



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS

**CARACTERIZAÇÃO DE PLANTAS TRANSGÊNICAS DE *CITRUS SINENSIS* COM
AUMENTO NA VOLATIZAÇÃO DE METIL-SALICILATO E RESISTÊNCIA
SISTÊMICA ADQUIRIDA NO PATOSSISTEMA HLB**

EDUARDA REGINA FISCHER

Araras

2023



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS

**CARACTERIZAÇÃO DE PLANTAS TRANSGÊNICAS DE *CITRUS SINENSIS* COM
AUMENTO NA VOLATIZAÇÃO DE METIL-SALICILATO E RESISTÊNCIA
SISTÊMICA ADQUIRIDA NO PATOSSISTEMA HLB**

EDUARDA REGINA FISCHER

ORIENTADOR: PROF. DR. HELVÉCIO DELLA COLETTA FILHO

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Produção
Vegetal e Bioprocessos Associados
como requisito parcial à obtenção do
título de MESTRE EM PRODUÇÃO
VEGETAL E BIOPROCESSOS
ASSOCIADOS

Araras

2023

Fischer, Eduarda Regina

Caracterização de plantas transgênicas de Citrus
Sinensis com aumento na volatilização de Metil-Salicilato
e Resistência Sistêmica Adquirida no patossistema HLB /
Eduarda Regina Fischer -- 2023.
58f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São
Carlos, campus Araras, Araras
Orientador (a): Helvécio Della Coletta Filho
Banca Examinadora: Ricardo Harakava, Marco Aurelio
Takita
Bibliografia

1. SAR. 2. Huanglongbing. 3. Transmissão. I. Fischer,
Eduarda Regina. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática
(SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Maria Helena Sachi do Amaral - CRB/8
7083



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Agrárias

Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Eduarda Regina Fischer, realizada em 14/03/2023.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Helvécio Della Coletta Filho (IAC)

Prof. Dr. Ricardo Harakava (IBC-SP)

Prof. Dr. Marco Aurelio Takita (IAC)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados.

AGRADECIMENTOS

Primeiro agradeço à Deus por sempre estar na frente dos meus sonhos, depois minha mãe, dona Lúcia, onde dedico a ela essa conquista. Agradeço-a por sempre depositar em mim sua confiança, apoio, incentivo e amor incondicional. Por nunca, em hipótese alguma poupar esforços para que eu chegasse até aqui. Por sempre ter mostrado que eu sou capaz de conquistar e realizar tudo que eu quiser. Essa vitória não seria possível sem ela e espero tê-la deixado orgulhosa.

Ao meu pai Alfredo e minha família (irmãos, cunhadas e sobrinhos) que estiveram comigo nessa caminhada sempre me apoiando.

Ao meu namorado, Flávio, por estar comigo em todos os momentos, me incentivando e apoiando. Por todo amor, carinho, compreensão e ajuda para eu conseguir realizar mais esse sonho.

Aos meus orientadores Dr. Helvécio Della Coletta Filho e Dra. Alessandra Alves de Souza pela oportunidade, confiança, ensinamentos, apoio, paciência e amizade nesses bons anos juntos. Por me ajudarem no meu crescimento profissional e também pessoal. Essa conquista não seria realizada sem eles.

Aos companheiros de trabalho dentro do Laboratório de Biotecnologia do Centro de Citricultura Sylvio Moreira – IAC, que tiveram grande importância na realização desse trabalho, pela ajuda, companheirismo e amizade; À Universidade Federal de São Carlos – Campus Araras, ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados e aos Docentes pela orientação, ensino, oportunidade, convivência e formação; Aos novos e velhos amigos que estiveram comigo durante o mestrado, pela amizade e apoio durante esses anos em especial a Maiara que não me permitiu desistir e sempre me ajudou em tudo que precisei; e por último mas não menos importante à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES (código 001), pela bolsa de estudos concedida.

SUMÁRIO

Página

ÍNDICE DE FIGURAS	i
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
INTRODUÇÃO	01
OBJETIVOS	03
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	03
REVISÃO DA LITERATURA	04
1 A citricultura brasileira e o HLB.....	04
2 Mecanismos de defesa das plantas e o papel do ácido salicílico (SA).....	06
3 Papel do SA na defesa contra <i>Ca. Liberibacter asiaticus</i> e a atratividade de <i>Diaphorina citri</i>	10
LITERATURA CITADA	11
CAPÍTULO 1. Avaliação de plantas transgênicas de citros expressando o gene <i>CsSAMT</i> e volatilizando o MeSA são mais atrativas ao inseto vetor, <i>D. Citri</i> , e se a atratividade está associada à preferência para pouso e oviposição em relação à planta não transgênica.....	17
1 Resumo.....	17
2 Introdução.....	18
3 Objetivos.....	19
4 Materiais e Métodos.....	20
4.1 Preparo do material vegetal.....	20
4.2 Confirmação quanto à transgenia nos clones desenvolvidos...	21
4.3 Criação de <i>Diaphorina citri</i>	22
4.4 Teste de atratividade de psílídeos em plantas transgênicas x não transgênicas.....	22
4.5 Teste de preferência para pouso e oviposição de psílídeos em plantas transgênicas x não transgênicas - "experimento de escolha múltipla".....	23

5	Resultados e Discussão.....	24
6	Conclusões.....	29
7	Literatura citada.....	29
CAPÍTULO 2. Avaliação da multiplicação de <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> e sintomas do HLB em plantas transgênicas de citros expressando o gene <i>CsSAMT</i>.....		
		32
1	Resumo.....	32
2	Introdução.....	32
3	Objetivos.....	34
4	Materiais e Métodos.....	34
4.1	Preparo do material vegetal.....	34
4.2	Confirmação da inserção gênica nos clones em estudo.....	35
4.3	Avaliação da resistência de plantas transgênicas a CLas.....	35
4.4	Colonização bacteriana x sintomatologia vegetal.....	36
4.5	Estimativa da concentração de CLas nas plantas.....	37
4.6	Análise de calose.....	37
5	Resultados e Discussão.....	37
6	Conclusões.....	43
7	Literatura citada.....	43
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....		
		47

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Literatura Citada	
Figura 1. Principais sintomas do HLB em citros.....	06
Figura 2. Ativação do SAR.....	08
Capítulo 1	
Figura 1. Produção de MeSA em plantas transgênicas.....	20
Figura 2. Representação das gaiolas em forma de H para determinar as escolhas dos adultos de <i>Diaphorina citri</i> em plantas transgênicas vs plantas não transformadas, WT.....	23
Figura 3. Esquema representativo do teste de preferência, ou teste de múltipla escolha.....	24
Figura 4. Identificação de plantas transgênicas superexpressando <i>CsSAMT</i>	25
Figura 5. Avaliação da preferência do psilídeo realizada com todos os eventos transgênicos x WT saudável.....	26
Figura 6. Avaliação de preferência do psilídeo realizada com todos os eventos transgênicos vs. plantas WT infectadas.....	26
Figura 7. Avaliação de preferência para pouso e oviposição de psilídeos utilizando apenas os eventos transgênicos H49 e V44 vs seus respectivos controles, plantas WT.....	28
Capítulo 2	
Figura 1. Concentração de CLas nas plantas transformadas com o gene <i>CrSAMT</i> e não transformadas (WT) determinada ao longo de 2 anos após a inoculação.....	39
Figura 2. Colonização de <i>Candidatus Liberibacter</i> em plantas de laranja doce transgênicas e não transgênicas (WT).....	40
Figura 3. Análises do teor de clorofila nas plantas de laranja doce infectadas com <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> analisadas mensalmente durante 3 meses.....	40
Figura 4. Número de pontos luminescentes relacionados a calose em corte de	

pecíolo de plantas transgênicas <i>CsSAMT</i> e não transgênicas infectadas e não infectadas por CLas. Análises realizadas 180 dias após a infecção.....	41
Figura 5. Diferença do tamanho dos grânulos de calose entre plantas transgênicas do evento H49 e não transgênicas infectadas e infectadas por CLas.....	4
Figura 6. Diferença do tamanho dos grânulos de calose entre plantas transgênicas do evento V44 e não transgênicas infectadas e infectadas por CLas.....	43

CARACTERIZAÇÃO DE PLANTAS TRANSGÊNICAS DE *CITRUS SINENSIS* COM AUMENTO NA VOLATIZAÇÃO DE METIL-SALICILATO E RESISTÊNCIA SISTÊMICA ADQUIRIDA NO PATOSSISTEMA HLB

Autor: EDUARDA REGINA FISCHER

Orientador: Prof. Dr. HELVÉCIO DELLA COLETTA FILHO

RESUMO

Atualmente, Huanglongbing (HLB) é considerada a doença mais devastadora dos citros em todo o mundo. No Brasil, a doença é causada pela bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), que coloniza os vasos do floema de plantas cítricas causando severos sintomas em folhas e frutos. Naturalmente, a bactéria é transmitida pela *Diaphorina citri*, que adquire CLas ao se alimentar de plantas infectadas e transmite para as sadias. O uso de pesticidas químicos tem sido bastante utilizado para o controle do vetor, porém traz consequências negativas para o meio ambiente, além de potencializar o desenvolvimento de insetos resistentes. Plantas geneticamente modificadas são estudadas como alternativa para mitigar a transmissão de CLas. O gene *SAMT*, codifica uma enzima que catalisa a reação do ácido salicílico (SA) a um sinal volátil conhecido como metil salicilato (MeSA), que está envolvido na via de sinalização do sistema de defesa da planta, ativando a Resistência Sistêmica Adquirida (SAR). Recentemente, foi demonstrado que a superexpressão de *SAMT* está envolvida com a resistência ao HLB. Entretanto, a produção do volátil MeSA pode afetar o comportamento do inseto, atuando como atrativo às plantas. Com isso, para o desenvolvimento do trabalho foram utilizadas plantas transgênicas que superexpressam o gene *CsSAMT*, apresentando ativação de genes associados a SAR e maior volatilização de MeSA. Assim, a hipótese do trabalho foi, plantas que superexpressam o gene *CsSAMT*, por volatilizarem o MeSA são mais atrativas a *D. citri*, porém mais resistentes ao HLB devido à ativação de mecanismos de defesa mediados pelo ácido salicílico (SA) e ativação de SAR. Mas, dentre os resultados obtidos em nosso estudo, concluímos que as plantas transformadas que volatizam MeSA não foram mais atrativas ao inseto vetor, pelo contrário, se mostraram menos preferidas por eles. E quanto a resistência das

plantas, após inoculação da bactéria, não foi observada diferença significativa na colonização de CLas entre as plantas.

Palavras-chave: SAR; MeSA; Huanglongbing, Greening, transmissão

CHARACTERIZATION OF TRANSGENIC CITRUS SINENSIS PLANTS WITH INCREASE IN METHYLSALICYLATE VOLATIZATION AND ACQUIRED SYSTEMIC RESISTANCE IN THE HLB PATHOSYSTEM

Author: EDUARDA REGINA FISCHER

Adviser: Prof. Dr. HELVÉCIO DELLA COLETTA FILHO

ABSTRACT

Currently, Huanglongbing (HLB) has been considered the most devastating disease of citrus worldwide. In Brazil, the disease is caused by the bacterium *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), which colonizes the phloem vessels of citrus plants, causing severe symptoms in leaves and fruits. Naturally, the bacterium is transmitted by *Diaphorina citri*, which acquires CLas when feeding on infected plants and transmits it to healthy ones. The use of chemical pesticides has been widely used to control the vector, but with negative consequences for the environment, in addition to enhancing the development of resistant insects. Genetically modified plants have been studied as an alternative to mitigate the transmission of CLas. The *SAMT* gene encodes an enzyme that catalyzes the reaction of salicylic acid (SA) to a volatile signal known as methylsalicylate (MeSA), which is involved in the signaling pathway of the plant defense system, activating Systemic Acquired Resistance (SAR). Recently, *SAMT* overexpression has been shown to be involved in HLB resistance. However, the production of volatile MeSA can affect the behavior of the insect, acting as an attractant for plants. With this, for the development of the work using transgenic plants that overexpress the *CsSAMT* gene and present high levels of MeSA. Thus, we hypothesize that plants that overexpress the *CsSAMT* gene, by volatilizing Methyl salicylate, are more attractive to *D. citri*, but more resistant to HLB due to the activation of SA-mediated defense mechanisms. However, among the results obtained in our study, we concluded that the transformed plants that volatilize MeSA were not more attractive to the insect vector, on the contrary, they were less preferred by them. And as for the resistance of the plants, after inoculation of the bacteria, no significant difference was observed in the colonization of CLas between the plants.

Keywords: SAR; MeSA; Huanglongbing, Greening, transmission

INTRODUÇÃO

O Brasil possui a maior produção de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) do mundo, sendo os Estados Unidos e a União Europeia os principais destinos das exportações do suco de laranja brasileiro (CONAB, 2019). No entanto, o avanço de doenças e pragas capazes de causar danos irreversíveis às plantas e frutos ameaça não só a citricultura brasileira, mas a mundial também.

Dentre as diversas doenças dos citros, o Huanglongbing (HLB), também conhecido como *greening*, é atualmente a mais devastadora doença dos citros em todo o mundo devido a sua rápida disseminação, severidade dos danos e difícil manejo (Sulzbach et al., 2017). Estima-se perdas de até 20% na produtividade das plantas em função do HLB (Fundecitrus, 2022). Um indicativo do impacto do HLB na produção de citros pode ser mensurado pela decrescente produção de frutos na Flórida desde 2005, ano em que esta doença foi oficialmente reportada no estado americano (Spreeen & Zansler, 2016). No Brasil o HLB foi detectado pela primeira vez em 2004 no estado de São Paulo (Coletta-Filho et al., 2004) sendo que atualmente a doença já se encontra presente também nos estados de Minas Gerais, Paraná e Mato Grosso do Sul (Fundecitrus, 2021). Atualmente a incidência média de plantas de citros com sintomas de HLB no cinturão citrícola paulista somado ao triângulo mineiro e sudoeste de Minas Gerais é de 24,42%, correspondendo a mais de 43 milhões de árvores infectadas (Fundecitrus, 2022).

O psilídeo *Diaphorina citri* é o vetor da bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), causadora do HLB. Este inseto ao se alimentar no floema da planta infectada adquire a bactéria e após um período de latência a transmite para as plantas sadias (BOVÉ 2006; Canale et al., 2017). Tecnicamente, no Brasil o manejo desta doença está pautado em ações integradas que envolvem o uso de mudas com qualidade sanitária e livre de patógenos, na erradicação de plantas sintomáticas e intenso controle do vetor (Fundecitrus, 2009). Mesmo que sendo pautado tecnicamente, tais ações tem exigido muito empenho e altos custos para o citricultor, com resultados muitas vezes frustrantes a depender da pressão de inóculo presente, localização geográfica do pomar e idade das plantas.

Face a necessidade do controle intensivo do vetor, na maioria das vezes pelo uso de inseticidas, gerando efeitos prejudiciais ao meio ambiente, resistência das populações alvo e ressurgência de pragas, esforços têm empreendidos para gerar métodos mais eficientes de controle de *D. citri* e com baixo impacto ambiental.

Dentre eles, pode-se citar o uso de: ectoparasitóides como a *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae) (Paiva & Parra, 2012); predadores naturais como algumas espécies da família Coccinellidae (Khan et al., 2016); fungos entomopatogênicos (Hoy; Singh & Rogers, 2010; Yan et al., 2022). Somando-se as ferramentas do controle biológico clássico tem-se as aplicações biotecnológicas, como o silenciamento de genes por meio da aplicação da técnica de interferência de RNA (RNAi) (Killny et al., 2014), o uso de plantas geneticamente modificadas visando resistência a CLas ou com repelência ao inseto vetor, podendo ser ferramentas a serem exploradas para a contenção/manejo do HLB (Belasque Jr et al., 2009; Caserta et al., 2019).

Dentre os sistemas de defesa das plantas ativados com estresses bióticos o que confere a resistência sistêmica adquirida (SAR) é um dos mais estudados. A ativação do SAR acontece no momento em que a planta percebe uma infecção local pelo patógeno (infecção primária), resultando na imunização em outras partes da planta contra infecções subsequentes (Fu et al., 2013; Shah et al. al., 2013; Klessig et al., 2018). O principal agente desse sistema é o gene S-adenosil-L-metionina: ácido salicílico carboxil metiltransferase (*SAMT*) responsável por converter o ácido salicílico (SA) em um sinal volátil, metil salicilado (MeSA). Essa molécula é produzida e translocada para tecidos distais da planta e também para plantas vizinhas, sinalizando para aquelas que não entraram em contato direto com o patógeno (Park et al., 2007; Tieman et al., 2010). Este mecanismo é conservado em todas as plantas e intrínseco ao sistema imunológico (Mauri-López et al., 2019).

Recentemente foi demonstrado que plantas transgênicas de *Citrus sinensis* superexpressando o gene *SAMT* (*CsSAMT*) volatilizam mais o MeSA e ativam SAR, como consequência, foram mais resistentes ao cancro cítrico, doença causada pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Nascimento et al., 2022). Adicionalmente, foi demonstrado por Zou et al. (2019 e 2021) que o MeSA está envolvido com a resistência ao HLB (Zou et al., 2029) e que plantas transgênicas de *C. sinensis* superexpressando o gene *SAMT* são mais tolerantes ao HLB. Por outro lado, o composto volátil pode ser um atrativo ao psíldeo transmissor, uma vez que, o odor emitido pelas folhagens infectadas por CLas é mais atraente para o *D. citri* do que o odor emitido por folhagens saudáveis (Martini et. al, 2016). Mann et al. (2012) detectaram que as folhas infectadas emitem menores quantidades de limoneno e metil antranilato, constituintes importantes para o odor de folhas saudáveis, e

grandes quantidades de MeSA. Ao mesmo tempo em que a emissão de MeSA pode ativar o sistema de defesa, este volátil pode funcionar como um caíromônio (ou aleloquímico), recrutando os psilídeos para as folhas de citros (Patt et. al, 2014). Dessa forma, em busca de uma visão mais sistêmica, além do potencial de resistência ao HLB das plantas transgênicas que superexpressam o gene *SAMT*, a interferência destas quanto a atratividade ao inseto vetor pela volatilização de MeSA necessita ser investigada.

