

Desenvolvimento de estratégias alternativas visando ao controle do *huanglongbing*

Sílvia de Oliveira Dorta^{1,2}, Marcos Antônio Machado¹ & Juliana Freitas-Astúa^{3,4}

RESUMO

A produção mundial de citros tem sido afetada em função de diversos estresses ambientais somados a problemas fitossanitários. Dentre as doenças, a principal é o *huanglongbing* (HLB), que se estabelece de forma rápida na cultura, afetando todas as variedades comerciais de citros, ou seja, não existe resistência conhecida dentro de *Citrus* spp. Ademais, a transmissão mediada por vetores é eficiente. Em função disso, vários grupos de pesquisa ao redor do mundo têm buscado diferentes estratégias visando ao controle da doença, através da melhor compreensão do patossistema e das interações planta-patógeno-vetor. As estratégias buscadas pela comunidade científica vão desde o manejo mais sustentável da cultura, incluindo o uso de agentes de controle biológico, até ferramentas poderosas de biotecnologia que poderiam ser usadas para mitigar a prevalência e a disseminação da doença. Aqui descrevemos algumas dessas estratégias, com ênfase na biotecnologia, visando o controle do HLB pela eliminação ou redução do crescimento bacteriano e o impedimento da transmissão pelo vetor. Dentre as linhas de pesquisa relatadas, a busca por variedades resistentes e/ou tolerantes ao HLB tem sido realizada há alguns anos, seja através da seleção de copas ou porta-enxertos pelo melhoramento convencional, seja por transgenia ou pelo uso de vetores virais e, mais recentemente, pela edição genômica.

Termos de indexação: *Citrus* spp., *Candidatus Liberibacter* spp., psilídeo dos citros, plantas transgênicas, resistência.

Developing alternative strategies for the control of *huanglongbing*

SUMMARY

The worldwide citrus production has been affected by adverse environmental conditions and serious phytosanitary problems. Among the diseases, *huanglongbing* (HLB) can be highlighted, since it quickly disseminates amongst orchards and affects all commercial varieties of citrus, that is, there is no reported resistance towards HLB within *Citrus* spp. In addition, vector-mediated transmission is efficient. As a result, several research groups around the world have pursued different strategies to better understand this pathosystem, through the plant-pathogen-vector interactions and their mechanisms of action. The strategies sought by the scientific community range from

¹ Centro de Citricultura Sylvio Moreira - IAC, Cordeirópolis, SP, Brasil

² Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, Brasil

³ Embrapa Mandioca e Fruticultura, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, Cruz das Almas, BA, Brasil

⁴ Instituto Biológico, São Paulo, SP, Brasil

Autor correspondente: Juliana de Freitas-Astúa, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA, Av. Embrapa, s/n, CEP 44380-000, Cruz das Almas, BA, Brasil. E-mail: juliana.astua@embrapa.br



more appropriate crop management, including the use of biological control agents, to powerful biotechnology tools that could be used to mitigate disease prevalence and spread. Here we point out some of these different approaches with promising results that are being studied by researchers around the Globe. Moreover, we describe some of the strategies, aimed at controlling HLB by eliminating or reducing bacterial growth and preventing vector transmission. Among the research lines, the search for HLB resistant or tolerant varieties has been carried out for several years through conventional breeding, through transgenic or viral vector-derived approaches and, more recently, through genome editing.

Index terms: *Citrus* spp., *Candidatus Liberibacter* spp., Asian citrus psyllid, transgenic plants, resistance.

INTRODUÇÃO

A indústria citrícola é uma das atividades mais importantes do agronegócio brasileiro, pois impacta positivamente a economia do país, gerando um PIB de US\$ 6,5 bilhões ao ano (Neves & Trombin, 2017). O Brasil é o líder mundial na produção e exportação de suco de laranja concentrado e congelado (FCOJ) (FAO, 2015). A reestimativa da safra 2018-2019 para o cinturão citrícola de São Paulo e Minas Gerais foi de 285,98 milhões de caixas de laranja (Fundecitrus, 2019).

