



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

**Respostas fisiológicas, bioquímicas e epigenéticas de espécies de citros a
Candidatus Liberibacter asiaticus empregando diferentes combinações de
enxertia**

Uiara Souza

ILHÉUS - BAHIA - BRASIL

JUNHO DE 2022

Uiara Souza

**Respostas fisiológicas, bioquímicas e epigenéticas de espécies de citros a
Candidatus Liberibacter asiaticus empregando diferentes combinações de
enxertia**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Genética e Biologia Molecular.

Área de Concentração: Genética e Biologia Molecular

APROVADA:

Dra. Dayse Drielly Souza Santana Vieira
(Ufopa)

Dr. Nelson Arno Wulff
(FUNDECITRUS)

Dr. Carlos Augusto Dórea Bragança
(UFRB)

Dr. Helvécio Della Coletta-Filho
(CCSM- IAC)

Prof. Dr. Abelmon da Silva Gesteira
(Embrapa-UESC-Orientador)

ÍNDICE

RESUMO	IX
ABSTRACT	XI
1. INTRODUÇÃO	19
2. HIPÓTESE	20
3. OBJETIVOS	20
3.1. Objetivo geral:	20
3.2. Objetivos específicos:.....	21
4. REVISÃO DE LITERATURA	22
4.1. Importância socioeconômica da citricultura.....	22
4.2. Botânica e principais espécies cultivadas	23
4.3. <i>Huanglongbing</i> (HLB)	24
4.3.1. Agente causal: <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> (CLas).....	24
4.3.2. Vetor: <i>Diaphorina citri</i>	24
4.3.3. Sintomas	26
4.4. Mecanismos envolvidos na resistência.....	27
4.5. Relações hospedeiro-CLas.....	28
5. MATERIAL E MÉTODOS	34
5.1. Material vegetal, condições de inoculação e manutenção de plantas	34
5.2. Delineamento experimental	35
5.3. Avaliações biométricas	36
5.4. Extração de DNA para detecção de CLas	37
5.5. PCR quantitativo em tempo real (qPCR) para detecção de CLas	38
5.6. Análises anatômicas.....	38
5.7. Análise de metilação do DNA total usando amplificação de polimorfismo sensível à metilação (MSAP)	39
5.8. Análises estatísticas	40
6. RESULTADOS	41
6.4. Detecção de <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>	41
6.5. Avaliações biométricas	45
6.6. Análises anatômicas.....	49
6.7. Análise de metilação do DNA total por MSAP.....	58
7. DISCUSSÃO	64
8. CONCLUSÕES	69
9. REFERÊNCIAS	69
MATERIAL SUPLEMENTAR	89

Não foi fácil chegar até aqui, mas... alguém disse que seria?

É com imensa alegria que dedico essa conquista a todos que me incentivaram e me inspiraram, em especial ao Dr. Abelmon da Silva Gesteira, ao Dr. Eduardo Augusto Girardi, a Dr^a. Juliana Freitas-Astúa e ao Dr. Walter dos Santos Soares Filho. Obrigada por todos os ensinamentos!

Dedico!

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, pelo dom da vida e por nunca me desamparar. Deus disse: de maneira alguma te deixarei, nunca, jamais te abandonarei. *Hebreus 13:5*;

A meus orientadores Prof. Dr. Abelmon da Silva Gesteira, Dr^a. Juliana Freitas-Astúa e Dr. Eduardo Augusto Girardi agradeço pela confiança depositada em mim e por toda orientação recebida. Tenham certeza que aprendi muito;

Agradeço aos meus, pais Balbino Serqueira Souza e Iris Souza por todo amor, paciência, educação e sabedoria. Tudo que sou devo a vocês;

A minha irmã Taiara Souza, por ser uma pessoa tão amável, carinhosa e preocupada. Agradeço por nos presentear com esse ser de luz que é Sophia, ela chegou para trazer luz e felicidade para minha vida. Te amo muito;

A Paulo Laesso por todo carinho e paciência;

A Ótavia Reis por todo carinho e parceria e companheirismo no período em que morei em São Paulo;

As minhas amigas, Fátima Costa, Nívea Adão, Mariana Lira, Olga Marques, Luziane Alves, Bruna Codorna, Magali Mota, Damiana Barros e Leandra Barros pelos momentos de alegria e acolhimento;

Ao Fundo de Defesa da Citricultura (FUNDECITRUS) pela produção das mudas, a Fundação Coopercitrus Credicitrus (FCC)- Bebedouro - SP por todo apoio prestado na enxertia e manutenção das mudas. A Laudecir Lemos Raiol Júnior por partilhar seu conhecimento e por toda colaboração nos experimentos. A Alécio de Souza Moreira por toda ajuda com as análises estatísticas;

Instituto Biológico de em São Paulo (IB-SP) e a toda equipe da Unidade Laboratorial de Referência em Biologia Molecular Aplicada- ULRBMA em especial a Camila, Pedro, Matheus, Mariane e Tháís;

Ao laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Mandioca e Fruticultura, em especial a Andresa Priscila de Souza Ramos e Raimundo Pereira da Silva pela ajuda na condução da análise de metilação do DNA e a. Dr^a. Cláudia Fortes Ferreira pela colaboração na análise e interpretação dos dados. A Adielle Rodrigues da Silva, Andressa Rodrigues de Oliveira Sousa e Ariana Silva Santos por toda ajuda e suporte.

Ao laboratório de Cultura de tecidos da Embrapa Mandioca e Fruticultura, em especial a Karen Cristina Fialho Dos Santos com a colaboração nas análises anatômicas.

A Universidade Estadual de Santa Cruz pelo ensino;

A FAPESB pelo apoio financeiro através da concessão da bolsa;

RESUMO

O Huanglongbing (HLB) é considerada a doença mais destrutiva dos citros no mundo e está associada às α -proteobactérias denominadas *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), *Ca. L. africanus* (CLaf) e *Ca. L. americanus* (CLam). No Brasil, o HLB foi reportado pela primeira vez no Estado de São Paulo em 2004 e, desde então, vem prejudicando e colocando em risco toda a cadeia citrícola nacional. Embora todas as variedades comerciais de citros sejam suscetíveis à doença, estudos sugerem que o grau de resistência e/ou tolerância possa ser influenciado pela copa e/ou porta-enxertos. Neste trabalho, foram avaliadas respostas fisiológicas, bioquímicas e epigenéticas durante a colonização por CLas em plantas de citros utilizando diferentes combinações de enxertia. Mudanças de *Citrus x sinensis* (laranjeira-doce Valência, VC) e *Poncirus trifoliata* (trifoliateiro Pomeroy, TR) foram selecionadas por apresentar maior e menor suscetibilidade a CLas, respectivamente, e foram usadas como pés-francos ou enxertadas nas seguintes posições de copa/porta-enxerto: VC/TR, TR/VC e dupla copa VC+TR/TR e TR+VC/VC. Nos tratamentos compostos por dupla copa, foram mantidas a copa do porta-enxerto original e a copa do genótipo enxertado. Plantas com 32 meses de idade cultivadas em sacolas contendo substrato Biomix Mudanças & Plantio Orgânico foram mantidas em casa de vegetação foram inoculadas com borbulhas de laranjeira-doce Pera infectadas por CLas enxertadas no porta-enxerto. As plantas do grupo controle foram enxertadas com borbulhas saudáveis. Folhas e raízes foram coletadas para análises moleculares, anatômicas e epigenéticas aos 4, 8 e 13 meses após a inoculação (MAI). A partir de 4 MAI, já era possível detectar CLas tanto em folhas como em raízes. Detectou-se CLas por qPCR em 70% das plantas que apresentavam VC como copa, enquanto combinações com TR na posição de copa apresentavam 28 % de infecção. No sistema radicular CLas foi detectada em 61 % em plantas de TR e 75 % das plantas de VC. Os pés-francos de VC inoculada apresentaram redução 60% no crescimento da parte aérea quando comparados com as plantas não inoculadas. Pé-franco VC e as combinações VC/TR e TR+VC/VC foram as que apresentaram redução 30% da matéria seca do sistema radicular quando comparados às plantas controle. Os dados obtidos através de corte transversais de pecíolo e raízes das combinações testadas demonstram ausência ou pouca deposição de calose em plantas de TR infectados com CLas, ao mesmo tempo em que houve menor deposição de calose na copa de laranja Valência quando TR foi usado como porta-

enxerto. No geral, observou-se hipometilação nas combinações com a copa de TR e maior metilação nas combinações com a copa de VC. No entanto, a média dos perfis metilados aumentou com o passar do tempo para ambas as copas. Esse é um trabalho inédito onde foi possível evidenciar uma ligação direta com a presença e título de CLas e os perfis de metilação. Considerando o conjunto dos resultados, confirmou-se experimentalmente em condições controladas que a posição da variedade na combinação de copa e porta-enxerto influencia diretamente na infecção por CLas, assim como nas características anatômicas, biométricas e nos padrões de metilação do DNA. Variedade mais susceptível ao HLB determinou maiores danos quando empregada como copa. Espera-se que esse estudo possa contribuir para o avanço do conhecimento sobre os mecanismos de resistência genética ao HLB presentes em plantas dos gêneros *Citrus* e *Poncirus*, seja para explorar combinações de enxertia mais tolerantes em curto prazo, seja para obter variedades resistentes no futuro.

Palavras-chave: *Citrus x sinensis*, *Poncirus trifoliata*, Alterações citológicas, Huanglongbing, Metilação, Propagação.

Physiological, biochemical and epigenetic responses of citrus species to *Candidatus*
Liberibacter asiaticus using different grafting combinations

ABSTRACT

Huanglongbing (HLB) is considered the most destructive disease of citrus worldwide and is associated with the α -proteobacteria *Candidatus* *Liberibacter asiaticus* (CLas), *Ca. L. africanus* (CLaf) and *Ca. L. americanus* (CLam). In Brazil, HLB was first reported in the State of São Paulo in 2004, and since then it has been harming and jeopardizing the entire national citrus chain. Although all commercial citrus varieties are susceptible to the disease, studies suggest that the level of resistance and/or tolerance may be influenced by the scion and/or rootstock varieties. In this work, physiological, biochemical and epigenetic responses during CLas colonization in citrus plants with different grafting combinations were evaluated. *Citrus x sinensis* (Valencia sweet orange, VC) and *Poncirus trifoliata* (Pomeroy trifoliolate orange, TR) were selected for presenting higher and lower susceptibility to CLas, respectively, and were used as seedlings (ungrafted plants) or grafted in the following scion/rootstock combinations: VC/TR, TR/VC and double scion, TR+VC/TR and TR+VC/VC. In the double scion treatments, the scion of the original rootstock and the scion of the grafted genotype were both maintained. Thirty-two-month-old plants grown in plastic bags in a greenhouse were inoculated with CLas-infected Pera sweet orange buds, whereas the control plants were mock-inoculated. Leaves and roots were collected for molecular, anatomical and epigenetic analyses at 4, 8 and 13 months after inoculation (MAI). From 4 MAI onwards, it was already possible to detect CLas in both leaves and roots. It was detected CLas by qPCR in 70% of the plants that presented VC as crown, while combinations with TR in the crown position presented 28% of infection, in the root system CLas was detected in 61% in TR plants and 75% of VC plants. The inoculated seedlings VC plants showed a reduction 60% in shoot growth when compared to the non-inoculated ones. The seedlings VC seedlings and the VC/TR and TR+VC/VC combinations showed the highest reduction 30 % in root system dry matter when compared to the control plants. The cross-sections of the petiole and roots of the tested combinations show absence or little deposition of callose in TR plants infected with CLas. Additionally, the deposition of callose in the VC scion tissues was lower on TR used as rootstock. While hypomethylation was observed in the combinations with the TR scion, hypermethylation pattern was observed in the combinations with the VC scion. However,

the average of the methylated profiles increased over time for both scions. This is an unprecedented work where it was possible to evidence a direct link with the presence and titer of CLas and the methylation profiles. Considering the set of results, it was experimentally confirmed in controlled conditions that the position of the variety in the scion/rootstock combination directly modulates the response to CLas infection. It also interferes with the anatomical and biometric features, as well as the DNA methylation patterns. Highly HLB-susceptible varieties determined higher damage when used in the scion position. This study may contribute to the advancement of knowledge about mechanisms of genetic resistance to HLB observed in *Citrus* sp. and *Poncirus* sp., which will support either the exploration of more tolerant grafting combination in the short term or the obtention of resistant varieties in the future.

Keywords: *Citrus ×sinensis*, *Poncirus trifoliata*, Cytological alterations, Huanglongbing, Methylation, Propagation.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Títulos bacterianos médios de *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) em folhas de laranja-doce Valência (VC) e *Poncirus trifoliata* (TR) aos 4, 8 e 13 meses após a inoculação (MAI) nas diferentes combinações de copa e porta-enxerto.....43
- Tabela 2.** Títulos bacterianos médios de *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) em raízes de diferentes combinações de copa e porta-enxerto de laranja-doce Valência (VC) e *Poncirus trifoliata* (TR) aos 4, 8 e 13 meses após a inoculação (MAI).....45
- Tabela 3.** Pontos médios de deposição de calose para o desdobramento do fator combinação copa/porta-enxerto para plantas inoculadas com *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) em folhas das combinações de laranja-doce Valência (VC) e *Poncirus trifoliata* (TR) inoculadas com *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) e avaliadas aos 4 e 13 meses após a inoculação (MAI).....49
- Tabela 4.** Pontos médios de deposição de calose para o desdobramento do fator combinação copa/porta-enxerto dentro do nível inoculação em folhas das combinações de laranja-doce Valência (VC) e *Poncirus trifoliata* (TR) inoculadas ou não com *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) e avaliadas aos 4 e 13 meses após a inoculação (MAI).....50
- Tabela 5.** Área média de deposição de calose (μm) para o desdobramento do fator combinação copa/porta-enxerto para plantas inoculadas com *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) em folhas das combinações de laranja-doce Valência (VC) e *Poncirus trifoliata* (TR) inoculadas com *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) e avaliadas aos 4 e 13 meses após a inoculação (MAI).....51
- Tabela 6.** Área média de deposição de calose (μm) para o desdobramento do fator combinação copa/porta-enxerto dentro do nível inoculação em folhas das combinações de laranja-doce Valência (VC) e *Poncirus trifoliata* (TR) inoculadas ou não com *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) e avaliadas aos 4 e 13 meses após a inoculação (MAI).....52
- Tabela 7.** Área médias de deposição de calose (μm) para o desdobramento do fator combinação copa/porta-enxerto em raízes das combinações de laranja-doce Valência (VC) e *Poncirus trifoliata* (TR) inoculadas ou não com *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) e avaliadas aos 4 meses após a inoculação (MAI).....53

Tabela 8. Área médias de deposição de calose (μm) para o desdobramento do fator combinação copa/porta-enxerto dentro do nível inoculação em raízes das combinações de laranjeira-doce Valência (VC) e *Poncirus trifoliata* (TR) inoculadas ou não com *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) e avaliadas aos 4 meses após a inoculação (MAI).....54

Tabela 9. Área médias de deposição de calose (μm) para o desdobramento do fator combinação copa/porta-enxerto dentro do nível inoculação em folhas das combinações de laranjeira-doce Valência (VC) e *Poncirus trifoliata* (TR) inoculadas ou não com *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) e avaliadas aos 13 meses após a inoculação (MAI).....55

Tabela 10. Diferentes tipos de MSAP dentro dos níveis de citosina metilada nas diferentes combinações de enxertia entre laranjeira-doce Valência (VC) e *Poncirus trifoliata* (TR) em folhas coletadas aos 4 e 13 meses após a inoculação (MAI) com *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas).....60

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Psílídeo asiático dos citros (*Diaphorina citri* Kuwayama - Psyllidae). Fonte: Fundecitrus.....25
- Figura 2.** Sintomas de plantas infectadas com *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas). **A:** Ramos com folhas amareladas e folhas com aspecto mosqueado. **B:** Frutos com tamanho reduzido e assimétrico. Fonte: Fundecitrus.....26
- Figura 3.** Representação esquemática da inoculação de *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) em diferentes combinações de copa/porta-enxerto variando a posição da espécie no momento da enxertia. **A:** VC – laranjeira-doce Valência [*Citrus xsinensis* (L.) Osbeck] suscetível ao HLB e TR – trifoliateiro Pomeroy *Poncirus trifoliata* (L.) tolerante ao HLB. **B:** Plantas pé-franco e em diferentes combinações de copa/porta-enxerto. **C:** Inoculações no porta-enxerto com borbulhas infectadas (amarelo) e não infectadas (cinza) para todos os tratamentos, sendo inoculadas (⊙, folhas amarelas) ou não inoculadas (©, folhas verdes).....36
- Figura 4.** Incidência de plantas positivas para *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) em plantas de laranjeira-doce Valência (VC) e *Poncirus trifoliata* (TR) nas diferentes combinações de copa e porta-enxerto avaliadas aos 4, 8 e 13 meses após a inoculação (MAI). **A:** Amostras de folhas. **B:** Amostras de raízes.....41 e 42
- Figura 5.** Plantas de pé-franco e enxertadas com copa simples ou dupla empregando diferentes combinações de laranjeira-doce Valência [*Citrus xsinensis* (L.) Osbeck] (VC) e trifoliateiro Pomeroy *Poncirus trifoliata* (L.) (TR) aos 395 dias após a inoculação com *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas).....46
- Figura 6.** Análise biométrica em plantas de laranjeira-doce Valência [*Citrus xsinensis* (L.) Osbeck] (VC) e trifoliateiro Pomeroy *Poncirus trifoliata* (L.) (TR) inoculadas com *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas). **A:** Taxa de crescimento de parte aérea (%) de plantas de citros avaliadas entre 30 e 180 dias após as inoculações. **B:** Matéria seca de raiz (g) de plantas de citros avaliadas 395 dias após as inoculações.....47
- Figura 7.** Dano relativo ao sistema radicular observado nas diferentes combinações de laranjeira-doce Valência [*Citrus xsinensis* (L.) Osbeck] (VC) e trifoliateiro Pomeroy

Poncirus trifoliata (L.) (TR) aos 395 dias após a inoculação com *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas).....48

Figura 8. Deposição de calose em pecíolos e raízes de plantas controles de laranja Valência (VC) e *Poncirus trifoliata* (TR) avaliadas com 4 e 13 meses após a inoculação com borbulhas saudáveis, corados com azul de anilina e analisados sob microscópio de fluorescência. Setas amarelas indicam pontos de deposição de calose.....56

Figura 9. Deposição de calose em pecíolos e raízes de laranja Valência (VC) e *Poncirus trifoliata* (TR) avaliadas com 4 e 13 meses após a inoculação com *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), corados com azul de anilina e analisados sob microscópio de fluorescência. Setas amarelas indicam pontos de deposição de calose.....57

Figura 10. Heatmap do perfil de metilação obtido com a análise MSAP, usando as enzimas HpaII e MspI, para as diferentes combinações de laranjeira-doce Valência (VC) e *Poncirus trifoliata* (TR) inoculadas com *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas). **A:** Avaliadas com 4 meses após as inoculações e **B:** Avaliadas com 13 meses após as inoculações. FICM: metilação completa e hemimetilação de ambas citosinas; NM: não houve metilação; M-HpaII: hemimetilação da citosina externa e M-MspI: metilação completa e hemimetilação da citosina interna.....62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CLaf - *Candidatus* Liberibacter africanus

CLam - *Candidatus* Liberibacter americanus

CLas - *Candidatus* Liberibacter asiaticus

COX - Gene mitocondrial citocromo oxidase

Cq - Quantification cycle

Ct - Cycle threshold

CTAB - Brometo de hexadeciltrimetilamônio catiônico surfactante

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

HLB - Huanglongbing

Log - Logaritmo

MSAP - Amplificação de Polimorfismo Sensível à Metilação

qPCR - Reação em cadeia da polimerase em tempo real

rDNA - DNA ribossômico

JA - Ácido Jasmônico

SA - Ácido salicílico o etileno

ET - Etileno

Proteínas PR - Proteínas Relacionadas à patogênese

PAMPs - Padrão Molecular Associado a Patógenos

PTI - Imunidade Desencadeada por PAMP

ETI - Imunidade Acionada por Efeitor

DEGs - Genes Diferencialmente Expressos

TR pé-franco^o - Pé-franco de *P. trifoliata*, avaliada a planta inoculada

TR pé-franco^o - Pé-franco de *P. trifoliata* avaliada a planta não inoculada

TR/VC^o - Copa de *P. trifoliata* enxertada em porta-enxerto de laranja Valência, avaliada a planta não inoculada

TR/VC^o - Copa de *P. trifoliata* enxertada em porta-enxerto de laranja Valência, avaliada a planta inoculada

TR+VC/VC^o - Duas copas de *P. trifoliata* e Valência sobre o porta-enxerto de Valência, avaliando a copa de Valência das plantas controles

TR+VC/VC^o - Duas copas de *P. trifoliata* e Valência sobre o porta-enxerto de Valência, avaliando a copa de *P. trifoliata* das plantas controles

TR+VC/VC^o - Duas copas de *P. trifoliata* e Valência sobre o porta-enxerto de Valência, avaliando a copa de Valência das plantas inoculadas

TR+VC/VC^o - Duas copas de *P. trifoliata* e Valência sobre o porta-enxerto de Valência, avaliando a copa de *P. trifoliata* das plantas inoculadas

VC pé-franco^o - Pé-franco de Valência avaliada a planta inoculada

VC pé-franco^o - Pé-franco de Valência, avaliada a planta não inoculada

VC/TR^o - Copa de laranja Valência enxertada no porta-enxerto de *P. trifoliata*, avaliada a planta inoculada

VC/TR^o - Copa de laranja Valência enxertada no porta-enxerto de *P. trifoliata*, avaliada a planta não inoculada

TR+VC/TR^o - Duas copas, *P. trifoliata* e laranja Valência em porta-enxerto de *P. trifoliata*, avaliando a copa de Valência das plantas controles

TR+VC/TR^o - Duas copas, *P. trifoliata* e laranja Valência em porta-enxerto de *P. trifoliata*, avaliando a copa das *P. trifoliata*

TR+VC/TR^o - Duas copas, *P. trifoliata* e laranja Valência em porta-enxerto de *P. trifoliata*, avaliando a copa de Valência das plantas inoculadas

TR+VC/TR^o - Duas copas, *P. trifoliata* e laranja Valência em porta-enxerto de *P. trifoliata*, avaliando a copa de *P. trifoliata* das plantas inoculadas

1. INTRODUÇÃO

O Huanglongbing (HLB), também conhecido como *Greening*, é considerada a doença mais importante e destrutiva da citricultura no mundo, sendo associada às α -proteobactérias Gram negativas *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), *Ca. L. africanus* (CLaf) e *Ca. L. americanus* (CLam) (Bové, 2006). As bactérias CLas e CLam são transmitidas pelo psílideo *Diaphorina citri* Kuwayama (Psyllidae) e CLaf por *Trioza erythrae* Del Guercio (Psyllidae) (Bové, 2006; Coletta-Filho *et al.*, 2004; Hollis, 1984; Burckhardt, Ouvrard e Percy, 2021). No Brasil, o primeiro relato da doença foi no estado de São Paulo em 2004 (Coletta-Filho *et al.*, 2004; Teixeira *et al.*, 2005a; 2005b), sendo relatada posteriormente em Minas Gerais em 2005 (Teixeira *et al.*, 2005), Paraná em 2007 (Meneguim *et al.*, 2008) e em 2019 no estado de Mato Grosso do Sul (MAPA, 2020).

Plantas doentes apresentam como principal característica folhas com mosqueado ou clorose irregular e amarelecimento da nervura central, sintomas que muitas vezes podem ser confundidos com deficiência nutricional. Nos frutos, a doença causa o desenvolvimento lento e maturação irregular, tornando-os pequenos e deformados, com alteração na coloração, elevada acidez do suco, baixa concentração de sólidos solúveis e presença de sementes abortadas (Bassanezi *et al.*, 2009). A queda precoce de frutos é frequente (Bové, 2006). O controle do psílideo é uma das formas mais importantes de manejo do HLB, que inclui ainda o uso de mudas saudáveis e a rápida eliminação das plantas doentes (Bassanezi *et al.*, 2020).

CLas é uma bactéria restrita aos vasos do floema, podendo se distribuir por quase toda a planta após a transmissão pelo vetor, desde as nervuras da folha, caule, tecidos florais (pétalas, pistilos e estames), frutos (Bové, 2006; Tatineni *et al.*, 2008; Hajeri e Yokomi, 2019), raízes (Boava *et al.*, 2017) até tegumento das sementes, porém, a transmissão via sementes até o momento não foi verificada (Morelli *et al.*, 2020). A distribuição da bactéria na planta ocorre de forma irregular, movimentando-se no sentido da relação fonte: dreno, preferencialmente para tecidos em desenvolvimento, e ocasiona danos na raiz antes da observação dos sintomas na parte aérea (Kunta *et al.*, 2014; Nehela e Killiny, 2020; Raiol-Junior *et al.*, 2021). A bactéria também pode ser detectada nas raízes antes da planta apresentar qualquer sintoma visual na parte aérea (Johnson *et al.*, 2014).

Pesquisas vêm sendo desenvolvidas na busca de variedades com resistência e/ou tolerância à CLas (Albrecht e Bowman, 2019). A espécie *Poncirus trifoliata*, que é usualmente utilizada como porta-enxerto de *Citrus*, apresenta menor suscetibilidade ao HLB, sendo infectada por CLas (Alves *et al.*, 2021), mas considerada parcialmente tolerante (Albrecht e Bowman 2019; Boava *et al.*, 2017), parcialmente resistente ou com certo grau de resistência (Folimonova *et al.*, 2009; Curtulo *et al.*, 2020) e até potencialmente resistente (Albrecht e Bowman, 2012) em função de recuperação após infecção ou infecção tardia (Ramadugu *et al.*, 2016).

Nesse cenário, é de grande importância a compreensão de alterações fisiológicas, moleculares, anatômicas e epigenéticas decorrentes da interação citros/CLas em genótipos com diferentes suscetibilidades ao HLB, bem como a influência da posição do genótipo na combinação de copa e porta-enxerto durante a colonização com CLas. Essa compreensão pode contribuir para o avanço do conhecimento sobre mecanismos genéticos de resistência e/ou tolerância ao HLB, seja para explorar combinações de enxertia mais tolerantes em curto prazo, seja para obter variedades resistentes no futuro.