OBJETIVOS

- Avaliar se as plantas transgênicas de citros expressando o gene *CsSAMT* e volatilizando MeSA são mais atrativas ao inseto vetor *D. citri* e se a atratividade está associada à preferência para oviposição, em relação à planta não transgênica (WT)
- Avaliar a multiplicação de *Candidatus Liberibacter asiaticus* e sintomas do HLB em plantas transgênicas de citros expressando o gene *CsSAMT*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Propagar e validar clones de cada evento de laranja doce superexpressando o gene *CsSAMT* quanto a presença do transgene, assim como seus respectivos controles, plantas não transgênicas;
- Inocular CLas por enxertia de borbulhas provenientes de planta sintomática para HLB em algumas plantas de cada evento previamente confirmados;
- Realizar ensaios de atratividade em plantas jovens de todos os eventos transgênicos e WT;
- Realizar ensaios de múltipla escolha para determinar a preferência do psilídeos em ovipositar nas plantas transgênicas ou WT, através da contagem de ovos e ninfas em cada planta;
- Avaliar a população de CLas por qPCR nas plantas infectadas por borbulhas aos 60, 90, 120 e 180 dias e 24 meses após a enxertia.

HIPÓTESE

Plantas que superexpressam o gene *CsSAMT*, por volatilizarem o Metil salicilato (MeSA) são mais atrativas por *D. citri*, porém mais resistentes ao HLB devido à ativação de mecanismos de defesa mediados por SA.

REVISÃO DA LITERATURA

1. A citricultura brasileira e o HLB

O Brasil é o maior produtor de laranja doce do mundo sendo que o cinturão citrícola paulista, o triângulo mineiro e o sudoeste de Minas Gerais são responsáveis pela maior parte da produção nacional. O país responde por 34% da produção mundial de laranja e 76% do comércio mundial de suco de laranja (Neves & Trombin, 2017). Segundo dados do sumário executivo do Fundecitrus (2021), a estimativa para a safra 2022/2023 é de aproximadamente 300 milhões de caixas (41 kg) de laranja. Esse mercado gera cerca de 200 mil empregos diretos e indiretos e contribui para um PIB de US\$ 6,5 bilhões em todos os elos de sua cadeia produtiva (Neves & Trombin, 2017). Somente a exportação de sucos nas formas concentrada (FCJ - frozen concentrate juice) e NFC (not-from-concentrate) é gerado receitas de mais de US\$ 1,4 bilhão em exportações (Comex STAT, 2020). No entanto, o surgimento de doenças tem impactado a produção de laranjas no Brasil, assim como qualidade do suco, trazendo grandes desafios e dificuldades ao setor. Dentre estas doenças destaca-se o HLB (Huanglongbing) ou *Greening*.

A doença HLB é causada principalmente pela bactéria do gênero *Candidatus Liberibacter asiaticus*, sendo esta naturalmente transmitida no Brasil, exclusivamente pelo psílideo, *Diaphorina citri*. A propagação através de material vegetativo contaminado (mudas e gemas) também ocorre, sendo responsável pela disseminação a longas distâncias (Bové, 2006). CLas é uma bactéria Gram-negativa, fastidiosa (Subdivisão α -proteobacteria, Rhizobiales, Rhizobiaceae) e restrita ao floema da planta hospedeira e ao vetor, sendo neste circulativa propagativa (Bové, 2006; Ammar et al., 2011). Por ser um parasita obrigatório (citros e *D. citri*), ainda não foi possível encontrar um método eficiente de isolamento e de cultivo em condições artificiais para CLas, dificultando seu estudo (Merfa et al, 2019).

No floema CLas passa livremente pelas placas crivadas presentes nos elementos do tubo crivado, não formando agregados visíveis capazes de bloquear o floema (Kim et al., 2009). Porém, quando a planta é colonizada pela bactéria, ocorre aumento da expressão de genes relacionados à síntese de amido e grande produção de calose. Essas substâncias são de alto peso molecular e acabam se depositando nos poros da placa crivada, impedindo o transporte de fotoassimilados

para folhas, flores, frutos e raízes (Koh et al., 2012). Com essas alterações anatômicas nos vasos, ocorre acúmulo excessivo de amido nos plastídios, no parênquima vascular, nos elementos do floema e do pecíolo (Kim et al., 2009), o que contribui para o desenvolvimento dos sintomas do HLB.

O inseto, psilídeo *D. citri*, foi identificado no Brasil na década de 40 sendo até 2004 considerada uma praga secundária, pois não causava danos diretos às plantas hospedeiras. No entanto, após 2004, com a identificação de CLas no Brasil, *D. citri* passou a ter a caracterização de vetor, demandando de grande atenção no controle (Sulzbach et al., 2017). As plantas da família Rutaceae são os hospedeiros típicos de *D. citri*, principalmente as murta - *Murraya paniculata* (Lopes et al., 2015), tendo preferência por brotos jovens para se alimentar e se reproduzir. Seu ciclo biológico (ovo-adulto) pode variar conforme a estação do ano (15 dias no verão e até 40 dias no inverno). O processo de aquisição de CLas pelo psilídeo ocorre durante a sua alimentação em plantas infectadas. Após serem ingeridas pelo vetor, CLas se transloca para a hemolinfa e então infecta sistematicamente o inseto. CLas se desloca até atingir os tecidos salivares, sendo a via de transporte para novas plantas hospedeiras quando são expelidas nas secreções salivares durante a sucção da seiva (Kruse et al., 2017). Tanto a fase adulta quanto a ninfal do inseto podem ser infectadas, mas taxas de transmissão mais altas têm sido detectadas por psilídeos que se infectam na fase ninfal e transmitem quando adultos (Canale et al., 2017).

O controle de *D. citri* é realizado principalmente por inseticidas (sistêmicos e de contato) onde recomenda-se rotação de moléculas com diferentes modos de ação, (Yamamoto et. al, 2009). No entanto, o uso indiscriminado desses inseticidas tem levado a efeitos indesejáveis como surtos de pragas secundárias e desenvolvimento de resistência, além de desequilíbrio biológico (Yamamoto; Alves & Beloti, 2015) e aumentos no custo operacional.

Entre os sintomas da doença está o amarelecimento das nervuras e manchas cloróticas difusas nas folhas, formando um mosqueado assimétrico em relação à nervura central. À medida que a doença progride, aparecem mais ramos com folhas totalmente amareladas. A bactéria pode se alojar em vários pontos da planta, o que torna a poda desaconselhável, pois os novos brotos que surgem após a poda ainda servem como novas fontes de infecções (Fundecitrus, 2009). Além disso, os frutos são deformados e assimétricos em relação à columela central, com tamanho reduzido, aborto de sementes, sofrem queda prematura acarretando uma redução

drástica da produtividade assim como a qualidade de suco é bastante comprometida (Bassanezi; Montesino & Stuchi, 2009) (Figura 1).

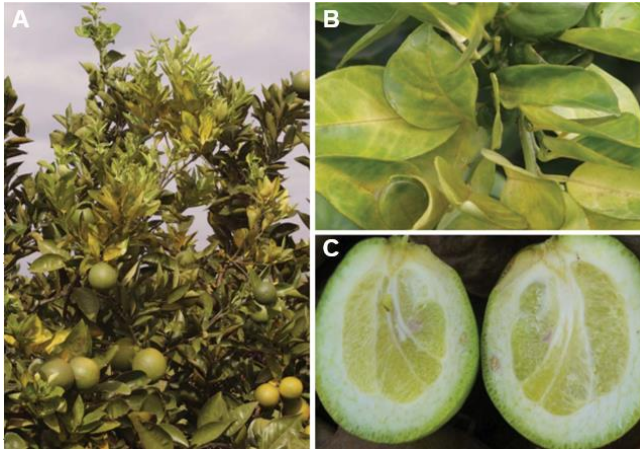


Figura 1. Principais sintomas do HLB em citros. A. Ramos com folhas amareladas. B. Folhas com mosqueamento assimétrico. C. Frutos com desenvolvimento assimétrico em relação ao eixo central e sementes abortadas (Fonte: Fundecitrus, 2009)

2. Mecanismos de defesa das plantas e o papel do ácido salicílico (SA)

As plantas possuem diversos mecanismos de defesa em resposta ao estresse biótico e abiótico, ativando vias locais e sistêmicas para sua adaptação (Dempsey & Klessig, 2012). O reconhecimento de fitopatógenos pode ser dividido em: PTI, sinalização que leva à imunidade mediada por padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), e a resposta imune mediada por efetores (ETI) que é ativada a partir do reconhecimento de proteínas efetoras liberadas pelo patógeno através das proteínas R (Bari & Jones, 2009). Entre as respostas ativadas estão o fluxo de íons de cálcio, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), ativação de MAPK, reprogramação da expressão gênica chave, morte celular programada, ativação de vias de sinalização mediadas por fitohormônios, liberação de voláteis, produção de metabólitos secundários, deposição de calose e lignina, entre outros (Arnaud & Hwang, 2015).

Os fitohormônios atuam como moléculas sinalizadoras na regulação das respostas de defesa contra diversos patógenos, pragas e injúrias (Bari & Jones, 2009). A via de sinalização do ácido salicílico (SA) está relacionada à resposta de defesa contra patógenos biotróficos e hemibiotróficos, enquanto o ácido jasmônico (JA) e o etileno (ET) estão geralmente associados à herbivoria e patógenos necrotróficos (Glazebrook, 2005; Kumar, 2014). O ácido salicílico (SA) é um composto fenólico especialmente relacionado à resistência sistêmica adquirida (SAR), além de desencadear a expressão de proteínas PR-like (KUMAR, 2014) e

fatores de transcrição da família WRKY (Pieterse et al., 2012). Plantas deficientes em SA apresentaram maior suscetibilidade a patógenos (Wildermuth et al., 2001), enquanto plantas pré-tratadas com SA são capazes de aumentar a resistência a doenças causadas por fungos (Crampton et al., 2009), vírus (Singh et al., al., 2004) ou bactérias (Rairdan & Delaney, 2002).

Wang e Liu (2012) e Rodrigues et al (2013) mostraram a importância da ativação do mecanismo de defesa mediada por SA em resposta a *Xanthomonas citri* e *Xylella fastidiosa*, respectivamente. A pulverização exógena de SA em plantas de *C. sinensis* inoculadas com *X. citri* causou um aumento significativo nos níveis endógenos de SA, seguido por uma diminuição na severidade da doença, bem como no crescimento bacteriano (Wang e Liu 2012; Lin et al., 2016; Gómez, 2016). Adicionalmente, a aplicação do SA tem sido utilizada como ativador de resistência para o manejo do HLB (Hu et al., 2018; Li et al., 2019).

A Resistência Sistêmica Adquirida (SAR) é uma resposta de defesa ativada por vias de sinalização mediada pelo SA, responsivas à infecção por patógenos ou por meio de compostos orgânicos exógenos, sendo dependente de um sinal dos tecidos infectados para se estabelecer (Dempsey & Klessig, 2012). Acreditava-se que esse sinal era o SA, mas descobriu-se que para translocar SA pelas plantas era necessário convertê-lo em um sinal volátil, o metil salicilato (MeSA). O SA produzido no local da infecção é convertido em MeSA pela metiltransferase *SAMT*, permitindo sua translocação para os tecidos distais da planta (Shah & Zeier, 2013). Nos tecidos distais, o MeSA é reconvertido em SA pela ação da enzima *SABP2* (Figura 2). O acúmulo de ácido salicílico em tecidos distais não infectados por um patógeno, também aumenta a expressão de genes relacionados à resistência antes de serem colonizados pelo patógeno (Forouhar et al., 2005), denominado de efeito *priming* (Nascimento et al., 2022).

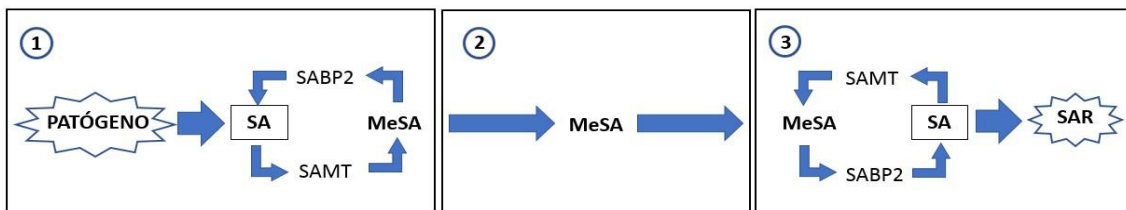
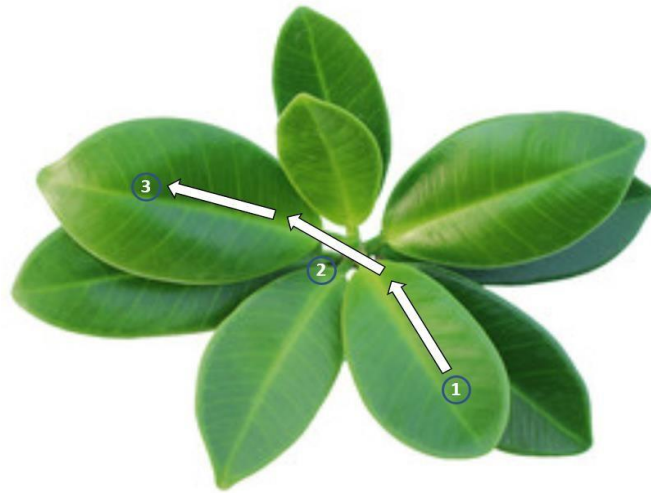


Figura 2: Ativação do SAR. 1: O acúmulo de SA inicia-se na região da infecção através da ação da metiltransferase SAMT, sendo assim convertido em MeSA. 2: O MeSA acumulado é translocado para partes distais da planta. 3: Nas regiões distais o MeSA é convertido em SA pela ação de SABP2, ativando os genes de resposta de defesa e induzindo a SAR.

O Ácido Salicílico Carboxyl Methyltransferase (*SAMT*) pertence ao grupo das O-metiltransferases, conhecidas por utilizar uma ampla gama de substratos, incluindo SA (Chen et al., 2003). Com exceção da planta modelo *A. thaliana* (Koo et al., 2007), plantas transgênicas de culturas comerciais como tomate, soja e citros foram mais resistentes ao patógenos quanto superexpressaram o gene *SAMT* (Park et al., 2007, Lin et al., 2016, Tieman et al., 2010, Gómez et al., 2020, Zhou et al 2020; Nascimento et al., 2022; Zou et al, 2021). Plantas de tomate superexpressando o gene *SrSAMT* infectadas por *X. campestris pv. vesicatoria* acumulou altos níveis de SA e SAG, além de níveis mais elevados de MeSA, resultando em um atraso no desenvolvimento dos sintomas (Tieman et al., 2010). Resultados semelhantes foram observados em soja, onde as plantas transgênicas superexpressando o gene *SAMT* foram mais resistentes ao nematoide do cisto (Lin et al., 2016). Curiosamente, foi

demonstrado em tabaco que a superexpressão de *SAMT* proporciona um aumento quantitativo de MeSA, que, por ser volátil, foi capaz de ativar SAR nos tecidos das plantas vizinhas, tornando-as mais resistentes aos patógenos, desencadeando o efeito *priming* (Park et al., 2007; Gómez et al., 2020).

Para estudar o papel do gene *SAMT* na resistência a *Xylella fastidiosa*, plantas modelo de tabaco foram transformadas com o gene *CrSAMT* de *Citrus reticulata* (Gómez, 2020), uma vez que, essa espécie é resistente a *X. fastidiosa*, e o gene *CrSAMT* foi induzido durante a infecção pelo patógeno (Rodrigues et al., 2013). As plantas transgênicas de tabaco volatilizaram mais o MeSA e foram mais resistentes a *X. fastidiosa*, uma vez que, apresentaram menor população bacteriana e menos sintomas da doença. Além disso, as plantas foram capazes de ativar SAR nas plantas vizinhas não transgênicas, devido a maior volatilização do MeSA. As plantas vizinhas não transgênicas induziram o gene de defesa *PR1* e foram mais tolerantes a *X. fastidiosa*. Com esses resultados, os autores concluíram que a tolerância das plantas pode estar relacionada ao efeito *priming* gerado pelas plantas transgênicas de tabaco.

Além de *Xylella fastidiosa*, trabalhos recentes utilizando plantas de *C. sinensis*, superexpressando o gene *SAMT*, demonstram seu papel em conferir resistência tanto para o cancro cítrico, causada pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, quanto para o HLB, causada pela *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) (Nascimento et al., 2022; Zou et al., 2021, respectivamente). No patossistema do cancro cítrico, foi demonstrado que as plantas transgênicas de laranja doce das variedades Hamlin e Valencia, superexpressando o gene *CsSAMT*, foram capazes de aumentar a volatilização do MeSA e induzir resposta de defesa a infecção primária e secundária do patógeno, diminuindo a população bacteriana e sintomas da doença (Nascimento et al., 2022).

No patossistema HLB, foi inicialmente verificado uma alta expressão do gene *SAMT* em plantas de *Citrus grandis* (tolerante) em comparação com *Citrus sinensis* (suscetível). Os resultados desse trabalho demonstraram o papel da sinalização mediada pelo MeSA em conferir tolerância ao HLB (Zou et al., 2019). Com base nesse estudo, os mesmos autores utilizaram o gene *SAMT* para obter plantas transgênicas de *C. sinensis* da variedade "Jincheng" superexpressando *CsSAMT*. As plantas transformadas aumentaram significativamente os níveis de SA e MeSA e mesmo após dois anos de infecção, apresentaram uma redução significativa dos

sintomas e da população bacteriana em relação às plantas não transgênicas (Zou et al., 2021). Curiosamente, em trabalho mais recente, foi utilizado o gene *SABP2* (ver Figura 2) para transformação de *C. sinensis*, e as plantas supexpressando esse gene também aumentou a expressão de genes de defesa associados a SAR e foram mais resistentes ao HLB (Soares et al., 2022). Porém, apesar do potencial dos genes *SAMT* e *SABP2* conferir mais resistência ao HLB, nada foi explorado sobre o efeito do MeSA em relação a atratividade do inseto vetor.