Na Flórida, a estimativa da safra de laranja prevista para 2018-2019 foi de 79 milhões de caixas (USDA, 2018), praticamente o dobro da safra anterior (45 milhões de caixas de laranja), considerada a menor produção em várias décadas. Além de condições ambientais adversas e danos causados por furacões nos últimos anos, a produção de citros tem sido severamente afetada por problemas fitossanitários, particularmente o *huanglongbing* (HLB), que teve forte impacto sobre a sociedade e a economia daquele estado (Li et al., 2017).

Relatos científicos da doença na Ásia datam do início do século XX (Graça, 1991; Bové, 2006; Graça et al., 2015), mas há indícios de que ela ocorra na região desde o século XVIII (Capoor, 1963; Graça et al., 2015). O primeiro relato da doença nas Américas ocorreu em São Paulo, Brasil, em 2004 (Coletta Filho et al., 2004; Teixeira et al., 2005) e em 2005 no sul da Flórida, EUA (Halbert, 2005). Em 2008 apenas 0,61% dos pomares paulistas apresentavam a doença. Em 2017, esse número passou para 16,73% e, em 2018, foi observado um aumento de 8,5%, chegando aos atuais 18,15% de incidência (Fundecitrus, 2018a). Na Flórida, a incidência de HLB ultrapassou os 90% das plantas nos últimos anos (Fundecitrus, 2017a).

A doença é causada por três bactérias Gram-negativas, não cultiváveis, restritas ao floema, do gênero *Candidatus Liberibacter* spp. (Bové, 2006; Gottwald, 2010; Ghosh et al., 2018), sendo *Ca. Liberibacter asiaticus* (CLAs) a mais importante por ser prevalente, apresentar distribuição

geográfica mais ampla (Bové, 2006; Gottwald, 2010; Tabachnick, 2015) e causar sintomas bastante severos (Ghosh et al., 2018). As bactérias são transmitidas de forma natural e eficiente pelos psílideos *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) e/ou *Trioza erythrae* (Del Guercio) (Hemiptera: Triozidae) (Aubert, 1987; Grafton-Cardwell et al., 2013; Tabachnick, 2015) quando se alimentam do tecido floemático de plantas infectadas (Tabachnick, 2015).

O vetor possui diferentes estádios de desenvolvimento: ovo, cinco estádios ninfais e adulto e seu ciclo completo varia entre 14 a 48 dias, dependendo da temperatura (Singh & Yadav, 2018). As ninfas possuem pouca mobilidade e permanecem em brotações novas, por outro lado os adultos são mais ativos, o que facilita a dispersão da doença (Hall et al., 2012; Singh & Yadav, 2018). Tanto ninfas de 4º e 5º instar quanto adultos podem adquirir a bactéria (Inoue et al., 2009), porém, a aquisição na fase ninfal é mais eficiente (Pelz-Stelinski et al., 2010; Wu et al., 2018) devido aos longos períodos de alimentação no floema (George et al., 2018). Além disso, uma vez que o psílideo *D. citri* ocorre há mais de 60 anos no Brasil, encontra-se endêmico em várias áreas do país, favorecendo a disseminação da bactéria (Tabachnick, 2015).

Os sintomas característicos do HLB em folhas são: mosqueamento, manchas cloróticas e espessamento das nervuras; em frutos ocorre a distorção da columela e a redução do tamanho. Observa-se também abortamento de sementes, redução do número de radículas, queda de folhas e frutos, levando a sérios danos na produção em função do comprometimento da planta (Bové, 2006; Wang et al., 2017).

A falta de resistência genética ao HLB contribui para a sua rápida disseminação (Graça et al., 2016), e a indução de sintomas severos com distribuição sistêmica tem causando fortes impactos na produção mundial de citros. Apesar da doença acometer todas as variedades comerciais de citros (Bové, 2006; Wang & Trivedi, 2013), existe diferença na resposta de sintomas entre os genótipos

(Folimonova et al., 2009; Boscariol-Camargo et al., 2010) que pode ser influenciada por diversos fatores, como idade da planta, estágio de infecção e o tempo (Ghosh et al., 2018). Um grande problema é a quantidade de plantas assintomáticas no campo ou a semelhança de sintomas com deficiência nutricional, o que muitas vezes confunde o produtor. Isto faz com que plantas fontes de inóculo mantidas no campo facilitem a disseminação da doença pelos vetores.

