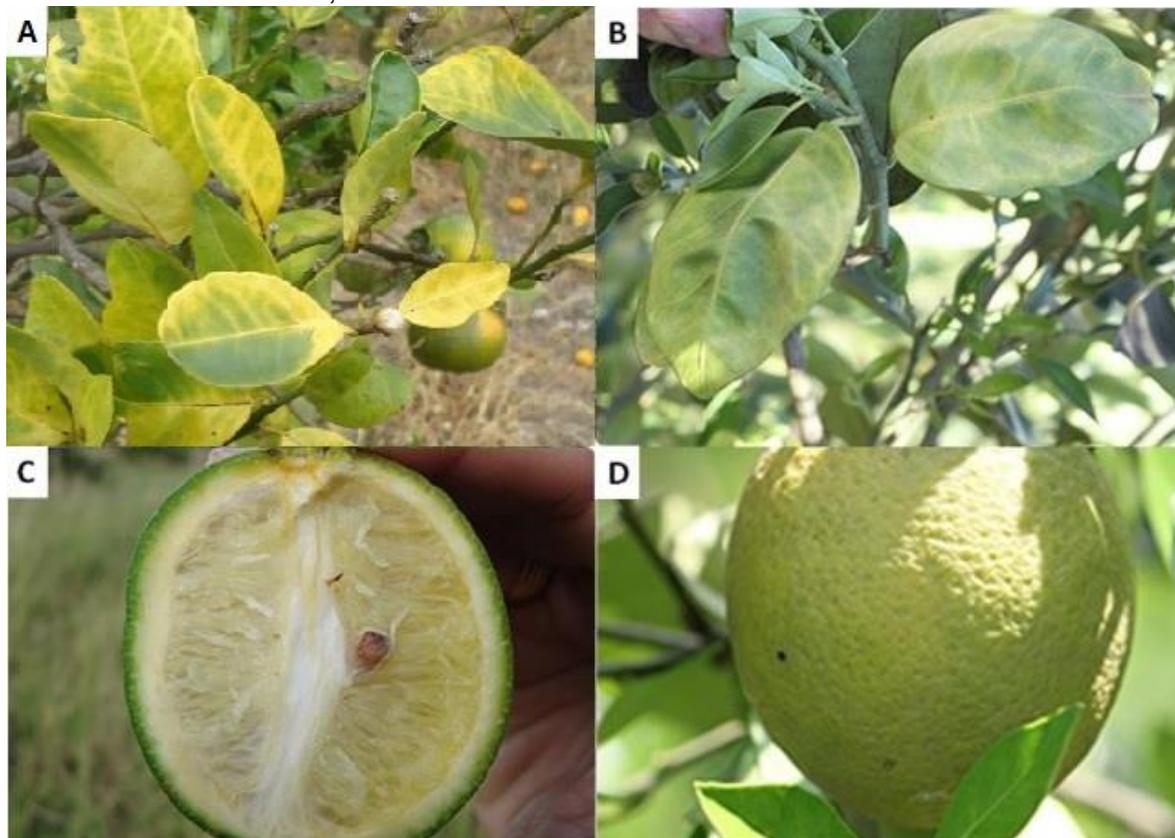
A citricultura é uma das principais e mais tradicionais atividades agrícolas no mundo. O Brasil é um importante fornecedor global de citros e maior exportador de suco de laranja, mantendo 76% de participação no comércio mundial de suco de laranja e 34% da produção mundial de laranja (FUNDECITRUS, 2019). Grande parte dessa produção se deve ao Estado de São Paulo e Minas Gerais, principais regiões citrícolas do país, com aproximadamente 407 mil hectares com pomares de citros (FUNDECITRUS, 2020). Além disso, a citricultura proporciona grande contribuição no crescimento socioeconômico do país, pois está presente em 350 municípios, mais de 200 mil empregos diretos e indiretos e movimentando US\$ 14 bilhões por ano (FUNDECITRUS, 2019).

Apesar do grande potencial produtivo, a citricultura brasileira é constantemente alvo de inúmeras pragas e doenças que são capazes de causar danos irreversíveis nas plantas e frutos, resultando na queda da produtividade e na qualidade dos frutos. Dentre as principais doenças com grande impacto econômico para a citricultura brasileira destacam-se aquelas causadas por bactérias: clorose variegada dos citros (BOVÉ; AYRES, 2007), cancro cítrico (BRUNINGS; GABRIEL, 2003) e *Huanglongbing* (HLB) (COLETTA-FILHO et al., 2004).

O HLB, também conhecido como *Greening*, é causado pela proteobactéria *Candidatus Liberibacter* spp. (BOVÉ, 2006). Das espécies identificadas até o momento, *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) é a mais encontrada no Brasil e tem causado sérios danos às zonas citrícolas de muitos países produtores de laranja (COLETTA-FILHO et al., 2004). CLas é transmitida pelo psílideo *Diaphorina citri* (HALBERT; MANJUNATH, 2004) durante o processo de alimentação.

As folhas de plantas infectadas com HLB geralmente apresentam um padrão mosqueado irregular, com manchas verdes-claros, que tendem ao amarelecimento completo com o tempo e que podem se tornar espessas, coriáceas e com nervuras proeminentes (suberizadas) (Figura 1). Os frutos sintomáticos são pequenos, assimétricos, com manchas esverdeadas, eixo central (columela) arqueado e sementes abortadas (BOVÉ, 2006). O HLB provoca, portanto, a depreciação do fruto e queda da produtividade, pois as plantas se tornam debilitadas e improdutivas (BELASQUE JUNIOR et al., 2009).

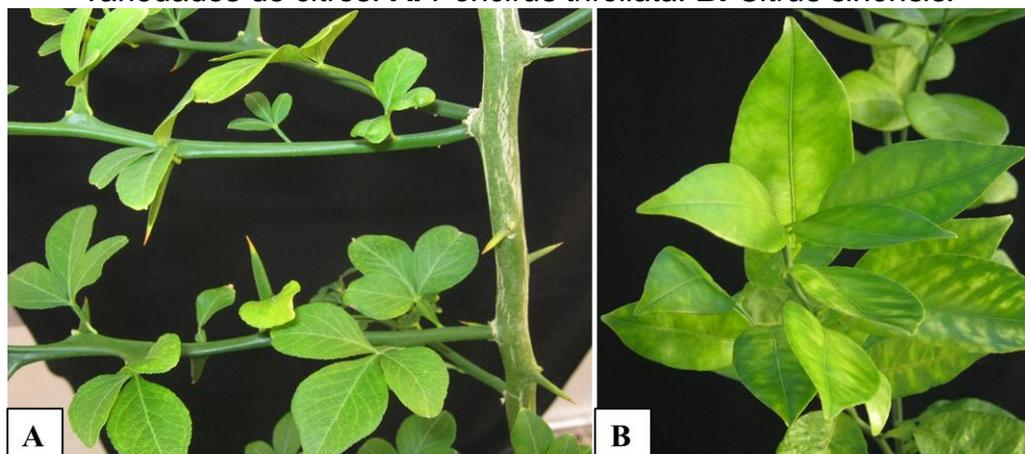
Figura 1. Sintomas do HLB. **A.** Ramos com folhas mosqueadas; **B.** Folhas com clorose, nervuras amareladas e suberizadas; **C.** Fruto com deformação de columela e tamanho reduzido; **D.** Fruto com manchas circulares verde-claras na casca.



Fonte: FUNDECITRUS.

As variedades cítricas demonstram diferentes graus de respostas a infecção por CLas (Figura 2). As variedades comerciais, como as laranjas (*Citrus sinensis*), tangerinas (*C. reticulata* Blanco) e tangelo (*C. reticulata* x *C. paradise*) são os mais suscetíveis a infecção por CLas, apresentando sintomas mais evidenciados. Em contraste, a tolerância a CLas é observada em poucos genótipos, principalmente em *Poncirus trifoliata* e alguns de seus híbridos, nos quais os sintomas de HLB são atenuados e com menor título de CLas (BOAVA et al., 2017; CURTOLO et al., 2020; GRANATO et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2019).

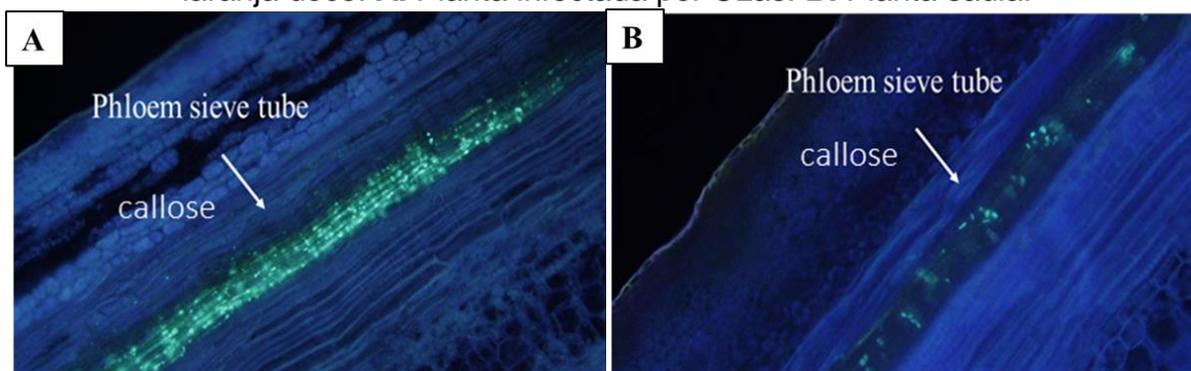
Figura 2. Diferença dos sintomas de plantas infectadas com CLas em diferentes variedades de citros. **A.** *Poncirus trifoliata*. **B.** *Citrus sinensis*.