Tomados em conjunto, esses resultados demonstram o potencial do gene *SAMT*, e consequente sinalização mediada pelo MeSA, em conferir resistência a bactérias patogênicas de citros (Gómez et al., 2020, Zou et al., 2021; Nascimento et al., 2022). Contudo, em relação ao HLB, cuja bactéria é transmitida pelo inseto *Diaphorina citri*, uma maior volatilização do MeSA pode impactar na atratividade da planta pelo vetor (Mann et al., 2012). Assim, estudos sobre a possível atratividade e preferência do vetor sobre essas plantas é fundamental para determinar o real impacto do uso dessa tecnologia para controle do HLB.

3. Papel do SA na defesa contra *Ca. Liberibacter asiaticus* e a atratividade de *Diaphorina citri*

Infecção por CLas afeta o metabolismo das plantas de citros e induz mudanças acentuadas na volatilidade foliar (Martini et. al, 2016). CLas é capaz de sintetizar SA hidrolases nas folhas, suprimindo a defesa da planta hospedeira e consequentemente colonizando o hospedeiro (Li et. al, 2017). Jiang & Wang (2018) demonstraram que a injeção de ativadores de defesa vegetal (incluindo o ácido salicílico) no tronco de citros, resultaram no controle significativo do HLB. A adição de SA superou a ação enzimática, resultando na redução da população de CLas e na severidade da doença. Zou et al. (2019) comparou a tolerância das variedades de pomelo (*Citrus grandis* Osbeck) e laranja doce (*Citrus sinensis* Osbeck) a infecção por CLas e constatou que a colonização bacteriana e os sintomas da doença demoraram mais para se manifestar em pomelo. Foi detectado um acúmulo de MeSA nos tecidos vegetais de pomelo anteriormente e posteriormente à infecção por CLas, evidenciando que MeSA tem um papel importante para a tolerância de citros ao HLB. Por outro lado, o composto volátil pode ser um atrativo ao psílideo transmissor, uma vez que o odor emitido pelas folhagens infectadas por CLas é mais atraente para o *D. citri* do que o odor emitido por folhagens saudáveis (Martini et. al,

2016). Mann et al. (2012) detectaram que as folhas infectadas emitem menores quantidades de limoneno e metil antranilato, constituintes importantes para o odor de folhas saudáveis. Deste modo, ao mesmo tempo em que a emissão de MeSA pode ativar o sistema de defesa, também pode funcionar como um caïromônio (ou aleloquímico), recrutando outros psílídeos para as folhas de citros (Patt et. al, 2014). Em contrapartida, a emissão de voláteis pode atrair *Tamarixia radiata*, uma ninfa parasitoide de *D. citri*, que utiliza os sinais bioquímicos para encontrar plantas infestadas de psílídeos (Patt et. al, 2014). A pulverização de indutores, como o ácido β -aminobutírico (BABA), 2,1,3-benzotiadiazol (BTH) e ácido 2,6 dicloroisonicotínico (INA), retarda o crescimento populacional de CLas e diminui a severidade da doença em aproximadamente 15% a 30% (Li et. al, 2016). Entretanto, dependendo da idade e severidade da doença, os resultados se mostraram não homogêneos e muitas vezes ineficientes. Adicionalmente, trabalhos recentes demonstram que a ativação da via SA e eficiência no mecanismo de defesa da planta, vai depender do tempo de exposição da planta ao inseto vetor, pois o tempo de exposição pode alterar as vias de defesa da planta facilitando a infecção pela bactéria (Ibanez et al., 2019, 2022). Assim, medidas de controle devem levar em consideração todos os aspectos envolvidos no patossistema, para encontrar soluções duradouras que levem em consideração tanto a resistência ao inseto vetor quanto a colonização bacteriana.

LITERATURA CITADA

- Ammar, E.; Shatters Jr, R.G.; Hall, D.G. Localization of Candidatus Liberibacter asiaticus, associated with citrus huanglongbing disease, in its psyllid vector using fluorescence in situ hybridization. *Journal of Phytopathology*, v.159, p. 726-734, 2011.
- Arnaud, D.; Hwang, I. A sophisticated network of signaling pathways regulates stomatal defenses to bacterial pathogens *Molecular Plant*, v. 8, p. 566-581, 2015.
- Bari, R.; Jones, J. D. G. Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology*, v. 69, n. 4, p. 473-488, 2009.
- Bassanezi, R. B.; Montesino, L. H.; Stuchi, E. S. Effects of huanglongbing on fruit quality of sweet orange cultivars in Brazil. *European Journal of Plant Pathology*, v. 125, p. 565-572, 2009.
- Belasque Jr, J.; Bergamin Filho, A.; Bassanezi, R. B.; Barborsa, J. C.; Fernandes, N. G.; Yamamoto, P. T.; Lopes, S. A.; Machado, M. A.; Leite J, R. P.; Ayres, A. J.; Massari, C. A. 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.

Borges, M.; Michereff, M. F. F.; Moraes, M. C. B.; Magalhães, D. M.; Hassemer, M. J.; Laumann, R. A.; Birkett, M. Metodologias para o estudo da defesa de memória (Priming) em plantas frente a estresse biótico. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Circular Técnica, v. 91, p.1-8, 2017.

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.

Canale, M. C.; Tomaseto, A. F.; Haddad, M. L.; Coletta-Filho, H. D.; Lopes, J. R. S. Latency and persistence of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ in its psyllid vector, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). *Phytopathology*, v. 107, n. 3, 264-272, 2017.

Caserta, R.; Teixeira-Silva, N. S.; Grantto, L. M.; Dorta, S. O.; Rodrigues, C. M.; Mitre, L. K.; Yochikawa, J. T. H.; Fischer, E. R.; Nascimento, C. A.; Souza-Neto, R. R.; Takita, M. A.; Boscariolcamargo, R. L.; Machado, M. A.; De Souza, A. A. Citrus biotechnology: What has been done to improve disease resistance in such an important crop? *Biotechnology Research and Innovation*, v. 3, n. 1, p. 95-109, 2019.

Chen, F.; D’auria, J. C.; Tholl, D.; Ross, J. R.; Gershenzon, J.; Noel, J. P.; Pichersky, E. An *Arabidopsis thaliana* gene for methylsalicylate biosynthesis, identified by a biochemical genomics approach, has a role in defense. *Plant Journal*, v. 36, n. 5, p. 577–588, 2003.

Coletta-Filho, H. D. Targon, M. L. P. N.; Takita, M. A.; DE Negri, J. D.; Pompeu JR., J.; Machado, M. A. First report of the causal agent of Huanglongbing (“*Candidatus Liberibacter asiaticus*”) in Brazil. *Plant Disease*, v. 88, n. 12, p. 1382–1382, 2004.

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). *Perspectiva para Agropecuária*. Brasília, 2019. Disponível em: 31 Acesso em: 22 jul. 2021.

Dempsey, D. A.; Klessig, D. F. SOS – too many signals for systemic acquired resistance? *Trends in Plant Science*, v. 17, n. 9, p. 538–545, 2012.

Fu, Z., Q.; Annu, X., D. Systemic Acquired Resistance: Turning Local Infection into Global Defense. *Rev. Plant Biol*, v. 25, n. 64:7.p. 1–7.25, 2013.

Fundecitris (Fundo de Defesa da Citricultura). *Sumário Executivo: Estimativa da safra de laranja 2022/2023 do Cinturão Citrícula de São Paulo e Triângulo /Sudeste Mineiro*.

Fundecitrus (Fundo de Defesa da Citricultura). *Relatório anual 2018*.

Forouhar, F.; Yang, Y.; Kumar, D.; Chen, Y.; Fridman, E.; Park, S. W.; Chiang, Y.; Acton, T. B.; Montelione, G. T.; Pichersky, E.; Klessig, D. F.; Tong, L. Structural

and biochemical studies identify tobacco SABP2 as a methyl salicylate esterase and implicate it in plant innate immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 102, n. 5, p. 1773-1778, 2005

Glazebrook, J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, v. 43, n. 1, p. 205–227, 2005.

Gómez-Krapp, L. M. Avaliação funcional do gene SAMT de *Citrus reticulata* na resistência a fitopatógenos de citros através da superexpressão em *Nicotiana tabacum*. Instituto agrônômico, 2016.

Gómez, L. M.; Teixeira-Silva, N. S.; Caserta, R.; Marques, M. O. M.; DE Souza, A. A. Overexpression of *Citrus reticulata* SAMT in *Nicotiana tabacum* increases MeSA volatilization and decreases *Xylella fastidiosa* symptoms. *Springer*, v. 13, p. 103-252, 2020. DOI:10.1007/s00425-020-03511-1

Gottwald, T. R. Current epidemiological understanding of citrus Huanglongbing. *Annual Review Phytopathol*, v. 48, p. 119–139, 2010.

Holopainen, J. K.; Blande, J. D. Molecular plant volatile communication. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 739, p. 17–31, 2012.

Hu, J.; Jiang, J.; Wang, N. Control of citrus Huanglongbing via trunk injection of plant defense activators and antibiotics. *Phytopathology*, 108: 186 – 195, 2018.

Hoy, M. A.; Singh, R.; Rogers, M. E. Evaluations of a novel isolate of *Isaria fumosorosea* for control of the Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera:Psyllidae). *Florida Entomologist*, v. 1, n. 93, p. 24–32, 2010

Ibanez, F.; Suh, J. H.; Wang, Y.; Rivera, M.; Setamou, M.; Stelinski, L. L. Salicylic acid mediated immune response of *Citrus sinensis* to varying frequencies of herbivory and pathogen inoculation. *Plant Biology*, 22: 7, 2022.

Ibanez, F.; Suh, J. H.; Wang, Y.; Stelinski, L. L. Long-term, sustained feeding by Asian citrus psyllid disrupts salicylic acid homeostasis in sweet Orange. *Plant Biology*, 19: 493, 2019.

Jiang, J. H.; Wang, N. Control of citrus huanglongbing via trunk injection of plant defense activators and antibiotics. *Disease Control and Pest Management*, v. 108, n. 2, p. 186-195, 2018.

Khan, A. A.; Qureshi, J. A.; Afzal, M.; Stansly, P. A. Two-Spotted ladybeetle *Adalia bipunctata* L. (Coleoptera: Coccinellidae): a commercially available predator to control Asian citrus psyllid *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). *PLoS ONE*, v. 9, n. 11, 2016. e0162843

Killiny, N.; Hajeri, S.; Tiwari, S.; Gowda, S.; Stelinski, L. L. Doublestranded RNA uptake through topical application, mediates silencing of five CYP4 genes and

- suppresses insecticide resistance in *Diaphorina citri*. PLoS ONE, v. 9, n.10, p. 1–8, 2014.
- Kim, J. S.; Sagaram, U. S.; Burns, J. K.; Li, J. L.; Wang, N. Response of sweet orange (*Citrus sinensis*) to “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” infection: microscopy and microarray analyses. *Phytopathology*, v. 99, n. 1, p. 50–7, 2009
- Klessig, D., F. et al. Systemic Acquired Resistance and Salicylic Acid: Past, Present, and future. *The American Phytopathological Society*, v. 31, n. 9, p. 871-888, 2018. doi.org/10.1094/MPMI-03-18-0067-CR
- Koh, E. J.; Zhou, L.; Williams, D. S.; Park, J.; Ding, N.; Duan, Y. P.; Kang, B. H. Callose deposition in the phloem plasmodesmata and inhibition of phloem transport in citrus leaves infected with “*Candidatus Liberibacter asiaticus*”. *Protoplasma*, v. 249, n. 3, p. 687–697, 2012.
- Koo, Y. J.; Kim, M. A.; Kim, E. H.; Song, J. T.; Jung, C.; Moon, J. K.; Kim, J. H.; Seo, H. S.; Song, S. I.; Kim, J. K.; Lee, J. S.; Cheong, J. J.; Choi, Y. Do. Overexpression of salicylic acid carboxyl methyltransferase reduces salicylic acid-mediated pathogen resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, v. 64, n. 1–2, p. 1–15, 2007.
- Kruse, A.; Fattah-Hosseini, S.; Saha, S.; Johnson, R.; Warwick, E.; Sturgeon, K.; Muller, L.; Maccross, M. J.; Shatters JR, R. G.; Heck, M. C. Combining 'omics and microscopy to visualize interactions between the Asian citrus psyllid vector and the Huanglongbing pathogen *Candidatus Liberibacter asiaticus* in the insect gut. PLoS ONE, v. 6, n. 12, 2017. e0179531. pmid:28632769
- Kumar, D. Salicylic acid signaling in disease resistance. *Plant Science*, v. 228, p. 127–134, 2014.
- Li, J.; Li, L.; Pang, Z.; Kolbasov, V. G.; Ehsani, R.; Carter, E. W.; Wang, N. Developing Citrus Huanglongbing (HLB) management strategies based on the severity of symptoms in HLB-Endemic Citrus-Producing regions. *Phytopathology*, 109: 582 – 592, 2019.
- Li, J.; Pang, Z.; Trivedi, P.; Zhou, X.; Ying, X.; Jia, H.; Wang, N. ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ encodes a functional salicylic acid (SA) hydroxylase that degrades SA to suppress plant defenses. *Molecular Plant Microbe Interactions*, v30, n. 8, p. 620-630, 2017.
- Li, J.; Trivedi, P.; Wang, N. Field evaluation of plant defense inducers for the control of citrus Huanglongbing. *Phytopathology*, v. 1, n. 106, p. 37–46, 2016.
- Tschaplinski, T. J.; Pantalone, V. R.; Arelli, P. R.; Hewezi, T.; Chen, F.; Stewart, C. N. Transgenic soybean overexpressing GmSAMT1 34 exhibits resistance to multiple-HG types of soybean cyst nematode *Heterodera glycines*. *Plant Biotechnology Journal*, v. 11, n. 14, p. 2100–2109, 2016.

- Lopes, J. R. S.; Parra, J. R. P.; Yamamoto, P. T.; Bento, J. M. S. Psílideoasiático-dos-citros, *Diaphorina citri* Kuwayama. In: Evaldo Ferreira Vilela; Roberto Antonio Zucchi. (Org.). Pragas Introduzidas no Brasil: Insetos e Ácaros. 1ed. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz - FEALQ, 2015, v. 1, p. 299-314.
- Mann, R. S.; Ali, J. G.; Hermann, S. L.; Tiwari, S.; Pelz-Stelinski, K. S.; Alborn, H. T.; Stelinski, L. L. Induced release of a plant-defense volatile 'deceptively' attracts insect vectors to plants infected with a bacterial pathogen. *PLoS pathogens*, v. 3, n. 8, 2012. e1002610 doi: 10.1371/journal.ppat.1002610
- Martini, X.; Willett, D. S.; Kuhns, E. H.; Stelinsil, L. L. Disruption of vector host preference with plant volatiles may reduce spread of insect-transmitted plant pathogens. *Journal of Chemical Ecology*, v. 42, p. 357–367, 2016. doi: 10.1007/s10886-016-0695-x
- Maruri-López, I.; Aviles-Baltazar, N. Y.; Buchala, A.; Serrano, M. Intra and extracellular journey of the phytohormone salicylic acid. *Front. Plant Sci*, v. 10, p. 423, 2019. doi: 10.3389/fpls.2019.00423
- Merfa, M. V., Pérez-López, E., Naranjo, E., Jain, M., Gabriel, D. W., and De La Fuente, L. Progress and obstacles in culturing 'Candidatus *Liberibacter asiaticus*', the bacterium associated with Huanglongbing. *Phytopathology* 109:1092-1101, 2019.
- Neves, M. F., Trombim, V. G. Citrus BR 2017: anuário da citricultura. São Paulo, v. 1, p. 57, 2017.
- Paiva, P. E. B.; Parra, J. R. P. Life table analysis of *Diaphorina citri* (Hemiptera psyllidae) infesting sweet orange (*Citrus sinensis*) in São Paulo. *Florida Entomologist*, v. 95, n. 2, p. 278–284, 2012.
- Patt, J. M.; Robbins, P. S.; Niedz, R.; Mccollum, G.; Alessandro, R. Exogenous application of the plant signalers methyl jasmonate and salicylic acid induces changes in volatile emissions from citrus foliage and influences the aggregation behavior of Asian citrus psyllid (*Diaphorina citri*), vector of Huanglongbing. *PLoS One*, v. 13, n. 3: e0193724. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193724>
- Park, S. W.; Kaimoyo, E.; Kumar, D.; Mosher, S.; Klessig, D. F. Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science*, v. 318, n. 5847, p. 113–116, 2007.
- Pieterse, C. M. J.; Van Der Does, D.; Zamioudis, C.; Leon-Reyes, A.; Van Wees, S. C. M. Hormonal Modulation of Plant Immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, v. 28, n. 1, p. 489–521, 2012.
- Rairdan, G. J.; Delaney, T. P. Role of salicylic acid and NIM1/NPR1 in racespecific resistance in arabidopsis. *Genetics*, v. 161, n. 2, p. 803–811, 2002.