MANEJO CULTURAL E GENÉTICO DO HLB

De acordo com características regionais, diferentes estratégias têm sido adotadas ao redor do mundo para impedir a disseminação do HLB (Wang et al., 2017). Dentre elas, medidas quarentenárias foram adotadas na região do Mediterrâneo e na Austrália. Na Califórnia, EUA, além destas, adotou-se a erradicação de plantas doentes. No Brasil, as medidas imediatas tomadas para a contenção da doença foram: 1) prevenção da entrada do patógeno pelo plantio de mudas sadias produzidas sob proteção, 2) redução da fonte de inóculo pela eliminação das plantas sintomáticas do campo e 3) promoção do controle químico do vetor (Belasque et al., 2010; Bassanezi et al., 2013; Fundecitrus, 2018c). Além destas medidas inicialmente implementadas, foi evidenciada a importância da ação conjunta entre citricultores no monitoramento da doença nos pomares, através do manejo regional para diminuir as infecções primárias que se devem à chegada de psilídeos infectivos que migram de outras áreas e se concentram nas primeiras plantas dos talhões localizados na divisa das propriedades (efeito de borda), iniciando novo foco da doença. Por isso a importância das pulverizações intensivas nessas áreas (Bassanezi et al., 2010). Estas e outras medidas encontram-se detalhadas em manuais como o “Manejo do greening: 10 mandamentos para o sucesso no controle da doença” (Fundecitrus, 2018c).

No entanto, apesar dessas recomendações serem, atualmente, o que melhor se pode fazer para o manejo adequado do HLB, o uso intensivo de agroquímicos pode ser perigoso para o meio ambiente, contaminando o solo e a água (Ribas & Matsumura, 2009) e causando desequilíbrio ao ecossistema, como a morte das abelhas evidenciada por Chen et al. (2017a). As aplicações excessivas destes produtos químicos com o mesmo modo de ação podem levar à forte pressão de seleção de resistência do vetor (Yamamoto et al., 2009; Tiwari et al., 2011; Boina & Bloomquist, 2015). Em função disso,

pesquisas relacionadas à seleção de novas moléculas mais seletivas têm sido vislumbradas (Brar et al., 2017; Chen et al., 2017b) a fim de propiciar estratégias como a combinação de produtos naturais e inseticidas (Khan et al., 2014; Beloti et al., 2015), que não afetem os inimigos naturais e que minimizem o custo de produção.

Neste sentido, o uso do controle biológico através de inimigos naturais, como os parasitoides *Tamarixia radiata* (Waterson) (Hymenoptera: Eulophidae) (Parra et al., 2010; Flores & Ciomperlik, 2017) e *Diaphorencyrtus aligarhensis* (Shafee, Alam and Agarwald) (Hymenoptera: Encyrtidae) (Portalanza et al., 2017), seria uma boa alternativa de manejo, e tem sido feito pela liberação desses insetos em pomares abandonados, cemitérios e áreas não comerciais, como alternativa ao controle químico. Microrganismos entomopatogênicos também têm sido utilizados. Em 2018, foi lançado no Brasil um bioinseticida à base de *Isaria fumosorosea* (Wize) (Hypocreales: Cordycipitaceae) (Fundecitrus, 2018b) após formulações do fungo terem demonstrado grande eficiência no controle de *D. citri* (Ausique et al., 2017).