Fonte: OLIVEIRA et al., 2019.

Os sintomas do HLB têm sido parcialmente relacionados ao acúmulo de calose (Figura 3) e proteínas 2 de floema (PP2) nos tubos de elementos crivados do floema da planta infectada, ocasionando a obstrução dos tubos e interferindo no transporte de fotoassimilados (nitrogênio e compostos de carbono) ao longo da planta (BOAVA et al., 2017; CURTOLO et al., 2020; GRANATO et al., 2019; MAFRA et al., 2013; WANG et al., 2017).

Figura 3. Deposição de calose nos tubos de elementos crivados do floema de laranja doce. **A.** Planta infectada por CLas. **B.** Planta sadia.



Fonte: GRANATO et al., 2019.

1.2. Proteínas PP2

As PP2 são lecitinas de floema bastante conservadas em plantas, e embora estejam associadas com proteínas estruturais do floema, as PP2 são proteínas abundantes na seiva do floema e podem ser translocadas juntamente com os fotoassimilados por longas distâncias (GOLECKI et al., 1999). Em *Arabidopsis*

thaliana são codificadas por trinta genes, que são divididas em dois grupos (*AtPP2-A1* a *AtPP2A-15* e *AtPP2-B1* a *AtPP2-B15*) (DINANT et al., 2003).

Estudos indicam que ao menos quinze dos trinta genes de proteína 2 de floema de *A. thaliana* são transcritos ativamente durante o seu crescimento e desenvolvimento. Além disso, são relatadas a identificação de genes *pp2* em espécies de dezessete gêneros em angiospermas e gimnospermas. Assim, a conservação da expressão das PP2 nas células especializadas do floema em diversos táxons não relacionados sugerem que as PP2 desempenham um papel generalizado no tecido vascular do floema (DINANT et al., 2003).

O acúmulo das proteínas PP2 estão associadas ao mecanismo de defesa contra insetos sugadores do floema, como psílídeos e pulgões (WILL; VAN BEL, 2006) ou ainda a outros estresses como ferimentos e estresse oxidativo (READ; NORTHCOTE, 1983). Na infecção por CLas ocorre forte deposição de proteínas de floema PP2 nos poros das placas crivadas do floema de laranja doce (ALBRECHT; BOWMAN, 2008; BOAVA et al., 2017; WANG et al., 2016), acompanhado de alterações na expressão de genes *pp2B15* e outros envolvidos na via de síntese de calose (ALBRECHT; BOWMAN, 2008; BOAVA et al., 2017; MAFRA et al., 2013). Estudos recentes das variedades de *C. sinensis* e *P. trifoliata* apresentaram que genes codificadores de proteínas do floema são diferencialmente expressos e tiveram suas expressões alteradas quando induzidos por CLas (BOAVA et al., 2017; CURTOLO et al., 2020). Por outro lado, em *Poncirus trifoliata* (considerado tolerante ao HLB), a deposição de calose e proteínas PP2 parece ocorrer somente ao longo de um único tubo crivado, sugerindo que a infecção bacteriana nesse genótipo não migra para vasos laterais, ocasionando redução no transporte de fotoassimilados para os órgãos dreno e acúmulo de fotoassimilados nos órgãos fonte, especialmente folhas (BOAVA et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2019).

A hipótese é que ao desencadear o acúmulo dessas proteínas, a planta reduz ou impede o adequado funcionamento do floema. O acúmulo de amido nas folhas, como ocorre em folhas de citros com HLB (BOAVA et al., 2017), poderia ser a causa primária dos sintomas de mosqueamento (clorose irregular na lâmina foliar) nos órgãos-fonte (folhas). Por outro lado, a deficiência ou falta de transporte de fotoassimilados para os órgãos-dreno, como frutos e raízes, poderia explicar o crescimento irregular (frutos deformados) ou redução do crescimento ou funcionalidade do sistema radicular.

Portanto, a resposta de genótipos de citros suscetíveis à infecção por CLas poderia ser vista como uma resposta de defesa da planta em setores infectados do floema, levando à perda de função. Com o processo de morte celular programada no floema, o bloqueio das placas crivadas por acúmulo de calose e proteínas PP2, acarretando na redução de transporte de fotoassimilados, seriam os mecanismos que levariam à morte do vaso crivado.

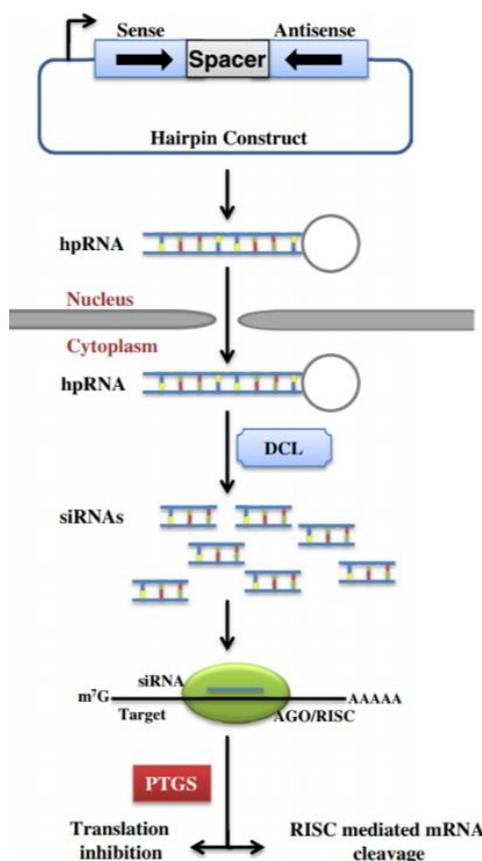
1.3. Tecnologia de RNA de interferência

A tecnologia do RNA interferente (RNAi) é uma das principais ferramentas genômicas para análise funcional de genes. O RNAi leva ao *knockdown* da expressão de genes alvos e tem a capacidade de silenciar vários membros de uma família gênica com uma única sequência de RNA guia, o que é uma grande vantagem dessa técnica (QI; HANNON, 2005). Em plantas, a técnica de RNAi é realizada por meio da expressão de um *hairpin* de RNA (hpRNA) que se dobra para criar um RNA de fita dupla (dsRNA). Estes hpRNAs são potentes indutores de silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS) e dão origem a RNA interferente pequenos (siRNAs) derivados do dsRNA (WESLEY et al., 2001). Entre os métodos comumente utilizados para o silenciamento de genes mediados por hpRNAi em plantas está a transformação estável de plantas por *Agrobacterium* com vetores produtores de hpRNA e a infiltração de culturas de *Agrobacterium* (agro-infiltração) utilizando construções em hpRNA para silenciamento de genes transitórios (PREUSS; PIKAARD, 2003). O silenciamento de genes de maneira estável é conhecido como silenciamento de genes do hospedeiro por *hairpin* de RNA (HGS-hpRNAi). Neste método, a planta hospedeira é geneticamente modificada para alterar sua própria expressão gênica, melhorando sua superioridade agrônômica ou para melhorar a capacidade das plantas contra os estresses biótico e/ou abiótico (SENTHIL-KUMAR; MYSORE, 2010).

A técnica de HGS-hpRNAi, como demonstrado na Figura 4, foi aplicada com sucesso para identificar a função de genes envolvidos no desenvolvimento de plantas (QIAO; YANG; ZHAO, 2007), metabolismo secundário (WAGNER; KROUMOVA, 2008), simbiose (LIMPENS et al., 2004), estresse abiótico (SENTHIL-KUMAR et al., 2010) e vários estresses bióticos (ENRIQUE et al., 2011; NORA et al., 2009).

Figura 4. Estratégia de silenciamento de genes em plantas. Construção típica de RNA em *hairpin* em gancho abriga a sequência alvo separada por um espaçador

como repetições invertidas (na direção sense e anti-sense) conduzidas sob o controle do promotor forte. Um hpRNA loop é formado após transcrição. No citoplasma, o hpRNA é processado em siRNAs por proteínas Dicers (DCLs) e após o carregamento no complexo protéico RISC realizou o silenciamento do gene alvo quer através da inibição da tradução ou por degradação dependente da homologia de transcritos alvo.



Fonte: TIWARI et al., 2014.