- Rodrigues, C. M.; De Souza, A. A.; Takita, M. A.; Kishi, L. T.; Machado, M. A. RNA-Seq analysis of *Citrus reticulata* in the early stages of *Xylella fastidiosa* infection reveals auxin related genes as a defense response. *BMC genomics*, v. 14, n. 676, p. 1-13, 2013.
- Shah, J.; Zeier, J. Long-distance communication and signal amplification in systemic acquired resistance. *Frontiers in Plant Science*, v. 4, n. 30, p. 1–16, 2013. doi: 10.3389/fpls.2013.00030
- Singh, D. P.; Moore, C. A.; Gilliland, A.; Carr, J. P. Activation of multiple antiviral defence mechanisms by salicylic acid. *Molecular Plant Pathology*, v. 1, n. 5, p. 57-63, 2004.
- Spreen, T. H.; Zansler, M. L. Economic analysis of incentives to plant citrus trees in Florida. *HortTechnology*, 26: 6, 2016.
- Soares, J.M.; Weber, K.C.; Qiu, W.; Mahmoud, L.M.; Grosser, J.W.; Dutt, M. Overexpression of the salicylic acid binding protein 2 (SABP2) from tobacco enhances tolerance against Huanglongbing in transgenic citrus. *Plant Cell Rep.* 41(12):2305-2320, 2022. doi: 10.1007/s00299-022-02922-6.
- Sulzbach, M.; Oliveira, R. P.; Girardl, A. E.; Schwarz, S.; Bertolini, E.; Schneider, L.; gonzatto, M. Huanglongbing (HLB) dos Citros e 36 Estratégias de Manejo Visando Prevenção e Controle. *Embrapa clima temperado*, 2017.
- Tieman, D.; Zeigler, M.; Schmelz, E.; Taylor, M. G.; Rushing, S.; Jones, J. B.; Klee, H. J. Functional analysis of a tomato salicylic acid methyl transferase and its role in synthesis of the flavor volatile methyl salicylate. *Plant Journal*, v. 62, n. 1, p. 113–123, 2010.
- Wang, Y.; Liu, J. H. Exogenous treatment with salicylic acid attenuates occurrence of citrus canker in susceptible navel orange (*Citrus sinensis* Osbeck). *Journal of Plant Physiology*, v. 169, n. 12, p. 1143–1149, 2012.
- Yamamoto, P. T.; Felipe, M. R.; Sanches, A. L.; Coelho, J. H. C.; Garbim, L. F.; Ximenes, N. L. Eficácia de inseticidas para o manejo de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) em citros. *BioAssay*, v. 4, p. 1– 9, 2009.
- Yan, J.; Liu, H.; Idress, A.; Chen, F.; Lu, H.; Ouyang, G.; Meng, Z. First record of *Aspergillus fijiensis* as a Entomopathogenic Fungus against Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera Liviidae). *Journal of Fungi*, 8, 1222. <https://doi.org/10.3390/jof8111222>
- Zou, X.; Zhao, K.; Liu, Y.; Du, M.; Zheng, L.; Wang, S.; Xu, L.; Peng, A.; He, Y.; long, Q.; Chen, S. Overexpression of Salicylic Acid Carboxyl Methyltransferase (CsSAMT1) Enhances Tolerance to Huanglongbing Disease in Wanjincheng Orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). *Int. J. Mol. Sci.* v. 22, p. 2803, 2021. <https://doi.org/10.3390/ijms22062803>

Zou, X.; Bai, X.; Wen, Q.; Xie, Z.; Wu, L.; Peng, A.; He, Y.; Xu, L.; Chen, S. Comparative Analysis of Tolerant and Susceptible Citrus Reveals the Role of Methyl Salicylate Signaling in the Response to Huanglongbing. *Journal of Plant Growth Regulation*, p. 1-13, 2019. doi.org/10.1007/s00344-019-09953-6

CAPÍTULO 1. Avaliação de plantas transgênicas de citros expressando o gene *CsSAMT* e volatilizando o MeSA quanto a atratividade e preferência a *Diaphorina citri*

1. Resumo

Diaphorina citri é o inseto vetor da bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus*, que causa a doença conhecida como Huanglongbing (HLB), uma das principais doenças de citros. As plantas infectadas apresentam drástica redução na produção e qualidade dos frutos. O processo de alimentação do inseto é visto como uma das principais formas de disseminação da doença, pois ao se alimentar de uma planta infectada, os psíldeos adquirem CLas e a transmitem para plantas saudáveis. Diversos estudos estão sendo desenvolvidos visando interferir neste processo de transmissão, onde o uso sistemático de defensivos químicos com objetivo de diminuir a população do vetor é ainda a principal medida utilizada. No entanto, este uso sistêmico tem trazido consequências negativas para o meio ambiente, além de potencializar o desenvolvimento de insetos resistentes. O desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas pode ser uma alternativa para mitigar a transmissão de CLas. O gene *SAMT* codifica uma enzima que catalisa a conversão de ácido salicílico (SA) em um sinal volátil conhecido como metilsalicilato (MeSA). Sabe-se que MeSA está envolvido na via de sinalização de defesa da planta (Resistência Sistêmica Adquirida). Existem evidências que a superexpressão de *SAMT* pode resultar no aumento da tolerância ao HLB. No entanto, foi demonstrado que a volatilização do MeSA pode ser atrativa aos insetos em plantas recém infectadas. Portanto, o objetivo do trabalho foi verificar se plantas superexpressando *CsSAMT* são mais atrativas a *D. citri*. Para isso, clones saudáveis e infectados por CLas de 2 diferentes linhagens transgênicas superexpressando *CsSAMT* e volatilizando maiores concentrações de MeSA foram testadas quanto a preferência, pouso e oviposição do inseto vetor. Os dados obtidos permitem concluir que as plantas transgênicas expressando altas concentrações de MeSA não foram mais atrativas

aos insetos vetores da bactéria CLas quando comparada as não transgênicas. Ou seja, as altas concentrações de MeSA pelas plantas transformadas não interferiu na escolha dos insetos pelas plantas. A preferência maior dos insetos foi pelas plantas não transgênicas (WT) o que leva a hipótese que MeSA não é o único e principal volátil associado a atratividade dos insetos.

Palavras-chave: Greening, SAR, transmissão, volátil, atratividade

2.Introdução

A *Diaphorina citri*, popularmente conhecida como psílídeo, vem sendo considerado umas das principais pragas da citricultura mundial, uma vez que este inseto é o vetor da bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), agente causador da doença conhecida como Huanglongbing (HLB) (Bové, 2006). Todas as cultivares de citros em maior ou menor grau são susceptíveis a CLas, cujos sintomas ocorrem nas folhas e frutos, podendo inclusive levar a morte da planta (Gottwald, 2010; Shokrollah et al. 2009).

Pode-se afirmar que o controle da doença exige ações integradas passando principalmente pela redução da população do inseto vetor (Bové, 2006). A aquisição da bactéria pelo inseto acontece quando este se alimenta da seiva de uma planta infectada, e a inoculação, no momento em que as secreções salivares do inseto infectado entra em contato com o floema de plantas saudáveis (Ammar et al. 2020). O ciclo biológico do psílídeo consiste em ovos, cinco fases ninfais e a fase adulta. É bem conhecido que as fases ninfais de *D.citri* adquirem muito mais eficientemente CLas que os adultos, pois passam mais tempo se alimentando-se no floema das plantas (Inoue et al. 2009, Pelz-Stelinski et al., 2010). Ainda, como CLas multiplica-se dentro dos insetos maiores títulos de CLas são observados em adultos oriundos de ninfas infectadas, tendo estas maiores eficiências na transmissão da bactéria (George et al. 2018). As estratégias de controle contra *D. citri* está no uso de inseticidas sistêmicos e de contato, preferencialmente com diferentes modos de ação (Yamamoto et. al, 2009). No entanto, o uso cada vez mais frequente dos inseticidas pode levar a efeitos indesejáveis, como exemplo o desenvolvimento de resistência do inseto a determinadas moléculas, além do desequilíbrio biológico nos pomares uma vez que os inseticidas hoje disponíveis são de amplo espectro (Yamamoto; Alves & Beloti, 2015).

Os insetos podem ser atraídos ou repelidos pelas plantas por várias formas diferentes. No caso de *D.citri*, a coloração dos brotos jovens e os voláteis liberados pelas plantas são os dois principais fatores que levam os psilídeos a encontrar e aceitar seus hospedeiros (Wu et al. 2015). Porém, esses fatores podem influenciar em sua alimentação e até oviposição, pois ao serem atraídos pela planta (pela coloração e/ou volátil) não quer dizer que tenham interesse em alimentar e ou se reproduzir na mesma (Mann et al. 2012).

Um dos voláteis bastante estudado atualmente é o Metil salicilato (MeSA). O MeSA é um volátil produzido e translocado em plantas como estratégia de defesa quando atacadas por patógenos e insetos sugadores, resultando na imunização nas outras partes da planta (Fu et a., 2013; Klessig et al., 2018; Shah et al., 2013; Walling, 2000). O volátil atua também na sinalização para plantas vizinhas as quais diretamente não entram em contato com o patógeno, ativando seu sistema de defesa, a resistência sistêmica adquirida (Gómez et al., 2020). Em citros, Nascimento et al., 2022 demonstraram que plantas transgênicas superexpressando o gene *CsSAMT* e volatilizando o MeSA em maiores concentrações, foram mais tolerantes as bactérias *Xanthomonas citri* e *Xylella fastidiosa*, agentes causais do Cancro Cítrico e da Clorose Variegada dos Citros (CVC), respectivamente. Ainda, Zou et al., (2021) observaram que plantas de citros superexpressando o gene *CsSAMT1* apresentaram maior tolerância a CLas.

Apesar destes conhecimentos acerca das respostas positivas de plantas de citros a infecção por patógenos bacterianos, não se tem informação na literatura quanto a capacidade de plantas transgênicas volatilizando o MeSA, infectadas ou não por CLas, em afetar o comportamento de *D. citri*. Baseada nas informações de literatura, a hipótese deste trabalho é que plantas superexpressando o gene *CsSAMT* são mais resistentes ao HLB devido a ativação dos mecanismos de defesa mediado por SA, porém, por volatilizarem MeSA, são mais atrativas pelos psilídeos.

3. Objetivos

- Propagar e validar clones de cada evento de laranja doce (*C. sinensis* L. Osbeck) superexpressando o gene *CsSAMT* quanto a presença do transgene, assim como seus respectivos controles, plantas não transgênicas (WT);
- Realizar ensaios de atratividade em plantas jovens com os eventos transgênicos e WT;

- Realizar ensaios de múltipla escolha para determinar a preferência do psilídeos em ovipositar nas plantas transgênicas ou WT, através da contagem de ovos e ninfas em cada planta;

4. Materiais e Métodos

4.1. Preparo do material vegetal e inoculação com CLas

Borbulhas das plantas matrizes transgênicas de laranja doce (*C. sinensis* L. Osbeck) dos eventos H49 e V44 obtidas por Nascimento et al (2022), foram utilizadas para enxertia em plantas de limão Cravo para produção dos clones que foram utilizados nos experimentos. Nascimento et al (2022) demonstraram que nestes dois eventos houve uma significativa volatilização do MeSA em relação a planta não transgênica (Figura 1).

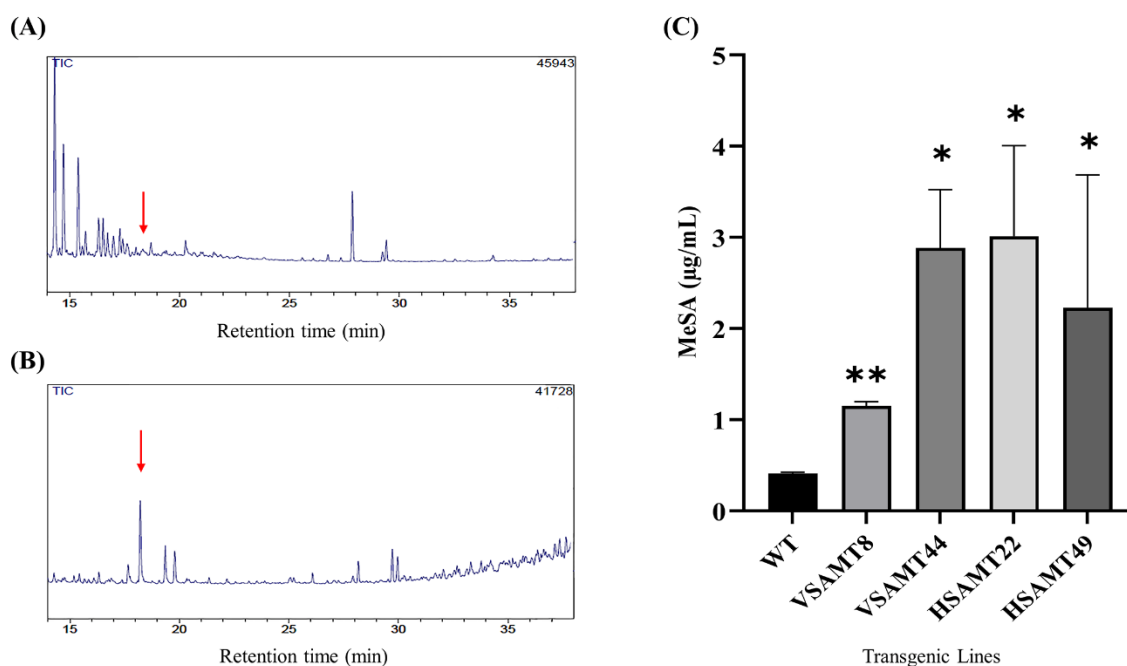


Figura 1. Produção de MeSA em plantas transgênicas. Cromatogramas representativos adquiridos de WT. A. Cromatogramas obtidos de plantas não transgênicas. B. Obtidos de plantas transgênicas superexpressando *CsSAMT* (HSAMT22), ambos através de cromatografia de gás e espectroscopia de massa (GC/MS) obtidos pelo método quantitativo (SIM). Em A e B as setas vermelhas representam o pico MeSA em um tempo de retenção de 18,3 min. C. Determinação da produção de MeSA nos eventos *CsSAMT* e plantas WT. As barras representam as médias de três réplicas biológicas extraídas de plantas inteiras usando um método de headspace e analisadas por GC/MS. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas com base no teste t de Student (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$) em relação aos valores obtidos para WT. Figura retirada do artigo de Nascimento et al (2022).

Após pegamento da enxertia, o ramo de limão Cravo foi cortado para que a copa fosse apenas da variedade transgênica. Vinte clones para cada evento foram produzidos. O mesmo procedimento foi realizado com plantas não transgênicas da mesma variedade, ou seja, Valência e Hamlin utilizadas como controles, denominados WT.

As inoculações com CLas foram realizadas em plantas transgênicas e não transgênicas por meio de enxertia de borbulhas retiradas de plantas com sintomas de HLB e testadas positivas para CLas por meio de qPCR. Em cada planta foi enxertado, na haste principal, cinco borbulhas em lados opostos. O sucesso das transmissões de CLas foi monitorado por meio de qPCR e somente as plantas positivas foram usadas nos ensaios. O mesmo procedimento de enxertia foi realizado nas plantas não inoculadas, porém usando de borbulhas retiradas de plantas sabidamente saudáveis.

4.2. Confirmação quanto à transgenia nos clones desenvolvidos

A confirmação da transgenia dos clones das plantas transgênicas foi realizada utilizando duas metodologias: *i.* análise histoquímica, utilizando o gene *udlA* presente no vetor como marcador e *ii.* Reação em cadeia da polimerase (PCR) para confirmação da inserção do gene *CsSAMT*. Para análise histoquímica da β -glucuronidase (GUS), foram coletadas partes do tecido foliar das plantas transgênicas e imersas em tubos contendo a solução de X-GLUC (5-bromo-cloro-3-indolil- β -D-glucuronídeo). As amostras foram incubadas por cerca de 20 horas a 37°C em ausência de luz posteriormente lavadas com uma solução de ácido acético e etanol (3:1). As plantas que apresentaram a cor azul foram consideradas como positivas.

Das plantas positivas para análises de GUS foram extraídas o DNA total pelo método CTAB (Murray & Thompson, 1980), e quantificado em espectrofotômetro ND-8000 NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, Estados Unidos). Os componentes das reações de amplificação foram; *i.* tampão GoTaq para um volume final da reação de 25 μ l, *ii.* 100ng de DNA total, *iii.* 60 μ M dos dNTPs, *iv.* 0,2 μ M de cada iniciador, e *v.* 1,25U de GoTaq DNA polimerase (Promega, Madison, WI, Estados Unidos). As amplificações foram realizadas em termociclador programado para etapa inicial de denaturação a 95°C por 5min seguindo-se 35 etapas de 94°C

por 30s, 58 e 60 °C por 30s, 72°C por 30s e uma extensão final a 72°C por 10min. Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose a 1%. Os primers utilizados foram confeccionados com o promotor FMV utilizando o Terminador CaMV35S para evitar a amplificação do endógeno gene *SAMT*, uma vez sequencias idênticas deste foram encontradas no genoma de laranja doce (*C. sinensis*).

4.3. Criação de *Diaphorina citri*

Insetos saudáveis foram criados em plantas *Murraya paniculata* (Murtas), conforme descrito por Souza Pacheco et al. (2020). Resumidamente, eram utilizadas gaiolas de plásticos (45 cm de comprimento; 45 cm de largura; 55 cm de altura), utilizando de quatro a seis plantas de murtas por gaiolas contendo de 240 a 360 insetos iniciais. As gaiolas foram mantidas no Centro de Citricultura Sylvio Moreira / IAC em uma sala com temperatura entre 24°C a 27°C, fotoperíodo de 14:10 h (claro:escuro) e 35 a 70% de umidade relativa (UR).

4.4. Teste de atratividade de psilídeos em plantas transgênicas x não transgênicas

O experimento foi realizado conforme Wu et al. (2015) utilizando duas gaiolas (30 cm de largura; 30 cm de comprimento; 50 cm de altura) com um cilindro conectando-as formando um “H” (13 cm de circunferência; 15 cm de comprimento), sendo uma planta transgênica colocada em uma gaiola e uma planta não transgênica na outra (Figura 2). Ambas as plantas tinham apenas um único caule e o mesmo número de folhas. As gaiolas foram protegidas da luz externa para que os insetos não fossem influenciados, a fim de proporcionar apenas um estímulo olfativo. Aproximadamente cem psilídeos adultos foram liberados no dispositivo através de um microtubo que era posicionado no centro do tubo de conexão horizontal entre as gaiolas. A lacuna foi fechada após o lançamento dos insetos. Após a soltura dos psilídeos, o número destes em cada uma das plantas foi contado quatro vezes ao dia, a cada duas horas, durante três dias consecutivos. O experimento foi repetido quatro vezes com cada evento transgênico utilizando plantas infectadas e não infectadas. As gaiolas foram mantidas nas mesmas condições descritas acima para a criação.