2. HIPÓTESE

A combinação de enxertia entre espécies de citros com diferentes níveis de tolerância a CLas pode modular a reação de uma planta infectada com a bactéria, promovendo uma maior tolerância a doença.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral:

Avaliar as respostas moleculares, biométricas, anatômicas e alterações no perfil de metilação após a colonização com *Candidatus Liberibacter asiaticus* em plantas de pé-franco e em diferentes combinações de copa e porta-enxerto com espécies de citros apresentando diferentes níveis de tolerância.

3.2. Objetivos específicos:

- ❖ Analisar a infecção e os sintomas de HLB em plantas de pé-franco e em diferentes combinações de copa e porta-enxerto submetidas à enxertia simples e dupla e inoculadas com CLas por borbulhia;
- ❖ Verificar possíveis alterações anatômicas em folhas e raízes de plantas de pé-franco e em diferentes combinações de copa e porta-enxerto em resposta à colonização por CLas;
- ❖ Avaliar as possíveis respostas epigenéticas usando a técnica MSAP para identificar alterações de produtos metilados em folhas de plantas de pé-franco e em diferentes combinações de copa e porta-enxerto à colonização por CLas.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1. Importância socioeconômica da citricultura

A citricultura é uma das principais atividades do agronegócio brasileiro, destacando-se o Brasil como maior produtor de laranja-doce e exportador de suco de laranja concentrado, bem como um grande produtor de tangerinas e limas-ácidas (Fundecitrus, 2019; FAO, 2022). Essa posição ocorreu na década de 1980, quando o Brasil superou os Estados Unidos da América (EUA) e conseguiu se tornar o maior produtor de laranja do mundo (Neves e Trombin, 2017b).

Os citros são cultivados em mais de 140 países, sendo que os principais países produtores de laranja em 2019 são o Brasil, com 17,073 milhões de toneladas, China (10,435 milhões de t), Índia (9,509 milhões de t), Estados Unidos da América (4,832 milhões de t), México (4,736 milhões de t) e Espanha (3,226 milhões de t) (FAO, 2022).

A produção de laranja no Brasil teve uma área colhida de 572.698 (ha), com produção 16,707.897 milhões de toneladas em 2020, sendo que essa produção se dá principalmente no cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro, com 13,952 milhões de toneladas em 2020. Em terceiro lugar aparece Bahia (com 595,404 t), seguido por Paraná (585,721 t) e Pará (387,570 t) (IBGE 2022). A safra de laranja 2021/22 no cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro foi de 264,97 milhões de caixas (Fundecitrus, 2022).

A citricultura brasileira encerrou o ano de 2021 registrando alta 17% no número de admissões, as contratações geradas setor agrícola saiu de 38.327 para 44.837 empregados, representando assim 5,6% dos empregos gerados pela agricultura no Brasil (CitrusBR, 2022). Ao mesmo tempo em o Produto Interno Bruto (PIB) do agronegócio brasileiro, cresceu 8,36% no mesmo período (CEPEA, 2022).

As frutas de citros constituem uma fonte chave de vitamina C e fornecem uma infinidade de outros nutrientes essenciais e fibras (Sicari *et al.*, 2016). Além de frutas frescas e sucos, os citros são cultivados para a produção de óleo e ácido cítrico, geralmente usados nas indústrias de alimentos, farmacêutica, de aromas e cosmética, além da agroquímica no controle de pragas, por suas composições químicas possuírem uma gama de atividades biológicas, que incluem atividade antimicrobiana, antioxidante, anticancerígena, anti-inflamatória e inseticida (González-Mas *et al.*,

2019, El Sawi *et al.*, 2019, Raspo *et al.*, 2020), enquanto a polpa é usada principalmente como ração animal (Lu *et al.*, 2018; Casagrande *et al.*, 2021).

4.2. Botânica e principais espécies cultivadas

Os citros são originados de regiões tropicais e subtropicais da Ásia e Oceania, com exceção do pomelo que é um provável híbrido natural nativo da Ilha de Barbados, no Caribe (Donadio *et al.*, 2005; FAO,2022). São pertencentes à família *Rutaceae*, subfamília *Aurantioideae*, sendo que a maioria das espécies cultivadas de importância econômica está dentro do gênero *Citrus*. Outras espécies cultivadas estão incluídas nos gêneros *Fortunella*, *Poncirus*, *Eremocitrus* e *Microcitrus* (Davies e Albrigo, 1994; Wu *et al.*, 2018). Os taxonomistas atualmente incluíram o gênero *Citrus* na Ordem Sapindales, enquanto antes pertencia à Ordem Geraniales (Ollitrault, Curk, Krueger, 2020; Rohini *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2018). Alguns autores consideram que esse gênero possui apenas três espécies verdadeiras, que são a toranja (*Citrus máxima* L., também conhecido como *Citrus grandis* L.) que provavelmente foi o primeiro ancestral, originou-se na Malásia e no arquipélago malaio; a cidra (*Citrus medica* L.), originária da Índia; e a tangerina (*Citrus reticulata* Blanco), originária da China. Os outros genótipos são derivados de hibridações entre elas e com o subgênero *Papeda* ou gêneros relacionados (Talon *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2018).

Dentre as espécies ou tipos de maior importância econômica dentro do gênero *Citrus*, destacam-se: laranja-doce [*C. xsinensis* (L.) Osbeck], tangerinas e híbridos (*C. reticulata* Blanco e outras espécies), limão-verdadeiro ou tipo siciliano [*C. xlimon* (L.) Burm. f.], limas-ácidas [*C. xaurantiifolia* (Christm.) Swingle e *C. xlatifolia* (Yu. Tanaka) Tanaka], pomelo (*C. xparadisi* Macfad.), entre outras (Neves *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2013).

Já o gênero *Poncirus* é pertencente à família *Rutaceae* (Huang *et al.*, 2021). Amplamente inserido da citricultura mundial, tem suas plantas mais usadas como porta-enxerto (Albrecht e Bowman, 2012) apresentando-se uma das fontes mais importantes de genes de resistência e tolerância para citros (Peng *et al.*, 2020). É caracterizado por apresentar sementes altamente poliembriônicas -presença de mais de um embrião por semente- fator que pode ajudar na obtenção de novas variedades por cruzamento, assim como na produção e estabelecimento de clones para uso como porta-enxerto (Moreira, Gurgel, Arruda, 1947; Soares Filho *et al.*, 2014; Santos *et al.*,

2015, Befu *et al.*, 2008), porte reduzido de planta e compatibilidade com a maioria das variedades de citros (Garnier, 1984; Folimonova *et al.*, 2009, Machado *et al.*, 2010, Albrecht e Bowman 2012; Miles *et al.*, 2017; Ramadugu *et al.*, 2016).

4.3. Huanglongbing (HLB)

4.3.1. Agente causal: *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas)

O HLB é uma doença associada a três bactérias pertencentes a espécies de procariotos gram-negativos, denominados *Candidatus Liberibacter* e pertencentes à subdivisão das α -proteobactérias, com colonização restrita ao floema das plantas e ao vetor *Diaphorina citri* (Bové, 2006). Essas bactérias recebem a designação de *Candidatus* por ainda não terem sido cultivadas em meio de cultura artificial e têm a denominação de acordo com o local em que foram primeiramente detectadas, sendo *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) (Jagoueix, Bové e Garnier, 1994), *Ca. L. africanus* (CLaf) (Planet *et al.*, 1995) e *Ca. L. americanus* (CLam) (Teixeira *et al.*, 2005b). Dentre essas três, CLas é a mais difundida e representa a maior ameaça à indústria citrícola em todo o mundo, enquanto CLaf ocorre principalmente na África e CLam, originalmente identificada no Brasil, praticamente não é mais encontrada nos pomares (Coletta-Filho *et al.*, 2004; Teixeira *et al.*, 2005; Lopes *et al.*, 2013).

Os primeiros relatos de HLB no Brasil foram em março de 2004 em pomares de citros localizados na região de Araraquara, SP (Coletta-Filho *et al.*, 2004; Teixeira *et al.*, 2005a; 2005b), sendo essa a primeira detecção da doença no continente americano. Em 2005, a doença foi detectada em Minas Gerais (Teixeira *et al.*, 2005) e dois anos depois no Paraná (Meneguim *et al.*, 2008). Já em 2019 foi relatada no Estado de Mato Grosso do Sul (Diário Oficial da União 2019; MAPA, 2020). Nos EUA, o HLB causado pelo CLas foi encontrado pela primeira vez na Flórida em 2005 (Sutton *et al.*, 2005) e, posteriormente, na Geórgia, Louisiana, Carolina do Sul, Arizona, Alabama, Texas e Califórnia. Encontra-se disseminada também pelo México e por praticamente todos os países da América Central e Caribe (Bassanezi *et al.*, 2009; Wang e Trivedi, 2013). Na América do Sul, além do Brasil, há presença do HLB na Argentina, no Paraguai, na Colômbia, na Guiana Francesa e na Venezuela (Outi *et al.*, 2014; COSAVE, 2018; Fundecitrus, 2017; Guerrero, 2018; Banco de dados global EPPO, 2020).

4.3.2. Vetor: *Diaphorina citri*

As bactérias associadas ao HLB são transmitidas entre plantas cítricas pelo psilídeo-asiático-dos-citros (ACP) *Diaphorina citri* Kuwayama (Psyllidae), inseto vetor de *Ca. L. asiaticus* (Burckhardt, Ouvrard e Percy, 2021) e *Ca. L. americanus* (Yamamoto *et al.*, 2006) e por *Trioza erythrae* Del Guercio (Hemiptera: Triozidae), inseto vetor de *Ca. L. africanus* (McClellan & Oberholzer, 1965). O ACP *D. citri* é o principal inseto vetor de bactérias associadas ao HLB (Figura 2). De origem asiática, o inseto vetor foi identificado durante a década de 1940 no Brasil mantendo o *status* de praga secundária. Maior importância foi dada a esse inseto quando observado que o ACP exerce papel crucial nas epidemias de HLB, sendo responsável pela disseminação de CLas, presente a partir de 2004. Geralmente os psilídeos são encontrados na face inferior de folhas maduras, mas têm preferência por brotações, onde se alimentam, fazem a oviposição e as ninfas se desenvolvem (Laranjeira *et al.*, 2018; Cifuentes-Arenas *et al.*, 2018). As ninfas possuem pouca mobilidade e permanecem em brotações novas, enquanto os adultos são alados e mais ativos, o que facilita a disseminação da doença (Singh & Yadav, 2018). As fêmeas de *D. citri* podem colocar até 800 ovos durante a sua vida.



Figura 1. Psilídeo asiático dos citros (*Diaphorina citri* Kuwayama - Psyllidae). Fonte: Fundecitrus.

O ciclo de vida total do ACP normalmente varia entre 15 e 47 dias dependendo da temperatura (Liu & Tsai, 2000; Grafton-Cardwell, *et al.*, 2013). *D. citri* tem como hospedeiras plantas da família Rutaceae, a exemplo de murta [*Murraya paniculata* (L.) Jack] e citros (Teixeira *et al.*, 2005; Bové, 2006), mas também é capaz de colonizar experimentalmente a pervinca (*Catharanthus roseus*) (Li *et al.*, 2018). Além disso, sabe-se que o psilídeo está presente nas principais regiões produtoras de citros do país (Laranjeira *et al.*, 2020). Segundo um levantamento realizado pelo Fundecitrus

(2021), a incidência média de laranjeiras com sintomas de HLB no cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste de Minas Gerais foi de 22,37% em 2021.

4.3.3. Sintomas

Os primeiros sintomas foliares identificados visualmente em pomares de citros são a presença de um ou mais ramos com folhas amareladas, inicialmente em poucas plantas (Bové, 2006; Bassanezi *et al.*, 2009). As folhas presentes nesses ramos perdem parte da sua coloração natural, apresentando-se irregularmente amareladas e esverdeadas, sem uma delimitação clara entre essas duas cores. A esse sintoma dá-se o nome de “mosqueado”, sendo ele o mais característico de plantas com HLB (Bové, 2006; Fundecitrus, 2019). As folhas de ramos sintomáticos podem apresentar-se curvadas, com tamanho reduzido, com nervuras mais grossas e escurecidas (Johnson *et al.*, 2014). Em estágios mais avançados da doença, pode ocorrer desfolha e morte das plantas. Os sintomas nos frutos incluem queda prematura, tamanho reduzido, assimetria, maturação incompleta (apresentam-se mais ácidos e com menores valores de concentração de sólidos solúveis, *ratio* e porcentagem de suco) e manutenção da coloração verde na região estilar (Brlansky *et al.*, 2009).

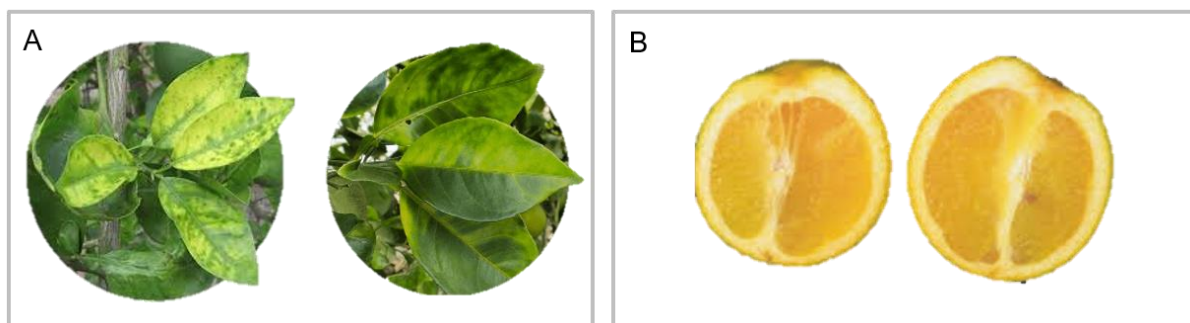


Figura 2. Sintomas de plantas infectadas com *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas). **A:** Ramos com folhas amareladas e folhas com aspecto mosqueado. **B:** Frutos com tamanho reduzido e assimétrico. Fonte: Fundecitrus.

Outros sintomas habitualmente observados consistem na seca e morte de ponteiros, definhamento progressivo da planta e aparecimento de deficiências nutricionais, especialmente de zinco (Coletta-Filho *et al.*, 2004). Esses sintomas ocorrem perante a reação da planta à infecção, em função da deposição de placas de calose ao redor dos poros dos plasmodesmos e nas células do floema condutoras de seiva elaborada, comprometendo o transporte de fotoassimilados (Koh *et al.*, 2012).

Antes dos sintomas visuais na parte aérea, no entanto, o HLB provoca a redução da matéria seca do sistema radicular de plantas infectadas (Johnson *et al.*, 2014).

Contudo, existem algumas formas de manejo da doença. A primeira delas e mais econômica é a prevenção, com o controle do químico do inseto vetor com rotação de produtos visando reduzir os riscos de resistência de *D. citri* a inseticidas, utilização de mudas saudáveis produzidas em ambientes protegidos e a erradicação de plantas doentes para redução das fontes de inóculo (Brasil, 2009; Gottwald, 2010; Boava *et al.*, 2014; Bassanezi *et al.*, 2020).

Outras medidas também podem ser essenciais para o controle do HLB: planejar o plantio e a renovação do pomar, se possível evitando áreas afetadas pelo HLB; plantar mudas saudáveis e vigorosas, produzidas em viveiros certificados; manter a planta bem nutrida; Inspeccionar com frequência o pomar; eliminar as plantas doentes; monitorar a presença do psilídeo por meio de armadilhas adesivas amarelas; controlar o psilídeo; Dar atenção às bordas dos experimentos; estabelecer parceria com seu vizinho e participar do manejo regional (Belasque Junior *et al.*, 2010; Fundecitrus, 2015; Bassanezi *et al.*, 2020).

4.4. Mecanismos envolvidos na resistência

A resistência de um hospedeiro, dentro do contexto da fisiologia do parasitismo, é definida por Pascholati (1994) como a capacidade da planta de atrasar ou de evitar a entrada e/ou subsequente atividade de um patógeno em seus tecidos. A resistência natural de plantas a patógenos baseia-se em barreiras e mecanismos de defesa já existentes, independente da chegada do patógeno ao sítio de infecção. Já a tolerância, segundo Caldwell *et al.* (1958), “é a capacidade das plantas suportarem a doença sem que haja muitos danos e perdas severas em produtividade ou qualidade”.

A reação da planta a determinado patógeno pode ser determinada por herança genética ou induzida, sendo que a planta passa a apresentar um estado geral de defesa após uma infecção inicial (Métraux, 2001). Para o desenvolvimento de resistência das plantas às doenças essenciais é necessário o eficiente reconhecimento de microrganismos invasores e a rápida indução de respostas de defesa das plantas frente ao ataque de patógenos (Cavalcante *et al.*, 2013; Curtolo *et al.*, 2012).

As defesas das plantas podem ser desencadeadas em três fases, a primeira dela é através do reconhecimento de padrões moleculares associadas a patógenos (“PAMPs e MAMPs”), que são reconhecidos pelos PRRs (Receptores de Reconhecimento de Padrão), resultando em imunidade desencadeada por PAMP (PTI) podendo interromper a invasão do patógeno. Sendo a segunda fase é desencadeada pela resistência específica do hospedeiro e a terceira fase defesa é devido ao reconhecimento da virulência do patógeno que é conhecida como imunidade acionada por efetor (ETI) (Jones & Dangl 2006; Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2017; Yu *et al.*, 2017; Andersen *et al.*, 2018; Curtolo *et al.*, 2020). A defesa das plantas é baseada na interação altamente específica que acontece entre efetores dos patógenos e produtos dos genes R (genes de resistência), que reconhece os genes de avirulência (*Avr*) do patógeno (Boller & Felix, 2009; Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011).

Logo após a interação PAMP-PRR e o reconhecimento inicial, seja por estímulo abiótico ou biótico, ocorre uma cascata de sinalizações, sendo a amplificação dos sinais feitos por mensageiros secundários como ácido jasmônico (JA), o ácido salicílico (SA), o etileno (ET), que por fim resulta ativação de fatores transcritos dos genes de defesa (Jones & Dangl 2006; Cavalcante *et al.*, 2013; Dalio, 2013; Curtolu *et al.*, 2021).

4.5. Relações hospedeiro-CLas

Até o presente momento, todas as cultivares comerciais de *Citrus* são suscetíveis à infecção por CLas (Bové, 2006; Albrecht e Bowman, 2019) e, entre as mais suscetíveis, estão as laranjeiras-doces e as tangerineiras, bem como outras espécies relacionadas e seus híbridos (Folimonova *et al.*, 2009). No entanto, análises de diferentes espécies próximas de citros indicaram que existe uma resistência significativa dentro da espécie de *P. trifoliata* (L.) Raf., e em alguns de seus híbridos, que são comumente usados como porta-enxertos, sendo considerada parcialmente tolerante (Albrecht & Bowman 2019; Boava *et al.*, 2017), tolerante (Curtolo *et al.*, 2020) parcialmente resistente ou com certo grau de resistência (Folimonova *et al.*, 2009) e potencialmente resistente (Albrecht & Bowman, 2012) em função de recuperação após infecção ou infecção tardia (Ramadugu *et al.*, 2016). Outras espécies de gêneros afins aos citros, na subfamília Aurantioideae, apresentaram maior potencial de

resistência às bactérias (Garnier, 1984; Miles *et al.*, 2017; Ramadugu *et al.*, 2016; Alves *et al.*, 2021), mas são pouco utilizadas em melhoramento genético ou enxertia em comparação ao *P. trifoliata*.

Os porta-enxertos são partes integrantes da produção de citros (Albrecht & Bowman, 2019). Eles não apenas influenciam a capacidade de transportar os nutrientes, mas também definem o tamanho da árvore, suportam condições ambientais e de solo desfavoráveis, alteram a qualidade dos frutos da copa e resistência a pragas e patógenos (Castle, 2010; Castle *et al.*, 2011; McCollum e Bowman, 2017; Wang; Jiang; Wu, 2017). Estudos mais recentes desenvolvidos por Albrecht e Bowman (2012a, 2019), avaliando variedades tolerantes [US-802 (*C. grandis* (L.) Siamese × *P. trifoliata* Gotha Road), US-897 (*C. reticulata* Cleópatra × *P. trifoliata* Flying Dragon) e US-942 (*C. reticulata* Sunki × *P. trifoliata* Flying Dragon)] e suscetíveis [tangerineira Cleópatra (*C. reticulata* Blanco) e laranjeira Valência (*C. sinensis* (L.) Osb)] ora como copa, ora como porta-enxerto, demonstraram que a copa também exerce influência sobre o porta-enxerto, e que as árvores com variedades tolerantes usadas como copa foram menos danificadas pela infecção por CLAs. Esses autores concluíram ainda que isso não indica que o porta-enxerto não desempenha nenhum papel na tolerância das árvores à infecção por CLAs, pelo contrário, isso pode ser parcialmente o resultado da capacidade do porta-enxerto de tolerar outros estresses (clima, do solo etc) sob o enfraquecimento da condição causada por CLAs.

Em pesquisas desenvolvidas por Machado *et al.* (2010), Albrecht e Bowman (2012) e Oliveira *et al.* (2019), foi observada uma distinção na expressão dos sintomas de HLB em plantas de *P. trifoliata*, sendo esta espécie considerada mais tolerante do que a laranjeira-doce. Albrecht & Bowman (2014), desenvolvendo experimentos em casa de vegetação após a inoculação do enxerto com gemas infectadas, observaram que não houve o aparecimento de sintomas da doença bem definidos nas árvores e plântulas de *P. trifoliata*.

Os sintomas de HLB indicam que a função do floema, os estímulos hormonais e a biossíntese de metabólitos secundários são totalmente afetados (Mafra *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2019; Nehela & Killiny, 2020). Uma das principais alterações anatômicas observadas em tecidos infectados com a bactéria é a formação e deposição de alta quantidade de calose aparentemente bloqueando os poros da placa

crivada dos elementos de vasos do floema (Curtolo *et al.*, 2020). Esse bloqueio pode interromper a distribuição de fotoassimilados, causando acumulação excessiva de amido nos cloroplastos das folhas, seu rompimento e clorose foliar (Wang *et al.*, 2017; Granato *et al.*, 2019). Outros fatores, como a acumulação de proteína de floema (PP2) nas placas crivadas e o colapso das células do floema podem contribuir para a disfunção do floema (Boava *et al.*, 2017; Oliveira *et al.*, 2019; Granato *et al.*, 2019).

Estudos desenvolvidos por Albrecht & Bowman, (2012) analisaram as alterações transcricionais em plantas tolerantes de tangerina 'Cleopatra' (*C. reticulata*) e US-897 (*C. reticulata* Blanco x *P. trifoliata* L. Raf.) quando comparadas com plantas suscetíveis em resposta à infecção por CLas e foi possível observar genes superregulados em plantas de US-897, genes esses associados a uma proteína de resistência à doença constitutiva (CDR1) que está diretamente envolvida na biossíntese de metabólitos secundários. A CDR2 e CDR8 estavam em abundância nos transcriptomas foliares de dois genótipos de *P. trifoliata* tolerantes ao HLB e também foram regulados positivamente em híbridos de *P. trifoliata* tolerantes a HLB (Yu *et al.*, 2017; Rawat *et al.*, 2017;).

Uma ampla análise transcriptômica usando genótipos contrastantes em relação à gravidade do HLB foi realizada com objetivo de identificar mecanismo genético de tolerância associado a essa doença. Os genótipos incluíram *C. sinensis*, *C. sunki*, *P. trifoliata* e três grupos distintos de híbridos obtidos de cruzamentos entre *C. sunki* e *P. trifoliata*, os resultados indicaram que o aumento nos fatores de transcrição WRKY em *P. trifoliata* está associado ao mecanismo de defesa genético envolvido na tolerância ao HLB (Kim *et al.*, 2009; Curtolo *et al.*, 2020).

Os hormônios vegetais, também chamado de fitohormônios são considerados substâncias de suma importância que atuam em diferentes funções nos vegetais, como no desenvolvimento da planta e do fruto, assim como na sobrevivência e senescência da planta (Kerbaui, 2004; Tada *et al.*, 2008). Estudos desenvolvidos por Seo *et al.* (2001), Albrecht & Bowman, (2008), Robert-Seilaniantz *et al.* (2011) mostram que o jasmonatos, etilenos e ácidos salicílico desempenham papel de suma importante na regulação dos processos de sinalização das vias envolvidas, em respostas de defesa das plantas infectadas.

A tolerância observada em *Poncirus* e seus híbridos para CLas pode ser devido à presença de compostos do floema que restringem a proliferação ou o movimento de CLas (Curtolo *et al.*, 2020). Estudos apontam que o híbrido USDA 'US SunDragon' que envolve *P. trifoliata* em seu cruzamento pode conferir tolerância ao HLB (Stover *et al.*, 2020). Pesquisas envolvendo *C. sinensis* e *P. trifoliata* demonstraram alterações fisiológicas e citológicas distintas no floema (Achor *et al.*, 2010; Etxeberria *et al.*, 2009; Pitino *et al.*, 2016). Estudos desenvolvidos por Oliveira *et al.* (2019) mostraram uma menor deposição de calose e menor hipertrofia das células do floema em plantas de *P. trifoliata* quando comparadas com plantas de *C. sinensis*. A deposição de calose e a modulação de PP2-B15 em resposta a CLas que atuam como barreira física, tentando bloquear a disseminação sistêmica de CLas (Granato *et al.*, 2019; Oliveira *et al.*, 2019; Curtolo *et al.*, 2020). A calose pode atuar como regulador chave das defesas das plantas mediadas por ácido salicílico contra um amplo espectro grupo de patógenos (Tanaka *et al.*, 2015).

Assim como, também foram encontrados vários acessos de *P. trifoliata* menos favoráveis ou atraentes aos psíldeos (Richardson e Hall, 2013). Também se reportou a redução da oviposição em *P. trifoliata*, provavelmente relacionada com fatores que impedem a oviposição, reduzem a eclosão dos ovos ou resultam em baixa sobrevivência das ninfas (Hall *et al.*, 2015).