A redução da expressão, mediada por RNAi, do gene *OsSSI2* de arroz, aumentou a resistência contra a bactéria *Xanthomonas oryzae* e ao fungo *Magnaporthe grisea* (JIANG et al., 2010). Em citros, o silenciamento do gene *callose synthase 1 (calS1)*, por meio HGS-hpRNAi, demonstrou que esse gene está envolvido no sistema de defesa da planta contra a bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, o que pode ser importante no desenvolvimento de novas estratégias de manejo da doença (ENRIQUE et al., 2011). Para controle do HLB, muitos trabalhos têm sido realizados, usando a tecnologia de RNAi, para redução da expressão de genes do vetor *Diaphorina citri*, entretanto, trabalhos de silenciamento em plantas de citros usando hpRNA ainda são incipientes.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

- Avaliar a expressão de genes codificadores de proteínas de floema (*pp2*) em plantas de laranja doce (*Citrus sinensis*), altamente suscetível, e de *Poncirus trifoliata* (tolerante), infectados com *Candidatus Liberibacter asiaticus*;
- Customizar um vetor de clonagem, por meio da tecnologia de RNA de interferência, para silenciamento do gene *pp2B10* em laranja doce (*C. sinensis*).

2.2. Objetivos específicos

- Comparar a expressão de genes codificados de proteínas de floema (*pp2*) entre *C. sinensis* e *P. trifoliata*;
- Seleção do gene;
- Seleção da sequência-alvo;
- Customização do vetor.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Análise filogenética das proteínas PP2

As sequências dos genes *phloem protein* (*pp2*) foram baseadas nas sequências de *Arabidopsis thaliana*, obtidos na base de dados The *Arabidopsis thaliana* Information Resource - TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>, 2000), e utilizados como molde para busca de sequências ortólogas em citros utilizando a ferramenta BLASTP. Os genes da família PP2 foram identificados no banco de dados de *C. sinensis* (<https://phytozome.jgi.doe.gov>).

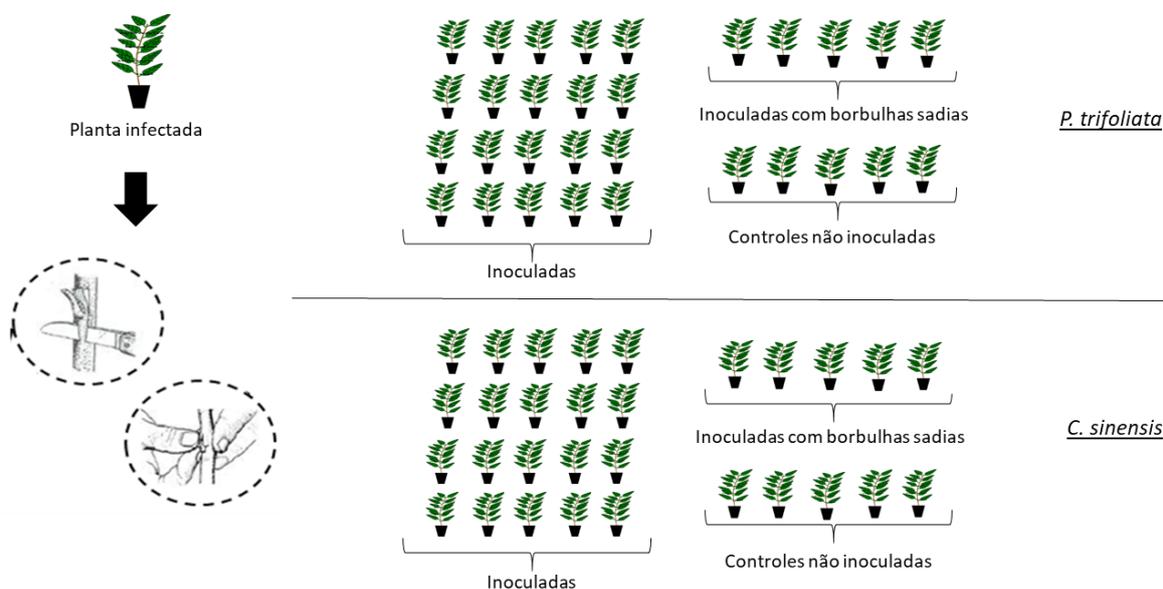
Trinta genes *pp2* são encontrados no genoma de *A. thaliana*, os quais são divididos em dois grupos (A e B). Em *C. sinensis* as sequências tanto das proteínas quanto dos genes são bastante diferentes, por isso, nas análises, foram mantidas somente as sequências com maior grau de similaridade com as sequências de *A. thaliana*.

Alinhamento das sequências foi realizado usando Clustal Omega (Sievers et al., 2011) e árvore filogenética foi construída usando o método neighbor-joining e o programa MEGA7 (Kumar et al., 2016).

3.2. Material biológico e coleta

Foram utilizadas plantas de *P. trifoliata*, como representante tolerante e de *C. sinensis*, como representante suscetível, e mantidas em condições controladas em casa de vegetação do Centro de Citricultura Sylvio Moreira, Cordeirópolis/SP. A inoculação da bactéria foi realizada por enxertia de borbulhas infectadas com CLas em porta-enxertos de limão Cravo de seis meses (*C. limonia* Osb.) em dez indivíduos de cada representante. Também foram enxertadas borbulhas sadias em cinco plantas de cada representante e ainda cinco plantas não inoculadas foram utilizadas como controle, conforme pode ser observado no esquema representativo da Figura 5.

Figura 5. Experimento em casa de vegetação. Inoculação da bactéria CLas por meio de borbulhas.



Fonte: Autoria própria.

Seis meses após a inoculação da bactéria CLas realizou-se a coleta do material biológico. Para isso, foram coletadas de 4 a 5 folhas de cada representante (*P. trifoliata* e *C. sinensis*). Para as análises de expressão gênica foram utilizadas apenas as nervuras centrais das folhas coletadas, utilizando de 4 a 5 folhas de diferentes regiões de cada planta.

3.3. Extração de DNA e detecção de CLas

Folhas de idade e posição semelhantes e mesmo estágio de desenvolvimento foram coletados dos quatro lados das plantas. Pecíolos de cinco folhas foram agrupados e 200 mg foram triturados utilizando duas *beads* metálicas (3 mm de diâmetro) em microtubos de 2 mL a 30 Hz por 120s em um TissueLyser II (Qiagen).

A extração de DNA foi realizada usando o Método CTAB conforme descrito por Murray e Thompson 1980). O DNA precipitado foi dissolvido em 40 μL de água livre de DNase e sua qualidade foi verificada por eletroforese em gel 1% de agarose. A concentração de DNA foi determinada usando NanoDropTM 8000 (Thermo Scientific) e ajustado para 100 ng μL^{-1} .

A detecção de CLas foi realizada por RT-PCR através da amplificação do gene 16S de CLas nas plantas avaliadas.

3.4. Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA total de cada amostra foi isolado individualmente a partir de tecido foliar usando o Direct-zol RNA MiniPrep Kit (Zymo Research). A concentração do RNA foi determinada em espectrofotômetro NanoDrop ND-8000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA). A pureza do RNA foi avaliada através da razão da leitura em espectrofotômetro a 260 nm e 280 nm (A260/A280), que permite estimar a presença de contaminantes, tais como proteínas. Foram consideradas puras, as amostras que obtiveram a razão A260/A280 entre 1.9-2.1. A integridade do tamanho do RNA purificado foi avaliada em gel de agarose 1,0%.

Os cDNAs foram sintetizados a partir de 1,0 µg de RNA total utilizando iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad) de acordo com as instruções do fabricante. O RNA foi preparado para síntese de cDNA em uma reação contendo: 4 µL iScript Reaction Mix (5x), 1 µL iScript Reverse Transcriptase e 1 µg de RNA em um volume total de 20 µL. As seguintes condições de reação foram utilizadas: 25 °C por 5 minutos (*priming*), 46 °C por 20 minutos (*reverse transcription*) e 95 °C por 1 minuto (*RT inactivation*).

3.5. PCR quantitativo em tempo real (RT-PCR)

GAPDH (*glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) e *EF1-K* (*elongation factor 1K*) foram usados como genes de controle interno (MAFRA et al., 2012). Os oligonucleotídeos iniciadores para os genes *pp2* foram desenhados utilizando o Primer Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). A partir dos cDNAs sintetizados, como descrito acima, foi realizado PCR em tempo real utilizando o reagente GoTaq® RT-PCR Master Mix (Promega). A reação consiste de 2,0 µL do cDNA e 120 nM de cada primer gene-específico em um volume final de 15 µL. Amplificações foram realizadas com três repetições técnicas para cada amostra das plantas, incluindo controles negativos e positivos. O ABI PRISM 7500 SDS (Applied Biosystems) foi utilizado para os seguintes ciclos térmicos: 50 °C por 2 min, 95 °C por 10 min e 40 ciclos de 95 °C por 15 s e 60 °C por 1 min.

Para a quantificação relativa, o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ entre as condições de RT-PCR foi aplicado (Livak and Schmittgen, 2001). Inicialmente foi calculado o ΔCT de cada amostra e subtraiu-se os valores de CT dos genes controles (*GAPDH* e *EF1-K*) dos valores de CT do gene alvo. Para o cálculo do $\Delta\Delta CT$ foi utilizada a seguinte fórmula: ΔCT (amostra) – ΔCT (amostra normalizadora). Assim, determinado o $\Delta\Delta CT$, aplicou-se a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$, que resultou no valor da quantificação relativa.