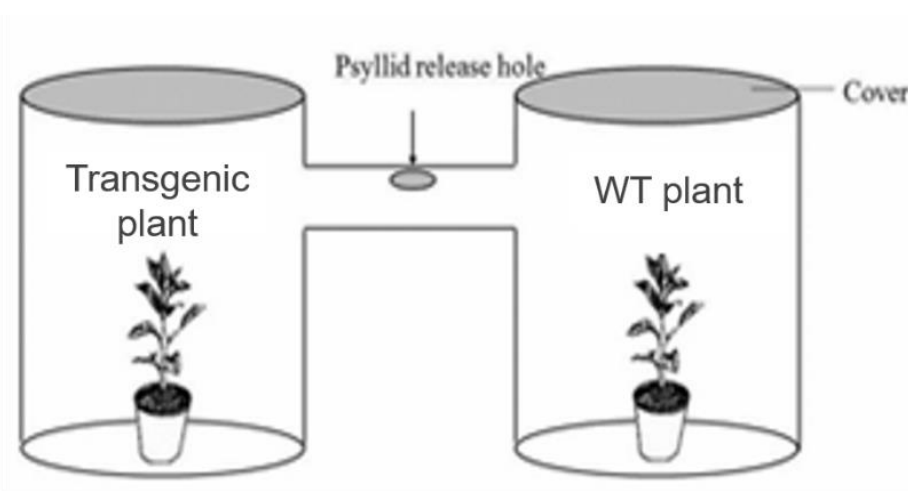


Figura 2. Representação das gaiolas em forma de H para determinar as escolhas dos adultos de *Diaphorina citri* em plantas transgênicas X plantas não transformadas, WT. Figura adaptada de Wu et al. (2015).

4.5. Teste de preferência para pouso e oviposição de psilídeos em plantas transgênicas x não transgênicas - "experimento de escolha múltipla"

O fato do psilídeo ser atraído por voláteis não significa que ele tenha preferência pela planta (Zhao, 2013), ou seja, após a prova ele pode não permanecer na planta e conseqüentemente não ovipositar sobre esta. Dessa forma, para determinar se os psilídeos têm menos ou mais preferência pelas plantas transgênicas em relação às plantas não transgênicas (WT), um experimento de múltipla escolha foi realizado. Duas plantas transgênicas e duas plantas WT da mesma variedade, todas apresentando brotos da mesma idade foram colocadas na mesma gaiola (45 cm de comprimento; 45 cm de largura; 55 cm de altura). Em seguida dez pares (macho / fêmea) de insetos foram soltos para acasalamento onde permaneceram por sete dias. Após a oviposição, os adultos foram retirados da gaiola e os ovos e ninfas de quinto ínstar foram contados com uma lupa portátil. Um total de quatro gaiolas foram avaliadas por evento. O experimento foi conservado a 24°C sob fotoperíodo 14:10 (claro:escuro) e 30 a 70% de umidade relativa (UR). Gaiolas de controle com apenas plantas WT foram montadas em cada experimento para avaliar possível interferência externa (dados não mostrados).

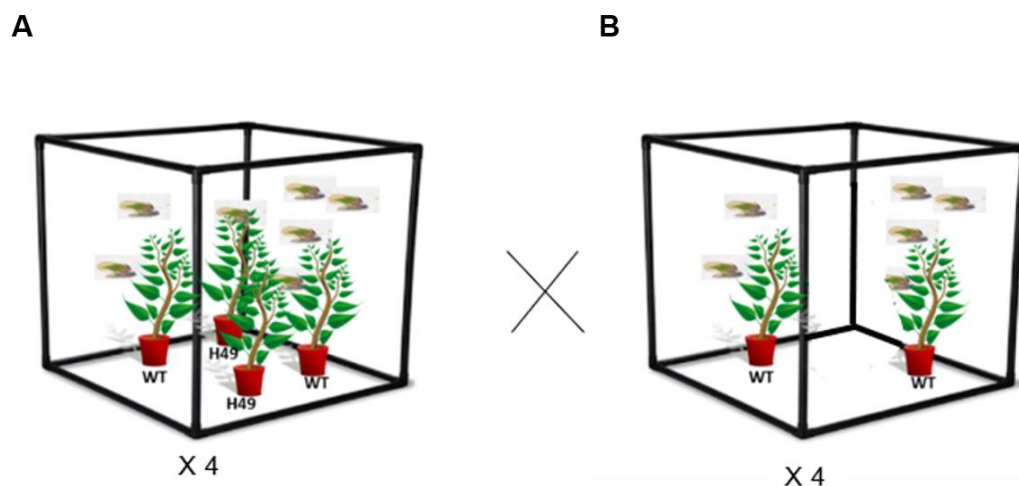


Figura 3. Esquema representativo do teste de preferência, ou teste de múltipla escolha. A. Representa o experimento de “escolha múltipla”, onde foram colocados dois clones do evento transgênico e dois clones de plantas WT (tipo selvagem) da mesma variedade, posicionados em forma de X dentro da gaiola. B. A segunda gaiola mostra apenas plantas de controle com duas plantas WT, ou seja, duas plantas não transformadas da mesma variedade. Foram introduzidos 10 casais de psilídeos para avaliação de preferência e oviposição entre as plantas transgênicas x WT, e na gaiola controle contendo apenas plantas WT foram introduzidos 5 casais. Três experimentos biológicos independentes foram realizados por evento.

5. Resultados e Discussão

5.1. Confirmação e validação de plantas transgênicas

Todos os clones transgênicos foram validados quanto à presença do transgene pela técnica de PCR convencional sendo visualizado um produto de amplificação de aproximadamente 1500 pares de bases (Figura 4A), referente ao tamanho do *CsSAMT* (Nascimento et al., 2022). Ainda, foi evidenciado a expressão do gene repórter GUS, onde partes do tecido vegetal apresentaram coloração azul (Figura 4B), indicando a presença do vetor nos tecidos avaliados.

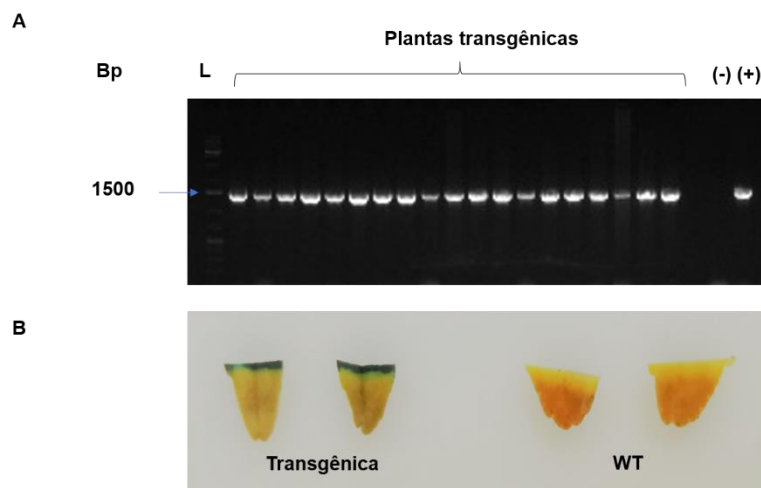


Figura 4. Identificação de plantas transgênicas superexpressando *CsSAMT*. A. Amplificação de um fragmento de 1540 pb das plantas transformadas; (L) GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Sigma-Aldrich); (+) controle positivo; (-) controle negativo; B. Ensaio GUS de folhas de plantas transgênicas (esquerda) e folhas de plantas WT como controles negativos (direita).

5.2. Atratividade dos psilídeos

Durante o período experimental foi observado que a preferência do inseto vetor *Diaphorina citri* entre plantas transgênicas vs. plantas WT, ambas não infectadas com CLas (Figura 5). Não foi observado diferenças estatísticas no número de psilídeos encontrados no evento V44 e no seu respectivo controle, ou seja, não houve interferência do volátil na escolha dos insetos pelas plantas (Figura 5.B). Porém, entre o evento H49 e seu respectivo controle (planta WT não transformada), houve preferência dos insetos pela a planta não transgênica (Figura 5.A), contrariando ao que se esperava em função de informações da literatura.

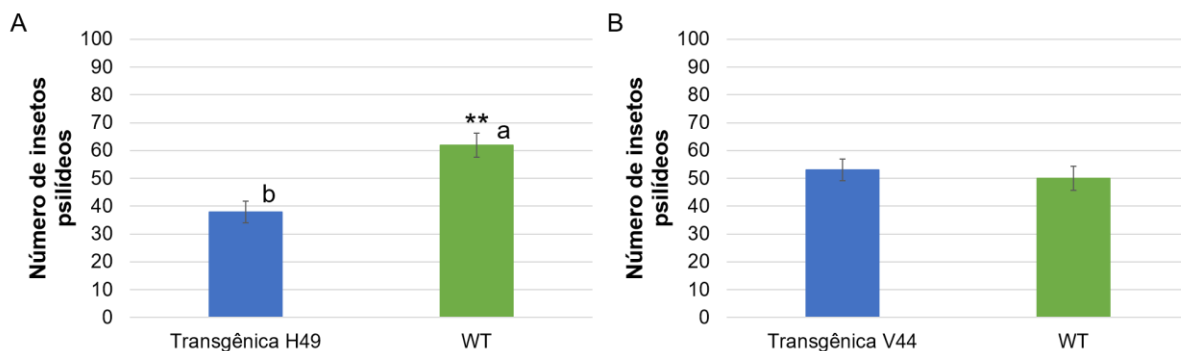


Figura 5. Avaliação da preferência do psilídeo realizada com os eventos transgênicos x WT não infectadas. A. Resultado com o evento V44 vs. WT da mesma variedade. B. Resultado com o evento H49 vs. WT da mesma variedade, onde houve maior atratividade dos insetos pela planta WT, ** $P < 0,001$.

Resultados semelhantes foram obtidos nas plantas transgênicas vs plantas WT infectadas com CLas (Figura 6). A preferência dos insetos foi pelas plantas não transgênicas (WT), quando comparadas aos dois eventos transgênicos (V44 e H49), resultando se mostrando significativo (Figuras 6A e 6B).

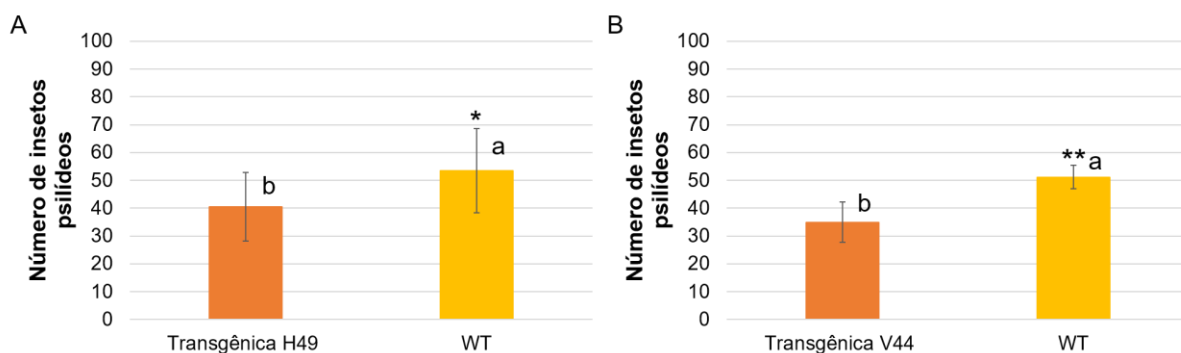


Figura 6. Avaliação de preferência do psilídeo realizada entre os eventos transgênicos vs. não transgênicos (WT) utilizando plantas infectadas com CLas. A. Resultado com o evento H49 vs. WT da mesma variedade. B. Resultado com o evento V44 vs. WT da mesma variedade. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$. Quatro experimentos biológicos independentes foram desenvolvidos para cada combinação de evento transgênico vs. plantas WT da mesma variedade (tipo selvagem).

Os resultados obtidos nestes experimentos foram inesperados uma vez que trabalhos prévios mostraram que o MeSA é um volátil atrativo aos insetos, principalmente em plantas infectadas com CLas. Mann et al. (2012), por exemplo, mostrou que a atração dos psilídeos é maior em plantas infectadas do que não infectadas e, segundo estes autores, a maior atração dos insetos às plantas

infectadas foi proporcional ao alto nível de metil salicilato presente nas plantas com CLas. Patt et al. (2018) fez comparações de voláteis emitidos de brotos de plantas da variedade Valência (*C. sinensis*) infectadas e não infectadas por CLas depois de serem tratadas com aplicações foliares com metil jasmonato, um composto de sinalização volátil associado à via de resistência sistêmica induzida, e ácido salicílico, o constituinte da via de resistência sistêmica adquirida. O resultado apresentado é que MeSA esteve presente em maiores proporções nos voláteis coletados de plantas infectadas por CLas, e quando avaliadas com insetos, mostra que metil salicilato é um volátil atraente aos insetos vetores, *D. citri*. *Candidatus Liberibacter asiaticus* realmente modifica odores liberados por sua planta hospedeira para atrair *D. citri*, liberando o volátil, metil salicilato. Esse por sua vez aumenta a atratividade dos insetos pelas plantas, onde inicialmente entre uma planta sadia x infectada, preferem plantas infectadas (Mann et al. 2012; Martini et al. 2014). Tais resultados de literatura leva-nos a afirmar que, nas condições experimentais e nas plantas transgênicas testadas (H49 e V44) pode haver um diferencial onde o MeSA não responde da mesma forma, sendo um ponto de investigação nos próximos estudos. Porém, vale salientar que, nos estudos de Mann et al. (2012), foi apresentado uma tabela com vários voláteis diferencialmente expressos em plantas de citros infectados com CLas, onde MeSA é o mais expresso entre eles, porém não o único. Portanto, baseado nos resultados obtidos neste trabalho, levantamos a hipótese de que a mistura desses voláteis pode ser a responsável pela atratividade de *D. citri*, e não necessariamente apenas o MeSA. Dessa forma, sugere-se que a maior volatilização do MeSA nas plantas transgênicas pode ter alterado o padrão dos diferentes voláteis observados por Mann et al (2012), e conseqüentemente, a atratividade dos insetos. Porém, como mencionado acima, maior atratividade não significa preferência dos insetos às plantas para oviposição e conseqüentemente reprodução, características que definem a aceitação final da planta como hospedeira do inseto (Finch & Collier, 2004).

5.3. Preferência para pouso e oviposição dos psílídeos

Nos resultados do experimento de preferência para pouso e oviposição de psílídeos, foi observado o comportamento dos 10 casais de insetos desde o momento inicial (escolha entre as plantas), até para a oviposição e desenvolvimento dos insetos (ninfas 5^o instar). Quando as plantas são escolhidas os insetos além de

se alimentarem, acasalam, as fêmeas ovipositam e esses se desenvolveram normalmente. Como visto, nos resultados obtidos neste experimento, em ambas as plantas (transgênicas e WT), não houve impedimento no desenvolvimento dos insetos (Figura 7). Porém, como observado nos experimentos de preferência (Figuras 5 e 6), as plantas WT foram mais preferidas pelos insetos para a oviposição e desenvolvimento até o 5º instar, quando comparado às plantas transgênicas. No entanto, embora haja uma clara tendência, significância estatística foi observada apenas nas ninfas do 5º instar no evento V44.

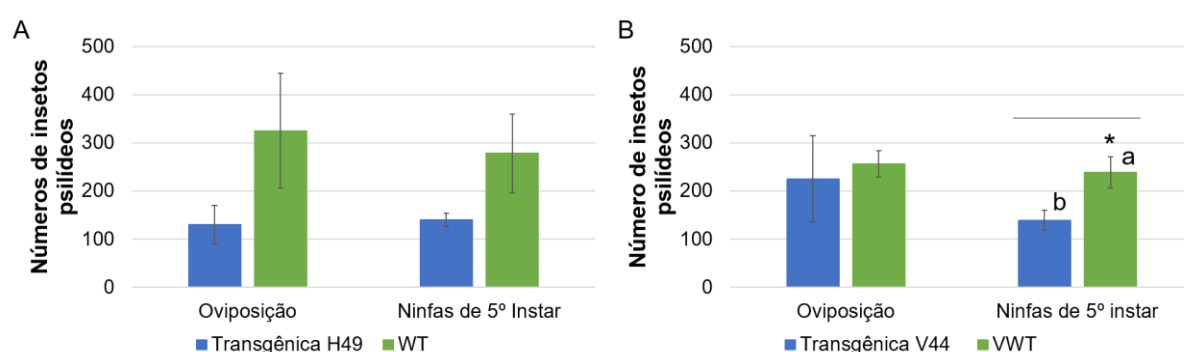


Figura 7. Avaliação de preferência para pouso e oviposição de psilídeos utilizando plantas sadias dos eventos transgênicos H49 e V44 e seus respectivos controles, WT. A. Resultado com o evento H49 vs. WT. B. Resultado com o evento V44 vs. WT. * $P < 0,05$. Três experimentos biológicos independentes foram realizados para cada evento transgênico e plantas WT.

Com os resultados obtido nos experimentos acima, concluí-se que apesar das plantas transgênicas estarem volatilizando MeSA em maiores concentrações, como descrito por Nascimento, et al. 2022 (dados apresentados anteriormente), o volátil não se mostrou mais atrativo aos insetos, ou seja, ele não interferiu na escolha dos insetos pelas plantas. Contrariamente, constatou-se uma maior tendência de atratividade e preferência para as plantas não transgênicas (Figuras 5, 6 e 7). Com base em publicações anteriores, esses resultados são contraditórios ao esperado, onde demonstrando-se que em estágios iniciais de infecção pela bactéria CLas o MeSA foi o volátil mais detectado, sendo atrativo aos insetos. Pressupõe-se que os psilídeos após se alimentarem das plantas infectadas, procuram por plantas sadias para se alimentarem uma vez que o estado nutricional das plantas sintomáticas esta abaixo do ideal. Assim, a duração da alimentação inicial em plantas infectadas é apenas para os vetores adquirem o patógeno antes de se dispersarem para plantas

não infectadas (Mann et al. 2012; Wu et al, 2015; Martini et al. 2014; Martini et al. 2018; Patt et al. 2018; Ibanez et al. 2019, 2022). O presente trabalho pautou-se na hipótese que as plantas transgênicas superexpressando o gene *CsSAMT* é mais atrativa aos psílídeos uma vez que volatilizam MeSA em maior quantidade, o que não foi comprovada. Porém, sabe-se que o MeSA não é o único volátil responsável por essa atratividade (Mann et al., 2012). Assim, sugerimos que possivelmente, um conjunto de voláteis emitidos pelas plantas em presença de CLas, seja responsável pela atratividade de *D. citri*. Dessa forma, o maior teor de MeSA das plantas transgênicas possa ter interferido na composição desses voláteis que ocorrem nas plantas infectadas, e conseqüentemente, no comportamento do inseto. Essas hipóteses precisam ser futuramente investigadas. Portanto, os resultados aqui obtidos abrem perspectivas para o uso dessas plantas para investigação da complexidade da transmissão de CLas pelos vetores, envolvendo a atratividade e preferência ao hospedeiro.