4.6. Respostas epigenéticas

Os fatores ambientais associados a modificações químicas também podem mudar a expressão dos genes, com mudanças reversíveis e herdáveis no genoma funcional, uma vez que o termo “epigenética” tem origem do grego, onde “epi” significa “acima, perto, a seguir”, e estuda as mudanças nas funções dos genes sem alterar as sequências de bases (adenina, guanina, citosina e timina) da molécula de DNA (ácido desoxirribonucleico). As modificações epigenéticas podem ser herdadas no momento da divisão celular (mitose) e terão um profundo efeito na biologia do organismo, definindo diferentes fenótipos (por exemplo, morfologia, desenvolvimento, comportamento etc) (Fantappie, 2013; Whitelaw, 2014; Ding *et al.*, 2015). No sentido mais amplo, a informação epigenética é aquela responsável pela variabilidade fenotípica não explicada por diferença na sequência do DNA (Bond, Baulcombe, 2014; Sahu *et al.*, 2013). Sendo assim, essas alterações apresentam-se de três formas:

ação de RNA não codificantes, modificações nas histonas e metilação na molécula de DNA (Ding *et al.*, 2012).

Nas plantas, a alteração epigenética mais frequente é a metilação na molécula de DNA, quando a metilação é persistente promove o fechamento da cromatina gerando uma inativação do gene, contudo, a metilações podem ocorrer também em regiões promotoras e gênicas, podendo ser reversíveis e resultando em ativação ou repressão da expressão gênica (Zhu *et al.*, 2016). A metilação do DNA também é conhecida como adição de grupos metil na extremidade 5' de resíduos de citosina no DNA, convertendo-a em 5-metilcitosina (5mC). Essa adição é feita por enzimas DNA-metiltransferase (DNMTs). Sendo que os resíduos de citosina podem ser metilados em três tipos de sequência: CG, CHG e CHH, em que H pode representar A, C ou T (Sahu *et al.*, 2013). Sendo CG é o local de metilação mais frequente (Park *et al.*, 2016).

Após a replicação do DNA, a metilação de sequências CG pode ser mantida por DNA metiltransferase 1 (MET1) funciona para estabelecer e manter a metilação da citosina do sítio CG, acredita-se que a metilação de sequências assimétricas CHH se der por metiltransferase que reconhece (H3K9me2) e um reforço de 24-nt siRNA que direciona os domínios rearranjados de metiltransferase 2 (DRM2), enquanto que CHG é mantida pela CROMOMETILASE 3 (CMT3) em um ciclo de retroalimentação com modificações nas histonas (Zhang; Lang; Zhu, 2018; Liu *et al.*, 2018).

Alguns métodos têm sido relatados para detectar a metilação de DNA e suas alterações, sendo classificados como geral ou específico. Na análise geral, a Cromatografia Líquida de Alta Performance (High Performance Liquid Chromatography – HPLC) ou métodos baseados em reações enzimáticas (Enzyme-Linked Immuno sorbent Assay – ELISA), sendo que o nível de metilação de DNA é determinado dentro de um genoma, por outro lado os métodos específicos de detecção são baseados em regiões dentro de sequências, em citosinas específicas ou pelo uso de enzimas de restrição sensíveis à metilação (Tang *et al.*, 2014).

A utilização de metodologias baseadas em enzimas de restrição para detecção de metilações do DNA têm sido utilizados por décadas, sendo caracterizado por apresenta como grande vantagem custo reduzido e fácil execução (Yong; Hsu; Chen, 2016; Birnbaum & Roudier, 2017). As enzimas HpaII e MspI desempenham a

clivagem (corte) de pontos específicos da sequência de nucleotídeos da molécula de DNA (Birnbaum & Roudier 2017), a ação das enzimas depende do estado de metilação dos resíduos internos e externos da citosina, em sequências reconhecidas 5'-CCGG-3' (Schulz; Eckstein; Durka, 2013; Chwialkowska *et al.*, 2017; Birnbaum & Roudier 2017).

As alterações no padrão de metilação do DNA de plantas e animais, tem sido analisada através da técnica de Amplificação de Polimorfismo Sensível a Metilação (MSAP) (Chwialkowska *et al.*, 2017; Nagymihály *et al.*, 2017), onde as diferenças no padrão de metilação classificadas de acordo com a presença ou ausência de bandas dos fragmentos: I - Presença de bandas em ambas as enzimas EcoRI/HpaII e EcoRI/MspI, indicando ausência de metilação; II - Presença de bandas geradas na enzima EcoRI/HpaII e ausência nas enzimas EcoRI/MspI; III - Presença de bandas na enzima EcoRI/MspI e ausência na enzima EcoRI/HpaII; e IV - Ausência de bandas em ambas as combinações de enzimas (Schulz; Eckstein; Durka, 2013; Tang *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2011).

As modificações epigenéticas possuem grande importância no controle da atividade genômica em plantas, estando envolvida em diversos processos biológicos como a regulação do desenvolvimento e diferenciação celular, regulação da expressão gênica, silenciamento de elementos transponíveis, imprinting genômico, e resposta a estresses bióticos e abióticos (Bouyer *et al.*, 2017; Schmitz; Lewis; Goll, 2019). Pesquisas desenvolvidas por Neves *et al.* (2017a) revelaram mecanismos epigenéticos relacionados ao déficit hídrico em citros. Após sucessivos ciclos de déficit hídrico e reidratação, a combinação laranjeira Valência (copa)/tangerineira 'Sunki Maravilha' (porta-enxerto) [*C. sunki* (Hayata) hort. ex Tanaka] apresentou características de aclimação que permitem uma maior tolerância ao déficit hídrico, o que, por sua vez, pode facilitar a sobrevivência da planta. Assim como apoia que também exista um papel para a modificação epigenética na tolerância a estresses bióticos em plantas cítricas (Silva *et al.*, 2021). Estudos desenvolvidos por Geng *et al.* (2019) demonstraram que a espécie *Aegilops tauschii*, induziu respostas de defesa à *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*, sendo as metilações localizadas no local CHH e associadas a ativação de genes. O estresse biótico induziu o surgimento de marcas epigenéticas que contribuíram com a ativação de respostas de defesa e o

reconhecimento precoce do patógeno em plantas de *Arabidopsis thaliana* e *Solanum lycopersicum* infectadas por *Botrytis cinérea* (Crespo-Salvador *et al.*, 2018).

Apesar do sequenciamento completo do genoma de CLas (Duan *et al.*, 2009), ainda não há informações consistentes sobre os mecanismos de patogenicidade que podem estar associados as alterações epigenéticas, com as respostas fisiológicas, bioquímicas em hospedeiros de citros a com diferentes combinações de enxertia submetidos a infecção com CLas.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Material vegetal, condições de inoculação e manutenção de plantas

Sementes de laranja-doce Valência (VC) [*Citrus xsinensis* (L.) Osbeck] e trifoliateiro Pomeroy (TR) *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. foram semeadas em julho de 2016 em tubetes com volume de 120 cm³, com substrato Biomix Mudas & Plantio Orgânico, dispostos em bandejas contendo 96 tubetes cada uma. Após oito meses, as plântulas foram transferidas para sacos de polietileno de 4 L contendo substrato a base de casca de pinheiro decomposta de textura média aplicando-se fertilizante de liberação lenta (Osmocote 14-14-14).

Mudas de pé-franco ou enxertadas com diferentes posições da espécie na combinação de copa/porta-enxerto foram usadas (Figura 1). Metade das mudas eram de pés-francos obtidos de clones nucelares provenientes de sementes. Na outra metade das mudas, com 17 meses de idade (dezembro de 2017) e com caules com aproximadamente 5 a 7 mm de diâmetro a 15 cm de altura do colo, realizou-se a técnica de borbulhia de 'T invertido' com borbulhas sadias de VC e TR obtidas da copa dos próprios pés-francos. Nos tratamentos que apresentaram dupla copa, após a enxertia de uma das espécies, a copa remanescente do porta-enxerto da outra espécie não foi podada, deste modo para um único porta-enxerto houve a presença de duas copas usando as duas espécies estudadas. Esse tratamento foi adicionado para investigar se a coexistência de porções de copa usando espécies com tolerância diferenciada ao HLB poderia influenciar na resposta do conjunto à doença (Stuchi & Girardi, 2010).

Oito meses após a enxertia (agosto de 2018), em casa de vegetação com

cobertura de plástico e lateral com telado antiafídeos em Bebedouro – SP (20°53'15" S 48°28'20" W, 591 m), metade das plantas foram inoculadas no porta-enxerto ou na base da planta pé-franco com CLas via borbulhas infectadas (Lopes; Frare, 2008). As borbulhas usadas na inoculação de CLas foram confirmadas por qPCR (reação em cadeia da polimerase em tempo real) (Li *et al.*, 2006), individualmente, e apresentaram média de Ct/log (ciclo limite/ logaritmo base 10) de 24,71(+/-4,98), e a outra metade das plantas foi mantida como controles enxertados com borbulhas saudias. As fontes de inóculo consistiram em ramos sintomáticos de oito plantas de laranjeira-doce Pera mantidas a campo. Em cada muda, foram enxertadas duas borbulhas que serviram como fonte de inóculo, sendo estas posicionadas de lados opostos do caule a uma altura de 10 cm do colo da planta.

Um mês após a inoculação, essas plantas foram transferidas para em São Paulo-SP (23°35'16" S, 46°38'55" W, 783 m), onde foram arranjadas sobre bancadas em casa de vegetação de vidro (9 m de largura por 12 m de comprimento, pé-direito de 2 m 20 cm, com tela antiafídeos nas janelas) e mantidas sob condições ambiente e de luz natural. As mudas foram irrigadas de duas a quatro vezes na semana, dependendo da época do ano. Junto com a água de irrigação, quinzenalmente as plantas receberam fertirrigação com uma solução nutritiva contendo os seguintes fertilizantes: nitrato de cálcio (1,35g/L), fosfato mono-amônio (0,111 g/L), sulfato de magnésio (0,4 g/L), cobre-ácido etileno diamino tetracético (EDTA) (0,015 g/L), zinco (EDTA) (0,01 g/L), manganês (EDTA) (0,0075 g/L) e ferro-ácido dietileno diamino hidróxidofenilacético (EDTA) (0,075 g/L). A cada cinco meses, as plantas foram adubadas de forma suplementar com o fertilizante de liberação controlada Osmocote® na formulação NPK 14-14-14, 5 g por planta. Inseticidas e acaricidas foram aplicados conforme necessário.

5.2. Delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 8x2 composto por oito combinações de copa e porta-enxerto e duas condições de inoculação por CLas (⊖, inoculada, e ⊕, não inoculada), totalizando 12 tratamentos e 20 repetições de uma planta por parcela. Convencionou-se denominar VC como 'susceptível ao HLB' e TR como 'tolerante ao HLB' nesse trabalho para representar a presença de espécies de citros com susceptibilidade distinta ao HLB em diferentes combinações de enxertia. Assim, os tratamentos incluíram: TR/VC (copa de *P.*

trifoliata enxertada em porta-enxerto de laranja Valência), TR (pé-franco de *P. trifoliata*), VC/TR (copa de laranja Valência enxertada no porta-enxerto de *P. trifoliata*), VC (pé-franco de laranja Valência), TR+VC/TR (duas copas, *P. trifoliata* e laranja Valência em porta-enxerto de *P. trifoliata*) e TR+VC/VC (duas copas, *P. trifoliata* e laranja Valência em porta-enxerto de laranja Valência) (Figura 3).

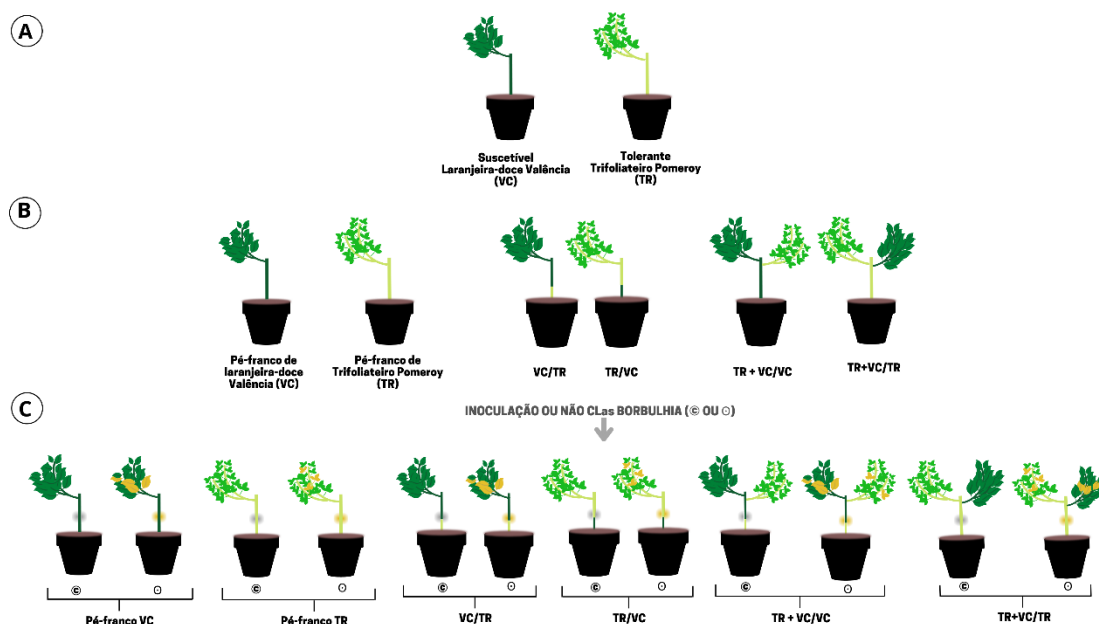


Figura 3 - Representação esquemática da inoculação de *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs) em diferentes combinações de copa/porta-enxerto variando a posição da espécie no momento da enxertia. **A:** VC - laranja-doce Valência [*Citrus xsinensis* (L.) Osbeck] suscetível ao HLB e TR - trifoliateiro Pomeroy *Poncirus trifoliata* (L.) tolerante ao HLB. **B:** Plantas pé-franco e em diferentes combinações de copa/porta-enxerto. **C:** Inoculações no porta-enxerto com borbulhas infectadas (amarelo) e não infectadas (cinza) para todos os tratamentos, sendo inoculadas (O, folhas amarelas) ou não inoculadas (©, folhas verdes).

5.3. Avaliações biométricas

Após a inoculação, todas as plantas do experimento foram avaliadas quanto ao número de brotações, altura da planta e diâmetro do caule no início do experimento (30 dias após a inoculação), antes da poda de manutenção (180 dias após à inoculação) e ao final do experimento (395 dias após a inoculação). No final do experimento, foi realizada ainda a avaliação de massa seca de raiz, sendo avaliadas 10 plantas positivas para HLB para os tratamentos de pés-francos de TR e VC, 16

plantas positivas para HLB para a combinação VC/TR; 11 plantas para a combinação TR/VC; 13 plantas para a combinação TR+VC/TR e 20 plantas positivas para o HLB para a combinação TR+VC/VC. Foram avaliadas 10 plantas controles para cada combinação. Para tal, as raízes foram coletadas e lavadas. Em seguida, foram acondicionadas em sacos de papel, colocadas em estufa de circulação forçada a 75 °C até atingirem peso constante e, posteriormente, foram pesadas com o auxílio de uma balança eletrônica.

5.4. Extração de DNA para detecção de CLas

Para cada tratamento, aos 4 (dezembro de 2018), 8 (abril de 2019) e 13 (setembro de 2019) MAI foram amostradas seis folhas sintomáticas de HLB (quando disponíveis) por repetição no estágio V5 (folhas totalmente expandidas, coloração verde-amarelada, endurecimento gradual do topo para a base e clorose e/ou abscisão da ponta do broto) (Cifuentes-Arenas *et al.*, 2018), que surgiram nas plantas após as inoculações. Para a coleta das raízes do porta-enxerto, foi retirado todo o substrato e as raízes secundárias jovens com aproximadamente 1mm de diâmetro foram identificadas e coletadas. Logo após a coleta, as folhas e raízes destinadas à detecção de CLas foram lavadas em água corrente com auxílio de uma esponja com detergente, secas com auxílio de papel toalha e, posteriormente, fotografadas. O material vegetal fresco, correspondente a pecíolo + nervura principal das folhas ou raízes secundárias, foi picado (0,5 g) sobre papel toalha com o auxílio de uma lâmina de aço inoxidável. O material processado foi acondicionado em tubo de 2 mL com rosca, acrescido de 1 mL do tampão de extração de DNA (CTAB 0,053 M, NaCl 1,4 M, PVP 10000 2%, Tris 0,1 M pH 8,0 e EDTA 0,25 M pH 8,0, adicionando b-mercaptoetanol em uma proporção de 0,2%) (Murray e Thompson, 1980) e macerado com três esferas de aço inoxidável de 1/8" (3,175 mm) de diâmetro com auxílio do equipamento FastPrep®, em três ciclos de 60 s com uma velocidade de 6,5 m/s. Em seguida, todas as amostras foram incubadas em banho-maria a 65 °C por 30 min. As amostras foram submetidas à centrifugação (Eppendorf Centrifuge 5804R) por 5 min a 1774 G a 22 °C, e 800 µL do sobrenadante obtido foram transferidos para um novo micro tubo de 2 mL. Posteriormente, foram adicionados 800 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e a fase aquosa (700 µL), obtida por centrifugação a 1774 G por 5 min a 22 °C, foi transferida para um novo micro tubo de 1,5 mL. O DNA foi então precipitado pela

adição de 0,6 v/v (420 µL) de isopropanol e incubado a -20 °C por 30 min. As amostras foram centrifugadas a 1774 G durante 20 min para formação do *pellet*, o qual foi lavado duas vezes com etanol 70 % e centrifugado a 1774 G por 10 min. Após essas etapas, o DNA foi desidratado por 3 min em *speed-vac* e ressuspendido em 20 µL de água Milli-Q autoclavada.

5.5. PCR quantitativo em tempo real (qPCR) para detecção de CLas

O DNA extraído foi quantificado em NanoDrop™ 8000 Spectrophotometer (ThermoFisher, MA, USA) (Desjardins and Conklin, 2010), ajustado para a concentração de 100 ng/µL e, em seguida, foi analisado por qPCR. As detecções por qPCR foram realizadas em aparelho 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems), sendo utilizados os primers específicos para a região 16S rDNA de CLas (HLBas - 5' TCGAGCGCGTATGCGAATACG 3' e HLBr - 5' GCGTTATCCCGTAGAAAAAGGTAG 3') juntamente com primers do controle endógeno (COXf - 5' GTATGCCACGTTCGCATTCCAGA 3' e COXr - 5' GCCAAAAGTCTAAGGGCATTTC 3') e as respectivas sondas (HLBp 5' AGACGGGTGAGTAACGCG 3' e COXp 5' ATCCAGATGCTTACGCTGG 3') (Li *et al.*, 2006). A reação foi composta por 300 ng de DNA total 0,5 µM de cada primer e 0,2 µM de sonda TaqMan Master Mix (Applied Biosystems), totalizando 12 µL de volume final em cada reação. As condições de amplificação foram de um ciclo de 95 °C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 15 s, 63 °C por 60 s e, para obtenção da curva de dissociação, a temperatura foi de 69 °C para 95 °C por 20 s. As reações foram feitas em duplicata para o cálculo da média ± erro padrão das amostras. Foi utilizado o valor limiar de ciclo (Ct), ou seja, o número de ciclos de PCR no qual a fluorescência aumenta acima do valor de limiar. A otimização das concentrações do reagente, incluindo iniciadores e sondas, foi realizada usando DNA já confirmado positivo ou negativo para a presença de CLas, sendo que valores de Ct < 35 foram considerados positivos e valores de Ct ≥ 35 foram considerados negativos para a presença de CLas nas amostras. Os valores de Cq (*quantification cycle*) foram convertidos para o logaritmo base 10 do número de cópias da região 16S rDNA de CLas por grama de tecido, com base na curva padrão definida por Lopes *et al.* (2013).

5.6. Análises anatômicas

A detecção de calose foi realizada em segmentos de 1 cm de comprimento de raízes secundárias e de pecíolos de folhas obtidas dos quatro lados da planta em três

repetições biológicas por tratamento (Oliveira *et al.*, 2019). Após a coleta, as amostras foram imediatamente transferidas para a solução Karnovsky modificada (glutaraldeído 1% em tampão fosfato 0,1M com pH 7,2; tampão fosfato 0,2M, pH 7,2 e formaldeído 4 %) (Karnovsky, 1965). Foram lavadas duas vezes em tampão fosfato 0,05 M pH 7 por 15 min. Em seguida, foram desidratadas em série de concentrações de etanol (30, 50, 70, 85, 95 e 100 %). Estas amostras foram infiltradas em solução de etanol e resina 3:1; 2:1; 1:1; 1:2 e 1:3 e três vezes em resina pura por 24 h em cada etapa. Secções transversais de 5 a 7 µm foram cortadas em micrótomo deslizante (Leica, SM2010R), coradas com 0,01% de anilina azul por 10 min e enxaguadas com água deionizada (Foster 1949). As amostras emblocadas foram examinadas em um microscópio de luz (Petená, 2016; Boava *et al.*, 2017). A presença de calose foi quantificada através do software ImageJ, quanto a quantidade e tamanho dos pontos fluorescentes no floema de cada amostra.

5.7. Análise de metilação do DNA total usando amplificação de polimorfismo sensível à metilação (MSAP)

Foram amostradas pecíolo e nervura principal de folhas de 10 réplicas biológicas por tratamento, segundo os mesmos períodos e procedimentos de coleta descritos no item 5.4. Nesta análise, utilizou-se a técnica de MSAP, que emprega enzimas de restrição sensíveis à metilação, tais como MspI e HpaII. Ambas reconhecem o mesmo local 5'-CCGG, mas são diferenciadas por sua sensibilidade para a metilação de DNA (TANG *et al.*, 2014). A avaliação da metilação do DNA consiste na geração de duas bibliotecas de fragmentos de DNA em paralelo a partir de uma mesma amostra de DNA, sendo uma população para a enzima HpaII e outra para a MspI. Foram utilizados 500 ng do DNA total do tecido foliar misturados ao tampão da reação 1X, juntamente com a enzima EcoRI/HpaII, que foram digeridos a 37 °C por 3 h com essas enzimas de restrição sensíveis à metilação. EcoRI/MspI foram utilizadas numa reação de digestão em paralelo como amostra controle no experimento. Em seguida, os fragmentos de DNA foram ligados a adaptadores EcoRI (F), EcoRI (R), HpaII/MspI (F) e HpaII/MspI (R), a fim de facilitar a sua amplificação. Subsequentemente, estes fragmentos foram seletivamente amplificados. Os fragmentos amplificados foram analisados no Fragment Analyzer (System Advanced Analytical) usando a DNF 477 0500- 1-1500pb Kit (Applied Biosystems). Em seguida, as populações de fragmentos de cada biblioteca são comparadas pela observação do

perfil de bandas formadas para a biblioteca de cada enzima. Conhecendo-se o perfil de sensibilidade à metilação das enzimas, é então possível relacionar a presença/ausência de bandas com a presença de metilações nos sítios de restrição das enzimas.

5.8. Análises estatísticas

Os dados obtidos a partir da detecção de CLas nas amostras avaliadas foram submetidos à análise fatorial 8x2x3 (oito combinações x duas condições de inoculação x três tempos) para a detecção de CLas em folhas e 6x2x3 (seis combinações x duas condições de inoculação x três tempos) para detecção de CLas em raízes, sendo as médias relativas às combinações copa e porta-enxerto de enxertia agrupadas pelo teste de Scott Knott ($p \leq 0,05$) e as médias de períodos de inoculação comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Nesse caso, as análises foram baseadas no título bacteriano médio de plantas positivas (\log_{10} do número de cópias da região 16S rDNA de CLas por grama de tecido vegetal). Além disso, calculou-se a percentagem de plantas positivas para CLas em todas as amostragens realizadas.

Os dados biométricos relativos à taxa de crescimento [(média crescimento final - média crescimento inicial / média crescimento final) * 100], foram comparadas entre os grupos controles e inoculadas. A matéria seca de raiz (comparada entre os grupos controles e inoculadas) e ambas analisadas pelo teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$), com o auxílio do software estatístico *jamovi*. (Version 1.6) (The jamovi project 2021).

Para as análises anatômicas foram utilizados o R, pacotes RVAideMemoire e ExpDes, usando modelos lineares generalizados, uma vez que a variável inoculação não atenderam aos pressupostos de normalidade. Foi aplicado o teste Tukey (5%).