Os dados foram apresentados como *fold change* de plantas saudáveis (cinco repetições biológicas) em comparação com a expressão de plantas HLB + (dez repetições biológicas). Para a análise estatística, foi realizado o teste t de Student a fim de avaliar as diferenças entre as médias dos dois grupos (HLB+ e inoculadas sadias).

3.6. Construção do vetor de clonagem

Fragmentos de DNA de aproximadamente 500pb do gene *pp2B10* foram amplificados usando como molde a sequência do DNA complementar (cDNA) e os *primers* F1 e R1 (contendo os sítios das enzimas *XhoI* e *KpnI*, respectivamente), e os *primers* F2 e R2 (contendo os sítios das enzimas *HindIII* e *BamHI*, respectivamente) (Tabela 1).

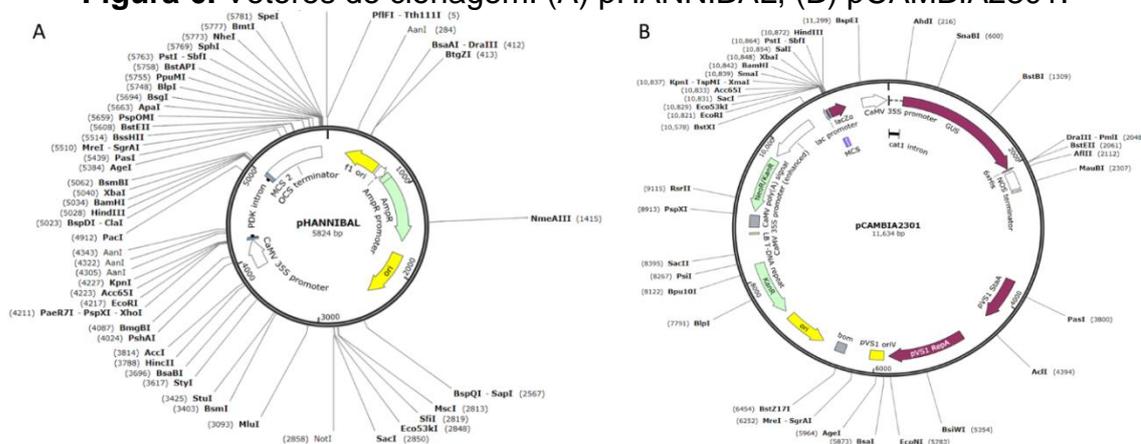
Tabela 1. *Primers* para construção do vetor de silenciamento

F1_02240_Xho	ATTATTCTCGAGTCTGCCGTCCGATTACAAGG
R1_02240_KpnI	ATTATTGGTACCTCTGGATGTCCGAATTTTACGCA
F2_02240_BamHI	ATTATTGGATCCTCTGCCGTCCGATTACAAGG
R2_02240_HindIII	ATTATTAAGCTTTCTGGATGTCCGAATTTTACGCA

Fonte: Autoria própria.

Os fragmentos (F1 e F2) amplificados foram clonados em direções opostas no vetor pHANNIBAL (WESLEY et al., 2001). A construção em *hairpin* sob controle do promotor 35S foi subclonada no vetor pCAMBIA2301 (Figura 6).

Figura 6. Vetores de clonagem. (A) pHANNIBAL; (B) pCAMBIA2301.



Fonte: SnapGene.

O vetor contendo o cassete de interesse (*hairpin*) foi transformado em células competentes da estirpe EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens* via choque térmico, seguindo protocolo previamente estabelecido, utilizando-se 1 µg do vetor (LACORTE; ROMANO, 1998). Após a transformação, a suspensão de *A. tumefaciens* foi plaqueada em meio de cultura LB sólido, suplementado com canamicina (100 mg L⁻¹) e rifampicina (30 mg L⁻¹), e cultivada a 27 °C, por 72 horas. A presença dos vetores em *A. tumefaciens* foi confirmada por meio de PCR com *primers* específicos para os genes em estudo e parte da região promotora.

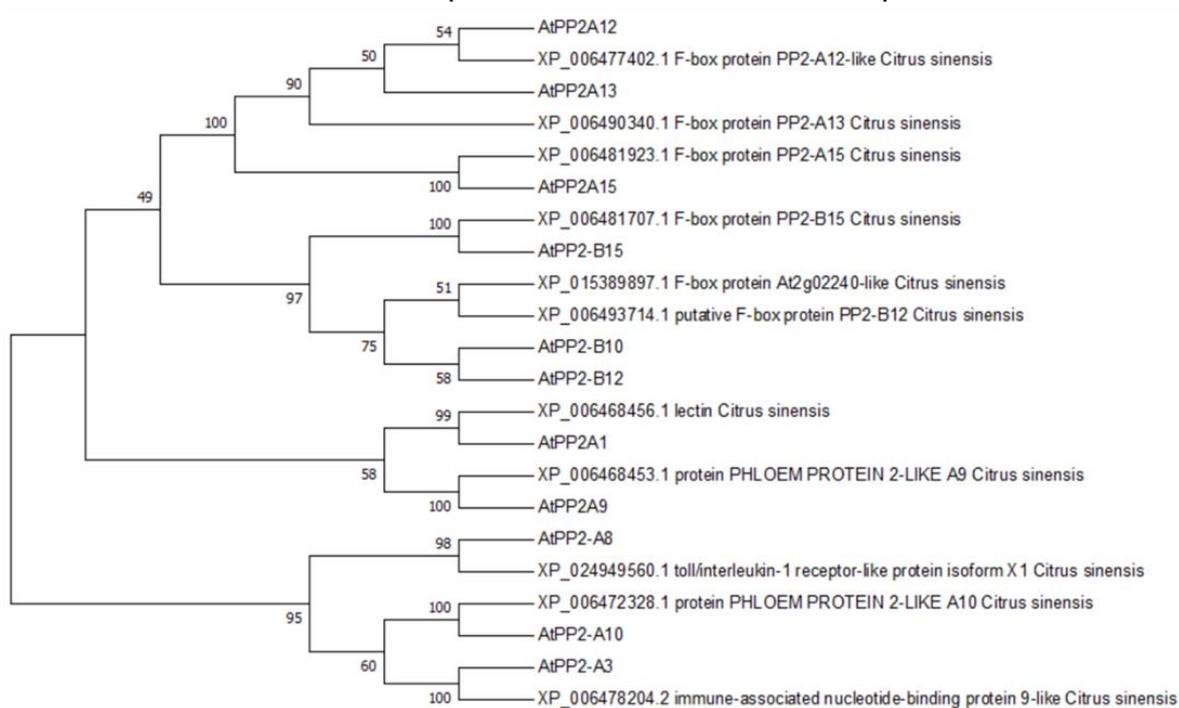
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise das sequências das proteínas PP2

Primeiramente foi realizada a análise das sequências de proteínas PP2 de *C. sinensis*. A partir de análises de alinhamentos de sequências e filogenia pode-se visualizar a correspondência entre as sequências das proteínas PP2. Em *A. thaliana* as proteínas PP2 são codificadas por trinta genes, que são divididas em dois grupos (*AtPP2-A1* a *AtPP2-A15* e *AtPP2-B1* a *AtPP2-B15*) (DINANT et al., 2003), já no genoma de *C. sinensis*, foi possível encontrar correspondência de quatorze sequências ortólogas. Devido as sequências de *C. sinensis*, tanto das proteínas quanto dos genes *pp2* serem bastante diferentes, nas análises filogenia, foram mantidas somente as sequências com maior grau de similaridade com as sequências de *A. thaliana*. Dessa maneira, onze sequências *pp2* foram mantidas, sendo elas: PP2-A1, PP2-A3, PP2-A8, PP2-A9, PP2-A10, PP2-A12, PP2-A13, PP2-A15, PP2-B10, PP2-B12, PP2-B15.

Análises prévias do transcriptoma tem indicado uma super-expressão dos genes *pp2-B10* e *pp2-B15* no floema de plantas infectadas por CLas (MAFRA et al, 2013). Na análise filogenética mostrada na Figura 7 observa-se que as proteínas de *C. sinensis* tem semelhança com sequências de *Arabidopsis thaliana*. As sequências das proteínas PP2B10 (*AtPP2-B10*) e PP2B12 (*AtPP2-B12*) de *A. thaliana* foram agrupados juntas em um primeiro clado, por serem semelhantes, o qual foi também agrupado com um segundo clado formado pelas sequências das proteínas PP2B10 (XP_015389897.1) e PP2B12 (XP_006493714.1) de *C. sinensis*. As sequências das proteínas PP2B15 de *A. thaliana* (*AtPP2-B15*) se agrupou com a sequência correspondente de *C. sinensis* (XP_006481707.1) com *bootstrap* igual a 100.

Figura 7. Análise filogenética das proteínas PP2 de *Citrus sinensis* e *Arabidopsis thaliana* utilizando o método neighbor-joining no programa MEGA7. Valores nos nós internos representam valores de *bootstraps*.