6. Conclusões

Os eventos transgênicos (V44 e H49) transformados com o gene *CsSAMT* que volatilizam MeSA em altas concentrações não interferiram na escolha dos insetos vetores da bactéria CLas, causadora do HLB. O volátil emitido pelas plantas transformadas não foi atrativo aos insetos, tendo sido a preferência pelas plantas não transgênicas. Estes resultados leva-nos a concluir que MeSA não é o único ou mesmo principal volátil associado a atratividade de *D.citri* às plantas e sim um conjunto de voláteis que ocorrem em presença da bactéria *Candidatus liberibacter asiaticus*.

7. Literatura citada

- Ammar, E.-D., Shatters, R. G. & Heck, M. Huanglongbing pathogens: acquisition, transmission and vector interactions. In *Asian Citrus Psyllid: Biology, Ecology and Management of the Huanglongbing Vector* (eds Qureshi, J. A. & Stansly, P. A.) 113–139 (CAB International, Wallingford), 2020.
- Bové, J. M. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology*, 88:17–37, 2006.
- Coletta-Filho, H. D., Takita, M. A., Targon, M. L. P. N., and Machado, M. A. 2005. Analysis of 16S rDNA strain associated with citrus disease in São Paulo. *Plant Dis.* 89:848-852.

- Finch, S., Collier, R.H. Host Plant Selection by Insects. In: Encyclopedia of Entomology. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/0-306-48380-7_2083, 2004.
- Fu, Z., Q.; Annu, X., D. Systemic Acquired Resistance: Turning Local Infection into Global Defense. *Rev. Plant Biol.* 25: , n. 64:7.p. 1–7.25, 2013.
- George, J., Ammar, E.-D., Hall, D. G., Shatters, R. G. & Lapointe, S. L. Prolonged phloem ingestion by *Diaphorina citri* nymphs compared to adults is correlated with increased acquisition of the citrus greening pathogen. *Sci. Rep.* 8, 10352, 2018.
- Gómez, L. M., Teixeira-Silva, N. S., Caserta, R., Takita, M. A., Marques, M. O. M., and de Souza, A. A. Overexpression of Citrus reticulata SAMT in Nicotiana tabacum increases MeSA volatilization and decreases Xylella fastidiosa symptoms. *Planta* 252, 103–114, 2020. doi: 10.1007/s00425-020-03511-1.
- Ibanez, F.; Suh, J. H.; Wang, Y.; Stelinski, L. L. Long-term, sustained feeding by Asian citrus psyllid disrupts salicylic acid homeostasis in sweet orange. *BMC Plant Biology*, 19(1), 2019. doi:10.1186/s12870-019-2114-2
- Inoue, H. *et al.* Enhanced proliferation and efficient transmission of *Candidatus Liberibacter asiaticus* by adult *Diaphorina citri* after acquisition feeding in the nymphal stage. *Ann. Appl. Biol.* 155, 29–36 (2009).
- Klessig, D., F. *et al.* Systemic Acquired Resistance and Salicylic Acid: Past, Present, and future. *The American Phytopathological Society*, 31: 71-888, 2018. doi.org/10.1094/MPMI-03-18-0067-CR
- Lacorte, C.; Romano, E. Transferência de vetores para Agrobacterium. BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T. (Org). Manual de transformação genética de plantas. Brasília: SPI/Embrapa, 1: 93-109, 1998.
- Mann, R.S., Ali, J. G., Hermann, S. L., Tiwari, S., Pelz-Stelinski, K. S., Alborn, H. T., Stelinski, L. L. Induced release of a plant-defense volatile 'deceptively' attracts insect vectors to plants infected with a bacterial pathogen. *PLoS Pathogens*, 3:8, 2012. doi: 10.1371/journal.ppat.1002610
- Martini, X.; Coy, M.; Kuhns, E.; Stelinski, L. L. Temporal decline in pathogen-mediated release of methyl salicylate associated with decreasing vector preference for infected over uninfected plants. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 6: 185, 2018. doi: 10.3389/fevo.2018.00185
- Martini, X.; Pelz-Stelinski, K. S.; & Stelinski, L. L. Plant pathogen-induced volatiles attract parasitoids to increase parasitism of an insect vector. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 2. 2014. doi:10.3389/fevo.2014.00008

- Murray, M. G.; Thompson, W. F. Nucleic acids research rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 8: 4321–4326, 1980.
- Nascimento, C.A.; Teixeira-Silva, N.S.; Caserta, R.; Marques, M.O.M.; Takita, M.A.; Souza, A.A. Overexpression of CsSAMT in *Citrus sinensis* Induces Defense Response and Increases Resistance to *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Front. Plant Sci.* 13:836582, 2022. doi: 10.3389/fpls.2022.836582
- de Souza Pacheco. I.; Galdeano, D. M.; Maluta, N. K. P.; Lopes, J. R. S.; Machado, M. A. Gene silencing of *Diaphorina citri* candidate effectors promote changes in feeding behaviors. *Sci. Rep.* 10:992, 2020.
- Patt, J.M; Robbins, P.S.; Niedz, R.; McCollum, G.; Alessandro, R. Exogenous application of the plant signalers methyl jasmonate and salicylic acid induces changes in volatile emissions from citrus foliage and influences the aggregation behavior of Asian citrus psyllid (*Diaphorina citri*), vector of Huanglongbing. *PLoS ONE*, 13 (3): e0193724, 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193724>
- Park, S. W.; Kaimoyo, E.; Kumar, D.; Mosher, S.; Klessig, D. F. Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science*, v. 318, n. 5847, p. 113–116, 2007.
- Shah, J.; Zeier, J. Long-distance communication and signal amplification in systemic acquired resistance. *Frontiers in Plant Science*, v. 4, n. 30, p. 1–16, 2013. doi: 10.3389/fpls.2013.00030
- Shokrollah, H.; Abdullah, T.L.; Sijam, K.; Siti Nor, A.A.; Nur Ashikin, P.A. Differential reaction of citrus species in Malaysia to Huanglongbing (HLB) disease using grafting method. *AJABS*, 4, 32–38, 2009.
- Tieman, D.; Zeigler, M.; Schmelz, E.; Taylor, M. G.; Rushing, S.; Jones, J. B.; Klee, H. J. Functional analysis of a tomato salicylic acid methyl transferase and its role in synthesis of the flavor volatile methyl salicylate. *Plant Journal*, v. 62, n. 1, p. 113–123, 2010.
- Walling LL. The myriad plant responses to herbivores. *Journal of Plant Growth Regulation* 19: 195–216, 2000.
- Wu, F.; Cen, Y.; Deng, X.; Chen, J.; Xia, Y.; Liang, G. Movement of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) Adults between Huanglongbing-Infected and Healthy Citrus. *Floridantomologist*, v. 98, n. 2, p. 410-416, 2015.
- Yamamoto, P. T.; Felipe, M. R.; Sanches, A. L.; Coelho, J. H. C.; Garbim, L. F.; Ximenes, N. L. Eficácia de inseticidas para o manejo de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) em citros. *BioAssay*, v. 4, p. 1– 9, 2009.

CAPÍTULO 2. Avaliação da multiplicação de *Candidatus Liberibacter asiaticus* e sintomas do HLB em plantas transgênicas de citros expressando o gene *CsSAMT*.

1. Resumo

O Brasil é o maior produtor de laranja doce no mundo, sendo uma das commodities mais importantes para a economia brasileira. Porém, a citricultura sofre com o ataque de diversas pragas e doenças gerando prejuízos a produção e a qualidade dos citros. O HLB (Huanglongbing ou *greening*) atualmente é considerada a maior ameaça da citricultura mundial. Causado principalmente pela bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs), que ao colonizar os vasos do floema do hospedeiro acarreta sintomas severos nas folhas e frutos. A bactéria é transmitida pelo psílideo - *Diaphorina citri* que, ao se alimentar da seiva de plantas infectadas, adquire CLAs e as transmite para plantas saudáveis. Diante desta problemática, agricultores tem erradicado plantas sintomáticas e feito uso frequente de defensivos químicos no controle do vetor, podendo aumentar custos e provocar desequilíbrio ambiental, carrear resíduos químicos nos frutos e induzir o desenvolvimento da resistência do inseto. Por isso, o desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas pode ser uma alternativa para impedir a proliferação de CLAs nos citros, diminuindo os sintomas do HLB. Em estudos anteriores, foi demonstrado que plantas transgênicas de *Citrus sinensis* da variedade "Wanjincheng" superexpressando o gene *SAMT* foi mais tolerante ao HLB. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar se os eventos transgênicos de *C. sinensis* das variedades Hamlin (H49) e Valencia (V44) superexpressando o gene *CsSAMT* também são mais resistentes ao HLB. Entretanto, com os resultados obtidos não foi possível observar diferenças entre os eventos transformados e seus controles WT. As plantas transgênicas não foram efetivas para impedir a colonização da bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus*.

Palavras chave: *greening*, *Diaphorina citri*, *SAMT*, MeSA, resistência genética, bactéria

2. Introdução

Huanglongbing ou *greening* dos citros é considerada a doença mais devastadora da citricultura em todo mundo (Gottwald, 2010). Todas as plantas infectadas com HLB apresentam uma drástica redução na qualidade de seus frutos, resultando em

grandes perdas econômicas dentro das principais áreas produtora de citros (Bassanezi et al. 2020; Bové 2006, 2014; Graham et al. 2020; Zhou 2020). A bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) é restrita ao floema e como resultado de sua colonização nas plantas observam-se aumento de amido e grande produção de calose dificultando o transporte de fotoassimilados dos órgãos fonte para os órgãos dreno em toda a planta (Koh et al., 2012). O principal meio de transmissão de CLas é pelo inseto vetor, *Diaphorina citri*, também conhecido como psílídeo dos citros, que ao se alimentar de uma planta infectada adquire a bactéria e a transmite para as plantas saudáveis. Fortes evidências apontam que a colonização de CLas no psílídeo é do tipo circulativa chegando às glândulas salivares sendo então inoculadas nas plantas saudáveis durante o processo de alimentação (Ammar et al. 2011; Canale et al., 2017; Ghanim et al. 2017; Kruse et al., 2017).

A rápida disseminação de CLas sob condições naturais as quais estão associados as altas eficiências na transmissão e mobilidade do vetor que em conjunto com a severidade dos danos, impõem sérias dificuldades no manejo do HLB (Sulzbach et al., 2017). O uso sistemático de defensivos químicos para controle da população do vetor, juntamente com o uso de plantas saudáveis na implantação dos pomares e a erradicação de plantas doentes alicerçam o pacote de ações técnicas recomendadas para o manejo do HLB (Hall et al. 2013). Entretanto, o controle sistêmico do psílídeo por meio de defensivos químicos não tem mostrado a eficácia esperada no controle da disseminação da doença (Bassanezi et al. 2013; Ichinose et al. 2010). Negativamente, tem levado a efeitos indesejáveis, como resistência de insetos e o desequilíbrio biológico, além da contaminação ambiental (Yamamoto; Alves & Beloti, 2015; Tiwari et al. 2011).

Em vista da problemática, esforços vêm sendo tomados a procura de desenvolver plantas geneticamente modificadas tolerantes ou resistentes ao HLB, pois atualmente nenhuma variedade comercial resistente está disponível aos citricultores (Shokrollah et al. 2009). Neste sentido, existem vários trabalhos que tem como estudo a resistência sistêmica adquirida (SAR), um mecanismo imunológico induzido que confere maior resistência contra uma variedade de patógenos. A ativação de SAR acontece na infecção primária onde a planta percebe infecção local pelo patógeno, resultando na imunização das outras partes da planta contra infecções subsequentes (FU et al., 2013; KLESSIG et al., 2018; SHAH et al., 2013). O principal agente desse sistema é o gene *S-adenosil-L-metionina: ácido salicílico*

carboxil metiltransferase (*SAMT*) responsável por converter o ácido salicílico (SA) em um sinal volátil, o metil salicilado (MeSA). Esta molécula, é produzida e translocada para tecidos distais da planta e, também, para plantas vizinhas, sinalizando para aquelas que não entraram em contato direto com o patógeno (Gómez et al., 2020).

Zou et al (2019, 2021) observaram que *CsSAMT1* desempenhou um papel de tolerância às plantas de citros infectadas com CLas. Plantas super expressando *CsSAMT1* apresentaram aumentos significativos nos níveis de SA e MeSA resultando em alterações nos níveis hormonais e nas respostas anatômicas e transcriptômicas ao HLB, com redução da população bacteriana comparada com seus controles não transformados após dois anos. Do mesmo modo, Nascimento et al 2022 obtiveram reduções nos sintomas e nos títulos de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e *Xylella fastidiosa* em plantas transformadas com *CsSAMT*.

Diante disso, no presente trabalho, serão avaliados os eventos transgênicos obtidos por Nascimento et al. 2022 quanto a resposta a infecção pela bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus*. Em consideração a isso, a hipótese é plantas que superexpressam o gene *CsSAMT* são mais resistentes ao HLB devido à ativação de mecanismos de defesa mediados por SA.

3. Objetivos

- Propagar e validar clones de cada evento de laranja doce (*C. sinensis* L. Osbeck) superexpressando o gene *CsSAMT* quanto a presença do transgene, assim como seus respectivos controles, plantas não transgênicas (WT);
- Inocular CLas por enxertia de borbulhas provenientes de planta sintomática para HLB em algumas plantas de cada evento previamente confirmados;
- Avaliar a população de CLas por qPCR nas plantas infectadas por borbulhas aos 60, 90, 120 e 180 dias e 24 meses após a enxertia;
- Integrar os resultados de resistência CLas, atratividade e preferência quanto ao potencial das plantas para futuros testes em campo.

4. Materiais e Métodos

4.1. Preparo do material vegetal

Borbulhas de plantas de laranja doce (*C. sinensis* L. Osbeck) transgênicas das variedades Hanlim (H49) e Valência (V44) (Nascimento et al. 2022) foram utilizadas para enxertia sobre porta-enxerto de limão Cravo (*C. x limonia*) para produção de 20 plantas (clones) de cada evento. O mesmo procedimento foi realizado para as plantas não transgênicas (controle não transformada) das mesmas variedades.

4.2. Confirmação da inserção gênica nos clones em estudo

Todos os clones oriundos das plantas transgênicas (H49 e V44) foram testados quanto à expressão do gene da β -glucuronidase (GUS) para certificação da inserção do evento transgênico. O cassete utilizado para transformação das plantas hospeda o gene *SAMT* oriundo de tangerina (*Citrus reticulata*) sob o controle do promotor FMV e contendo terminador 35S, estando a construção clonada no vetor pCAMBIA2201 (Gomez et al., 2020; Nascimento et al., 2020). Para realizar a análise histoquímica do GUS, partes do tecido foliar de plantas transformadas foram cortadas e imersas em solução de 1 mg/mL X-GLUC (5-bromo-cloro-3-indolil- β D-glucuronídeo). As amostras foram incubadas overnight a 37°C em ausência de luz (Lacorte, 1998) e, posteriormente, foram lavadas com uma solução de ácido acético e etanol (3:1, v/v) para retirada da clorofila e assim facilitar a visualização da coloração azul dada pela reação da enzima.

As plantas GUS positivas foram analisadas por reação em cadeia da polimerase (PCR) usando um par de primers confeccionado para unir com o promotor FMV e o Terminador CaMV35S evitando amplificação do gene endógeno *SAMT*, uma vez sequencias idênticas deste foram encontradas no genoma de laranja doce (*C. sinensis*). Previamente a PCR o DNA total das plantas foi extraído pelo método CTAB (Murray & Thompson, 1980), e quantificado em espectrofotômetro ND-8000 NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, Estados Unidos). As reações de amplificação continham tampão GoTaq para um volume final da reação de 25 μ l, 100ng de DNA total, 160 μ M dos dNTPs, 0,2 μ M de cada iniciador, e 1,25U de GoTaq DNA polimerase (Promega, Madison, WI, Estados Unidos). As etapas da PCR foram; 95°C por 5min; 30 s a 94°C, 30 s a 58°C e 60 s a 72°C (repetidas 35 vezes) e uma extensão final a 72°C por 10min. O produto de amplificação foi visualizado em gel de agarose a 1%.

4.3. Avaliação da resistência de plantas transgênicas a CLas

Clones dos eventos H49 e V44 foram inoculados por enxertia na haste principal de duas borbulhas oriundas de plantas sintomáticas para HLB e checadas quanto a infecção por CLas. Foram feitas diversas inoculações de borbulhas infectadas em cada planta até obtermos resultados positivos. O acompanhamento da infecção foi monitorado aos 60, 90, 120 e 180 dias e 24 meses após a inoculação (dai). A cada amostragem, uma folha foi destacada da planta acima da inoculação e 300 mg (pecíolo e parte da nervura central) foram macerados através do TissueLyser II (QIAGEN, Hilden, Germany), com o auxílio de duas esferas (5 mm de diâmetro) em um microtubo de 2mL na frequência de 30 Hz/s por 3 minutos. Seguiu-se a extração DNA total pelo método CTAB e quantificação por meio do NanoDrop ND-8000 (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). A concentração do DNA total de cada amostra foi ajustada para 100 ng/uL. A quantificação de CLas foi realizada por meio da PCR quantitativa em tempo real (qPCR) utilizando-se o sistema TaqMan com primers e probe que amplificam parcialmente o gene 'elongation factor Tu' (Lin et al. 2010). O gene GAPDH (glutathione S-transferase) foi utilizado como normalizador da concentração e qualidade do DNA total na reação (BOAVA et al. 2015).