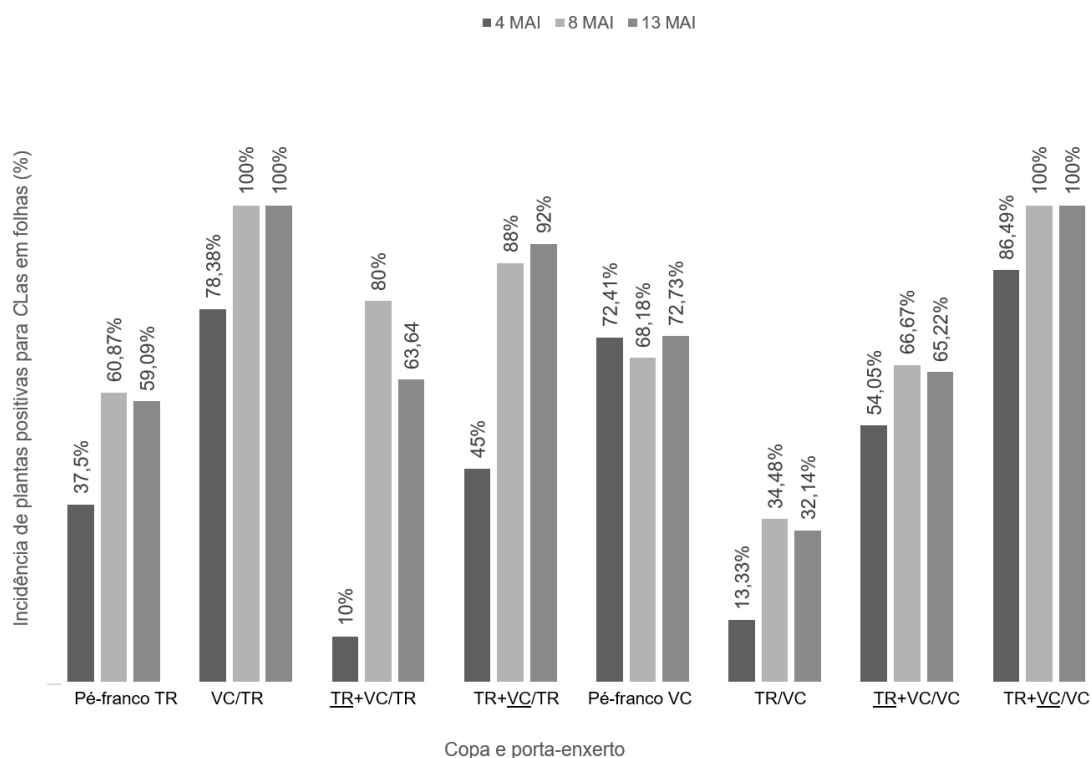
As análises de MSAP foram feitas utilizando-se o pacote msap (Pérez-Figueroa, 2013) do software R (Core Team Development, 2016). O tipo de modificação epigenética foi classificada de acordo com a sensibilidade padrão das enzimas HpaII e MspI a diferentes tipos de metilação (Schulz *et al.*, 2013). A partir desses resultados, elaborou-se o *heatmap* de frequência com o auxílio do programa R v. 3.5.1 (R Core Team, 2020) com o pacote Heatmap79 R.

6. RESULTADOS

6.4. Detecção de *Candidatus Liberibacter asiaticus*

De modo geral, detectou-se a presença de CLas na maior parte das plantas analisadas em todos os tratamentos inoculados (Figura 3). Avaliou-se a porcentagem de plantas positivas para CLas nas combinações TR+VC/VC (duas copas: *P. trifoliata* e Valência sobre porta-enxerto de Valência, avaliando a copa de Valência), TR+VC/TR, VC/TR e do pé-franco VC, que apresentaram as maiores incidências de CLas (86,49 %, 100 % e 100 %), (48 %, 88 % e 92 %), (78,38 %, 100 % e 100 %) e (72,41 % 68,18 % e 72,73 %), respectivamente, aos 4, 8 e 13 MAI. Já as combinações TR+VC/VC (54,05 %, 66,67 %, 65,22 %), TR+VC /TR (10 %, 80 %, 63,64 %), TR/VC (13,33 %, 34,48 %, 32,14 %) e o pé-franco TR (37,5 %, 60,87 % e 59,09 %) tiveram uma redução na quantidade de plantas positivas para CLas aos 13 MAI quando comparadas a 8 MAI (Figura 4A).

A



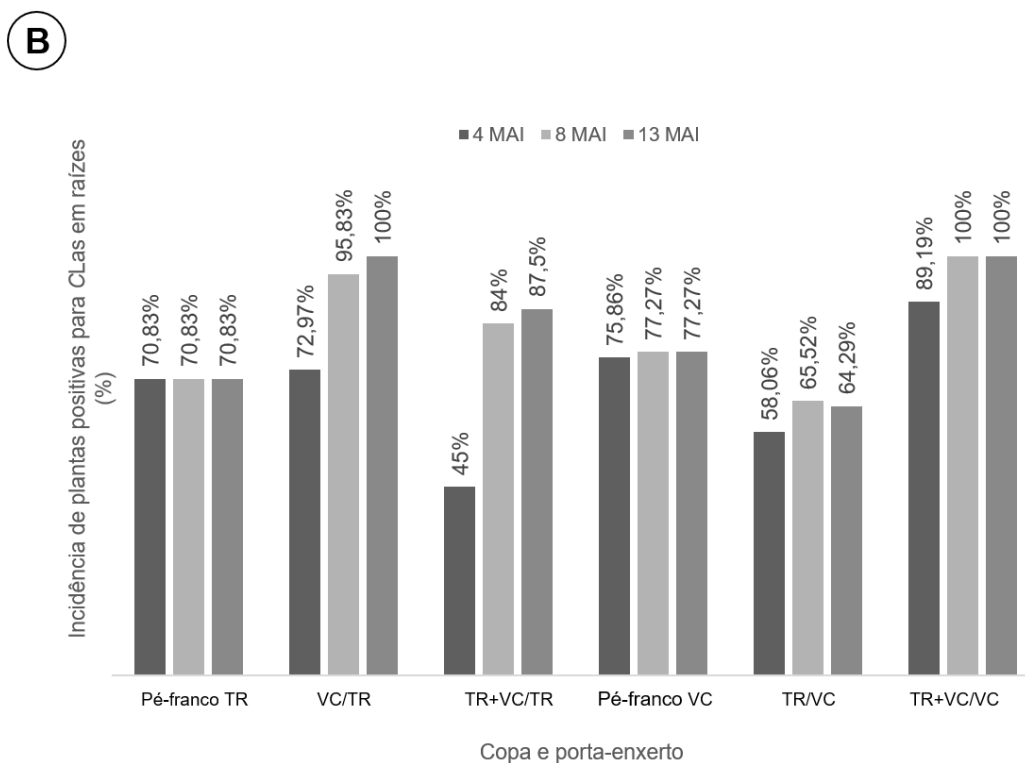


Figura 4. Incidência de plantas positivas para *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) em plantas de laranja-doce Valência (VC) e *Poncirus trifoliata* (TR) nas diferentes combinações de copa e porta-enxerto avaliadas aos 4, 8 e 13 meses após a inoculação (MAI). **A:** Amostras de folhas. **B:** Amostras de raízes

Pé-franco TR (pé-franco de *P. trifoliata*), VC/TR (Valência sobre o porta-enxerto de *P. trifoliata*), TR+VC/TR (duas copas de Valência e *P. trifoliata* sobre o porta-enxerto de *P. trifoliata*), TR+VC/TR (duas copas, laranja Valência e *P. trifoliata* em porta-enxerto de *P. trifoliata*, avaliando a copa de Valência), TR+VC/TR (duas copas, laranja Valência e *P. trifoliata* em porta-enxerto de *P. trifoliata*, avaliando a copa de *P. trifoliata*), pé-franco VC (pé-franco de Valência), TR/VC (*P. trifoliata* sobre o porta-enxerto de Valência), TR+VC/VC (duas copas de *P. trifoliata* e Valência sobre o porta-enxerto de Valência), TR+VC/VC (duas copas de *P. trifoliata* e Valência sobre o porta-enxerto de Valência, avaliando a copa de Valência) e TR+VC/VC (duas copas de *P. trifoliata* e Valência sobre o porta-enxerto de Valência, avaliando a copa de *P. trifoliata*).

A incidência de CLas em amostras de raízes das plantas de citros foi crescente ao longo do tempo para três combinações estudadas: TR+VC/VC (89,19 %, 100 % e 100 %), VC+TR/TR (45 %, 84 % e 87,5 %) e VC/TR (72,97 %, 95,83 % e 100 %), mas constante para as demais combinações ao longo do período de avaliação, em média 70% (Figura 4B).

Avaliações aos 4 MAI mostraram que as combinações de copa/porta-enxerto TR+VC/VC, TR/VC e o pé-franco TR apresentaram menor título bacteriano nos

tecidos foliares. Por outro lado, o pé-franco VC e as combinações TR+VC/TR, TR+VC/TR e TR+VC/VC apresentam os maiores títulos bacterianos nos tecidos foliares para os mesmos períodos de avaliação (Tabela 1).

Tabela 1. Títulos bacterianos médios de *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) em folhas de laranjeira-doce Valência (VC) e *Poncirus trifoliata* (TR) aos 4, 8 e 13 meses após a inoculação (MAI) nas diferentes combinações de copa e porta-enxerto.

Combinação Copa/porta-enxerto	Título de CLas em folhas (Log*)		
	4 MAI	8 MAI	13 MAI
Pé-franco TR	3.21 ± 0.8 cB	5.31 ± 0.3bA	3.30 ± 0.9 dB
VC/TR	4.29 ± 1.0 bB	6.34 ± 0.1 aA	6.42 ± 0.1 aA
TR+ <u>VC</u> /TR	5.36 ± 0.5 aB	6.44 ± 0.2 aA	6.75 ± 0.1 aA
<u>TR</u> +VC/TR	5.05 ± 0.1 aA	5.10 ± 0.3 bA	5.28 ± 0.2 bA
Pé-franco VC	5.31 ± 0.6 aB	6.33 ± 0.2 aA	6.70 ± 0.3 aA
TR/VC	3.49 ± 0.1 cB	5.09 ± 0.4 bA	3.58 ± 1.2 dB
TR+ <u>VC</u> /VC	5.58 ± 0.3 aB	6.44 ± 0.2 aA	6.57 ± 0.2 aA
<u>TR</u> +VC/VC	2.83 ± 0.8 cC	3.92 ± 1.2 cB	4.79 ± 0.3 cA

Pé-franco TR (pé-franco de *P. trifoliata*), VC/TR (Valência sobre o porta-enxerto de *P. trifoliata*), TR+VC/TR (duas copas, laranja Valência e *P. trifoliata* em porta-enxerto de *P. trifoliata*, avaliando a copa de Valência), TR+VC/TR (duas copas, laranja Valência e *P. trifoliata* em porta-enxerto de *P. trifoliata*, avaliando a copa de *P. trifoliata*), pé-franco VC (pé-franco de Valência), TR/VC (*P. trifoliata* sobre o porta-enxerto de Valência), TR+VC/VC (duas copas de *P. trifoliata* e Valência sobre o porta-enxerto de Valência, avaliando a copa de Valência) e TR+VC/VC (duas copas de *P. trifoliata* e Valência sobre o porta-enxerto de Valência, avaliando a copa de *P. trifoliata*).

*Os valores de Log ± erro padrão da média foram ajustados com base na curva de quantificação descrita por Lopes *et al.* (2013), para determinar o título bacteriano por grama de tecido. O Log representa o logaritmo base 10 do número de cópias da região 16S rDNA de CLas.

Letras minúsculas comparam tratamentos dentro de cada nível de tempo [Teste Scott Knott ($p \leq 0,05$)] e letras maiúsculas comparam tempos dentro de cada nível de tratamento [Teste de Tukey ($p \leq 0,05$)].

A combinação TR+VC/VC apresentou o menor título bacteriano aos 8 MAI. Já aos 13 MAI, as plantas do pé-franco TR e da combinação TR/VC foram as que apresentaram os menores títulos bacterianos nos tecidos foliares. Os tratamentos que apresentaram maiores títulos bacterianos nos tecidos foliares, seja aos 8 ou aos 13 MAI, foram o pé-franco VC e as combinações VC/TR, TR+VC/TR e TR+VC/VC.

Portanto, desde os 4 MAI, em geral houve maior título bacteriano na copa de laranja-doce Valência em relação à copa de *P. trifoliata*, independentemente do porta-enxerto utilizado na combinação, além de maior incidência da bactéria (Figura 4A). A combinação TR/VC e o pé-franco TR não diferiram estatisticamente em relação ao título bacteriano entre 4 e 13 MAI, sendo esses tempos caracterizados pela menor quantidade de bactérias nos tecidos foliares. A combinação TR+VC/TR não diferiu estatisticamente para nenhum dos tempos avaliados em relação ao título bacteriano; em contrapartida, a combinação TR+VC/VC diferiu em todos os tempos, apresentando uma detecção crescente de CLas nos tecidos foliares ao decorrer das avaliações. As combinações TR+VC/TR e TR+VC/VC e o pé-franco VC, não apresentaram diferença estatística significativa para os períodos avaliados (MAI) (Tabela 1). Dessa forma, a titulação da bactéria foi crescente e proporcional à extensão de presença de tecidos de VC na combinação de enxertia, enquanto só se reduziu em combinações com copa completa de TR.

Aos 4 MAI, a combinação TR+VC/TR e o pé-franco TR foram os que apresentaram os menores títulos bacterianos em seus tecidos radiculares, enquanto as combinações TR+VC/VC e TR/VC e o pé-franco VC apresentaram maiores títulos em amostras de raiz (Tabela 2). Quando avaliamos as combinações de copa e porta-enxerto aos 8 MAI, observamos que as combinações VC/TR e TR+VC/TR apresentaram menores títulos bacterianos em raízes quando comparadas às demais combinações, enquanto o pé-franco VC resultou em maior título bacteriano em raízes. Aos 13 MAI, a combinação TR+VC/TR e o pé-franco VC diferiram estatisticamente entre si e entre as demais combinações, apresentando menor e maior títulos bacterianos no tecido radicular, respectivamente. Fica evidente que, no caso do sistema radicular, menores títulos bacterianos foram observados quando se utilizaram porta-enxertos de TR, enquanto porta-enxertos de VC resultaram em títulos bacterianos maiores, especialmente com a copa do mesmo genótipo. Quando comparamos os três períodos de avaliação, observamos que as amostragens realizadas aos 4 e 13 MAI diferiram estatisticamente para cinco dos seis tratamentos estudados, sendo que aos 4 MAI detectou-se em média o menor título bacteriano nos tecidos radiculares. As amostragens realizadas aos 8 e 13 MAI não diferiram entre si, ao mesmo tempo em que a coleta realizada aos 8 MAI diferiu estatisticamente do período de 4 MAI para cinco das combinações.

Tabela 2. Títulos bacterianos médios de *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) em raízes de diferentes combinações de copa e porta-enxerto de laranjeira-doce Valência (VC) e *Poncirus trifoliata* (TR) aos 4, 8 e 13 meses após a inoculação (MAI).

Combinação Copa/Porta-enxerto	Título bacteriano médio de CLas em raízes (*Log)		
	4 MAI	8 MAI	13 MAI
Pé-franco TR	4.19 ± 0.5 cB	5.19 ± 0.2cA	5.03 ± 0.4 cA
VC/TR	4.60 ± 0.3 bB	4.89 ± 0.4 dAB	5.09 ± 0.3 cA
TR+VC/TR	4.14 ± 0.5 cB	4.73 ± 0.4 dA	4.62 ± 0.4 dA
Pé-franco VC	5.28 ± 0.4 aB	6.20 ± 0.4 aA	6.20 ± 0.2 aA
TR/VC	5.12 ± 0.5 aB	5.85 ± 0.3 bA	5.91 ± 0.3 bA
TR+VC/VC	5.23 ± 0.3 aB	5.82 ± 0.3 bA	5.69 ± 0.3 bA

Pé-franco TR (Pé-franco de *P. trifoliata*), VC/TR (Valência sobre o porta-enxerto de *P. trifoliata*), TR+VC/TR (duas copas, Valência e *P. trifoliata* sobre o porta-enxerto de *P. trifoliata*), pé-franco VC (Pé-franco de Valência), TR/VC (*P. trifoliata* sobre o porta-enxerto de Valência), e TR+VC/VC (duas copas de *P. trifoliata* e Valência sobre o porta-enxerto de Valência).

*Os valores de Log foram ajustados com base na curva de quantificação definida por Lopes *et al.* (2013), para determinação do título bacteriano por grama de tecido. O Log representa o logaritmo base 10 do número de cópias da região 16S rDNA de CLas. Letras minúsculas comparam tratamentos dentro de cada nível de tempo [Teste Scott Knott ($p \leq 0,05$)] e letras maiúsculas comparam tempos dentro de cada nível de tratamento [Teste de Tukey ($p \leq 0,05$)].

6.5. Avaliações biométricas

Todas as plantas de Valência e *P. trifoliata* avaliadas aos 1 e aos 6 MAI (foi analisado os dados antes da poda, para que o fator poda não interferisse no crescimento final da planta) desconsideramos os dados após a poda, pois algumas combinações não tiveram bom desenvolvimento comprometendo o valor da altura final) apresentaram variações no crescimento em altura total da planta de 6,74 % a 40,60 % para as plantas controles e de 11,44 % a 34,65 % para as plantas inoculadas. As combinações TR+VC/VC, TR/VC, TR+VC/VC, VC/TR e os pés-franco VC e TR apresentaram maiores variações de crescimento no grupo controle quando comparados com as plantas inoculadas com CLas. As combinações TR+VC/TR e TR+VC/TR apresentaram maiores variações no crescimento das plantas inoculadas quando comparadas com seus respectivos controles, sendo que a combinação de TR+VC/TR inoculada variou 1,58 % enquanto a combinação de TR+VC/TR inoculada variou 4,71 % em relação aos respectivos controles (Figura 6A). Observou-se que as

combinações de dupla copa sobre porta-enxerto de trifoliata foram menos vigorosas em termos absolutos de altura entre todas as combinações avaliadas. Quando se comparou a taxa de crescimento das plantas pelo Teste de Mann-Whitney dois a dois (grupo controle vs inoculado para cada tratamento), houve diferença estatística apenas para o pé-franco de VC que se comportou, desse modo, como mais susceptível ao HLB em termos de redução de crescimento da parte aérea.

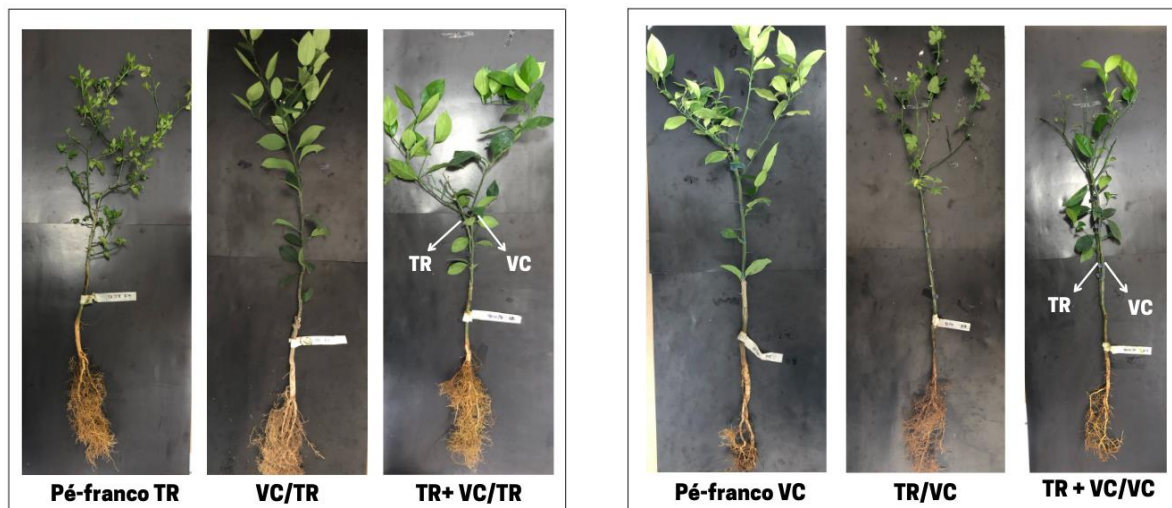


Figura 5. Plantas de pé-franco e enxertadas com copa simples ou dupla empregando diferentes combinações de laranja-doce Valência [*Citrus x sinensis* (L.) Osbeck] (VC) e trifoliato Pomeroy *Poncirus trifoliata* (L.) (TR) aos 395 dias após a inoculação com *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs).

Pé-franco TR - Pé-franco de *P. trifoliata*; VC/TR - Valência sobre o porta-enxerto de *P. trifoliata*; TR+VC /TR - Valência e *P. trifoliata* sobre o porta-enxerto de *P. trifoliata*; Pé-franco VC - Pé-franco de Valência; TR/VC - *P. trifoliata* sobre o porta-enxerto de Valência; TR+VC/VC - *P. trifoliata* e Valência sobre o porta-enxerto de Valência.

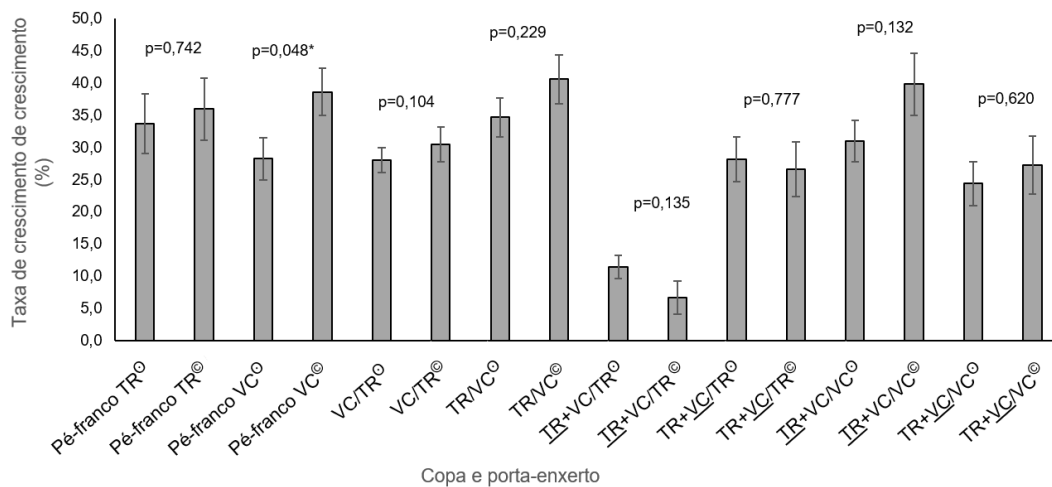
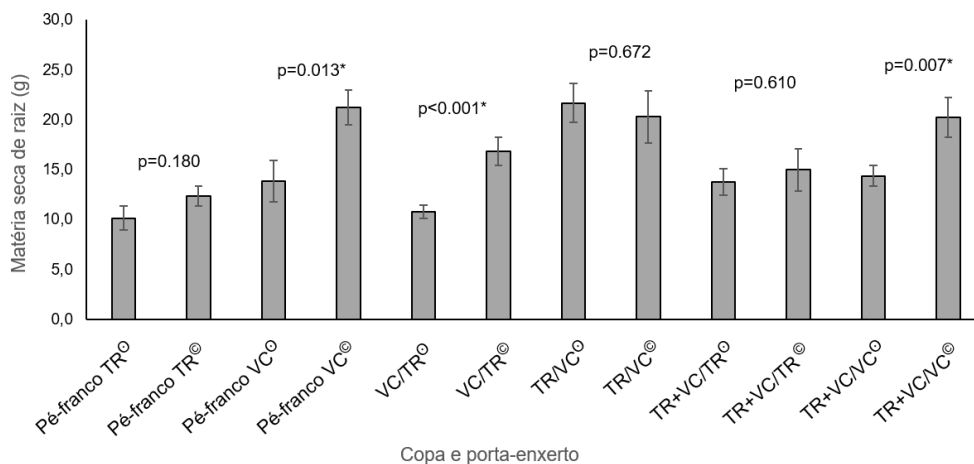
A**B**

Figura 6. Análise biométrica em plantas de laranjeira-doce Valência [*Citrus xsinensis* (L.) Osbeck] (VC) e trifoliatoeiro Pomeroy *Poncirus trifoliata* (L.) inoculadas com *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs). **A:** Taxa de crescimento de parte aérea (%) de plantas de citros avaliadas entre 30 e 180 dias após as inoculações. **B:** Matéria seca de raiz (g) de plantas de citros avaliadas 395 dias após as inoculações. Pé-franco TR (pé-franco de *P. trifoliata*), VC/TR (Valência sobre o porta-enxerto de *P. trifoliata*), TR+VC/TR (duas copas de Valência e *P. trifoliata* sobre o porta-enxerto de *P. trifoliata*), TR+VC/TR (duas copas, laranja Valência e *P. trifoliata* em porta-enxerto de *P. trifoliata*, avaliando a copa de Valência), TR+VC/TR (duas copas, laranja Valência e *P. trifoliata* em porta-enxerto de *P. trifoliata*, avaliando a copa de *P. trifoliata*), pé-franco VC (pé-franco de Valência), TR/VC (*P. trifoliata* sobre o porta-enxerto de Valência), TR+VC/VC (duas copas de *P. trifoliata* e Valência sobre o porta-enxerto de Valência), TR+VC/VC (duas copas de *P. trifoliata* e Valência sobre o porta-enxerto de Valência, avaliando a copa de Valência) e TR+VC/VC (duas copas de *P. trifoliata* e

Valência sobre o porta-enxerto de Valência, avaliando a copa de *P. trifoliata*). (⊖) Inoculada e (⊙) Não Inoculada.

* diferença significativa pelo Teste de Mann-Whitney ($p \leq 0,05$).

A matéria seca das raízes de plantas de laranjeira-doce Valência e *P. trifoliata* comparadas pelo Teste de Mann-Whitney mostram que, aos 395 dias após as inoculações com CLas, houve diferença estatística entre o grupo controle e o inoculado para as combinações VC/TR e TR+VC/VC e o pé-franco VC, com uma redução de 35,85 %, 29 % e 18 % da biomassa da raiz nas plantas inoculadas. Embora as demais combinações avaliadas não tenham diferido estatisticamente entre o grupo controle e o inoculado, apenas a combinação TR/VC não apresentou redução de matéria seca do sistema radicular em função da presença de CLas (Figura 5, 6B e 7). Portanto, a presença de copa de VC também se relacionou mais à redução de matéria seca de raiz em função da inoculação com CLas.