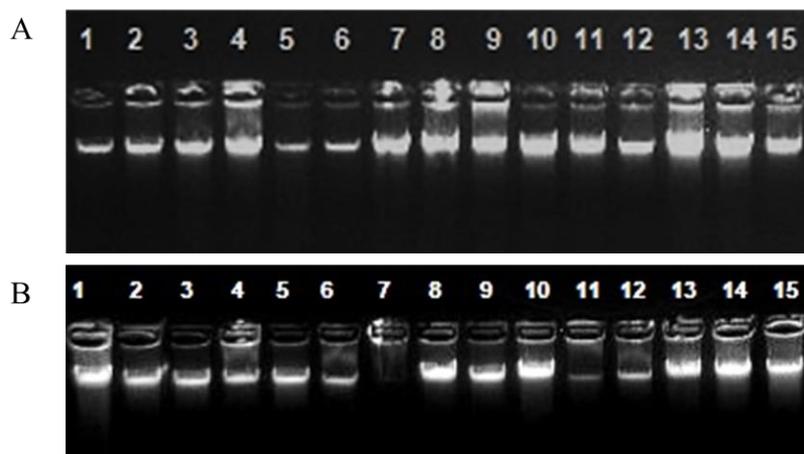
Fonte: Autoria própria.

Estudos das proteínas PP2 em *A. thaliana* indicaram que ao menos quinze dos trinta genes são transcritos ativamente durante o seu crescimento e desenvolvimento (DINANT et al., 2003). Possivelmente, por somente essas quinze proteínas de *A. thaliana* serem mais funcionalmente estudadas, é que menos sequências são anotadas no genoma de *C. sinensis*.

4.2. Confirmação da presença de CLas

Para detecção de CLas realizou-se a extração do DNA das plantas infectadas e sadias de *C. sinensis* e *P. trifoliata*. Além disso, as qualidades desses DNAs extraídos foram averiguadas em gel de agarose, como observada na Figura 8.

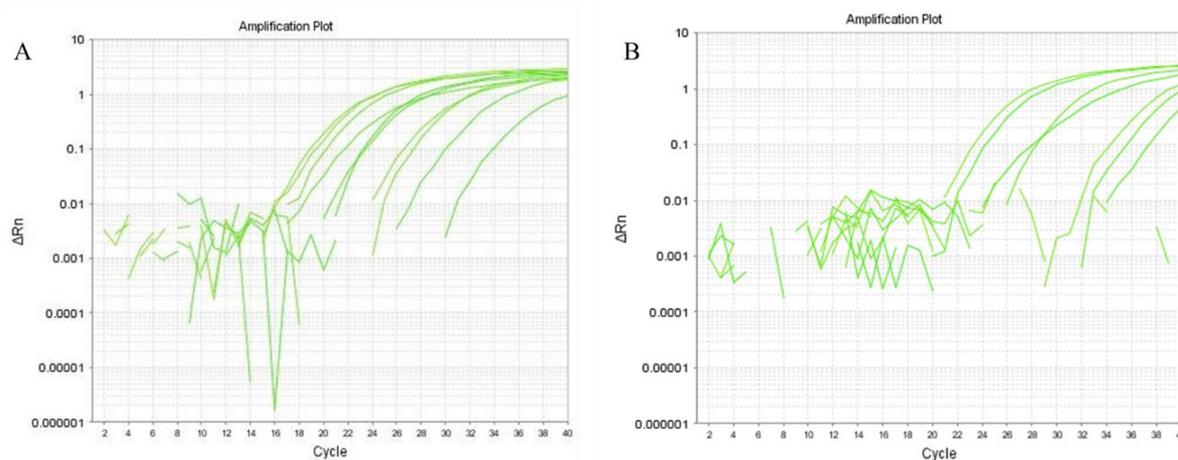
Figura 8. Géis de agarose mostrando o DNA extraído de *Citrus sinensis* (A) e *Poncirus trifoliata* (B). Plantas inoculadas com borbulhas infectadas com CLas de 1 a 10, e inoculadas com borbulhas sadias de 11 a 15.



Fonte: Autoria própria.

Análises de RT-PCR foram realizadas para averiguar a presença da bactéria CLas nas plantas de *C. sinensis* e *P. trifoliata* utilizadas durante as avaliações de expressão gênica. Observa-se na Figura 9A que as 10 plantas de *C. sinensis* foram confirmadas com a presença de CLas, uma vez que houve amplificação do gene 16S de CLas em todas as plantas avaliadas. Já na Figura 9B observa-se que houve amplificação em sete plantas de *P. trifoliata*. Após essas avaliações, somente as plantas positivas foram utilizadas nas análises de expressão dos genes *pp2*.

Figura 9. Amplificação do gene 16S de CLas por RT-PCR. **A.** Gráfico das curvas de amplificação nas plantas de *Citrus sinensis*. **B.** Gráfico das curvas de amplificação nas plantas de *Poncirus trifoliata*.



Fonte: Autoria própria.

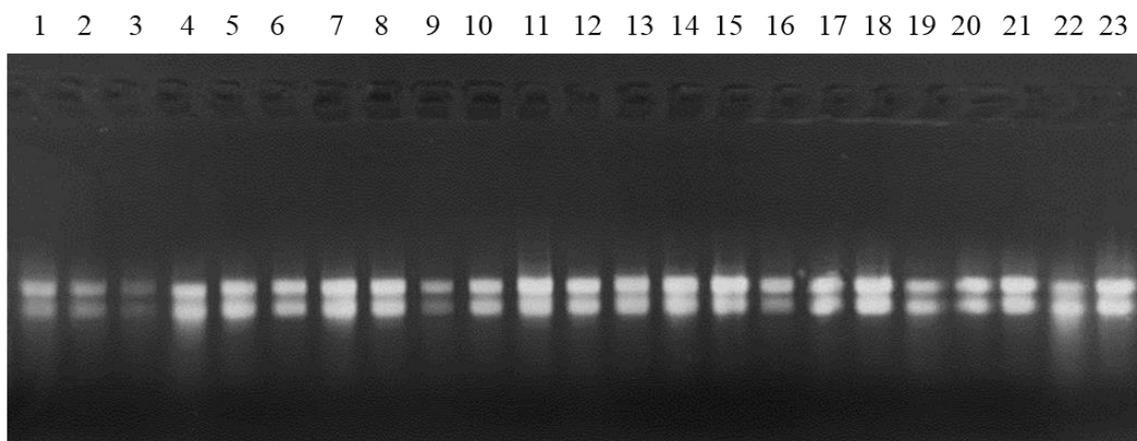
No momento da avaliação da presença da bactéria, todas as plantas possuíam a mesma idade e tempo de inoculação, no entanto, já se observava alguns sintomas característicos de HLB nas plantas de *C. sinensis*, mas não em *P. trifoliata*, concordando com relatos de trabalhos anteriores que mostram que os sintomas de HLB em *P. trifoliata* demoram mais tempo para serem observados e não são muito específicos (OLIVEIRA et al., 2019).

4.3. Estudo da expressão dos genes *pp2* em plantas infectadas com CLas

Para que a expressão dos genes *pp2* possa ser realizada, alguns parâmetros precisaram ser anteriormente considerados bons, entre eles estão a qualidade do RNA observada com eletroforese em gel de agarose 1% e observação das razões A260/A280 e A260/A230 em espectrofotômetro NanoDrop. Amostras consideradas puras possuem as razões A260/A280 e A260/A230 entre 1.9-2.1.

A qualidade das extrações de RNA e tratamento com DNase das amostras de *C. sinensis* e *P. trifoliata* foram confirmadas através de eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 10) e também por meio do NanoDrop (Tabelas 2 e 3). Dessa maneira pode-se observar que não há traços restantes de DNA ou degradação, ou seja, as extrações foram bem-sucedidas e a qualidade do RNA está de acordo com os parâmetros de qualidade pré-estabelecidos.

Figura 10. Gel de agarose 1% mostrando a qualidade do RNA extraído das plantas de *Citrus sinensis* (1 a 10) e *Poncirus trifoliata* (11 a 17), e das plantas de *Citrus sinensis* (18 a 20) e *Poncirus trifoliata* (21 a 23), inoculadas com borbulhas sadias.



Fonte: Autoria própria.

Tabela 2. Leitura do RNA extraído de *Citrus sinensis* por meio do NanoDrop.

Plantas *	Nanogramas μL^{-1}	A260/A280	A260/A230
1	422,0	2,07	2,10
2	394,7	2,09	2,03
3	397,5	2,08	2,03
4	355,8	2,08	1,87
5	405,1	2,07	1,98
6	315,1	2,08	2,07
7	487,1	2,05	2,09
8	369,9	2,09	2,08
9	149,7	2,04	1,97
10	458,9	2,07	2,12
11	199,0	2,10	2,03
12	239,9	2,06	1,95
13	375,7	2,08	2,08
14	259,3	2,05	2,09

*Plantas inoculadas com borbulhas infectadas com CLAs de 1 a 8 e inoculadas com borbulhas sadias de 9 a 14.

Fonte: Autoria própria.

Tabela 3. Leitura do RNA extraído de *Poncirus trifoliata* por meio do NanoDrop.