4.4. Colonização bacteriana x sintomatologia vegetal

A colonização de CLas nas plantas testes (transgênicas e não transgênicas) foi avaliada amostrando-se folhas aos 180 dias após a inoculação em três diferentes posições na planta acima da borbulha de inoculação; *i.* 5-10 cm, *ii.* 30 a 40 cm, e *iii.* 50 a 60 cm. Tais variações ocorreram em função do crescimento da planta ao longo do período experimental. Folhas presentes nestes mesmos pontos de amostragem também foram utilizadas para avaliação do teor de clorofila, de forma não destrutiva, utilizando-se o medidor de clorofila atLEAF (FT Green LLC, Wilmington, DE, US), uma vez que o amarelecimento está relacionado aos sintomas de HLB (Bové, 2006; Etxeberria, et al. 2009). Estas análises foram realizadas mensalmente durante três meses consecutivos (Dezembro, 2021, Janeiro e Fevereiro, 2022) para minimizar artefatos que possam ser resultados de uma análise pontual. E após 12 meses da última avaliação de 2022, uma nova análise foi realizada (Fevereiro, 2023) para observar possíveis diferenças entre as plantas. Foram utilizadas plantas não inoculadas de cada uma das condições em teste (transgênicas e não transgênicas) como referência. Durante o período experimental todas as plantas permaneceram

em câmara de crescimento tipo fitotron, com temperatura entre 24°C a 30°C e fotoperíodo de 12 horas.

4.5. Estimativa da concentração de CLas nas plantas

A concentração de CLas nas plantas foi estimada seguindo-se a metodologia proposta por Wang et al. (2006). Resumidamente, uma equação de regressão linear ($Y = -3,5818x + 38,971$, $R^2 = 0,9993$) foi obtida interpolando-se os valores de Ct (cycle treshold) obtidos nas amplificações com qPCR usando como alvo concentrações conhecidas do DNA plasmidial contendo o inserto clonado do gene efTU de CLas. Admitindo-se cópia única do gene alvo no genoma de CLas pode-se estimar o número de cópias do gene presente na massa quantificada do plasmídeo, e por consequência "número de células de CLas". Esta metodologia vem sendo usada nos trabalhos realizados por nosso grupo de pesquisa (Coletta-Filho et al. 2010 e 2014; Canale et al., 2017; Beloti et al., 2018; da Silva et al., 2020; Merfa et al., 2021).

4.6. Análise de calose

Pecíolos de folhas de cada planta foram utilizados para determinação e quantificação da presença de calose. O material vegetal de cada planta foi colocado por 72 horas em solução FAA (50 mL de formaldeído 37%, 50 mL de ácido acético glacial e 900 uL de etanol 70%), conforme descrito por Koh et al. (2012). Após o período de incubação, foram armazenados em etanol 70%. Em seguida, cortes transversais foram realizados e incubados por 40 min em 0,15 mL em tampão fosfato (pH 9,5), contendo 0,01% de azul de anilina (Jin & Mackey, 2017). Quando corados, os cortes foram avaliados em microscópio fluorescente (Olympus BX61), em filtro de excitação 355-375 nm, espelho dicromático 400 nm e filtro de emissão 435-49. A deposição calose foi quantificada pela contagem do número de pontos fluorescentes no floema de cada amostra dentro de um quadrante. Três pecíolos de três plantas de cada condição biológica foram avaliados

6. Resultados e Discussão

5.1. Confirmação da inserção gênica nos clones

Tal como mostrado no Capítulo 1, todos os eventos foram confirmados para a presença do inserto de 1540 pb, referente ao tamanho do *CsSAMT* (Nascimento et al., 2022) assim como pela expressão do gene repórter GUS, onde partes do tecido vegetal apresentaram coloração azul (Figura 4B - Capítulo 1).

5.2. Quantificação temporal de CLas nas plantas testes

Durante o período experimental observou-se um crescimento da população de CLas em todas as plantas, independente do evento de transformação, assim como nas plantas não transformadas. Desde a primeira avaliação, 60 dias após a inoculação até a última aos 2 anos, a bactéria se manteve em crescimento contínuo, não havendo diferenças estatísticas entre as plantas geneticamente transformadas e as não transformadas (Figura 1).

Estes resultados contrapõem-se aos obtidos por Zou et al (2021). Estes autores observaram que plantas transformadas com o gene *CsSAMT1* e com aumento de níveis de MeSA e SA, apresentaram menores concentrações de CLas quando comparadas às plantas não transformadas, dados estes determinados por qPCR aos 12, 18 e 24 meses após a infecção. Porém, semelhante ao obtido neste trabalho, os dados de Zou e colaboradores mostram um aumento gradual na concentração de CLas ao longo do tempo mesmo nas plantas geneticamente transformadas. Hu et al (2018) também observaram diferenças do crescimento populacional de CLas quando plantas infectadas foram tratadas com SA, as mesmas apresentaram diminuição da população bacteriana em comparação com seu controle, plantas sem tratamento com SA, resultados apresentados após anos de análises (entre 2014 a 2016). Zou et al (2019) relatam, que em seus resultados comparando pomelo (*C. grandis* Osbeck), espécie naturalmente tolerante a CLas apresentando alta expressão do gene *SAMT* e altos níveis de MeSA, contra uma planta suscetível de laranja, Jincheng (*C. sinensis* Osbeck), depois de 18 meses de infecção, houve a diminuição da população bacteriana em plantas de pomelo.

Os resultados observados no presente trabalho se diferem dos demais, não sendo observado diminuição da população ao longo das avaliações e nem a estabilidade do crescimento populacional após 2 anos de infecção. Porém, existe a possibilidade de uma quebra de resistência das plantas transformadas utilizadas em nosso estudo. Em cada planta foram realizadas várias enxertias de borbulhas infectadas, ou seja, as plantas que avaliamos receberam maiores concentrações da

população CLas levando quebrando da resistência dos eventos transformados, diferente de Zou et al (2021), que apresenta ter realizado apenas uma enxertia.

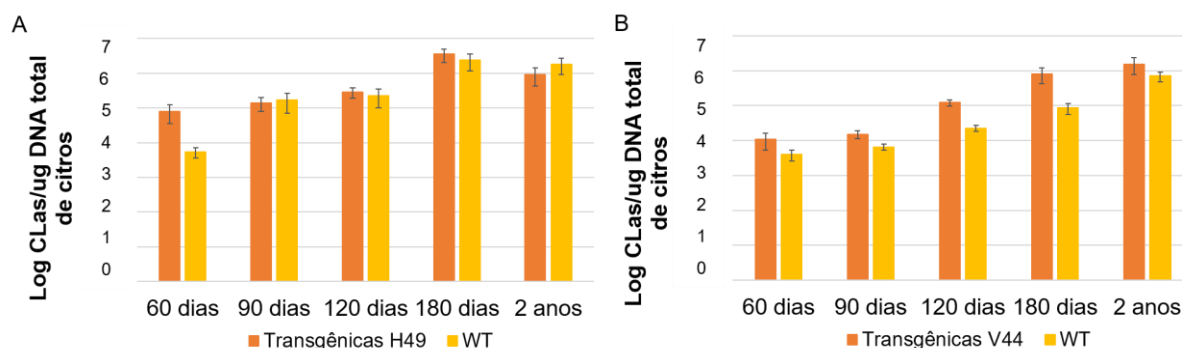


Figura 1. Concentração de CLas nas plantas transformadas com o gene *CsSAMT* e não transformadas (WT) determinada ao longo de 2 anos após a inoculação. A. Evento transgênico cv. Hanlim (H49) e respectivo não transgênico (HWT). B. Evento transgênico cv. Valencia (V44) e respectivo não transgênico (VWT).

5.3. Colonização de CLas em plantas transgênicas e sintomatologia do HLB

Uma análise visando determinar o padrão de colonização de CLas nas plantas infectadas foi realizada tomando-se amostras logo acima da borbulha de inoculação (5 -10 cm), aos 30 - 40 cm, e aos 50 - 60 cm. Os resultados mostraram que não houve diferenças quanto a presença de CLas e concentração nos diferentes pontos de amostragem, seja nos diferentes eventos transgênicos ou nas plantas não transformadas (Figura 2). Portanto, CLas colonizou sistemicamente toda a planta, não havendo diferença entre as plantas transgênicas e não transgênicas. Nestes mesmos pontos foram analisados o teor de clorofila nas folhas, cujos resultados não mostraram diferenças entre os eventos transgênicos e nem mesmo quando comparado as plantas controle, não inoculadas (Figura 3). Entretanto, avaliações visuais aos 180 dias após a infecção mostraram ausência de sintomas associados ao HLB em todas as plantas (transgênicas e não transgênicas), explicando os dados obtidos para o teor de clorofila. Aos 12 meses após a última avaliação de 2023, o teor de clorofila e as nas avaliações visuais nas plantas se repetiram, não mostrando diferenças entre as plantas, porém nas avaliações visuais foi possível observar folhas mais jovens encarquilhadas ("corcking") e com limbo foliar espeço em todas as plantas (dados não mostrados), um dos sintomas associados a doença.

Resultados esses que mais uma vez se contrapõem dos dados apresentados por Zou et al (2021), uma vez que, após dois anos de avaliação em casa de vegetação,

não houve sintomas óbvios observados nas plantas transformadas, porém em seus controles já encontravam sintomas característicos como amarelecimento e nervuras mais grossas. Li et al (2021), também observa os mesmos resultados quando tratou suas plantas com SA através de pulverizações foliares e injeções no tronco da planta, havendo a diminuição dos sintomas em plantas infectadas com HLB quando comparadas com os controles, plantas que não obtiveram tratamentos após anos de avaliação.

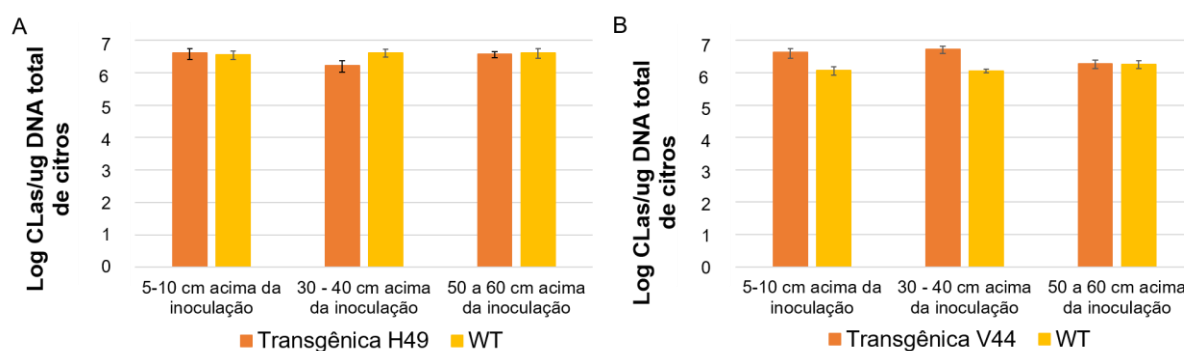


Figura 2. Colonização de *Candidatus Liberibacter* em plantas de laranja doce transgênicas e não transgênicas (WT). Amostragens realizadas logo acima do ponto de inoculação (5-10 cm), entre 30 - 40 cm, e entre 50 - 60cm. A. Evento transgênico cv. Hanlim (H22) e respectivo tratamento não transgênico (WT). B. Evento transgênico vc. Valencia (V44) e respectivo não transgênico (WT).

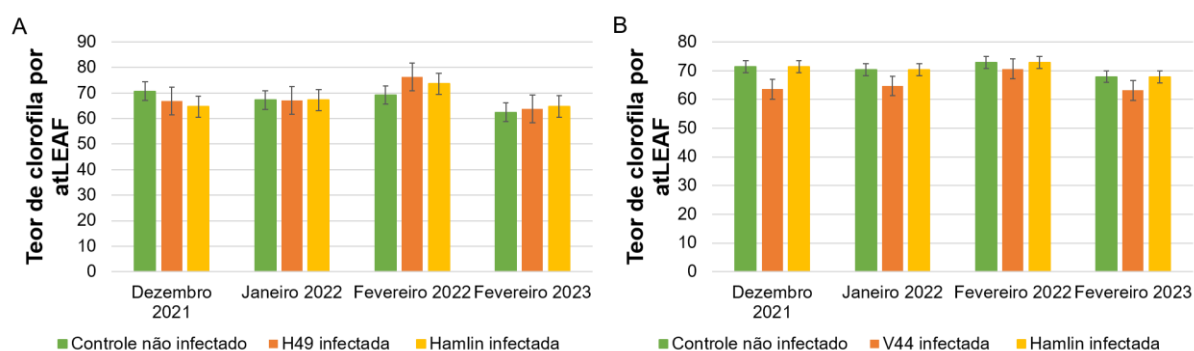


Figura 3. Análises do teor de clorofila nas plantas de laranja doce transgênicas e não transgênicas infectadas com *Candidatus Liberibacter asiaticus* analisadas mensalmente durante 4 meses. A. Evento transgênico H49 em comparação as plantas WT da mesma variedade. B. Evento transgênico V44 em comparação com as plantas WT da mesma variedade. Em nenhum dos eventos se mostraram diferenças significativas.

5.4. Deposição de calose nas plantas transgênicas e não transgênicas aos 180 dias de infecção por CLas

Vários estudos mostram que as plantas cítricas aumentam o acúmulo de calose em resposta à infecção por CLas (Achor et al., 2010; Etxeberria et al., 2009; Pitino et al., 2016). Koh et al. (2012) também observou níveis maiores de deposição calose em plantas com a presença de CLas, mas não oclusão completa dos poros crivados.

Neste presente trabalho também foi observado significativos aumentos na deposição de calose nas plantas infectadas com CLas quando comparado as não infectadas, independentemente da transgenia (Figura 4). Analisando-se cada evento, o H49 apresentou significativo aumento de calose quando comparado a planta não transformada (Figura 4A), enquanto o V44 não diferiu da Valencia não transformada (Figura 4B). Estes resultados mais uma vez contrapõem-se aos obtidos por Zou et al. (2021) que observaram deposições de calose significativamente menores em plantas geneticamente transformadas com o gene *CsSAMT*, quando comparada as não transformadas, quando ambas estavam infectadas com CLas.

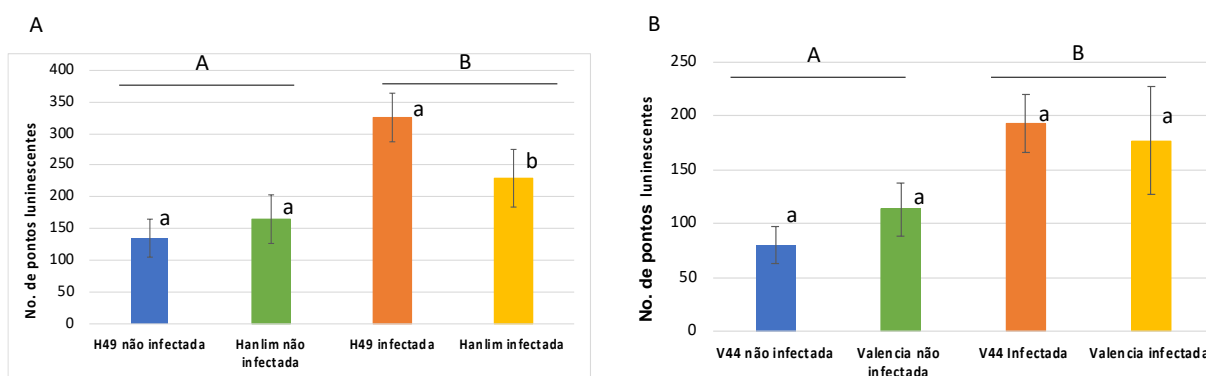


Figura 4. Número de pontos luminescentes relacionados a calose em corte de pecíolo de plantas transgênicas *CsSAMT* e não transgênicas infectadas e não infectadas por CLas. Análises realizadas 180 dias após a infecção. A. Evento transgênico H49 e Hanlim não transgênica. B. Evento transgênico V44 e Valencia não transgênica. Letras maiúsculas comparam estatística entre grupos de plantas infectadas e não infectadas por CLas. Letras minúsculas comparam entre o evento transgênico e não transgênico da mesma variedade. Letras iguais referem-se a comparações estatisticamente não significante. Letras diferentes referem-se a comparações estatisticamente significante a 5% pelo teste t.

Análises mais detalhadas das estruturas de calose permitiram observar que os tamanhos dos grânulos de calose nas plantas transgênicas foram menores que em plantas não transformadas (Figura 5 e 6). Dado este que se mostra curioso, mas que não apresentam diferenças entre a resposta de defesa entre planta transformadas e não transformadas.

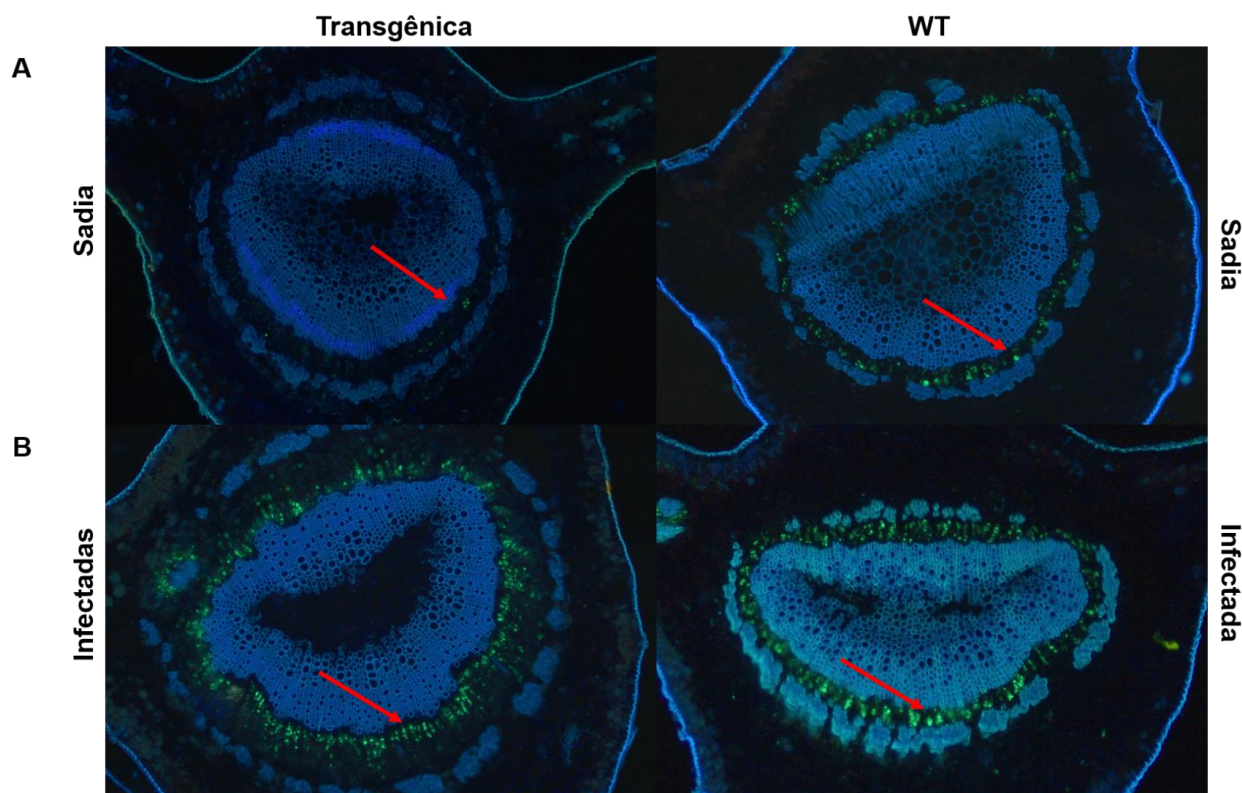


Figura 5. Diferença do tamanho dos grânulos de calose entre plantas transgênicas do evento H49 e não transgênicas infectadas e infectadas por CLas. A. Imagens representativas plantas saudias, transgênica vs WT. B. Imagens representativas plantas infectadas, transgênica vs WT. Eventos transgênicos apresentam grânulos menores de calose do que plantas controle.