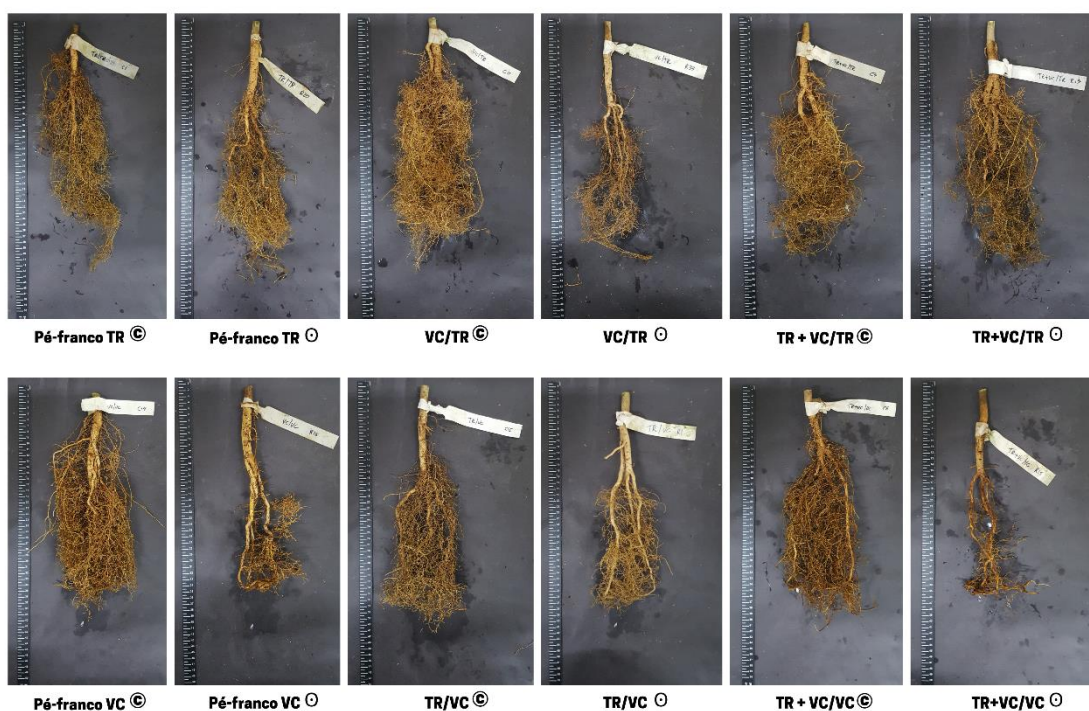


Figura 7. Dano relativo ao sistema radicular observado nas diferentes combinações de laranjeira-doce Valência [*Citrus x sinensis* (L.) Osbeck] (VC) e trifoliatário Pomeroy *Poncirus trifoliata* (L.) (TR) aos 395 dias após a inoculação com *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas).

Pé-franco TR (Pé-franco de *P. trifoliata*), VC/TR (Valência sobre o porta-enxerto de *P. trifoliata*), TR+VC/TR (duas copas, Valência e *P. trifoliata* sobre o porta-enxerto de *P. trifoliata*), pé-franco VC (Pé-franco de Valência), TR/VC (*P. trifoliata* sobre o porta-enxerto de Valência), e TR+VC/VC (duas copas de *P. trifoliata* e Valência sobre o porta-enxerto de Valência). (⊖) Inoculadas e (⊙) Não Inoculada.

6.6. Análises anatômicas

Analisando a quantidade médio de pontos de deposição de calose em folhas com 4 e 13 meses após a inoculação houve diferença estatística para os fatores tratamento e inoculação com CLas, assim como para a interação para esses fatores. No desdobramento dos dados para análise com 4 meses após as inoculações, analisando apenas plantas inoculadas com CLas, os tratamentos Pé-franco TR, TR+VC/VC e TR+VC/TR apresentaram menores quantidades de pontos de deposição de calose, não diferindo apenas para a combinação TR/VC. Já o Pé-franco VC apresentou maior quantidade de pontos de deposição de calose, diferindo estatisticamente de todos os tratamentos. Para as análises realizadas com 13 meses após as inoculações os tratamentos Pé-franco VC e TR+VC/TR apresentaram maior quantidade de pontos de deposição de calose (Tabela 3, Figura 8 e 9).

Tabela 3. Pontos médios de deposição de calose para o desdobramento do fator combinação copa/porta-enxerto para plantas inoculadas com *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) em folhas das combinações de laranjeira-doce Valência (VC) e *Poncirus trifoliata* (TR) inoculadas com *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) e avaliadas aos 4 e 13 meses após a inoculação (MAI).

Combinação	4 MAI		Combinação	13 MAI	
	Pontos de calose em folhas			Pontos de calose em folhas	
Copa/Porta-enxerto			Copa/Porta-enxerto		
Pé-franco VC	68,00	a	Pé-franco VC	225,33	a
TR+VC/TR	47,67	b	TR+VC/TR	211,33	a
VC/TR	40,67	b	VC/TR	65,67	b
TR+VC/VC	33,33	bc	TR+VC/VC	54,33	bc
TR/VC	14,33	cd	TR/VC	11,00	bc
Pé-franco TR	8,00	d	Pé-franco TR	7,67	c
TR+VC/VC	6,00	d	TR+VC/VC	3,33	c
TR+VC/TR	3,33	d	TR+VC/TR	1,00	c

Pé-franco TR (pé-franco de *P. trifoliata*), VC/TR (Valência sobre o porta-enxerto de *P. trifoliata*), TR+VC/TR (duas copas, laranja Valência e *P. trifoliata* em porta-enxerto de *P. trifoliata*, avaliando a copa de Valência), TR+VC/TR (duas copas, laranja Valência e *P. trifoliata* em porta-enxerto de *P. trifoliata*, avaliando a copa de *P. trifoliata*), pé-franco VC (pé-franco de Valência), TR/VC (*P. trifoliata* sobre o porta-enxerto de Valência), TR+VC/VC (duas copas de *P. trifoliata* e Valência sobre o porta-enxerto de Valência, avaliando a copa de Valência) e TR+VC/VC (duas copas de *P. trifoliata* e Valência sobre o porta-enxerto de Valência, avaliando a copa de *P. trifoliata*).

Letras minúsculas comparam tratamentos dentro de cada nível de tempo [Teste de Tukey ($p \leq 0,05$)].

Nossos resultados evidenciam o aumento na deposição de calose nas plantas inoculadas com CLas aos 13 MAI com o avanço da severidade da doença. Além disso, é nítida uma maior deposição de calose em cortes transversais de pecíolos ou brotos jovens de VC quando comparada a TR. Notou-se uma redução significativa na deposição de calose em plantas de VC/TR quando comparadas com pé-franco de VC, ao mesmo tempo em que se observou uma maior deposição de calose em pecíolos de TR/VC em relação aos pés-francos de TR. Quando comparamos as plantas que apresentam dupla copa (TR+VC/TR e TR+VC/VC), notamos que ambas as combinações apresentaram maior deposição de calose em pecíolos e brotos jovens de laranja Valência quando comparadas com *P. trifoliata* (Tabela 3).

Tabela 4. Pontos médios de deposição de calose para o desdobramento do fator combinação copa/porta-enxerto dentro do nível inoculação em folhas das combinações de laranjeira-doce Valência (VC) e *Poncirus trifoliata* (TR) inoculadas ou não com *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) e avaliadas aos 4 e 13 meses após a inoculação (MAI).

Tempo	Combinação Copa/porta-enxerto	Pontos médios de deposição de calose em folhas	
		⊖ (Inoculado)	⊕ (Controle)
4 MAI	Pé-francoTR	8,00 ns	7,00 ns
	Pé-franco VC	68,00 a	40,00 b
	TR/VC	14,33 ns	4,67 ns
	<u>TR</u> +VC/TR	4,00 ns	0,67 ns
	TR+ <u>VC</u> /TR	46,67 a	22,33 b
	<u>TR</u> +VC/VC	33,33 a	3,00 b
	TR+ <u>VC</u> /VC	6,00 b	28,33 a
	VC/TR	40,67 a	2,67 b
13 MAI	Pé-francoTR	7,67 ns	5,67 ns
	Pé-franco VC	225,33 a	40,67 b
	TR/VC	11,00 ns	14,67 ns
	<u>TR</u> +VC/TR	1,00 ns	1,33 ns
	TR+ <u>VC</u> /TR	211,33 a	3,33 b
	<u>TR</u> +VC/VC	3,33 ns	2,33 ns
	TR+ <u>VC</u> /VC	54,33 a	10,67 b
	VC/TR	65,67 a	19,67 b

Pé-franco TR (pé-franco de *P. trifoliata*), VC/TR (Valência sobre o porta-enxerto de *P. trifoliata*), TR+VC/TR (duas copas, laranja Valência e *P. trifoliata* em porta-enxerto de *P. trifoliata*, avaliando a copa de Valência), TR+VC/TR (duas copas, laranja Valência e *P. trifoliata* em porta-enxerto de *P. trifoliata*, avaliando a copa de *P. trifoliata*), pé-franco

VC (pé-franco de Valência), TR/VC (*P. trifoliata* sobre o porta-enxerto de Valência), TR+VC/VC (duas copas de *P. trifoliata* e Valência sobre o porta-enxerto de Valência, avaliando a copa de Valência) e TR+VC/VC (duas copas de *P. trifoliata* e Valência sobre o porta-enxerto de Valência, avaliando a copa de *P. trifoliata*).

Letras minúsculas na mesma linha comparam os fatores inoculado com não inoculado com CLas dentro de cada tratamento [Teste de Tukey ($p \leq 0,05$)].

Houve diferença estatística para o Pé-franco VC e as combinações TR+VC/TR, TR+VC/VC, TR+VC/VC e VC/TR quando analisado o desdobramento do fator combinação copa/porta-enxerto dentro do nível inoculação para plantas avaliadas com 4 MAI para a quantidade de pontos médios de deposição de calose (Tabela 4). Nas avaliações com 13 MAI o Pé-franco VC e as combinações TR+VC/TR, TR+VC/VC e VC/TR apresentaram diferença estatística quando comparadas plantas inoculadas com plantas controle.

Tabela 5. Área médias (μm) de deposição de calose para o desdobramento do fator combinação copa/porta-enxerto para plantas inoculadas com *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) em folhas das combinações de laranjeira-doce Valência (VC) e *Poncirus trifoliata* (TR) inoculadas com *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) e avaliadas aos 4 e 13 meses após a inoculação (MAI).

Combinação	4 MAI	Combinação	13 MAI
Copa/Porta-enxerto	Área (μm)	Copa/Porta-enxerto	Área (μm)
TR/VC	46,49 a	Pé-franco TR	9,27 ns
TR+ <u>VC</u> /TR	22,61 b	Pé-franco VC	11,41 ns
TR+ <u>VC</u> /VC	18,24 b	TR/VC	13,24 ns
<u>TR</u> +VC/VC	13,30 b	<u>TR</u> +VC/TR	9,51 ns
<u>TR</u> +VC/TR	11,29 b	TR+ <u>VC</u> /TR	14,86 ns
VC/TR	11,02 b	<u>TR</u> +VC/VC	11,04 ns
Pé-franco TR	11,01 b	TR+ <u>VC</u> /VC	9,06 ns
Pé-franco VC	9,84 b	VC/TR	9,93 ns

Pé-franco TR (pé-franco de *P. trifoliata*), VC/TR (Valência sobre o porta-enxerto de *P. trifoliata*), TR+VC/TR (duas copas, laranja Valência e *P. trifoliata* em porta-enxerto de *P. trifoliata*, avaliando a copa de Valência), TR+VC/TR (duas copas, laranja Valência e *P. trifoliata* em porta-enxerto de *P. trifoliata*, avaliando a copa de *P. trifoliata*), pé-franco VC (pé-franco de Valência), TR/VC (*P. trifoliata* sobre o porta-enxerto de Valência), TR+VC/VC (duas copas de *P. trifoliata* e Valência sobre o porta-enxerto de Valência, avaliando a copa de Valência) e TR+VC/VC (duas copas de *P. trifoliata* e Valência sobre o porta-enxerto de Valência, avaliando a copa de *P. trifoliata*).

Letras minúsculas comparam tratamentos dentro de cada nível de tempo [Teste de Tukey ($p \leq 0,05$)].

Quando a analisamos a área de deposição (μm) de calose em folhas com 4 MAI, as variáveis tratamento e inoculação apresentaram valores significativos com um valor $p = 0,001$ pelo teste de Tukey. No desdobramento dos dados analisando a inoculação com CLas dentro das combinações de copa/porta-enxerto, apenas a combinação TR/VC diferiu estatisticamente das demais combinações (Tabela 5). As plantas avaliadas com 13 MAI apresentaram diferença estatística para o fator combinação e para a interação combinação x inoculação, sendo que não houve diferença estatística para o desdobramento dos dados de inoculação com CLas dentro das combinações de copa/porta-enxerto.

Tabela 6. Área médias de deposição de calose (μm) para o desdobramento do fator combinação copa/porta-enxerto dentro do nível inoculação em folhas das combinações de laranja-doce Valência (VC) e *Poncirus trifoliata* (TR) inoculadas ou não com *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) e avaliadas aos 4 e 13 meses após a inoculação (MAI).

Tempo	Combinação Copa/porta-enxerto	Área média de deposição de calose (μm) em folhas	
		⊖ (Inoculado)	⊙ (Controle)
4 MAI	Pé-francoTR	11,63 ns	8,26 ns
	Pé-franco VC	9,84 ns	8,85 ns
	TR/VC	46,49 a	12,24 b
	<u>TR</u> +VC/TR	11,28 ns	4,97 ns
	TR+ <u>VC</u> /TR	22,61 a	11,78 b
	<u>TR</u> +VC/VC	13,30 ns	11,39 ns
	TR+ <u>VC</u> /VC	18,24 ns	9,45 ns
	VC/TR	11,01 ns	9,33 ns
13 MAI	Pé-francoTR	9,27 ns	8,76 ns
	Pé-franco VC	11,41 ns	10,06 ns
	TR/VC	13,24 ns	12,93 ns
	<u>TR</u> +VC/TR	6,47 a	3,85 b
	TR+ <u>VC</u> /TR	14,74 a	4,34 b
	<u>TR</u> +VC/VC	11,51 a	4,54 b
	TR+ <u>VC</u> /VC	17,97 a	9,06 b
VC/TR	9,93 b	21,74 a	

Pé-franco TR (pé-franco de *P. trifoliata*), VC/TR (Valência sobre o porta-enxerto de *P. trifoliata*), TR+VC/TR (duas copas, laranja Valência e *P. trifoliata* em porta-enxerto de *P. trifoliata*, avaliando a copa de Valência), TR+VC/TR (duas copas, laranja Valência e *P. trifoliata* em porta-enxerto de *P. trifoliata*, avaliando a copa de *P. trifoliata*), pé-franco VC (pé-franco de Valência), TR/VC (*P. trifoliata* sobre o porta-enxerto de

Valência), TR+VC/VC (duas copas de *P. trifoliata* e Valência sobre o porta-enxerto de Valência, avaliando a copa de Valência) e TR+VC/VC (duas copas de *P. trifoliata* e Valência sobre o porta-enxerto de Valência, avaliando a copa de *P. trifoliata*). Letras minúsculas na mesma linha comparam os fatores inoculado com não inoculado com CLas dentro de cada tratamento [Teste de Tukey ($p \leq 0,05$)].

Analisando a área médias de deposição de calose para o desdobramento do fator combinação copa/porta-enxerto dentro do nível inoculação para plantas avaliadas com 4 MAI, apenas os tratamentos TR/VC e TR+VC/TR apresentaram diferença estatística quando comparado plantas controle versus plantas inoculadas. Já para as avaliações com 13 MAI TR+VC/TR, TR+VC/TR, TR+VC/VC, TR+VC/VC e VC/TR apresentaram diferença estatística entre plantas controle e inoculadas (Tabela 6).

Análises do sistema radicular para combinação copa/porta-enxerto de plantas de VC e TR para quantidade de pontos de deposição de calose com 4 MAI não foi significativo pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

As áreas médias de deposição de calose variaram de 17,81 à 5,41 (μm), para as combinações TR/VC e VC/TR, respectivamente (Tabela 7), sendo que o tratamento TR/VC apresentou diferença estatística para as combinações Pé-franco VC, Pé-franco TR e VC/TR.

Tabela 7. Área médias de deposição de calose (μm) para o desdobramento do fator combinação copa/porta-enxerto em raízes das combinações de laranjeira-doce Valência (VC) e *Poncirus trifoliata* (TR) inoculadas ou não com *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) e avaliadas aos 4 meses após a inoculação (MAI).

Combinação Copa/Porta-enxerto	4 MAI
	Área média de deposição de calose (μm) em raízes
TR/VC	17,81 a
TR+VC/VC	15,73 ab
TR+VC/TR	13,36 abc
Pé-franco VC	8,63 bc
Pé-franco TR	6,07 bc
VC/TR	5,41 c

Pé-franco TR (Pé-franco de *P. trifoliata*), VC/TR (Valência sobre o porta-enxerto de *P. trifoliata*), TR+VC/TR (duas copas, Valência e *P. trifoliata* sobre o porta-enxerto de *P. trifoliata*), pé-franco VC (Pé-franco de Valência), TR/VC (*P. trifoliata* sobre o porta-enxerto de Valência), e TR+VC/VC (duas copas de *P. trifoliata* e Valência sobre o porta-enxerto de Valência).

Letras minúsculas comparam os tratamentos dentro do nível de tempo [Teste de Tukey ($p \leq 0,05$)].

O Pé-franco VC e as combinações TR/VC, TR+VC/VC e VC/TR apresentaram diferença estatística quando comparado plantas inoculadas com plantas controle dentro de cada tratamento para análise em raízes, sendo que as combinações TR/VC e TR+VC/VC apresentaram maior área de deposição de calose em plantas inoculadas com CLas (Tabela 8).

Tabela 8. Área médias de deposição de calose (μm) para o desdobramento do fator combinação copa/porta-enxerto dentro do nível inoculação em raízes das combinações de laranja-doce Valência (VC) e *Poncirus trifoliata* (TR) inoculadas ou não com *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) e avaliadas aos 4 meses após a inoculação (MAI).

Tempo	Combinação Copa/porta-enxerto	Área média de deposição de calose (μm) em raízes	
		⊖ (Inoculado)	⊙ (Controle)
4 MAI	Pé-franco TR	6,07 ns	4,62 ns
	Pé-franco VC	8,63 b	16,23 a
	TR/VC	17,30 a	7,30 b
	TR+VC/TR	13,40 ns	7,25 ns
	TR+VC/VC	15,73 a	5,35 b
	VC/TR	5,41 b	17,16 a

Pé-franco TR (Pé-franco de *P. trifoliata*), VC/TR (Valência sobre o porta-enxerto de *P. trifoliata*), TR+VC/TR (duas copas, Valência e *P. trifoliata* sobre o porta-enxerto de *P. trifoliata*), pé-franco VC (Pé-franco de Valência), TR/VC (*P. trifoliata* sobre o porta-enxerto de Valência), e TR+VC/VC (duas copas de *P. trifoliata* e Valência sobre o porta-enxerto de Valência).

Letras minúsculas na mesma linha comparam os fatores inoculado com não inoculado com CLas dentro de cada tratamento [Teste de Tukey ($p \leq 0,05$)].

As raízes de Pé-franco VC, TR/VC e TR+VC/VC inoculadas com CLas e avaliadas com 13 MAI apresentaram maiores médias para quantidade de pontos de deposição de calose, quando comparado com os demais tratamentos (Tabela 9).

Tabela 9. Área médias de deposição de calose (μm) para o desdobramento do fator combinação copa/porta-enxerto dentro do nível inoculação em folhas das combinações de laranja-doce Valência (VC) e *Poncirus trifoliata* (TR) inoculadas ou não com *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) e avaliadas aos 13 meses após a inoculação (MAI).

Combinação	13 MAI
Copa/Porta-enxerto	Pontos médios de deposição de calose em raiz
Pé-franco VC	27,58 a
TR/VC	27,08 a
TR+VC/VC	19,92 ab
VC/TR	14,58 bc
Pé-franco TR	13,58 bc
TR+VC/TR	8,25 c

Pé-franco TR (Pé-franco de *P. trifoliata*), VC/TR (Valência sobre o porta-enxerto de *P. trifoliata*), TR+VC/TR (duas copas, Valência e *P. trifoliata* sobre o porta-enxerto de *P. trifoliata*), pé-franco VC (Pé-franco de Valência), TR/VC (*P. trifoliata* sobre o porta-enxerto de Valência), e TR+VC/VC (duas copas de *P. trifoliata* e Valência sobre o porta-enxerto de Valência).

Letras minúsculas comparam os tratamentos dentro do nível de tempo [Teste de Tukey ($p \leq 0,05$)].

CONTROLE

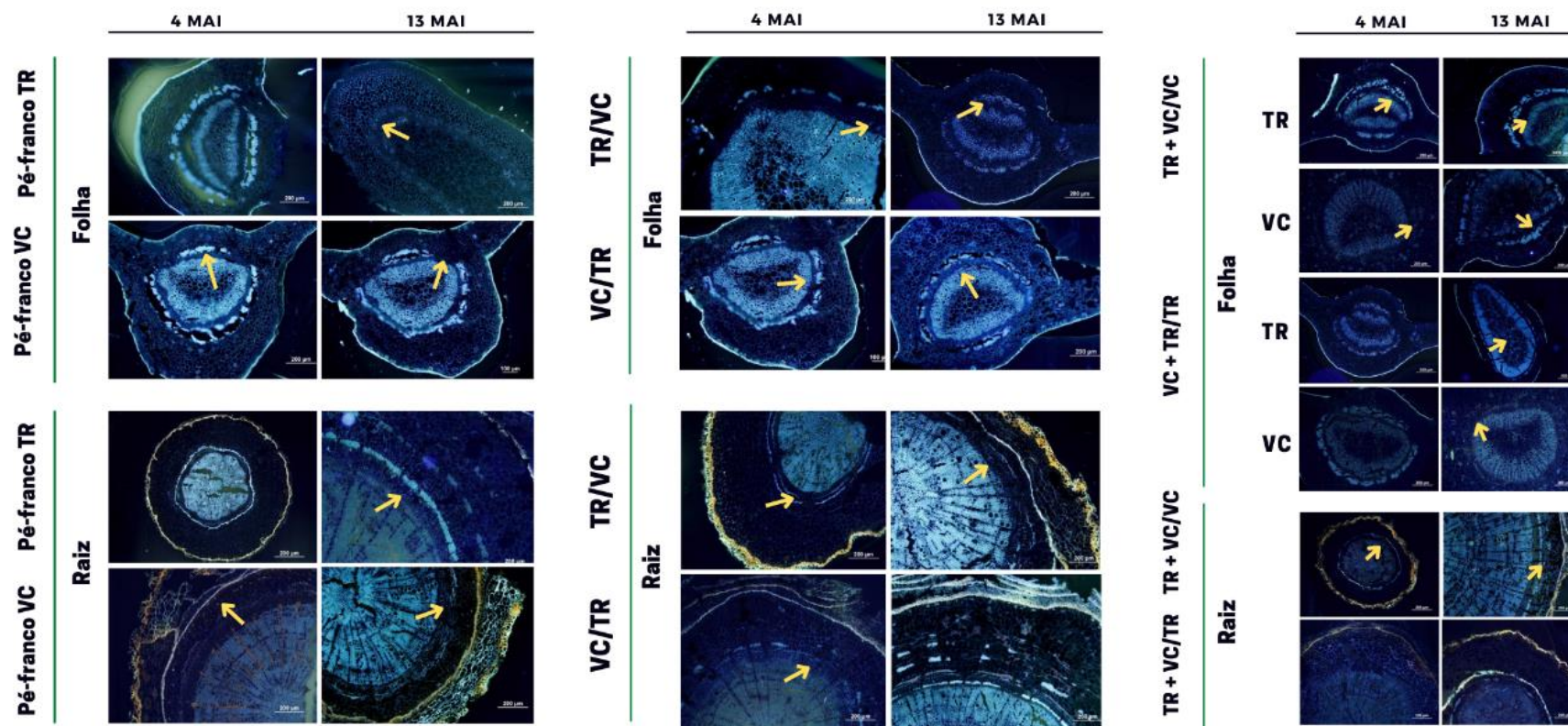


Figura 8. Deposição de calose em pecíolos e raízes de plantas controles de laranja Valência (VC) e *Poncirus trifoliata* (TR) avaliadas com 4 e 13 meses após a inoculação com borbulhas saudáveis, corados com azul de anilina e analisados sob microscópio de fluorescência. Setas amarelas indicam pontos de deposição de calose.

Pé-franco TR (Pé-franco de *P. trifoliata*), VC/TR (Valência sobre o porta-enxerto de *P. trifoliata*), TR+VC/TR (duas copas, Valência e *P. trifoliata* sobre o porta-enxerto de *P. trifoliata*), pé-franco VC (Pé-franco de Valência), TR/VC (*P. trifoliata* sobre o porta-enxerto de Valência), e TR+VC/VC (duas copas de *P. trifoliata* e Valência sobre o porta-enxerto de Valência).