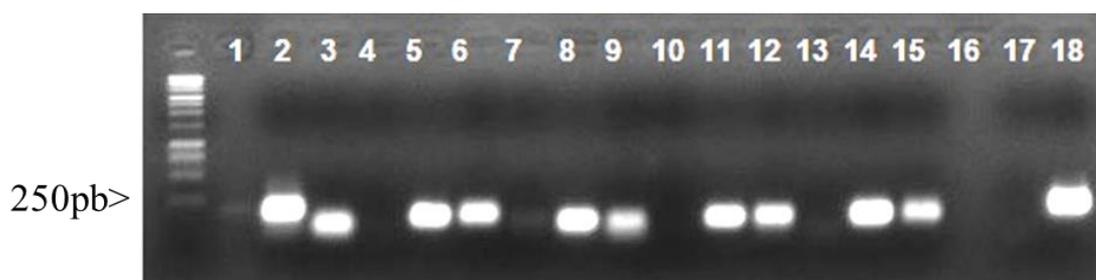
Plantas *	Nanogramas μL^{-1}	A260/A280	A260/A230
1	514,5	2,00	2,04
2	334,4	2,03	1,97
3	580,4	1,98	2,03
4	402,8	2,05	2,15
5	347,7	2,05	2,10
6	512,0	2,02	2,06
7	144,6	2,03	2,03
8	590,2	1,97	2,00
9	170,4	2,02	1,97
10	894,5	2,07	2,13
11	422,5	2,05	2,07
12	219,2	1,98	1,91
13	628,6	2,06	2,16
14	676,1	2,02	2,14

*Plantas inoculadas com borbulhas infectadas com CLAs de 1 a 8, e inoculadas com borbulhas sadias de 9 a 14.

Fonte: Autoria própria.

Além disso, também foi realizado um gel de agarose 1% a fim de verificar a amplificação dos primers *pp2A3*, *pp2A8*, *pp2B1*, *pp2B10*, *pp2B13* e *pp2B15* utilizados na realização do projeto (Figura 11).

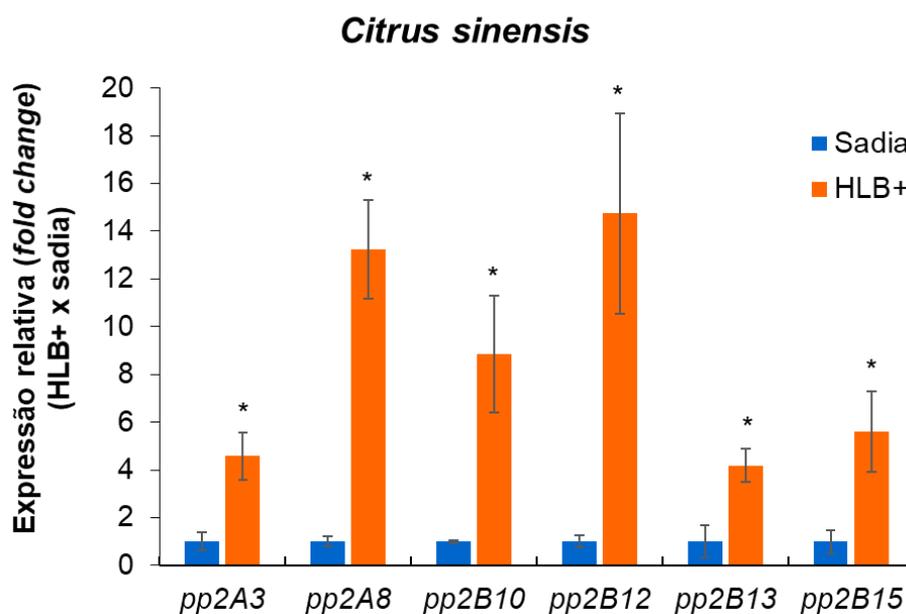
Figura 11. Gel PCR testando eficiências dos *primers*. *pp2A3*: 1 controle negativo, 2 cDNA e 3 DNA. *pp2A8*: 4 branco, 5 cDNA e 6 DNA. *pp2B10*: 7 branco, 8 cDNA e 9 DNA. *pp2B12*: 10 branco, 11 cDNA e 12 DNA. *pp2B13*: 13 branco, 14 cDNA e 15 DNA. *pp2B15*: 16 branco, 17 cDNA e 18 DNA. Marcador Promega 1Kb DNA Ladder.



Fonte: Autoria própria.

Tanto em *C. sinensis* quanto em *P. trifoliata* foi verificada a diferença na expressão relativa dos genes das proteínas do floema das plantas inoculadas com CLas (HLB+) em relação às inoculadas com borbulhas sadias (Sadia), assim como já foi demonstrado por outros autores (BOAVA et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2019; CURTOLO et al., 2020). Nas plantas de *C. sinensis* infectadas com CLas (HLB+) houve o aumento significativo da expressão relativa de todos os genes avaliados em comparação com as plantas sadias, conforme demonstrado na Figura 12. Os genes *pp2A8* e *pp2B12*, foram os que obtiveram maior expressão, seguidos dos genes *pp2B10*, *pp2B15*, *pp2A3* e *pp2B13*.

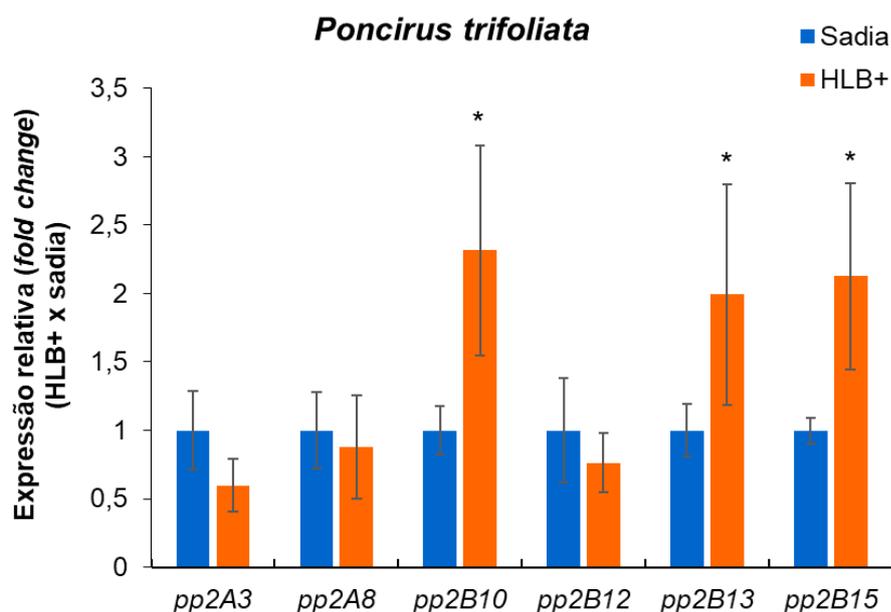
Figura 12. Expressão relativa dos genes *pp2A3*, *pp2A8*, *pp2B10*, *pp2B12*, *pp2B13* e *pp2B15* de proteínas 2 de floema (PP2) entre plantas de *Citrus sinensis* HLB+ (dez réplicas biológicas) e Sadia (cinco réplicas biológicas). Os normalizadores *GAPDH* e *EF1K* foram utilizados. Os dados são apresentados como *fold change* de plantas saudáveis (cinco repetições biológicas) em comparação com a expressão de plantas HLB + (dez repetições biológicas). * indicam valores de *p* significativamente diferentes ($P < 0,05$) no teste t de Student.



Fonte: Autoria própria.

Nas análises de expressão em *P. trifoliata* (Figura 13), os genes *pp2B10*, *pp2B13* e *pp2B15* apresentaram diferenças significativas em relação às plantas sadias. Entretanto, os genes *pp2A3*, *pp2A8* e *pp2B12* foram mais expressos em plantas sadias. De acordo com a literatura, foi relatado a expressão do gene *pp2B15* em resposta a CLas como nove vezes maior para *P. trifoliata* quando comparado a plantas inoculadas sadias (CURTOLO et al., 2020). Em nossas análises, o gene *pp2B10* apresentou uma tendência de ser o mais expresso, enquanto que o gene *pp2B15* foi o segundo gene mais expresso em *P. trifoliata*.