Dentre as práticas de manejo cultural, principalmente em locais onde a eliminação de plantas sintomáticas não é mandatória, como na Flórida, diferentes alternativas têm sido estudadas, com destaque para o uso de antibióticos (Zhang et al., 2014; Hu et al., 2018) e a termoterapia (Hoffman et al., 2013; Yang et al., 2016; Doud et al., 2017). No caso da termoterapia, não se sabe por quanto tempo o título bacteriano pode ser mantido em níveis baixos (Fan et al., 2016). Ademais, uma vez que não há a eliminação total de CLAs das raízes (Doud et al., 2017), plantas infectadas podem servir como fonte de inóculo da doença (Wang et al., 2017). A combinação de mais de um tipo de antibióticos pode ser eficaz na supressão ou redução do título bacteriano (Zhang et al., 2011). No entanto, para o manejo do HLB sua aplicação é ainda mais complexa, pois não apenas acarreta em aumento significativo no custo de produção (Hu et al., 2018), como têm sido levantadas muitas dúvidas sobre o efeito dos antibióticos no microbioma do solo, nos lençóis freáticos, nas plantas, e mesmo no homem e em outros animais que se alimentem de citros ou de seus derivados (Zhang et al., 2014). Além disso, para que estes compostos sejam efetivos, é necessário que eles não apresentem toxicidade, não selecionem patógenos resistentes, tolerem mudanças de temperatura e sejam de fácil entrega no floema (Munir et al., 2018). Sendo assim, apesar de se mostrarem alternativas potenciais para

o controle do HLB, precisam de diversos ajustes visando à sua aplicação em larga escala no campo.

A busca por variedades resistentes e/ou tolerantes à doença tem sido vislumbrada como estratégia de manejo em longo prazo, tanto através do melhoramento convencional (Boava et al., 2015; Bowman & McCollum, 2015; Stover et al., 2016; Allen et al., 2017) quanto da transgenia (Hao et al., 2016; Dutt & Grosser, 2017; Miyata et al., 2017; Robertson et al., 2018; Tavano et al., 2019). Não existem genótipos de citros imunes ao patógeno, mas níveis ampliados de resistência e/ou tolerância são obtidos principalmente em trifoliatas [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] e alguns de seus híbridos (Albrecht & Bowman, 2011; Boava et al., 2015; 2017; Bowman et al., 2016) e também na copa híbrida da tangerineira ‘Sugar Belle’ (Wang et al., 2017).

Em função disso, foi implementado pela Universidade da Flórida e pelo USDA-ARS um programa visando a produção de plantas resistentes ao HLB (Lavagi et al., 2017; Allen et al., 2017). Além disso, Bowman et al. (2016) avaliaram por sete anos (2008 a 2015) o efeito da laranja doce ‘Valência’ [*Citrus sinensis* (L.) Osb.] sobre 17 porta-enxertos distintos em produção comercial de citros na Flórida, num local onde a incidência do HLB era de praticamente 100%. Foi observado que, apesar de ocorrer certo declínio nas árvores infectadas com CLAs, alguns porta-enxertos tiveram efeito significativo no tamanho das árvores, produção e qualidade dos frutos, sendo os porta-enxertos US-942 e US-1516 os mais produtivos e com maiores rendimentos cumulativos.

Estudos similares têm sido conduzidos em centros de pesquisa brasileiros, como o Centro de Citricultura Sylvio Moreira, do Instituto Agrônomo de Campinas (CCSM-IAC) e a Embrapa Mandioca e Fruticultura (Embrapa-CNPMP) (Boava et al., 2015, 2017; Cristofani-Yaly, 2017; Fundecitrus, 2018d). Em um estudo de campo realizado pelos pesquisadores do CCSM, foi sugerido que o uso de um porta-enxerto de citrandarin [*Citrus sunki* Hort. ex Tanaka. x *P. trifoliata* (L.) Raf.] poderia melhorar a tolerância da planta ao HLB (Boava et al., 2015).

Outra estratégia de manejo do HLB seria o uso de porta-enxertos ananizantes ou semiananizantes para o replantio de novos pomares, através do adensamento ou ultra-adensamento de plantios, pois permite o aumento da produção de frutos, de modo a compensar em parte a perda ocasionada pelo HLB (Stuchi & Girardi, 2010; Sulzbach et al., 2017). De acordo com Girardi (2018), o ideal seria obter uma variedade copa imune ou altamente resistente à bactéria; contudo, as medidas preventivas adotadas no Brasil e outras atualmente utilizadas no manejo da doença podem mitigar os danos causados pela doença.