INOCULAÇÃO - CLas

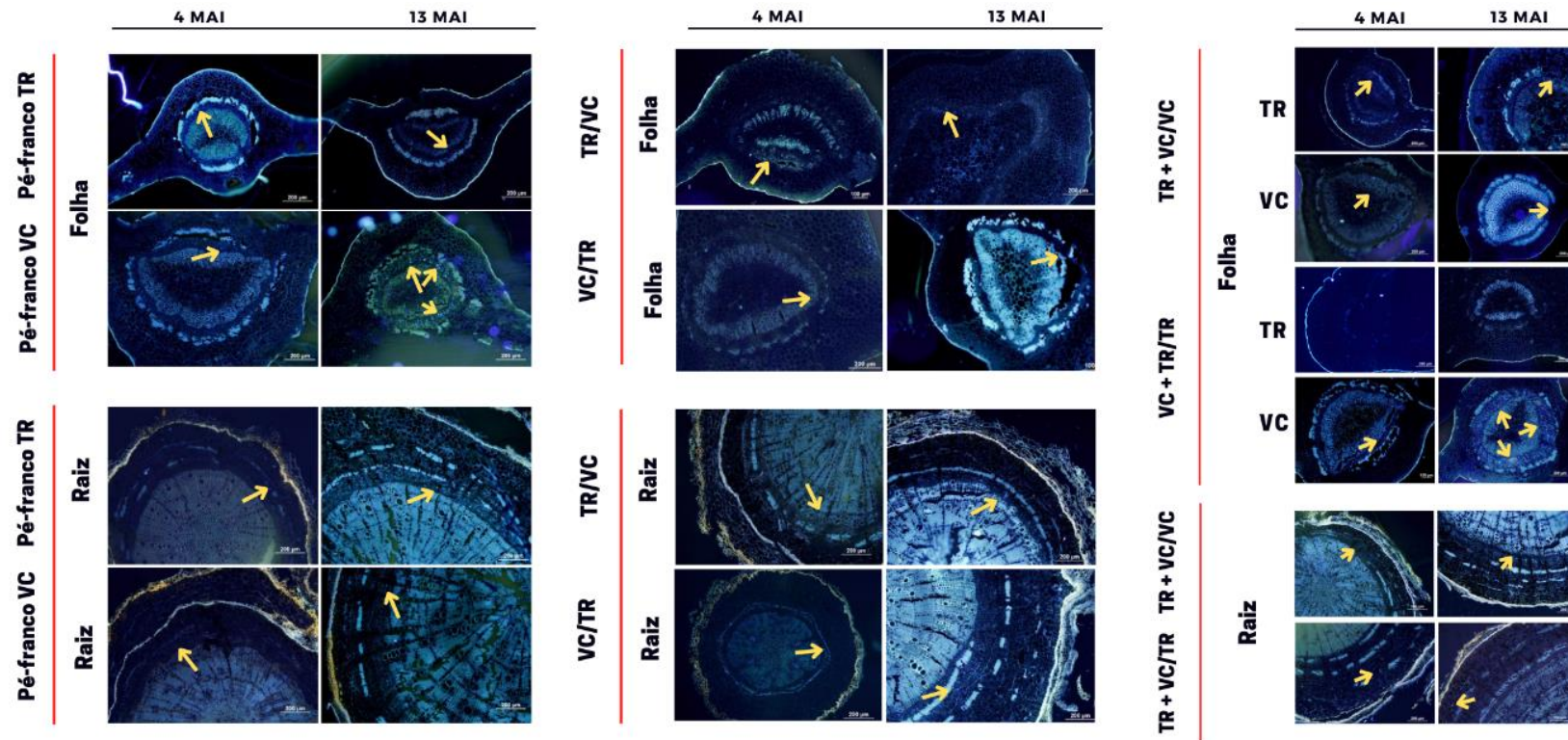


Figura 9. Deposição de calose em pecíolos e raízes de laranja Valência (VC) e *Poncirus trifoliata* (TR) avaliadas com 4 e 13 meses após a inoculação com *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), corados com azul de anilina e analisados sob microscópio de fluorescência. Setas amarelas indicam pontos de deposição de calose.

Pé-franco TR (Pé-franco de *P. trifoliata*), VC/TR (Valência sobre o porta-enxerto de *P. trifoliata*), TR+VC/TR (duas copas, Valência e *P. trifoliata* sobre o porta-enxerto de *P. trifoliata*), pé-franco VC (Pé-franco de Valência), TR/VC (*P. trifoliata* sobre o porta-enxerto de Valência), e TR+VC/VC (duas copas de *P. trifoliata* e Valência sobre o porta-enxerto de Valência).

6.7. Análise de metilação do DNA total por MSAP

Analisando as combinações de enxertia e pés-franco de citros aos 4 MAI, comparando-se plantas inoculadas e grupo controle dentro de cada tratamento, notadamente o tratamento pé-franco TR e a combinação TR+VC/TR apresentaram maior metilação para as plantas controle. Aos 13 MAI, o tratamento pé-franco TR se manteve com maior metilação para as plantas controle, seguida das combinações TR+VC/VC e TR+VC/TR. Quando analisadas apenas as combinações inoculadas com CLas, aos 4 MAI, os tratamentos apresentaram variação de metilação de 62,75% a 87,27%, sendo ordenadas de forma crescente: TR+VC/TR, pé-franco VC, pé-franco TR, TR/VC, TR+VC/TR, TR+VC/VC, TR+VC/VC e VC/TR. Aos 13 MAI, houve um aumento da metilação para os tratamentos TR+VC/TR, pé-franco VC, VC+TR/TR e VC/TR, variando de 78,18% a 91,15%. Os tratamentos pé-franco TR, TR+VC/VC e TR+VC/VC apresentaram redução na metilação quando comparadas com as avaliações realizadas aos 4 MAI. Para TR/VC, não foi detectada alteração na metilação entre os dois tempos de avaliação. Analisando apenas os controles de todas as combinações de enxertia aos 4 MAI, observamos que 70% a 80,91% das plantas foram metiladas, com os seguintes tratamentos em ordem crescente de metilação: TR+VC/VC, pé-franco VC, VC/TR, TR+VC/VC, TR+VC/TR, TR/VC, TR+VC/TR e pé-franco TR. Aos 13 MAI, os tratamentos apresentaram perfil de metilação variando de 76,19% a 82,86%. O tratamento pé-franco VC e as combinações TR/VC, TR+VC/VC, TR+VC/TR e VC/TR, apresentaram aumento nos perfis metilados em contra partida, os tratamentos pé-franco TR, TR+VC/TR e TR+VC/VC apresentaram redução nos perfis metilados para as avaliações realizadas aos 13 MAI. Plantas inoculadas da combinação VC/TR apresentaram maior percentual de MSAP, perfil de metilação completa e hemimetilação em plantas avaliadas aos 4 e 13 MAI, respectivamente (Tabela 10).

Aos 4 MAI, os tratamentos VC/TR^o, TR+VC/TR^o, TR/VC^o, pé-franco TR^o, TR+VC/TR^o e TR+VC/TR^o apresentaram frequências mais intensas para o perfil metilação completa (F1CM) em relação aos demais tratamentos. Já os tratamentos TR/VC^o, pé-franco VC^o, VC/TR^o, TR+VC/VC^o e TR+VC/TR^o apresentaram frequências menos intensas para o perfil hemimetilação/HPAll, enquanto que TR+VC/TR^o, pé-franco VC^o, TR+VC/VC^o, TR+VC/VC^o e TR+VC/TR^o apresentaram frequências menos intensas para o perfil hemimetilação/MSPI (Figura 10A). Aos 13

MAI, os tratamentos VC/TR⁰, TR+VC/TR⁰, VC/TR⁰ e TR+VC/VC⁰ apresentaram frequências mais intensas para o perfil metilação completa (F1CM). Os tratamentos VC/TR⁰, TR+VC/VC⁰, VC/TR⁰ e TR+VC/VC⁰ apresentaram frequências mais intensas para o perfil hemimetilação/HPAII. Os tratamentos TR+VC/VC⁰, VC/TR⁰, TR+VC/VC⁰, TR+VC/VC⁰, TR+VC/TR⁰, TR+VC/TR⁰, TR+VC/VC⁰, pé-franco VC⁰ e TR+VC/TR⁰ apresentaram frequências menos intensas para o perfil hemimetilação/MSPI, enquanto pé-franco TR⁰, TR/VC⁰ e TR+VC/TR⁰ apresentaram frequências mais intensas para o perfil hemimetilação/MSPI (Figura 10B).

Somando a porcentagem de bandas metiladas e hemimetiladas para plantas controles e inoculadas, foi possível constatar que as plantas inoculadas apresentaram frequências mais intensas para os perfis de hemimetilação e metilação completa do DNA quando comparada com plantas controle, e esses perfis metilados foram encontrados em maior porcentagem (52%) em folhas de laranjeira Valência, evidenciando uma ligação direta com a presença e título de CLas e os perfis de metilação.

Tabela 10. Diferentes tipos de MSAP dentro dos níveis de citosina metilada nas diferentes combinações de enxertia entre laranjeira-doce Valência (VC) e *Poncirus trifoliata* (TR) em folhas coletadas aos 4 e 13 meses após a inoculação (MAI) com *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs).

Combinação Copa/porta- enxerto	CLas	4 MAI									13 MAI								
		TIPOS DE BANDA				Total		%			TIPOS DE BANDA				Total		%		
		I*	II**	III***	IV****	^a Bandas amp	^b Bandas met	^c MSAP	^d Met completa (II + IV)	^e Hemi- metilado (III)	I*	II**	III***	IV****	^a Bandas amp	^b Bandas met	^c MSAP	^d Met completa (II + IV)	^e Hemi- metilado (III)
Pé-franco TR	Controle	21	9	20	60	110	89	80,91	62,73	18,18	22	11	19	58	110	88	80,00	62,73	17,27
	Inoculado	24	14	15	57	110	86	78,18	64,55	13,64	33	14	7	56	110	77	70,00	63,64	6,36
VC/TR	Controle	27	8	16	59	110	83	75,45	60,91	14,55	18	17	4	66	105	87	82,86	79,05	3,81
	Inoculado	14	17	20	59	110	96	87,27	69,09	18,18	10	27	13	63	113	103	91,15	79,65	11,50
TR+ <u>VC</u> /TR	Controle	25	8	13	64	110	85	77,27	65,45	11,82	20	13	8	70	111	91	81,98	74,77	7,21
	Inoculado	22	17	6	65	110	88	80,00	74,55	5,45	20	9	14	67	110	90	81,82	69,09	12,73
<u>TR</u> +VC/TR	Controle	23	10	10	67	110	87	79,09	70,00	9,09	23	11	6	64	104	81	77,88	72,12	5,77
	Inoculado	38	8	2	54	102	64	62,75	60,78	1,96	24	13	7	66	110	86	78,18	71,82	6,36
Pé-franco VC	Controle	29	17	6	58	110	81	73,64	68,18	5,45	25	7	12	61	105	80	76,19	64,76	11,43
	Inoculado	27	5	17	62	111	84	75,68	60,36	15,32	21	12	9	68	110	89	80,91	72,73	8,18
TR/VC	Controle	23	8	18	53	102	79	77,45	59,80	17,65	26	9	11	64	110	84	76,36	66,36	10,00
	Inoculado	24	11	9	66	110	86	78,18	70,00	8,18	24	14	18	54	110	86	78,18	61,82	16,36
TR+ <u>VC</u> /VC	Controle	24	16	8	56	104	80	76,92	69,23	7,69	26	9	6	69	110	84	76,36	70,91	5,45
	Inoculado	21	16	13	61	111	90	81,08	69,37	11,71	22	9	10	69	110	88	80,00	70,91	9,09
<u>TR</u> +VC/VC	Controle	33	7	11	59	110	77	70,00	60,00	10,00	20	20	10	60	110	90	81,82	72,73	9,09
	Inoculado	21	15	21	53	110	89	80,91	61,82	19,09	21	19	7	56	103	82	79,61	72,82	6,80

Tipo *I - bandas em ambas as enzimas EcoRI/HpaII e EcoRI/MspI, indicando ausência de metilação; Tipo **II –bandas apenas na enzima EcoRI/HpaII; Tipo ***III –bandas apenas na enzima EcoRI/MspI; e Tipo ****IV - ausência de bandas em ambas as enzimas. Pé-franco TR (pé-franco

de *P. trifoliata*), VC/TR (Valência sobre o porta-enxerto de *P. trifoliata*), $\frac{VC+TR}{TR}$ (duas copas, laranja Valência e *P. trifoliata* em porta-enxerto de *P. trifoliata*, avaliando a copa de Valência), $\frac{TR+VC}{TR}$ (duas copas, laranja Valência e *P. trifoliata* em porta-enxerto de *P. trifoliata*, avaliando a copa de *P. trifoliata*), pé-franco VC (pé-franco de Valência), TR/VC (*P. trifoliata* sobre o porta-enxerto de Valência), $\frac{TR+VC}{VC}$ (duas copas de *P. trifoliata* e Valência sobre o porta-enxerto de Valência, avaliando a copa de Valência) e $\frac{TR+VC}{VC}$ (duas copas de *P. trifoliata* e Valência sobre o porta-enxerto de Valência, avaliando a copa de *P. trifoliata*).

^aTotal de bandas amplificadas;

^bTotal de bandas metiladas (II + III + IV);

^cMSAP - razão percentual do total de bandas metiladas (II + III + IV)

^dTaxa de bandas completamente metiladas (II + IV); ^eTaxa de bandas hemi-metiladas (III) em relação ao total de bandas amplificadas.

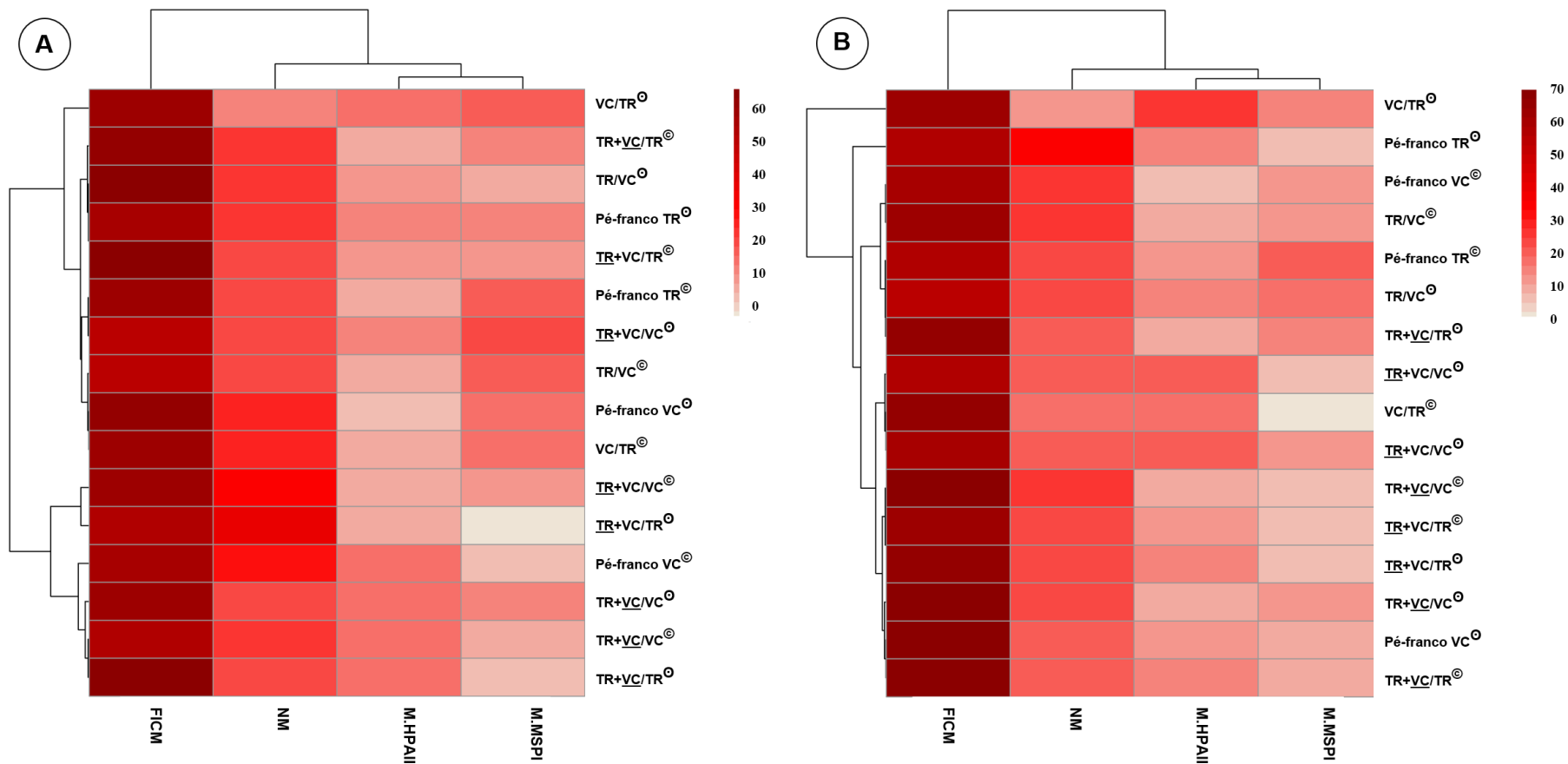


Figura 10. Heatmap do perfil de metilação obtido com a análise MSAP, usando as enzimas HpaII e MspI, para as diferentes combinações de laranja-doce Valência (VC) e *Poncirus trifoliata* (TR) inoculadas com *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs). **A:** avaliadas com 4 meses após as inoculações e **B:** avaliadas com 13 meses após as inoculações. FICM: metilação completa e hemimetilação de ambas citosinas; NM: não houve metilação; M-HpaII: hemimetilação da citosina externa e M-MspI: metilação completa e hemimetilação da citosina interna.

Pé-franco TR (pé-franco de *P. trifoliata*), VC/TR (Valência sobre o porta-enxerto de *P. trifoliata*), TR+VC/TR (duas copas, laranja Valência e *P. trifoliata* em porta-enxerto de *P. trifoliata*, avaliando a copa de Valência), TR+VC/TR (duas copas, laranja Valência e *P. trifoliata* em porta-enxerto de *P. trifoliata*, avaliando a copa de *P. trifoliata*), pé-franco VC (pé-franco de Valência), TR/VC (*P. trifoliata* sobre o porta-enxerto de Valência), TR+VC/VC (duas copas de *P. trifoliata* e Valência sobre o porta-enxerto de Valência, avaliando a copa de Valência) e TR+VC/VC (duas copas de *P. trifoliata* e Valência sobre o porta-enxerto de Valência, avaliando a copa de *P. trifoliata*).[○] - Inoculado e [©] - Controle.

7. DISCUSSÃO

Muito tem sido feito para a obtenção de variedades de citros que sejam tolerantes ou resistentes ao HLB, mas, apesar de todos os esforços, até o presente momento não existe variedade comercial de citros resistente a CLas. Na tentativa de sanar esse problema e diminuir os danos causados por essa doença, inúmeras pesquisas vêm estudando a interação citros/CLas. Verificam-se respostas decorrentes dessa interação, incluindo alterações fisiológicas, anatômicas e morfológicas que resultam em modificações fenotípicas provocadas pela bactéria em plantas de citros (Bové, 2006; Tatineni *et al.*, 2008; Lopes *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2009; Raiol-Junior *et al.*, 2021; Hilf & Luo, 2018). Diante de tudo isso, é relevante avaliar a influência da posição de genótipos com diferentes graus de resistência em combinações de copa e porta-enxerto variando plantas com dupla copa, copa simples e plantas de pé-franco durante a colonização com CLas. A avaliação das respostas biométricas, anatômicas e epigenéticas nesses modelos permitiu uma maior compreensão sobre mecanismos de resistência que podem ser explorados pelo melhoramento genético, propagação e manejo da cultura.

A detecção de CLas, baseada em PCR em tempo real, tem sido relatada em amostras de casca verde do caule, casca madura, pecíolos, nervuras médias de folhas, limbo foliar, raízes e frutos de plantas de citros sintomáticas (Li *et al.*, 2006, Bové, 2006; Folimonova *et al.*, 2009, Kunta *et al.*, 2014, Boava *et al.*, 2015, Braswell *et al.*, 2020). Nossas análises evidenciaram maiores proporções de infecção por CLas no sistema radicular do que em pecíolos de folhas, notadamente em genótipo mais tolerante como *P. trifoliata*. Após a inoculação, a bactéria, que é restrita ao floema e apresenta movimento seguindo o fluxo de seiva, multiplicou-se mais eficientemente no sistema radicular. Como consequência, pode dificultar a absorção de água, sais minerais e nutrientes, podendo levar as plantas à morte (Graham *et al.* 2013; Johnson *et al.* 2014; Louzada *et al.* 2016; Park *et al.* 2018; e Braswell *et al.* 2020).

Analisado o título bacteriano, para todos os períodos amostrados e tratamentos, constatou-se que as maiores concentrações bacterianas sempre foram detectadas em amostras de laranjeira Valência, independente da sua posição (copa ou porta-enxerto). Esses resultados mostram que plantas de Valência apresentam

poucos mecanismos de resistência para barrar a infecção e multiplicação da bactéria. Folimonova *et al.* (2009) analisaram a resposta de 30 genótipos de citros infecção por CLas e observaram que a bactéria foi capaz de se multiplicar na maioria das combinações testadas, sendo laranja-doce e toranja (*C. maxima* L.) as mais suscetíveis ao patógeno. Estudos posteriores também evidenciaram uma maior suscetibilidade da laranja-doce Valência à CLas (Albrecht e Bowman, 2012, Kunta *et al.*, 2014, Boava *et al.*, 2015, Louzada *et al.*, 2016).

Contudo, evidenciamos menor concentração da bacteriana de CLas em folhas e raízes (pé-franco, porta-enxerto ou copa) de *P. trifoliata*, confirmando a hipótese de que a colonização de CLas ocorre de forma mais lenta em plantas de *P. trifoliata*, sugerindo que essa espécie apresenta alguns mecanismos de tolerância a CLas, reduzindo assim os danos causados por CLas e eventualmente permitindo a exploração mais prolongada de pomares comerciais, mesmo estando a copa das plantas infectada por CLas (Boava *et al.*, 2015; 2017, Albrecht e Bowman, 2011, 2012a, 2019).

As plantas pé-franco de VC, VC/TR e TR+VC/VC apresentaram redução expressiva na matéria seca de sistema radicular nas plantas inoculadas com CLas quando comparada com plantas controles. De acordo com Johnson *et al.* (2014) CLas move-se preferencialmente do local da infecção para o sistema radicular, onde coloniza, se multiplica, danifica o sistema radicular e, posteriormente, se espalha para o sistema de parte aérea durante novos fluxos de folhas. Os autores ainda relatam que as árvores com sintomas de HLB geralmente têm menos raízes em comparação com árvores presumivelmente saudáveis e sem sintomas de HLB.

Por outro lado, em análises transcriptômicas e metabolômicas de folhas, cascas e raízes de mudas tangerinas selvagens Chongyi (*C. reticulata*) inoculada com CLas, foi possível observar que os genes diferencialmente expressos (DEGs) atingiram suas expressões máximas de 24%, 18% e 15% para amostras de folhas, cascas e raízes infectadas com CLas, acreditando que valores mais altos de DEGs nos tecidos infectados com CLas causa um aumento geral no acúmulo de transcritos (Peng *et al.*, 2021). Em uma comparação dos níveis de expressão gênica de caules e raízes de plantas infectadas com CLas *versus* plantas saudáveis foi possível observar um total de 988 genes com expressão significativamente alterada, sendo 885 nos

caules e 111 nas raízes. Ainda foi possível evidenciar maior expressão dos genes regulados positivamente em árvores doentes com HLB em comparação com plantas saudáveis (Aritua *et al.*, 2013).

No presente estudo foi possível observar o comprometimento da taxa de crescimento da parte aérea em pé-franco de VC na presença da bactéria, evidenciando, assim, maior dano por CLas nas plantas com predomínio de copa mais susceptível de VC. Estudos descrevem que plantas com maior suscetibilidade são caracterizadas por apresentar sintomas mais intensos devido à pouca ou ausência de mecanismos envolvidos na tolerância dessas plantas (Bové, 2006). A ausência de resistência genética ao HLB contribui para a indução de sintomas severos que parecem estar relacionados a disfunção do floema (Machado *et al.*, 2010, Koh *et al.*, 2012) e distribuição sistêmica da bactéria (Graça *et al.*, 2016), sendo que a presença de CLas modifica o desenvolvimento da planta devido à indução de distúrbios metabólicos no hospedeiro, provavelmente em resposta a produtos da bactéria, levando ao desequilíbrio no metabolismo de carboidratos e por consequente a expressão de genes associados à síntese de amido e proteínas do sistema estrutural e funcional do floema (Mafra *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2017; Veloso dos Santos *et al.*, 2018; Soratto *et al.*, 2020; Nehela & Killiny, 2020; Alves *et al.*, 2021).

Evidenciamos maior deposição de calose em tecidos de plantas de laranjeira Valência. Por outro lado, evidenciamos baixa deposição de calose em tecidos de plantas de *P. trifoliata* avaliadas com 4 e 13 MAI, respectivamente. Curtolo *et al.* 2020 encontraram resultados bem semelhantes aos nossos, onde *P. trifoliata* e seis híbridos obtidos de um cruzamento controlado entre *C. sunki* e *P. trifoliata* cv Roubidoux não apresentaram bloqueio de floema induzido por calose, sendo que não houve diferença entre as plantas controle e inoculadas com CLas. Plantas mais tolerantes a CLas apresentam menor deposição de calose, o que possivelmente se deve a outros mecanismos de tolerância bem-sucedidos para conter/evitar a multiplicação da bactéria.

De acordo com Granato *et al.* (2019) a deposição de calose é uma das modificações causadas por CLas, atua como mecanismo de defesa contra patógenos teciduais invasivos, tentando bloquear a disseminação sistêmica de CLas com o fortalecimento da parede celular; contudo, também pode causar distúrbios

metabólicos com a expressão de genes ligados à síntese de amido e proteínas do sistema estrutural e funcional no floema da planta, levando ao desequilíbrio no metabolismo de carboidratos. Oliveira *et al.* (2019) sugerem que células do floema colapsadas podem ter uma implicação importante na sintomatologia de plantas altamente suscetíveis.

Em adição, foi possível evidenciar uma redução significativa na quantidade de pontos de deposição de calose em plantas de copa simples de laranjeira Valência enxertada em porta-enxerto de *P. trifoliata* quando comparadas com plantas de pé-franco de laranjeira Valência, ao mesmo tempo em que observamos maior deposição de calose nas plantas de copa simples de *P. trifoliata* enxertadas em porta-enxerto de laranjeira Valência em relação às plantas de pé-franco de *P. trifoliata*. Portanto, os resultados indicam que *P. trifoliata* tende a diminuir a deposição de calose em plantas de Valência quando usado como porta-enxerto desta.

Esses resultados anatômicos sugerem uma característica importante para minimizar os danos do efeito do transporte irregular no floema causado pela deposição de calose em plantas infectadas, embora o sistema radicular também tenha sido afetado nessa combinação. É importante ressaltar que, a despeito da constatação de que existe influência da posição do genótipo na combinação de enxertia sobre a resposta ao HLB, as taxas de infecção neste estudo foram em geral altas e, por essa razão, o manejo para prevenção de infecção ainda é um fator imprescindível em combinações de citros susceptíveis, sendo o monitoramento e controle do *D. citri* de suma importância, assim como utilização de plantas saudáveis (Bassanezi *et al.*, 2020).