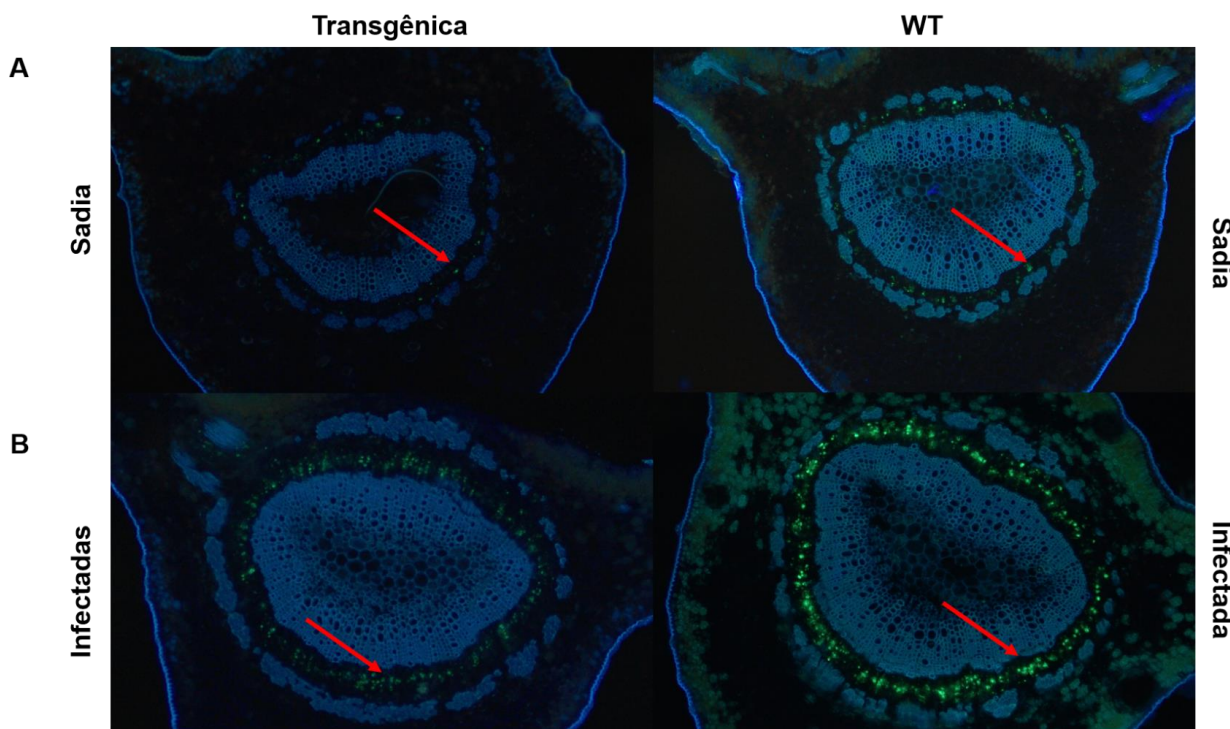


Figura 6. Diferença do tamanho dos grânulos de calose entre plantas transgênicas do evento V44 e não transgênicas infectadas e infectadas por CLas. A. Imagens representativas plantas saudáveis, transgênica vs WT. B. Imagens representativas plantas infectadas, transgênica vs WT. Eventos transgênicos apresentam grânulos menores de calose do que plantas controle.

6. Conclusões

Os dados obtidos permitem-nos concluir que o gene *CsSAMT* expressos em plantas de citros das variedades Hanlim (H49) e Valencia (V44) as quais apresentam altas concentrações de MeSA e ácido salicílico (Nascimento et al, 2022), não foram efetivas para impedir a colonização da bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus* nas plantas inoculadas por enxertia de borbulhas oriundas de plantas sintomáticas. Entretanto, não descartamos a possibilidade da quebra de resistência dos eventos transformados devido a altas concentrações da população bacteriana em cada uma.

7. Literatura citada

- Achor, D. S., Etxeberria, E., Wang, S. Y., Folimonova, K. R., Albrigo, C., & Albrigo, L. G. Sequence of anatomical symptom observations in citrus affected with Huanglongbing disease. *Plant Pathology Journal*, 9(2), 56-64, 2010.
- Ammar, E. D., Shatters, R. G., and Hall, D. G. Localization of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, associated with citrus Huanglongbing disease, in its

- psyllid vector using fluorescence in situ hybridization. *Journal of Phytopathology* 159:726-734, 2011.
- Bassanezi, R. B.; Lopes, S. A.; de Miranda, M. P.; Wulff, N. A.; Volpe, H. X. L.; Ayres, A. J. Overview of citrus Huanglongbing spread and management strategies in Brazil. *Trop. Plant Pathol*, 45:254-264, 2020
- Bassanezi, R. B.; Montesino, L. H.; Gimenes-Fernandes, N.; Yamamoto, P. T.; Gottwald, T. P.; Amorim, L.; Bergamin Filho, A. Efficacy of área-wide inoculum reduction and vector control on temporal progress of Huanglongbing in Young Sweet Orange plantings. *Plant Dis*, 97:789-796
- Boava, L. P.; Sagawa, C. H. D.; Cristofani-Yaly, M.; Machado, M. A. Incidence of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in infected plants among citrandarins 30 as rootstock and scion under field conditions. *Phytopathology*, v. 105, n. 4, p. 518–524, 2015
- 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
- Bové, J. M. Huanglongbing or yellow shoot, a disease of Gondwanan origin: Will it destroy citrus worldwide? *Phytoparasitica*, 42:579-583, 2014
- Coletta-Filho, H. D.; Carlos, E. F.; Alves, K. C. S.; Pereira, M. A. R.; Boscardiol-Camargo, R. L.; Souza, A. A.; Machado, M. A. In planta multiplication and graft transmission of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' revealed by Real-Time PCR. *European Journal of Plant Pathology*, v. 126, n. 1, p. 53- 60, 2010
- Etcheberia, E.; Gonzalez, P.; Achor, D.; Albrigo, G. Anatomical distribution of abnormally high levels of starch in HLB-affected valencia orange trees. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 74(1), 76-83, 2009
- Fu, Z., Q.; Annu, X., D. Systemic Acquired Resistance: Turning Local Infection into Global Defense. *Rev. Plant Biol*, v. 25, n. 64:7.p. 1–7.25, 2013
- Ghanim, M., Achor, D., Ghosh, S., Kotsedalov, S., Lebedev, G., and Levy, A. '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' accumulates inside endoplasmic reticulum associated vacuoles in the gut cells of *Diaphorina citri*. *Sci Rep* 7:16945, 2017.
- Gómez, L. M., Teixeira-Silva, N. S., Caserta, R., Takita, M. A., Marques, M. O. M., and de Souza, A. A. Overexpression of *Citrus reticulata* SAMT in *Nicotiana tabacum* increases MeSA volatilization and decreases *Xylella fastidiosa* symptoms. *Planta* 252, 103–114, 2020. doi: 10.1007/s00425-020-03511-1.
- Gottwald, T. R. Current epidemiological understanding of citrus Huanglongbing. *Annu Rev Phytopathol*, 48:119-139, 2010
- Graham, J.; Gottwald, T.; Setamou, M. Status of Huanglongbing (HLB) outbreaks in Florida, California and Texas. *Trop. Plant Pathol*, 45:265-278, 2020

- Hall, D. G.; Richardson, M. L.; Ammar, E. D.; Halbert, S. E. Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, vector of citrus huanglongbing disease. *Entomol. Exp. Appl.*, 146:207-223, 2013
- Hao, G.; Stover, E.; Gupta, G. Overexpression of a Modified Plant Thionin Enhances Disease Resistance to Citrus Canker and Huanglongbing (HLB). *Front. Plant Sci.* 7, 1078, 2016
- Hu, J.; Jiang, J.; Wang, N. Control the Citrus Huanglongbing via Trunk Injection of Plant Defense Activators and Antibiotics. *Phytopathology*, p. 108:186 – 195, 2018. doi.org/10.1094/PHYTO-05-17-0175-R
- Ichinose, K.; Miyazi, K.; Matsuhira, K.; Yasuda, K.; Sadoyama, Y.; Tuan, D. H.; Bang, D. V.; Unreliable pesticide control of the vector psyllid *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) for the reduction of microorganism disease transmission. *J. Environ. Sci. Health B*, 45:466-472, 2010
- Jin, L.; Mackey, D. M. Measuring callose deposition as an indicator of cell wall reinforcement, during bacterial infection in *Arabidopsis*. In P. Shan & L. He (Eds.), *Plant Pattern Recognition Receptors*, 1578, 195-205, 2017
- Klessig, D., F. et al. Systemic Acquired Resistance and Salicylic Acid: Past, Present, and future. *The American Phytopathological Society*, v. 31, n. 9, p. 871-888, 2018. <https://doi.org/10.1094/MPMI-03-18-0067-CR>
- Kruse, A.; Fattah-Hosseini, S.; Saha, S.; Johnson, R.; Warwick, E.; Sturgeon, K.; Muller, L.; Maccross, M. J.; Shatters JR, R. G.; Heck, M. C. Combining 'omics and microscopy to visualize interactions between the Asian citrus psyllid vector and the Huanglongbing pathogen *Candidatus Liberibacter asiaticus* in the insect gut. *PLoS ONE*, v. 6, n. 12, 2017. e0179531.
- Koh, E. J.; Zhou, L.; Williams, D. S.; Park, J.; Ding, N.; Duan, Y. P.; Kang, B. H. Callose deposition in the phloem plasmodesmata and inhibition of phloem transport in citrus leaves infected with “*Candidatus Liberibacter asiaticus*”. *Protoplasma*, v. 249, n. 3, p. 687–697, 2012
- Lacorte, C.; Romano, E. Transferência de vetores para *Agrobacterium*. BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T. (Org). *Manual de transformação genética de plantas*. Brasília: SPI/Embrapa, v.1, p.93-109, 1998.
- Li, J.; Kolbasov, V. G.; Pang, Z.; Duan, S.; Lee, D.; Huang, Y.; X. j.; Teper, D.; Lamichhane, T.; Wang, N. *Phytopathology Research*. 3:2, 2021
- Lin, H.; Chen, C.; Doddapaneni, H.; Duan, Y.; Civerolo, E. L.; Bal, X.; Zhao, X. A new diagnostic system for ultra-sensitive and specific detection and quantification of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the bacterium associated with citrus Huanglongbing. *Journal of Microbiological Methods*, v. 81, n. 1, p. 17–25, 2010

- Murray, M. G.; Thompson, W. F. Nucleic acids research rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, v. 8 n. 19, p. 4321–4326, 1980.
- Peng, A.; Zou, X.; He, Y.; Chen, S.; Liu, X.; Zhang, J.; Zhang, Q.; Xie, Z.; Long, J.; Zhao, X. Overexpressing a NPR1-like gene from *Citrus paradisi* enhanced Huanglongbing resistance in *C. sinensis*. *Plant Cell Rep.* 40, 529–541, 2021
- Nascimento, C.A.; Teixeira-Silva, N.S.; Caserta, R.; Marques, M.O.M.; Takita, M.A.; de Souza, A.A. Overexpression of CsSAMT in *Citrus sinensis* Induces Defense Response and Increases Resistance to *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Front. Plant Sci.* 13:836582, 2022
- Park, S. W.; Kaimoto, E.; Kumar, D.; Mosher, S.; Klessig, D. F. Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science*, v. 318, n. 5847, p. 113–116, 2007
28. Peng, A.; Zou, X.; He, Y.; Chen, S.; Liu, X.; Zhang, J.; Zhang, Q.; Xie, Z.; Long, J.; Zhao, X. Overexpressing a NPR1-like gene from *Citrus paradisi* enhanced Huanglongbing resistance in *C. sinensis*. *Plant Cell Rep.* 2021, 40, 529–541
- Pitino, M., Armstrong, C. M., Cano, L. M., & Duan, Y. Transient expression of *Candidatus liberibacter asiaticus* effector induces cell death in *Nicotiana benthamiana*. *Frontiers of Plant Science*, 7, 1-13, 2016.
- Shah, J.; Zeier, J. Long-distance communication and signal amplification in systemic acquired resistance. *Frontiers in Plant Science*, v. 4, n. 30, p. 1–16, 2013
- Shokrollah, H.; Abdullah, T.L.; Sijam, K.; Siti Nor, A.A.; Nur Ashikin, P.A. Differential reaction of citrus species in Malaysia to Huanglongbing (HLB) disease using grafting method. *AJABS*, 4, 32–38. 2009
- Sulzbach, M.; Oliveira, R. P.; Giraril, A. E.; Schwarz, S.; Bertolini, E.; Schneider, L.; Gonzatto, M. Huanglongbing (HLB) dos Citros e 36 Estratégias de Manejo Visando Prevenção e Controle. *Embrapa clima temperado*, 2017
- Tieman, D.; Zeigler, M.; Schmelz, E.; Taylor, M. G.; Rushing, S.; Jones, J. B.; Klee, H. J. Functional analysis of a tomato salicylic acid methyl transferase and its role in synthesis of the flavor volatile methyl salicylate. *Plant Journal*, v. 62, n. 1, p. 113–123, 2010
- Tiwari, S.; Mann, R. S.; Rogers, M. E.; Stelinski, L. L. Insecticide resistance in field populations of Asian citrus psyllid on Florida. *Pest Manag. Sci.* 67:1258-1268, 2011
- Wang Z., Yin Y., Hu H., Yuan Q., Peng G., Xia Y. Development and application of molecular-based diagnosis for “*Candidatus Liberibacter asiaticus*”, the causal pathogen of citrus huanglongbing. *Plant Pathology*, v. 55 n. 5, p. 630–638, 2006

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

Zou, X.; Bai, X.; Wen, Q.; Xie, Z.; Wu, L.; Peng, A.; He, Y.; Xu, L.; Chen, S. Comparative Analysis of Tolerant and Susceptible Citrus Reveals the Role of Methyl Salicylate Signaling in the Response to Huanglongbing. *J. Plant Growth Regul.* 38, 1516–1528, 2019

Zou, X.; Zhao, K.; Liu, Y.; Du, M.; Zheng, L.; Wang, S.; Xu, L.; Peng, A.; He, Y.; long, Q.; Chen, S. Overexpression of Salicylic Acid Carboxyl Methyltransferase (CsSAMT1) Enhances Tolerance to Huanglongbing Disease in Wanjincheng Orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). *Int. J. Mol. Sci.* v. 22, p. 2803, 2021

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados obtidos nas condições experimentais utilizadas neste trabalho permitem concluir que o MeSA não é o único volátil responsável pela atratividade em plantas infectadas com CLAs. O aumento dos níveis de MeSA em plantas transgênicas interferiu no comportamento do inseto. Esses resultados contribuem para ampliar o entendimento da biologia da interação planta-bactéria-inseto e uso como ferramenta biotecnológica.

Nas condições experimentais utilizadas, as plantas transgênicas superpressando o gene *CsSAMT* com altas concentrações de MeSA não foram efetivas para controle da bactéria, diferente do observado por outros autores (Zou et al, 2019, 2021). Entretanto, com base em estudos prévios mostrando a eficiência do SA para manejo do HLB, e a ativação do SA sinalizado pelo MeSA, não se pode descartar a possibilidade da quebra de resistência dessas plantas devido a elevada população de bactérias inoculadas através de enxertias de borbulhas, tal como utilizadas no presente trabalho.

Portanto, estudos de infecção natural através da inoculação por vetores são essenciais para verificar se esse gene realmente teria potencial em conferir tolerância ao HLB nas variedades comerciais utilizadas no Brasil. Recentemente, o Centro de Citricultura Sylvio Moreira obteve aprovação de LPMA, pela CTNBIO, para testes dessas plantas em campo, as quais foram plantadas em novembro de 2022. Portanto, num espaço de tempo não muito longo espera-se ter respostas destas plantas transgênicas quanto a tolerância ao HLB em região com alta pressão da doença e abundância do vetor.

LITERATURA CITADA

- Zou, X.; Bai, X.; Wen, Q.; Xie, Z.; Wu, L.; Peng, A.; He, Y.; Xu, L.; Chen, S. Comparative Analysis of Tolerant and Susceptible Citrus Reveals the Role of Methyl Salicylate Signaling in the Response to Huanglongbing. *J. Plant Growth Regul.* 38, 1516–1528, 2019
- Zou, X.; Zhao, K.; Liu, Y.; Du, M.; Zheng, L.; Wang, S.; Xu, L.; Peng, A.; He, Y.; Long, Q.; Chen, S. Overexpression of Salicylic Acid Carboxyl Methyltransferase (CsSAMT1) Enhances Tolerance to Huanglongbing Disease in Wanjincheng Orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). *Int. J. Mol. Sci.* v. 22, p. 2803, 2021. <https://doi.org/10.3390/ijms22062803>