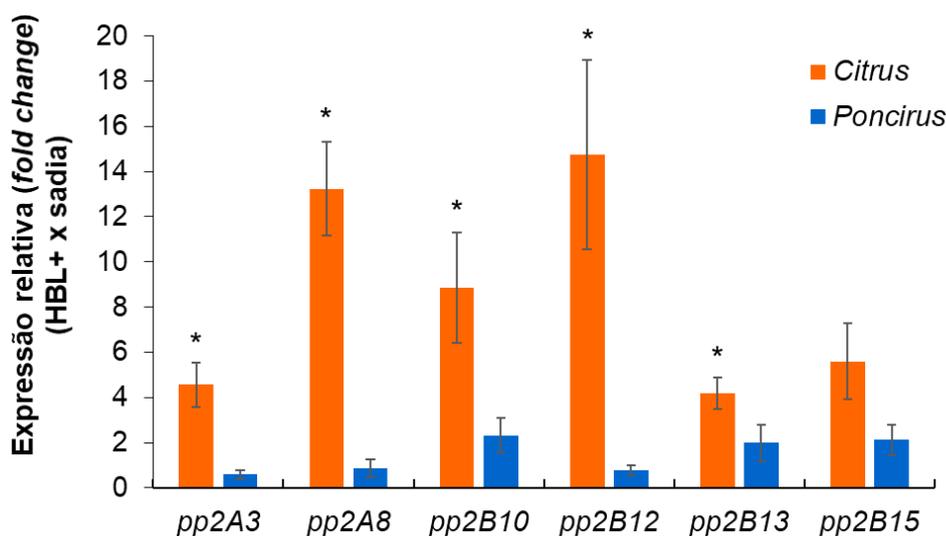
Figura 13. Expressão relativa dos genes *pp2A3*, *pp2A8*, *pp2B10*, *pp2B12*, *pp2B13* e *pp2B15* de proteínas 2 de floema (PP2) entre plantas de *Poncirus trifoliata* HLB+ (dez réplicas biológicas) e Sadia (cinco réplicas biológicas). Os dados são apresentados como *fold change* de plantas saudáveis (cinco repetições biológicas) em comparação com a expressão de plantas HLB + (dez repetições biológicas). * indicam valores de *p* significativamente diferentes ($P < 0,05$) no teste t de Student.



Fonte: Autoria própria.

Quando foi comparada a expressão somente das plantas infectadas (HLB+) de *C. sinensis* com a *P. trifoliata*, observa-se que a maioria dos genes *pp2* avaliados foram significativamente mais expressos em *C. sinensis* (Figura 14). O gene *pp2B15* apesar de ser mais expresso em *C. sinensis*, não apresentou diferença estatística. Isso se deve ao fato deste gene ser bastante expresso em *P. trifoliata*. O gene *pp2B12* exibiu a maior diferença de expressão entre as variedades, sendo o mais expresso para *C. sinensis*, seguido por *pp2A8*. De acordo com a literatura, isto pode ocorrer devido ao fato do *C. sinensis* ser considerado uma variedade mais suscetível ao HLB quando comparado a uma variedade tolerante como o *P. trifoliata* (BOAVA et al., 2017; CURTOLO et al., 2020; GRANATO et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2019).

Figura 14. Expressão relativa dos genes *pp2A3*, *pp2A8*, *pp2B10*, *pp2B12*, *pp2B13* e *pp2B15* de proteínas 2 de floema (PP2) entre *Citrus sinensis* e *Poncirus trifoliata*. Os dados são apresentados como *fold change* de plantas saudáveis (cinco repetições biológicas) em comparação com a expressão de plantas HLB + (dez repetições biológicas). * indicam valores de *p* significativamente diferentes ($P < 0,05$) no teste t de Student.



Fonte: Autoria própria.

Estudos sugerem que apenas plantas suscetíveis, como o *C. sinensis* apresentam deposição de calose e de proteínas PP2 nos vasos do floema, tentando bloquear a propagação sistêmica de CLas, desta forma provocando distúrbios no floema e levando ao acúmulo de amido nas folhas (BOAVA et al., 2017; CURTOLO et al., 2020; GRANATO et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2019). É relatado também uma alta expressão gênica de *pp2B10* e *pp2B15* em citros suscetíveis a HLB quando comparado a *P. trifoliata* (ALBRECHT e BOWMAN, 2008; BOAVA et al., 2017; CURTOLO et al., 2020; MAFRA et al., 2013). Diante disso, os dados obtidos no presente trabalho estão de acordo com a literatura, pois é relatado que em infecções por CLas, a expressão de PP2 é induzida significativamente em *C. sinensis*, em contraste com o observado em *P. trifoliata* (BOAVA et al., 2017; CURTOLO et al., 2020).

Após finalizadas as análises, o gene *pp2B10* foi selecionado por apresentar maior diferença da expressão relativa de plantas HLB+, tanto em *Citrus sinensis* quanto *Poncirus trifoliata*, para a confecção do vetor de clonagem por meio da tecnologia de RNA de interferência para silenciamento do gene *pp2B10*.

4.4. Construção do vetor

Os produtos de PCR dos fragmentos de 500pb (F1 e F2), foram purificados e clonados em direções opostas no vetor pHANNIBAL, como observado na Figura 15.

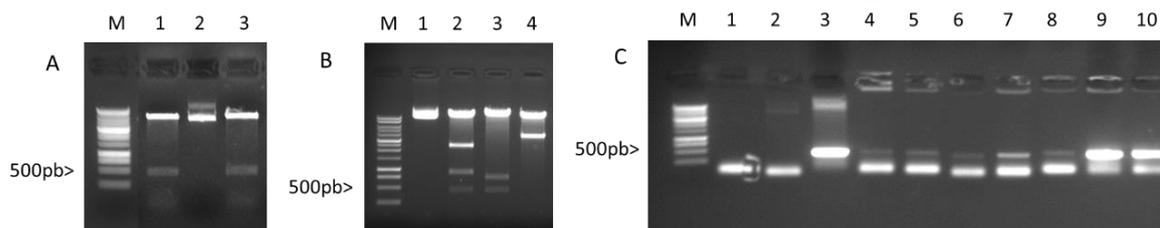
Figura 15. Modelo da construção em *hairpin* (9.293 pb). LB: borda esquerda; RB: borda direita.



Fonte: Autoria própria.

As confirmações das clonagens para silenciamento do gene *pp2B10* pode ser vista na Figura 16. A construção em *hairpin* sob controle do promotor 35S foi subclonada no vetor pCAMBIA 2301 utilizando as enzimas *SacI* e *PstI*. Esse fragmento possui um tamanho de aproximadamente 4000pb e a confirmação da clonagem pode ser observada na figura 16B. Células de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 foram transformadas e a presença do transgene de interesse foi confirmada por PCR do fragmento F1 de aproximadamente 500pb (F ATTCTCGAGTCTGCCGTCCGATTACAAGG e R ATTGGTACCTCTGGATGTCCGAATTTTACGCA) o que pode ser visualizado pela presença do fragmento de tamanho esperado (Figura 16). O vetor pCambia2301 + *hairpinpp2B10* tem aproximadamente 15.547 pb.

Figura 16. Confirmação da customização dos vetores pHANNIBAL e pCAMBIA2301 para o gene *pp2B10*. **A.** Digestão dos fragmentos sense com as enzimas *XhoI* e *KpnI* e do fragmento anti-sense com as enzimas *BamHI* e *KpnI* (1- pHANNIBAL + fragmento sense; 2- pHANNIBAL 3- pHANNIBAL + fragmento anti-sense); **B.** Digestão do fragmento sense + anti-sense com as enzimas *SacI* e *PstI* do vetor pCambia2301 (1 - pCAMBIA2301; 2- pCAMBIA2301+fragmento sense; 3- pCAMBIA2301+fragmento anti-sense; 4- pCAMBIA2301+fragmento 4000pb). **C.** Confirmação das colônias de *Agrobacterium* EHA105 transformadas (1 - branco, 2 a 10 - pCAMBIA2301 + *hairpin* pp2B10). M - Marcador Promega 1 Kb DNA Ladder.



Fonte: Autoria própria.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No genoma de *Arabidopsis thaliana* são encontrados trinta genes de proteínas de floema 2, os quais estão divididos em dois grupos (A e B), enquanto que em *Citrus sinensis* foram encontrados de 14 sequências ortólogas, mas devido a diferença entre as sequências, nas análises filogenia, foram mantidas somente as sequências com maior grau de similaridade com as sequências de *A. thaliana*. Já para os ensaios de expressão foram selecionados seis genes de proteínas 2 de floema (*pp2A3*, *pp2A8*, *pp2B10*, *pp2B12*, *pp2B13* e *pp2B15*).

Os seis genes avaliados (*pp2A3*, *pp2A8*, *pp2B10*, *pp2B12*, *pp2B13* e *pp2B15*) foram mais expressos em *C. sinensis* infectado com HLB, sendo que os genes *pp2A8* e *pp2B10* apresentaram maior expressão, seguidos, respectivamente, dos genes *pp2B12*, *pp2B15*, *pp2A3* e *pp2B13*. Por outro lado, em *Poncirus trifoliata*, apenas prevaleceu a maior expressão dos genes *pp2B10*, *pp2B13* e *pp2B15*. Os demais genes que não se sobressaíram nas amostras de HLB+ nessa variante mais tolerante (*P. trifoliata*), podem não ser tão expressos no tempo utilizado no experimento, o qual foi de seis meses após infecção por CLAs. Além disso, observou-se que os genes *pp2* analisados foram mais expressos em *C. sinensis* do que em *P. trifoliata*.

Por fim, através das análises de expressão foi selecionado o gene *pp2B10*, por ter se mostrado bastante expresso tanto em *C. sinensis* quanto em *P. trifoliata*, para ser alvo do silenciamento pela tecnologia de RNA de interferência (RNAi) em laranja doce. Como primeiro passo, foi mostrado nesse trabalho a construção do vetor pCambia2301 + *hairpinpp2B10*, o qual está sendo utilizado em experimentos de transformação genética de citros para confirmação da função do gene e obtenção de plantas tolerantes ao HLB.