Estudos foram desenvolvidos a fim de identificar a regulação epigenética das respostas à colonização por Clas. Sabe-se que a enxertia pode desencadear alterações em fatores epigenéticos da copa (Huang *et al.*, 2021, Silva *et al.*, 2021). Uthup *et al.* (2018) e Perrin *et al.* (2020), estudando plantas perenes, encontraram alterações nos perfis de metilação de heteroenxertos de *Hevea brasiliensis* (seringueira) e *Malus domestica* (macieira). A metilação do DNA pode variar a depender das combinações de espécies utilizadas na enxertia, regulando interações intercelulares entre a copa e o porta-enxerto (Huang *et al.*, 2021, Silva *et al.*, 2021).

Relatos envolvendo déficit hídrico em plantas de citros vêm trazendo evidências de que a defesa de plantas de citros pode estar associada a regiões metiladas do DNA (Neves *et al.*, 2017a, Santos *et al.*, 2020), assim como apoia que também exista um papel para a modificação epigenética na tolerância a estresses bióticos em plantas cítricas (Silva *et al.*, 2021). Na presente pesquisa, foi possível observar maior quantidade de metilação completa (FICM) e de hemimetilação/MSPI em plantas de pé-franco de laranjeira Valência quando comparadas com plantas de pé-franco de *P. trifoliata*. Huang *et al.* (2021) observou que, no geral, o nível de metilação do DNA de laranjeira-doce foi maior do que o de *P. trifoliata*. Esses autores mostraram que essas regiões diferencialmente metiladas (DMRs) continham genes com papéis importantes na resposta de defesa da planta.

Curtolo *et al.* (2020) fizeram uma ampla análise transcriptômica usando genótipos contrastantes em relação à gravidade do HLB com intuito de identificar mecanismos genéticos associados à tolerância ao HLB, perceberam que poucos genes foram diferencialmente expressos de acordo com a análise de RNAseq das plantas tolerantes e, acredita-se que plantas resistentes e tolerantes tendem a responder mais rápida e vigorosamente a um patógeno do que plantas suscetíveis. Pressupõe que a baixa metilação do DNA promove a defesa do hospedeiro em respostas contra a infecção por patógenos (Crespo-Salvador *et al.*, 2018, Kuźnicki *et al.*, 2019). O perfil de metilação de DNA de alta resolução revelou que regiões hipometiladas de DNA induzida por patógeno, ocorre em muitas regiões da cromatina próximas a genes relacionados à defesa, incluindo promotores, corpos gênicos e elementos transponíveis (TEs) (López Sánchez *et al.*, 2016; Wang C. *et al.*, 2018; Geng *et al.*, 2019 ; Sun *et al.*, 2019 ; Atighi *et al.*, 2020 ; Annacondia *et al.*, 2021), com isso, acredita-se que *P. trifoliata* possa utilizar essa estratégia, em função da maior resistência observada ao HLB, esse é um trabalho inédito onde foi possível evidenciar uma ligação direta com a presença e título de CLas e os perfis de metilação. Desse modo, acredita-se que futuros estudos adicionais e mais aprofundados sobre hipometilação poderão avançar na elucidação sobre mecanismos de resistência genética ao HLB presentes em plantas dos gêneros *Citrus* e *Poncirus*.

Além disso, sugere-se que as pesquisas sejam focadas no isolamento das bandas polimórficas do MSAP para fins de sequenciamento e identificação dos genes

diferencialmente metilados e suas funções, assim como nas alterações da expressão gênica por meio da repressão de genes perante a infecção causada por CLAs.

8. CONCLUSÕES

As combinações de copa e porta-enxerto de citros avaliadas influenciaram na infecção causada por CLAs, assim como em respostas anatômicas, biométricas e de padrões de metilação do DNA. As alterações observadas nesses indicadores são dependentes da posição do genótipo na combinação enxertada, sendo que o uso de genótipo susceptível na posição de copa está relacionado a maiores alterações pela doença.

9. REFERÊNCIAS

Agrios, G. N. (2005). Plant pathology. 5th Edition. Burlington, **Elsevier Academic Press**.

Albrecht, U., Bowman, K. (2019). Reciprocal influences of rootstock and scion citrus cultivars challenged with *Ca. Liberibacter asiaticus*. **Scientia Horticulturae**. 254:133-142. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.05.010>.

Albrecht, U., Bowman, K. D., (2012a). Tolerance of trifoliolate citrus rootstock hybrids to *Candidatus Liberibacter asiaticus*. **Scientia Horticulturae**. 147, 71–80

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

Albrecht, U.; Bowman, K.D. (2012b). Transcriptional response of susceptible and tolerant citrus to infection with *Candidatus Liberibacter asiaticus*. **Plant Science**. Amsterdam, v. 185-186, p. 118-130.

Albrecht, U.; Hall, D. G.; Bowman, D. K. (2014). Transmission efficiency of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' and progression of huanglongbing disease in graft- and psyllid-inoculated citrus. **HortScience**. 49:367-377.

Alves, M. N., Lopes, S. A., Raiol-Junior, L. L., Wulff, N. A., Girardi, E. A., Ollitrault, P., et al. (2021). Resistance to ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*,’ the Huanglongbing associated bacterium, in sexually and/or graft-compatible *Citrus* relatives. **Frontiers in Plant Science**. 11:617664.

Aritua, V., Achor, D., Gmitter, F.G., Albrigo, G., Wang, N. (2013). Transcriptional and microscopic analyses of citrus stem and root responses to *Candidatus Liberibacter asiaticus* infection. **PLoS One**. Sep 13;8(9):e73742. doi: 10.1371/journal.pone.0073742. PMID: 24058486; PMCID: PMC3772824.

Banco de dados global EPPO, acessado em 12/01/2022 disponível em: <https://gd.eppo.int/taxon/LIBEAS/distribution>

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

Bassanezi, R. B.; Lopes, S. A.; Belasque Jr.; J.; Spósito, M. B.; Yamamoto, P. T.; Miranda, M. P.; Teixeira, D. C.; Wulff, N. A. (2009). Epidemiologia do Huanglongbing e suas implicações para o manejo da doença. **Citrus Research & Technology**. Cordeirópolis, v.31, n.1, p 11-23.

Birnbaum, K. D., Roudier, F. (2017). Epigenetic memory and cell fate reprogramming in plants. **Regeneration**, v. 4, n. 1, p. 15–20, fev. ISSN 2052-4412.

Boava, L. P. *et al.* (2015). Incidence of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*”-infected plants among citrandarins as rootstock and scion under field conditions. **Phytopathology**. v. 105, n. 4, p. 518-524, abr. 2015.

Boava, L. P.; Cristofani-Yaly, M.; Machado, M. A. (2017). Physiologic, anatomic, and gene expression changes in *Citrus sunki*, *Poncirus trifoliata* and their hybrids after ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ infection. **Phytopathology**. v. 107, n. 5, p. PHYTO-02-16-0077-R.

Bond, D.M., Baulcombe, D.C. (2014). Small RNAs and heritable epigenetic variation in plants. **Journal of Cell Biology**. 24: 100-107.

Bouyer, D., Kramdi, A., Kassam, M., Heese, M., Schnittger, A., Roudier, F., Colot, V. (2017). DNA methylation dynamics during early plant life. **Genome biology**, 18(1), 1-12.

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

Brasil. (2009). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Huanglongbing (*Candidatus Liberobacter* spp.). Manual de procedimentos para execução de levantamentos fitossanitários e ações de prevenção e de controle. Brasília, DF: **MAPA** / Secretaria de Defesa Agropecuária, Divisão de Prevenção, Vigilância e Controle de Pragas, 6 p.

Braswell, W.E.; Park, J.-W.; Stansly, P.A.; Kostyk, B.C.; Louzada, E.S.; da Graça, J.V.; Kunta, M. (2020). Root samples provide early and improved detection of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in Citrus. **Scientific Reports**. 10, 16982.

Brlansky, R. H. *et al.* (2009). Florida *Citrus* Pest Management Guide: Blight 1. **Extension Digital Information Source (EDIS)**. v. PP-225 Dep, p. 2-3.

Burckhardt, D., Ouvrard, D., Percy, D. M. (2021). An updated classification of the jumping plant-lice (Hemiptera: Psylloidea) integrating molecular and morphological evidence. *European Journal of Taxonomy*, 736, 137-182.

Carvalho, N. L. (2012). Resistência genética induzida em plantas cultivadas. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**. v. 7, n. 7, p. 1379-1390.

Casadesus, J. e Low, D. A. (2013). Programmed heterogeneity: epigenetic mechanisms in bacteria. **Journal of Biological Chemistry**. 288, 13929-13935.

Castle, W. S., (2010). A career perspective on citrus rootstocks, their development, and commercialization. **Hort. Science**. 45, 11–15.

Castle, W.S., Bowman, K.D., Baldwin, J.C., Grosser, J.W., Gmitter Jr., F.G., (2011). Rootstocks affect tree growth, yield, and juice quality of ‘Marsh’ grapefruit. **HortScience**. 46, 841–848.

CEPEA- Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada: PIB-AGRO/CEPEA: PIB DO AGRO CRESCE 8,36% EM 2021; PARTICIPAÇÃO NO PIB BRASILEIRO

CHEGA A 27,4%. acessado em 29/05/2022, disponível em: <https://www.cepea.esalq.usp.br/br/releases/pib-agro-cepea-pib-do-agro-cresce-8-36-em-2021-participacao-no-pib-brasileiro-chega-a-27-4.aspx>.

Chwialkowska, K., Korotko, U., Kosinska, J., Szarejko, I., Kwasniewski, M. (2017). Methylation Sensitive Amplification Polymorphism Sequencing (MSAP-Seq) - A Method for High-Throughput Analysis of Differentially Methylated CCGG Sites in Plants with Large Genomes. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 2056.

Cifuentes-Arenas, J. C., Beattie, G. A. C., Pena, L., Lopes, S. A. (2019) *Murraya paniculata* and *Swinglea glutinosa* as short-term transient hosts of 'Candidatus Liberibacter asiaticus' and implications for spread of huanglongbing. **Phytopathology**. 109: 2064–2073.

Cifuentes-Arenas, J.C., Goes, A., Miranda, M.P., Beattie, G.A.C., Lopes, S.A. (2018). Citrus flush shoot ontogeny modulates biotic potential of *Diaphorina citri*. **Plos One**. 13:1-17.

CITRUSBR- Associação Nacional dos Exportadores de Sucos Cítricos. Disponível em <https://citrusbr.com/noticias/geracao-de-empregos-na-laranja-cresce-206-na-safra-2021-2022/>. Acesso em: 04 jun. 2022.

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

COSAVE (Comitê de Sanidade Vegetal do Cone Sul). HLB: Regional Program of Control and Prevention. [S.d.]. Disponível em: *lista de las principales plagas cuarentenarias para la region del cosave*. (2018). Retrieved from [http://www.cosave.org/sites/default/files/paginas/adjuntos/Anexo Lista de Plagas Cuarentenarias Re0.pdf](http://www.cosave.org/sites/default/files/paginas/adjuntos/Anexo%20Lista%20de%20Plagas%20Cuarentenarias%20Re0.pdf) . Acesso em: 10 jun. 2021.

Crespo-Salvador, Ó., Escamilla-Aguilar, M., López-Cruz, J., López-Rodas, G., González-Bosch, C. (2018). Determination of histone epigenetic marks in Arabidopsis and tomato genes in the early response to *Botrytis cinerea*, **Plant Cell Reports**. 37. 153-166.

Curtolo, M., de Souza Pacheco, I., Boava, L. P., Takita, M. A., Granato, L. M., Galdeano, D. M., de Souza, A. A., Cristofani-Yaly, M., e Machado, M. A. (2020). Wide-ranging transcriptomic analysis of *Poncirus trifoliata*, *Citrus sunki*, *Citrus sinensis* and contrasting hybrids reveals HLB tolerance mechanisms. **Scientific reports**. 10 (1), 20865. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77840-2>

Da Silva P. A., Fassini, C. G., Sampaio, L. S., Dequigiovanni, G., Zucchi, M. I., e Wulff, N. A. (2019). Genetic diversity of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ revealed by short tandem repeats and prophage typing indicates population homogeneity in Brazil. **Phytopathology**. <https://doi.org/https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-18-0295>.

Del Guercio (1918). Note ed osservazione di entomologia agrarian. Il cecidio delle foglie del limone ed il suo cicidoozo in Eritrea. **Agricoltura Coloniale**. 1918:167–169. 2 figs, 1 pl.

Diário Oficial da União (2019) Instrução Normativa N° 26, de 10 de setembro de 2019, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, acessado em 08/01/2022, disponível em: <https://www.in.gov.br/web/dou/-/instrucao-normativa-n-26-de-10-de-setembro-de-2019-216065360>

Ding, B.; Wang, G. (2015). Chromatin versus pathogens: the function of epigenetics in plant immunity. **Frontiers in Plant Science**. 6:675.

Ding, Y, Fromm, M. e Avramova, Z. (2012). Multiple exposures to drought ‘train’ transcriptional responses in *Arabidopsis*. **Nature COMMUNICATIONS**. Vol 3. 740.

Duan, Y.; Zhou, L.; Hall, D.G.; Li, W.; Doddapaneni, H.; Lin, H.; Liu, L.; Vahling, C.M.; Gabriel, D.W.; Williams, K.P.; Dickerman, A.; Sun, Y.; Gottwald, T. (2009). Complete Genome Sequence of Citrus Huanglongbing Bacterium, “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” Obtained Through Metagenomics. **Molecular Plant Microbe Interaction**. 22:1011-1020.

El Sawi, S. A., Ibrahim, M. E., El-Rokiek, K. G., e El-Din, S. A. S. (2019). Allelopathic potential of essential oils isolated from peels of three citrus species. **Annals of Agricultural Sciences**, 64(1), 89-94.

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

Fan, J., Chen C., Yu, Q., Khalaf, A, Achor D. S., and Brlansky R. H. (2012). Comparative transcriptional and anatomical analyses of tolerant rough lemon and susceptible sweet orange in response to ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ Infection. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. 25(11):1396-407.

FAO -Commodity in focus- Disponível em: <https://www.fao.org/markets-and-trade/commodities/citrus/en/>. Acessado em março de 22.

Folimonova, S. Y. S. *et al.* (2009). Examination of the responses of different genotypes of citrus to huanglongbing (citrus greening) under different conditions. **Phytopathology**. v. 99, n. 23, p. 1346-1354, dez.

Folimonova, S. Y.; Achor, D. S. (2010). Early events of citrus greening (huanglongbing) disease development at the ultrastructural level. **Phytopathology**. 100:949-958.

Foster, A.S. (1949). Practical plant anatomy. D. Van Nostrand Company Inc., New York.

Fox, J., e Weisberg, S. (2020). *car: Companion to Applied Regression*. [R package]. Retrieved from <https://cran.r-project.org/package=car>.

Fujimoto, R., Sasaki, T., Ishikawa, R., Osabe, K., Kawanabe, T., and Dennis, E. S. (2012). Molecular mechanisms of epigenetic variation in plants. **International Journal of Molecular Sciences**. 13, 9900–9922. doi: 10.3390/ijms13089900.

Fundecitrus - Estimativa da safra de laranja 2021/2022 do cinturão citrícola de São Paulo e triangulo/sudoeste Mineiro,2021. Disponível em:https://www.fundecitrus.com.br/pdf/pes_relatorios/2021_05_27_Sum%C3%A1rio_Executivo_da_Estimativa_da_Safra_de_Laranja_2021-2022.pdf

Fundecitrus - Plantas com sintomas de HLB são identificadas na Colômbia (2017) Fundecitrus. (n.d.). Retrieved June 6, 2021, from

<https://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/noticias/integra/plantas-com-sintomas-de-hlb-sao-identificadas-na-colombia/390>

Fundecitrus-levantamento_de_doencas. Disponível em: https://www.fundecitrus.com.br/pdf/levantamentos/Relatorio_levantamento_de_doencas_2021-greening_CVC_e_cancro_citrico.pdf

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

Gaut, B. S., Miller, A. J., and Seymour, D. K. (2019). Living with two genomes: grafting and its implications for plant genome-to-genome interactions. Phenotypic Variation and Evolution. **Annual Review of Genetics**. 53, 195–215. doi: 10.1146/annurev-genet-112618-043545.

Geng S., Kong X., Song G., Jia M., Guan J., Wang F., Qin Z., Wu L., Lan X., Li A., Mao L., (2019). DNA methylation dynamics during the interaction of wheat progenitor *Aegilops tauschii* with the obligate biotrophic fungus *Blumeria graminis* f. sp. *Tritici*, **New Phytologist**. 221, 023-1035.

González-Mas, M. C., Rambla, J. L., López-Gresa, M. P., Blázquez, M. A., e Granell, A. (2019). Volatile compounds in citrus essential oils: A comprehensive review. **Frontiers in Plant Science**, 10, 12.

Gonzatto, M. P., Kovalski, A. P., Brugnara, E. C., Weiler, R. L., Sartori, I. A., Lima, J. G. D., Schwarz, S. F. (2011). Performance of 'Oneco' mandarin on six rootstocks in South Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 46, 406-411.

Gottwald, T. R. (2010). Current epidemiological understanding of citrus Huanglongbing. **Annual Review of Phytopathology**. 48:119-139.

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

- Grafton-Cardwell, E. E., Stelinski, L. L., Stansly, P. A. (2013) Biology and management of Asian citrus psyllid, vector of the huanglongbing pathogens. **Annual Review of Entomology**. 58:413–432. <https://doi.org/10.1146/annurevento-120811-153542>
- Graham, J. H., Johnson, E. F., Gottwald, T. R. e Irey, M. S. (2013). Pre-symptomatic fibrous root decline in citrus trees caused by huanglongbing and potential interaction with *Phytophthora* spp. **Plant Disease**. 97, 1195–1199.
- Granato, L. M., Galdeano, D. M., Alessandre, N. R., Breton, M. C., Machado, M.A. (2019) Callose synthase family genes plays an important role in the *Citrus* defense response to *Candidatus Liberibacter asiaticus*. **European Journal of Plant Pathology** 155:25-38.
- Guerrero, Y. (2018). O ataque do dragão amarelo. PRODAVINCI. Retrieved June 20, 2019, from <http://factor.prodavinci.com/elataquedeldragonamarillo/index.html>
- Hajeri, S. e Yokomi, RK (2019). Reliable tissue sampling and seasonality for consistent detection of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' by qPCR. **Current Agriculture Research Journal**. 8, 1-3. doi: 10.12944 / CARJ.8.1.01
- Hall, D. G.; George, J.; Lapointe, S. L. (2015). Further investigations on colonization of *Poncirus trifoliata* by the Asian citrus psyllid. **Crop Protection**. 72:112-118.
- Hollis, D. (1984). Afrotropical jumping plant lice of the family Triozidae (Homoptera: Psylloidea). Bulletin of the British Museum **Natural History**. 49 (1): 1-102.
- Hu, B., Rao, M. J., Deng, X., Pandey, S. S., Hendrich, C., Ding, F., et al. (2021) Molecular signatures between citrus and *Candidatus Liberibacter asiaticus*. **Plos Pathogens**. 17(12): e1010071. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010071>
- Huang Y., Xu Y., Jiang X., Jia H., Tan C., Hu G., Hu Y., Rao M.J., Deng X., Xu Q. (2021). Genome of a citrus rootstock and global DNA demethylation caused by heterografting, **Horticulture Research**. 8:69, 1-13.
- Jagoueix. S, Bové J. M., Garnier, M. (1994) The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the subdivision of the Proteobacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**. 44:397-386.

Johnson, E. G.; Wu, J.; Bright, D. B.; Graham, J. H. (2014). Association of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' root infection, but not phloem plugging with root loss on huanglongbing-affected trees prior to appearance of foliar symptoms. **Plant Pathology**. 63:290-298.

Jones, J.D.; Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. *Nature*, v. 16, n. 444(7117), p. 323-9.

Kachroo, A., Kachroo, P., Mobile signals in systemic acquired resistance. **Current Opinion in Plant Biology**. 58 (2020) 41-47.

Kapazoglou, A., Ganopoulos, I., Tani, E., and Tsaftaris, A. (2018). Epigenetics, epigenomics and crop improvement. **Advances in Botanical Research**. 86, 287–324. doi: 10.1016/bs.abr.2017.11.007.

Kapazoglou, A., Tani, E., Avramidou, E. V., Abraham, E. M., Gerakari, M., Megariti, S.; Doupis, G., Doulis, A.G. (2021). Epigenetic Changes and Transcriptional Reprogramming Upon Woody Plant Grafting for Crop Sustainability in a Changing Environment. **Frontiers in Plant Science**. 11, 2160.

Karnovsky, M. J. (2014). A Formaldehyde-Glutaraldehyde Fixative of High Osmolality for Use in Electron Microscopy. (November), 1964–1965.

Killiny, N., (2017). Metabolite signature of the phloem sap of fourteen *Citrus* varieties with different degrees of tolerance to *Candidatus Liberibacter asiaticus*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. 97, 20–29.

Koh, E. J.; Zhou, L.; Williams, D. S.; Park, J.; Ding, N.; Duan, Y. P.; Kang, B. H. (2012). Callose deposition in the phloem plasmodesmata and inhibition of phloem transport in citrus leaves infected with '*Candidatus Liberibacter asiaticus*'. **Protoplasma**. Viena, v. 249, p. 687-697.

Kunta, M., da Graça, J. V., Malik, N., Louzada, E. S., Sétamou, M. (2014). Quantitative distribution of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in the aerial parts of the HLB-infected citrus trees in Texas. **HortScience**. 49, 65–68.

Kuźnicki, D., Meller, B., Arasimowicz-Jelonek M., Braszewska-Zalewska, A., Drozda, A., Floryszak-Wieczorek, J., BABA. (2019) Induced DNA Methylome Adjustment to Intergenerational Defense Priming in Potato to *Phytophthora infestans*, **Frontiers in Plant Science** 10. 650.

Laranjeira, F. F., Amorim, L., Berg amin Filho, A., AguilarVildoso, C.I., Coletta-Filho, H.D. (2005). Fungos procariotos e doenças abióticas In: Mattos Jr D, De Negri JD, Pio RM e Pompeu Jr J. **Citros. IAC e Fundag: Campinas**. p.509-536.

Laranjeira, F. F., Santos, T. A., Moreira, A. S., Sanches, Í. B., Nascimento, A. S., Silva, S. X., Andrade, E. C., Almeida, D. O. (2020). *Presence and abundance of Diaphorina citri in Murraya paniculata in urban areas free of huanglongbing in Brazil*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**. 168(9), 695–702. doi:10.1111/eea.12968

Laranjeira, F., Santos, T., Moreira, A., Sanches, I., Nascimento, A. et al. (2018) Association between citrus flushing cycles and Asian citrus psyllid demography in Huanglongbing-free area in Brazil. **Neotropical Entomology**.48: 503–514.

Li, J., Pang, Z., Trivedi, P., Zhou, X., Ying, X., Jia, H., Wang, N. (2017). 'Candidatus Liberibacter asiaticus' encodes a functional salicylic acid (sa) hydroxylase that degrades sa to suppress plant defenses. **Mol Plant Microbe Interact**. Aug;30(8):620-630. doi: 10.1094/MPMI-12-16-0257-R. Epub Jun 13. PMID: 28488467.

Li, W., Hartung, J. S., Levy, L. (2006). Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus huanglongbing. **Journal of Microbiological Methods**. v. 66, n. 1, p. 104-115.

Li. Y., Xu, M. R., Dai, L. P., Deng, X. L. (2018). Distribution pattern and titer of *CandidatusLiberibacter asiaticus* in periwinkle (*Catharanthus roseus*). **Journal of Integrative Agriculture**. 17:2501–2508.

Liu, Y. H., Tsai, J.H. (2000) Effects of temperature on biology and life table parameters of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae). **Annals of Applied Biology**. 137:201–206. [https://doi.org/ 10.1111/j.1744-7348.2000.tb00060.x](https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2000.tb00060.x).

Lopes, S. A., Luiz, F. Q. B. Q., Martins, E. C., Fassini, C. G., Barbosa, J. C., and Beattie, G. A. C. (2013). *Candidatus Liberibacter asiaticus* titers in citrus and Acquisition Rates by *Diaphorina citri* Are Decreased by Higher Temperature. **Plant Disease**. 2013 97:12, 1563-1570

Lopes, S.A.; Frare, G.F. (2008). Graft transmission and cultivar reaction of citrus to '*Candidatus Liberibacter americanus*'. **Plant Disease**, v.92, p.21-24. DOI: 10.1094/PDIS-92-1-0021.

Louzada, E. S., Vazquez, O. E., Braswell, W. E., Yanev, G., Devanaboina, M., e Kunta, M. (2016). Distribution of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' above and below ground in Texas citrus. **Phytopathology**, 106(7), 702-709.

Lu, J., Long, X., He, Z., Shen, Y., Yang, Y., Pan, Y., Zhan, J., Li, H. Effect of dietary inclusion of dried citrus pulp on growth performance, carcass characteristics, blood metabolites and hepatic antioxidant status of rabbits. **Journal of Applied Animal Research**, v.46, n.1, p.529-533, 2018.

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

Mafra, V., Martins, P.K., Francisco, C.S., Ribeiro-Alves, M., Freitas-Astúas, J., Machado, M. (2013). *Candidatus Liberibacter americanus* induces significant reprogramming of the transcriptome of the susceptible citrus genotype. **Bmc Genomics**. Edinburgh, v 14, e. 31263.

MAPA- Portaria institui programa nacional de prevenção e controle da doença dos citros- acessado em 08/01/2022, disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/portaria-institui-programa-nacional-de-prevencao-e-controle-da-doenca-dos-citros>

McCollum, T.G., Bowman, K.D. (2017). Rootstock affects fruit quality among 'Ray Ruby' grapefruit trees grown in the Indian River district of Florida. **HortScience**. 52,541–546.

Meneguim, L., Buassi, M., Vilas-Boas, L. A., Marques-Marçal, V. V., Paccola-Meirelles, L. D., Leite Jr., R. P. (2008). Ocorrência de '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' agente causal do Huanglongbing no estado do Paraná. **Tropical Plant Pathology**. Brasília, v. 33, n. 100.

Miles, G.P.; Stover, E.; Ramadugu, C.; Keremane, M.L.; Lee, R.F. (2017). Apparent tolerance to huanglongbing in *Citrus* and *Citrus*-related germplasm. **HortScience**. v.52, n.1, p.31-39.

Miranda, M. P., Noronha Júnior, N. C., Marques, R. N. (2011). Alternativas para o manejo do vetor do greening no Brasil. In: Baldin, E. L. L., Fujihara, R. T., Firmino, A. C., Negrisoni, E., Souza, E. de S., Prado, E. P., Marubayashi, J. M. (Ed.). **Avanços em fitossanidade. Botucatu: UNESP/FEPAF**. p. 143-163, 2011.

Moreira, S., Gurgel, J.T.A., Arruda, L.F. (1947). Poliembrionia em citrus. **Bragantia** [online]., v. 7, n. 3 [Acessado 12 Julho 2022], pp. 69-106. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0006-87051947000300002>>. Epub 08 Jun 2010. ISSN 1678-4499. <https://doi.org/10.1590/S0006-87051947000300002>.

Morelli, M., Takayassu, F. H., de Andrade Pacheco, C., da Conceição, P. M., Della Coletta Filho, H., e de Azevedo, F. A. (2020). Impact of HLB on the physiological quality of citrus rootstock seeds and non-vertical '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' transmission. **Tropical Plant Pathology**. 45(6), 620-625.

Murray, M. G., Thompson, W. F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**. v. 8, n. 19, p. 4321-4326.

Nagymihály, M., Veluchamy, A., Györgypál, Z., Ariel, F., Jégu, T., Benhamed, M., ... Kondorosi, É. (2017). Ploidy-dependent changes in the epigenome of symbiotic cells correlate with specific patterns of gene expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 114(17), 4543-4548.

Nanda, A. K., Melnyk, C. W. (2018). The role of plant hormones during grafting. **Journal of Plant Research**. 131, 49–58. doi: 10.1007/s10265-017-0994-5.

Nehela, Y., e Killiny, N. (2020). "Revisiting the Complex Pathosystem of Huanglongbing: Deciphering the Role of Citrus Metabolites in Symptom Development" **Metabolites** 10, no. 10: 409. <https://doi.org/10.3390/metabo10100409>

Neves, D. M., Almeida, L.A.d.H., Santana-Vieira, D.D.S., Freschi, L., Ferreira, C. F., Soares-Filho, W. S., Costa, M. G. C., Micheli, F., Coelho-Filho, M. A., Gesteira, A. S. Gesteira (2017a). Recurrent water deficit causes epigenetic and hormonal changes in citrus plants. **Scientific Reports**. v. 7, n. 1, p. 1-11.

Neves, M. F., Trombin, V. G. (2017b). Anuário da Citricultura. São Paulo: **CitrusBR**. 2017. 60p.

Oliveira, T.S., Granato, L.M., Galdeano, D.M., Marques, J.P.R., Coerini, L.F., Freitas-Astúa, J., Machado, M.A. (2019). Genetic analysis of salicylic acid-mediated defenses responses and histopathology in the huanglongbing pathosystem. **Citrus Research & Technology**. 40, e1049 – doi.org/10.4322/crt.18419

Outi, Y., Cortese, P., Santinoni, L., Palma, L., Agostini, J., Preusler, C., Gastaminza, G., Perez, G., Dominguez, E. (2014). HLB in Argentina: a new disease outbreak. **Journal of Citrus Pathology**. v. 1, p. 82.

Park, J. W., Louzada, E. S., Braswell, W. E., Stansly, P. A., Graça, J. V., McCollum, G., Rascoe, J. E., Kunta, M. (2018). A new real-time PCR method for huanglongbing detection in citrus root tissue. **Journal of General Plant Pathology**. 84, 359–367.

Peng, T., Kang, J.L., Xiong, X.T., Cheng, F.T., Zhou, X.J., Dai, W.S., Wang, M., Li, Z.Y., Su, H.N., Zhong, B.L. (2021). Integrated Transcriptomics and Metabolomics Analyses Provide Insights Into the Response of Chongyi Wild Mandarin to Candidatus Liberibacter Asiaticus Infection. **Frontiers in Plant Science**. Oct 14;12:748209. doi: 10.3389/fpls.2021.748209. PMID: 34721476; PMCID: PMC8551615.

Peng, Z., Bredeson, J. V., Wu, G. A., Shu, S., Rawat, N., Du, D., et al. (2020). A chromosome-scale reference genome of trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata*) provides insights into disease resistance, cold tolerance and genome evolution in Citrus. **The Plant Journal**, 104(5), 1215-1232.

Pérez-Figueroa A. (2013). msap: a tool for the statistical analysis of methylation-sensitive amplified polymorphism data, *Molecular Ecology Resources*. 13, 522-527.

Perrin, A., Daccord, N., Roquis, D., Celton, J.-M., Vergne, E., and Bucher, E. (2020). Divergent DNA methylation signatures of juvenile seedlings, grafts and adult apple trees. *Epigenomes*. 4:4. doi: 10.3390/epigenomes4010004.

Petená, G. (2016). Estudos anatômicos e ultraestruturais dos *Citrus*: efeitos de fontes de nitrogênio em pomar refrigerado. 2016. 46 f. Dissertação de Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical. **Instituto Agronômico de Campinas - IAC**. Campinas.

Pitino, M., Armstrong, C. M., Cano, L. M., e Duan, Y. (2016). Transient expression of *Candidatus liberibacter asiaticus* effector induces cell death in *Nicotiana benthamiana*. *Frontiers of Plant Science*. 7, 1-13.

Planet, P., Jagoueix, S., Bové, J.M., Garnier, M. (1995). Detection and characterization of the African citrus greening *Liberibacter* by amplification, cloning, and sequencing of the rplKAJL-rpoBC operon. *Current Microbiology*. 30:137-141.

R Core Team (2020). *R: A Language and environment for statistical computing*. (Version 4.0) [Computer software]. Retrieved from <https://cran.r-project.org>. (R packages retrieved from MRAN snapshot 2020-08-24).

Raiol-Junior, L. L., Cifuentes-Arenas, J. C., Carvalho, E. V., Girardi, E. A., Lopes, S. A. (2021). Evidence that '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' moves predominantly towards new tissue growth in citrus plants. *Plant Disease*. doi: 10. 1094/PDIS-01-20-0158-RE Online ahead of print.

Ramadugu, C., Keremane, M. L., Halbert, S. E., Duan, Y. P., Roose, M. L., Stover, E., Lee, R.F. (2016). Long-term field evaluation reveals huanglongbing resistance in *Citrus* relatives. *Plant Disease*. v.100, n.9, p.1858-1869.

Raspo, Matías Alejandro et al. (2020). Antioxidant and antimicrobial activities of citrus essential oils from Argentina and the United States. *Food Bioscience*, [s. l.], v. 36, p. 100651.

Rawat, N., Kumar, B., Albrecht, U., Du, D., Huang, M., Yu, Q., Zhang, Y., Duan, Y.P., Bowman, K.D., Gmitter, F.G.Jr., Deng, Z. (2017). Genome resequencing and transcriptome profiling reveal structural diversity and expression patterns of constitutive disease resistance genes in Huanglongbing-tolerant *Poncirus trifoliata* and its hybrids. **Horticulture Research - Nature**. 4, 17064.

Richardson, M. L., Hall, D. G. (2013). Resistance of *Poncirus* and *Citrus x Poncirus* germplasm to the Asian citrus psyllid. **Crop Science**. 53:183-188. 10.2135/cropsci2012.02.0091.

Robert-Seilaniantz, A., Grant, M., Jones, J.D. (2011). Hormone crosstalk in plant disease and defense: More than just jasmonate-salicylate antagonism. **Annual Review of Phytopathology**. 49:317–343. doi: 10.1146/annurev-phyto-073009-114447.

Sahu, P.P.; Pandey, G.; Sharma, N.; Puranik, S.; Muthamilarasan, M. Prasad, M. (2013). Epigenetic mechanisms of plant stress responses and adaptation. **Plant Cell Reports**. 32, 1151-1159.

Santos, A. S., Neves, D. M., Santana-Vieira, D. D. S., Almeida, L. A. H., Costa, M. G. C., Soares Filho, W. S., et al. (2020). Citrus scion and rootstock combinations show changes in DNA methylation profiles and ABA insensitivity under recurrent drought conditions. **Scientia Horticulturae**. 267:109313. doi: 10.3389/fpls.2016.01475.

Santos, C. Q. J.; Girardi, E. A.; Vieira, E. L.; Ledo, C. A. S.; Filho, W. S. S. (2015). Tamanho ótimo de amostras de frutos e de sementes para determinação da poliembrionia em citros. **Rev. Bras. Frutic, Jaboticabal - SP**, v. 37, n. 1, p. 172-178.

Schmitz, R. J., Lewis, Z. A., Goll, M. G. (2019). Dna methylation: shared and divergent features across eukaryotes. **Trends in Genetics, Elsevier**, v. 35, n. 11, p. 818–827.

Schulz, B., Eckstein, R. L., Durka, W. (2013). Scoring and analysis of methylation-sensitive amplification polymorphisms for epigenetic population studies. **Molecular Ecology Resources**. v. 13, p. 642-653.

Sharma, A., Zheng, B. (2019). Molecular responses during plant grafting and its regulation by auxins, cytokinins, and gibberellins. **Biomolecules**. 9:397. doi: 10.3390/biom9090397.

Sicari, V., Pellicanò, T. M., Giuffrè, A. M., Zappia, C., e Capocasale, M. (2016). Bioactive compounds and antioxidant activity of citrus juices produced from varieties cultivated in Calabria. **Journal of Food Measurement and Characterization**, 10(4), 773-780. <http://dx.doi.org/10.1007/s11694-016-9362-8>

Silva, A. R., Delmira, Dos. S. P., Kaliane, N., Santos Filho, H. P.; Coelho Filho, M. A.; Soares Filho, W. S., Ferreira, C. F., Gesteira, A. da. S. (2021) Epigenetic responses to *Phytophthora citrophthora* gummosis in citrus. **Plant Science**. v. 313, p. 111082.

Singh, N. V., e Yadav, G. S. (2018). Bio-ecology and Management of Citrus psylla, *Diaphorina citri* Kuwayama on Citrus - A Review. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, 7(04), 3091-3107.

Soares Filho, W.S., Souza, U., Ledo, C.A.S., Santana, L.G.L., Passos, O.S. (2014). Poliembrionia e potencial de obtenção de híbridos em citros. **Revista Brasileira de Fruticultura** 36: 950-956.

Soratto, T. A. T., Curtolo, M., Marengo, S., Dezotti, A. L., Lima, R. P. M., Gazaffi, R., Machado, M. A. Cristofani-Yaly, M. (2020). QTL and eQTL mapping associated with host response to *Candidatus Liberibacter asiaticus* in citrandarins. **Tropical Plant Pathology**, 45(6), 626-645.

Stover, E., F.G. Gmitter, Jr., J. Grosser, E. Baldwin, G.A. Wu, J. Bai, Y. Wang, P. Chaires, and J.C. Motamayor. 2020. Rationale for reconsidering current regulations restricting use of hybrids in orange juice. **Horticulture Research - Nature**. 7:38, <https://doi.org/10.1038/s41438-020-0277-5>.

Stuchi, E. S., e Girardi, E. A. (2010). Utilização de práticas culturais na citricultura frente ao Huanglongbing (1. ed., 77 p.). Cruz das Almas: **Embrapa Mandioca e Fruticultura**.

Stuchi, E. S.; Bassanezi, R. B.; Girardi, E. A.; Moreira, A. S.; Parolin, L. G.; Reiff, E. T.; Sempionato, O. R. (2018). Incidência de huanglongbing (HLB) em pomares experimentais de combinações de porta-enxertos e cultivares de laranja doce e outros citros. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura. 33p. il. (**Embrapa Mandioca e Fruticultura**. Documentos, 227

Sulzbach, M.; Oliveira, R. P. de; Girardi, E. A.; Schwarz, S. F.; Bertolini, E.; Scheneider, L. A.; Gonzatto, M. P. (Ed.). (2017). Huanglongbing (HLB) dos citros e estratégias de manejo visando prevenção e controle. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 36 p. (**Embrapa Clima Temperado. Documentos**. 450).

Tada, Y., Spoel, S.H., Pajeroska-Mukhtar, K., Mou, Z., Song, J., Wang, C., Zuo, J., Dong, X. (2008). Plant immunity requires conformational changes of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. **Science**. 321:952–956. doi: 10.1126/science.1156970.

Tang, X., Tao, X., Wang, Y., Mad, W., Lid., Yang, H. e Max, Y. (2014). Analysis of DNA methylation of perennial ryegrass under drought using the methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP) technique. **Molecular Genetics and Genomics**. Vol. 289, p. 1075-1084.

Tatineni, S. et al. (2008). In planta distribution of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ as revealed by polymerase chain reaction (PCR) and real-time PCR. **Phytopathology**. 98, 592–599.

Teixeira, C. D., Saillard, C., Eveillard, S., Danet, J. L., da Costa, P. I., Ayres, A. J., e Bové, J. (2005a). ‘*Candidatus Liberibacter americanus*’, associated with citrus huanglongbing (greening disease) in São Paulo State, Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 55, 1857–1862.

Teixeira, D.C.; Ayres, A.J.; Danet, J.L.; Saillard, E.S.; Bové, J.M. (2005b). First report of a huanglongbing-like disease of citrus in Sao Paulo State, Brazil, and association of a new *Liberibacter* species, “*Candidatus Liberibacter americanus*”, with the disease. **Plant Disease**. 89:107.

Thapa, S. P., De Francesco, A., Trinh, J., Gurung, F. B., Pang, Z., Vidalakis, G., et al. (2020). Genome-wide analyses of *Liberibacter* species provides insights into evolution, phylogenetic relationships, and virulence factors. **Molecular Plant Pathology**. 21: 716–31. pmid:32108417

The jamovi project (2021). *jamovi*. (Version 1.6) [Computer Software]. Retrieved from <https://www.jamovi.org>.

Thomas, H. R., and Frank, M. H. (2019). Connecting the pieces: uncovering the molecular basis for long-distance communication through plant grafting. **New Phytologist**. 223, 582–589. doi: 10.1111/nph.15772.

USDA. (2019). Citrus: World Markets and Trade. United States Department of Agriculture. **Foreign Agricultural Service**. July, 1–11.

Uthup, T. K., Karumamkandathil, R., Ravindran, M., and Saha, T. (2018). Heterografting induced DNA methylation polymorphisms in *Hevea brasiliensis*. **Planta**. 248, 579–589. doi: 10.1007/s00425-018-2918-6.

Veloso Dos Santos, J.D.; Murata, M.; Gerberich, K.; Bright, D.; Johnson, E. (2018). Limited movement of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in split-root citrus provides a model system for local and systemic effects of Huanglongbing. **Phytopathology**, 108, 127.

Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, et al. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**. 1995 Nov 11;23(21):4407-14.

Wang, J., Jiang, L., Wu, R. (2017). Plant grafting: how genetic exchange promotes vascular reconnection. **New Phytol**. Apr;214(1):56-65. doi: 10.1111/nph.14383. Epub 2016 Dec 19. PMID: 27991666.

Wang, N., e Trivedi, P. (2013). Citrus huanglongbing: a newly relevant disease presents unprecedented challenges. **Phytopathology**, 103(7), 652-665.

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

Wang, N.; Trivedi, P. (2013a). *Citrus* huanglongbing: a newly relevant disease presents unprecedented challenges. **Phytopathology**. 103:652-665.

Wang, X., Su, H., Huang, L., Deng, X., Chen, J., Zhou, C., Li, Z. (2015). Identification of a novel 1033-nucleotide deletion polymorphism in the prophage region of

'*Candidatus Liberibacter asiaticus*': potential applications for bacterial epidemiology. **Journal Phytopathol.** 163:681-685.

Wang, X., Tan, J., Bai, Z., Su, H., Deng, X., Li, Z., Zhou, C., and Chen, J. (2013b). Detection and characterization of miniature inverted-repeat transposable elements in "*Candidatus Liberibacter asiaticus*". **Journal of Bacteriology.** 195:3979-3986.

Wang, Y., Zhou, L., Yu, X., Stover, E., Luo, F., Duan, Y., (2016). Transcriptome profiling of Huanglongbing (HLB) tolerant and susceptible citrus plants reveals the role of basal resistance in HLB tolerance. **Frontiers in Plant Science.** 7, 933.

Wu, R., Wang, X., Lin, Y., Ma, Y., Liu, G., Yu, X., et al. (2013). Inter-species grafting caused extensive and heritable alterations of DNA methylation in solanaceae plants. **PLoS One.** 8:e61995. doi: 10.1371/journal.pone.0061995.

Yamamoto, P. T.; Paiva, P. E. B.; Gravena, S. (2001). Flutuação populacional de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) em pomares de citros na região norte do estado de São Paulo. **Neotropical Entomology.** 30: p. 165-170.

Yang, C.; Powell, C. A.; Duan, Y.; Shatters, R.; FANG, J.; Zhang, M. (2016). Deciphering the Bacterial Microbiome in Huanglongbing-Affected *Citrus* Treated with Thermotherapy and Sulfonamide Antibiotics. **PLoS One.** 11:e0155472.

Yong, W.-S., Hsu, F.-M., Chen, P.-Y. (2016). Profiling genome-wide DNA methylation. **Epigenetics & Chromatin,** v. 9, p. 26, jun. ISSN 1756-8935.

Yu, Q., Chen, C., Du, D., Huang, M., Yao, J., Yu F., Brlansky, R.H., Gmitter, F.G.Jr. (2017). Reprogramming of a defense signaling pathway in rough lemon and sweet orange is a critical element of the early response to '*Candidatus Liberibacter asiaticus*'. **Horticulture Research - Nature.** Nov 29;4:17063. doi: 10.1038/hortres.2017.63. PMID: 29214028; PMCID: PMC5705785.

Yu, X., Armstrong C.M., Zhou M., Duan Y., Bismertiazol Inhibits *Xanthomonas citri* subsp. *citri* Growth and Induces Differential Expression of Citrus Defense-Related Genes, **Phytopathology.** 106 (2016) 693-701.

Zhang, H., Lang, Z., Zhu, J. K. (2018). Dynamics and function of DNA methylation in plants. **Nature reviews Molecular cell biology,** 19(8), 489-506.

Zhang, M., Yang, C., Powell, C. A., Avery, P. B., e Wang, J. (2019). Field Evaluation of Integrated Management for Mitigating *Citrus* Huanglongbing in Florida. **Frontiers in Plant Science**. 9, 1890.

Zheng, Z., Bao, M., Wu, F., Chen, J., and Deng, X. (2016). Predominance of single prophage carrying a CRISPR/*cas* system in “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” strains in southern China. **PLoS One**. 11:e0146422.

Zhu, F., Chen, J., Xiao, X., Zhang, M., Yun, Z., Zeng, Y., Xu, J., Cheng, Y., Deng, X., (2016). Salicylic acid treatment reduces the rot of postharvest citrus fruit by inducing the accumulation of H₂O₂, primary metabolites and lipophilic polymethoxylated flavones, **Food Chemistry** 207 68–74.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela 1. Análise de variância para pontos médios de deposição de calose em folhas das combinações copa/porta-enxerto de laranjeira-doce Valência (VC) e *Poncirus trifoliata* (TR) inoculadas ou não com *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) e avaliadas aos 4 meses após a inoculação (MAI).

FV	GL	SQ	QM	F value	Pr(>F)
Copa/porta-enxerto	7	5014,7	716,38	31,021	0,0000 ***
Inoculação	1	1131	1131,02	48,975	0,0000 ***
Copa/porta-enxerto:Inoculação	7	2297,8	328,26	14,214	0,0000 ***
Resíduo	32	739	23,09		

CV= 23,29%

***: altamente significativo (P<0,000); FV: Fonte de Variação; GL: Graus de liberdade; SQ: Soma de Quadrados; QM: Médias Quadradas; F value: F calculado; Pr>F: Nível de significância; CV%: coeficiente de variação.

Tabela 2. Análise de variância para área média de deposição de calose (μm) em folhas das combinações copa/porta-enxerto de laranjeira-doce Valência (VC) e *Poncirus trifoliata* (TR) inoculadas ou não com *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) e avaliadas aos 4 meses após a inoculação (MAI).

FV	GL	SQ	QM	F value	Pr(>F)
Copa/porta-enxerto	7	3478,7	496,95	5,0039	0,0006 ***
Inoculação	1	2002,1	2002,08	20,1594	0,0000 ***
Copa/porta-enxerto:Inoculação	7	553,3	79,04	0,7958	0,5964 ns
Resíduo	32	3178	99,31		

CV= 35,77%

***: altamente significativo (P<0,000); ns: não significativo; FV: Fonte de Variação; GL: Graus de liberdade; SQ: Soma de Quadrados; QM: Médias Quadradas; F value: F calculado; Pr>F: Nível de significância; CV%: coeficiente de variação.

Tabela 3. Análise de variância para pontos médios de deposição de calose em folhas das combinações copa/porta-enxerto de laranjeira-doce Valência (VC) e *Poncirus trifoliata* (TR) inoculadas ou não com *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) e avaliadas aos 13 meses após a inoculação (MAI).

FV	GL	SQ	QM	F value	Pr(>F)
Copa/porta-enxerto	7	107637	15377	32,558	0,0000 ***
Inoculação	1	43440	43440	91,978	0,0000 ***
Copa/porta-enxerto:Inoculação	7	78670	11239	23,796	0,0000 ***
Resíduo	32	15113	472		

CV=51,26%

***: altamente significativo (P<0,000); FV: Fonte de Variação; GL: Graus de liberdade; SQ: Soma de Quadrados; QM: Médias Quadradas; F value: F calculado; Pr>F: Nível de significância; CV%: coeficiente de variação.

Tabela 4. Análise de variância para área média de deposição de calose (μm) em folhas das combinações copa/porta-enxerto de laranjeira-doce Valência (VC) e *Poncirus trifoliata* (TR) inoculadas ou não com *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) e avaliadas aos 13 meses após a inoculação (MAI).

FV	GL	SQ	QM	F value	Pr(>F)
Copa/porta-enxerto	7	501320968	71617281	4,2468	0,0020 **
Inoculação	1	62178045	62178045	3,6871	0,0637 ns
Copa/porta-enxerto:Inoculação	7	462727909	66103987	3,9199	0,0034 **
Resíduo	32	539637523	16863673		

CV = 39,14 %

** : significativo ($P < 0,01$); ns: não significativo; FV: Fonte de Variação; GL: Graus de liberdade; SQ: Soma de Quadrados; QM: Médias Quadradas; F value: F calculado; Pr>F: Nível de significância; CV%: coeficiente de variação.

Tabela 5. Análise de variância para pontos médios de deposição de calose em raízes das combinações copa/porta-enxerto de laranjeira-doce Valência (VC) e *Poncirus trifoliata* (TR) inoculadas ou não com *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) e avaliadas aos 4 meses após a inoculação (MAI).

FV	GL	SQ	QM	F value	Pr(>F)
Copa/porta-enxerto	5	2045,08	409,02	7	0,0002 ***
Inoculação	1	210,25	210,25	4	0,0634 ns
Copa/porta-enxerto:Inoculação	5	285,83	57,17	1	0,4222 ns
Resíduo	24	1331.33	55.47		

CV=44,68%

***: altamente significativo ($P < 0,000$); ns: não significativo; FV: Fonte de Variação; GL: Graus de liberdade; SQ: Soma de Quadrados; QM: Médias Quadradas; F value: F calculado; Pr>F: Nível de significância; CV%: coeficiente de variação.

Tabela 6. Análise de variância para área média de deposição de calose (μm) em raízes das combinações copa/porta-enxerto de laranjeira-doce Valência (VC) e *Poncirus trifoliata* (TR) inoculadas ou não com *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) e avaliadas aos 4 meses após a inoculação (MAI).

FV	GL	SQ	QM	F value	Pr(>F)
Copa/porta-enxerto	5	679	135,8	5	0,0046 **
Inoculação	1	169	169	6	0,0257 *
Copa/porta-enxerto: Inoculação	5	2319,67	463,93	16	0,0000 ***
Resíduo	24	717,33	29,89		

VC=33,93%

***: altamente significativo ($P < 0,000$); **: significativo ($P < 0,01$); *: significativo ($P < 0,05$); FV: Fonte de Variação; GL: Graus de liberdade; SQ: Soma de Quadrados;

QM: Médias Quadradas; F value: F calculado; Pr>F: Nível de significância; CV%: coeficiente de variação.

Tabela 7. Análise de variância para pontos médios de deposição de calose em raízes das combinações copa/porta-enxerto de laranjeira-doce Valência (VC) e *Poncirus trifoliata* (TR) inoculadas ou não com *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) e avaliadas aos 13 meses após a inoculação (MAI).

FV	GL	SQ	QM	F value	Pr(>F)	
Copa/porta-enxerto	5	10208,1	2041,6	11	0,0000	***
Inoculação	1	6972,2	6972,2	39	0,0000	***
Copa/porta-enxerto:Inoculação	5	1747,9	349,6	2	0,1253	ns
Resíduo	24	4331,3	180,5			

CV=40,33%

***: altamente significativo (P<0,000); ns: não significativo; FV: Fonte de Variação; GL: Graus de liberdade; SQ: Soma de Quadrados; QM: Médias Quadradas; F value: F calculado; Pr>F: Nível de significância; CV%: coeficiente de variação.

Tabela 8. Análise de variância para área média de deposição de calose (μm) em raízes das combinações copa/porta-enxerto de laranjeira-doce Valência (VC) e *Poncirus trifoliata* (TR) inoculadas ou não com *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) e avaliadas aos 13 meses após a inoculação (MAI).

FV	GL	SQ	QM	F value	Pr(>F)	
Copa/porta-enxerto	5	980,33	196.067	22.769	0,07908	ns
Inoculação	1	113,78	113.778	13.213	0,26169	ns
Copa/porta-enxerto:Inoculação	5	724,22	144.844	16.821	0,17727	ns
Resíduo	24	2066,67	86.111			

CV=58,62%

ns: não significativo; FV: Fonte de Variação; GL: Graus de liberdade; SQ: Soma de Quadrados; QM: Médias Quadradas; F value: F calculado; Pr>F: Nível de significância; CV%: coeficiente de variação.