REFERÊNCIAS

- ALBRECHT, U.; BOWMAN, K. D. Gene expression in *Citrus sinensis* (L.) Osbeck following infection with the bacterial pathogen *Candidatus Liberibacter asiaticus* causing Huanglongbing in Florida. **Plant Sci**, v. 175, p. 291-306, 2008.
- BELASQUE JUNIOR, J. et al. Base científica para a erradicação de plantas sintomáticas e assintomáticas de Huanglongbing (HLB, Greening) visando o controle efetivo da doença. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, n. 3, p. 137-145, 2009.
- BOAVA, L. P. et al. Incidence of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*”-infected plants among citrandarins as rootstock and scion under field conditions. **Phytopathology**, v. 105, n. 4, p. 518-524, 2015.
- BOAVA, L. P. et al. Physiologic, anatomic, and gene expression changes in *Citrus sunki*, *Poncirus trifoliata* and their hybrids after *Liberibacter asiaticus* infection. **Phytopathology**, v. 107, n. 5, p. PHYTO-02-16-0077-R, 2017.
- BOLLER, T.; FELIX, G. A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. **Annu. Rev. Plant Biol**, v. 60, p. 379-406, 2009.
- BOVÉ, J. M.; AYRES, A. J. Etiology of three recent diseases of citrus in São Paulo State: sudden death, variegated chlorosis and huanglongbing. **IUBMB life**, v. 59, p. 346–354, 2007.
- BOVÉ, J. M. Huanglongbing: a Destructive , Newly-Emerging, Century-Old Disease of Citrus. **Journal of Plant Pathology**, v. 88, n. 1, p. 7–37, 2006.
- BRUNINGS, A. M.; GABRIEL, D. W. *Xanthomonas citri*: breaking the surface. **Molecular Plant Pathology**, v. 4, p. 141–157, 2003.
- COLETTA-FILHO, H. D. et al. First Report of the Causal Agent of Huanglongbing (“*Candidatus Liberibacter asiaticus*”) in Brazil. **Plant Disease**, v. 88, n. 12, p. 1382–1382, 2004.
- CURTOLO, M. et al. Wide-ranging transcriptomic analysis of *Poncirus trifoliata*, *Citrus sunki*, *Citrus sinensis* and contrasting hybrids reveals HLB tolerance mechanisms. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-14, 2020.
- DALIO, R. J. D. et al. PAMPs, PRRs, effectors and R-genes associated with citrus-pathogen interactions. **Ann. Bot.**, mcw238, 2017.
- DINANT, S. et al. Diversity of the superfamily of phloem lectins (phloem protein 2) in angiosperms. **Plant physiology**, v. 131, n. 1, p. 114-128, 2003.
- ENRIQUE, R. et al. Novel demonstration of RNAi in citrus reveals importance of citrus callose synthase in defence against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Plant Biotechnology Journal**, v. 9, n. 3, p. 394-407, 2011.

FUNDECITRUS. Relatório de Atividades – Junho de 2019/ Maio de 2020. **Fundecitrus**, São Paulo, 2020. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/pdf/relatorios/2020.pdf>>. Acesso em: 12 jan. 2021.

FUNDECITRUS. Quinze anos de greening no Brasil: como a citricultura de SP e MG tem conseguido controlar a doença e se manter como principal produtora de suco de laranja do mundo. **Fundecitrus**, São Paulo, 22 fev. 2019. Disponível em: <<https://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/noticias/integra/quinze-anos-de-greening-no-brasil-como-a-citricultura-de-sp-e-mg-tem-conseguido-controlar-a-doenca-e-se-manter-como-principal-produtora-de-suco-de-laranja-do-mundo/777>>. Acesso em: 12 jan. 2021.

GRANATO, L. M. et al. Callose synthase family genes plays an important role in the Citrus defense response to *Candidatus Liberibacter asiaticus*. **European Journal of Plant Pathology**, 2019.

GOLECKI, B. et al. Translocation of Structural P Proteins in the Phloem. **Plant Cell**, v. 11, n. 1, p. 127-140, 1999.

HALBERT, S. E.; MANJUNATH, K. L. Asian Citrus Psyllids (Sternorrhycha:Psyllidae) and Greening Disease of Citrus: A literature review and assessment of risk in Florida. **The Florida Entomologist**, v. 87, n. September, p. 330-353, 2004.

JIANG, C. J.; et al. Abscisic Acid Interacts Antagonistically with Salicylic Acid Signaling Pathway in Rice–*Magnaporthe grisea* Interaction. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 23, n. 6, p. 791-798, 2010.

JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, v. 444, p. 323-329, 2006.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology And Evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870-1874, 2016.

LACORTE, C.; ROMANO, E. Transferência de vetores para *Agrobacterium*. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. (Eds.). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília, p.93-109, 1998.

LETUNIC, I.; BORK, P. 20 years of the SMART Protein Domain Annotation Resource. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. 1, p. 493-496, 2017.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and. **Methods**, v. 25, p. 402–408, 2001.

MAFRA, V. Reference genes for accurate transcript normalization in citrus genotypes under different experimental conditions. **PLoS One**, v. 7, n. 2. 2012.

MAFRA, V. et al. *Candidatus Liberibacter americanus* induces significant reprogramming of the transcriptome of the susceptible citrus genotype. **BMC Genomics**, v. 14, p. 247, 2013.

MURRAY, M. G.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant ONA. **Nucleic Acids Research**, v. 8, n. 19, p. 4321–4326, 1980.

NORA, S. et al. RNAi-mediated resistance to Potato spindle tuber viroid in transgenic tomato expressing a viroid hairpin RNA construct. **Molecular Plant Pathology**, v. 10, n. 4, p. 459–469, 2009.

OLIVEIRA, T. S.; et al. Genetic analysis of salicylic acid-mediated defenses responses and histopathology in the *huanglongbing* pathosystem. **Citrus Research & Technology**, v. 40, p. 1-13, 2019.

PREUSS, S.; PIKAARD, C. S. Targeted gene silencing in plants using RNA interference. In: ENGELKE, D. (Ed.). **RNA Interference (RNAi) Nuts & Bolts of siRNA Technology**. [s.l: s.n.]. p. 23–36.

QI, Y.; HANNON, G. J. Uncovering RNAi mechanisms in plants: Biochemistry enters the foray. **FEBS Letters**, v. 579, n. 26, p. 5899–5903, 2005.

QIAO, F. et al. Modification of plant height via RNAi suppression of *OsGA20ox2* gene in rice. **Euphytica**, v. 158, p. 35–45, 2007.

READ, S. M.; NORTHCOTE, D. H. Subunit Structure and Interactions of the Phloem Proteins of *Cucurbita maxima* (Pumpkin). **European Journal of Biochemistry**, v. 134, n. 3, p. 561–569, 1983.

SENTHIL-KUMAR, M. et al. Plant Physiology and Biochemistry Functional characterization of three water deficit stress-induced genes in tobacco and *Arabidopsis* : An approach based on gene down regulation. **Plant Physiology et Biochemistry**, v. 48, n. 1, p. 35-44, 2010.

SENTHIL-KUMAR, M.; MYSORE, K. S. RNAi in Plants: Recent Developments and Applications in Agriculture. In: CATALAMO, A. J. Gene Silencing: Theory and Applications, **Nova Science Publishers**, 2010.

TIWARI, M.; SHARMA, D.; TRIVEDI, P. Artificial microRNA mediated gene silencing in plants: progress and perspectives. **Plant Molecular Biology**, v. 86, n. 1-2, p. 1-18, 2014.

WAGNER, G. J.; KROUMOVA, A. B. The Use of RNAi to Elucidate and Manipulate Secondary Metabolite Synthesis in Plants. In: YING, S. Y. Current Perspectives in microRNAs (miRNA), **Springer Science**, 2008.

WANG, N. et al. The *Candidatus* Liberibacter-Host Interface: Insights into Pathogenesis Mechanisms and Disease Control. **Annual review of Phytopathology**, v. 55, n. June, p. 1–32, 2017.

WANG, Y. et al. Transcriptome Profiling of Huanglongbing (HLB) Tolerant and Susceptible Citrus Plants Reveals the Role of Basal Resistance in HLB Tolerance. **Front. Plant Sci.** v. 7, p. 1-13, 2016.

WESLEY, S. V. et al. Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. **The Plant Journal**, v. 27, n. 6, p.581–590, 2001.

WILL, T.; VAN BEL, A. J. E. Physical and chemical interactions between aphids and plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 4, p. 729–737, 2006.

ZHANG, C. et al. Harpin-induced expression and transgenic overexpression of the phloem protein gene *AtPP2-A1* in *Arabidopsis* repress phloem feeding of the green peach aphid *Myzus persicae*. **BMC plant biology**, v. 11, n. 1, p. 11, 2011.

ZHANG, J.; ZHOU, J. M. Plant immunity triggered by microbial molecular signatures. **Mol. Plant**, v. 3, p. 783-793, 2010.