ESTRATÉGIAS BIOTECNOLÓGICAS PARA O MANEJO DO HLB

Diferentes linhas de pesquisa têm sido abordadas pela comunidade científica visando ao controle da doença, sejam elas para atuar diretamente no controle do vetor e da bactéria ou para promover a ação conjunta das medidas já aplicadas. Por exemplo, se faz necessário a compreensão dos mecanismos envolvidos na interação molecular entre planta-patógeno durante o processo de infecção, uma vez que os patógenos possuem fatores de virulência essenciais durante seu estabelecimento no hospedeiro para suprimir o sistema de defesa, através da secreção de moléculas efetoras (Jones & Dangl, 2006; Wang et al., 2017). Desta forma, alguns pesquisadores têm buscado identificar quais moléculas efetoras estão associadas a este processo e, assim, atuar de forma efetiva no manejo da doença interferindo diretamente na infecção (Pitino et al., 2016, 2018; Clark et al., 2018).

Esta estratégia tem grande potencial e relevância, pois a produção de citros e toda a cadeia produtiva têm sido severamente afetadas em decorrência do HLB. Este fato se reflete na área total de produção no cinturão citrícola brasileiro, que de 482.591 ha em 2015 passou para 465.635 ha em 2018 (CitrusBR, 2018), além da eliminação de 46 milhões de plantas doentes e de 100 mil ha desde a descoberta do HLB no país em 2004 (Fundecitrus, 2017b). A incidência da doença na região centro-sul do cinturão citrícola no estado de São Paulo é considerada severa (Fundecitrus, 2018a), e o manejo do vetor tem sido feito através do controle químico seja via aplicação sistêmica, foliar ou drench (Miranda et al., 2016). Em função do uso intensivo de agrotóxicos, diversos grupos de pesquisadores têm buscado alternativas mais sustentáveis para o controle do inseto vetor, como o silenciamento gênico pelo uso da interferência por RNA (RNAi) (El-Shesheny et al., 2013; Andrade & Hunter, 2017; Galdeano et al., 2017). Esta alternativa biotecnológica é considerada promissora por proporcionar perda total ou parcial de função em atividades importantes para o inseto, como por exemplo, a formação das asas, dificultando seu voo e limitando a transmissão do patógeno (Hajeri et al., 2014; Killiny & Kishk, 2017) ou pelo silenciamento de genes que levam diretamente à mortalidade dos psílideos (Yu & Killiny, 2018). Sendo assim, pesquisadores do Fundecitrus têm buscado incorporar a tecnologia RNAi à transgenia para obter plantas de *Murraya* sp. letais, visando ao controle do vetor através do silenciamento de genes relacionados ao seu desenvolvimento (Fundecitrus, 2016; Wulff, 2018).

Estas plantas poderiam ser usadas para atrair insetos infectivos migrantes de outras áreas que se concentram nas plantas da bordadura dos pomares.

Outras linhas de pesquisas desenvolvidas são as relacionadas a substâncias (feromônio e compostos voláteis) que possam atrair (Zanardi et al., 2018; Beloti et al., 2017) ou repelir (Silva et al., 2016; Alquézar et al., 2017; Fancelli et al., 2018) o vetor. Neste sentido, foi isolado o gene de um composto volátil produzido pela goiabeira (β -cariofileno) e utilizado para a transformação genética de *Arabidopsis thaliana* visando à repelência ao psilídeo (Alquézar et al., 2017). Com o mesmo intuito, pesquisas relacionadas à produção de plantas transgênicas (soja e citros) que visam à expressão de genes que regulam a produção de compostos voláteis estão sendo conduzidas por pesquisadores do Fundecitrus em colaboração com a EMBRAPA/CENARGEN e a ESALQ/USP (Fundecitrus, 2016, 2017c; Wulff, 2018).

Outra estratégia para combater a doença seria através do aumento da resposta de defesa da planta contra o patógeno de forma mais efetiva pela produção de plantas transgênicas com promotores que possam controlar a expressão de genes alvos em tecidos específicos (Dutt et al., 2015; Miyata et al., 2017; Tavano et al., 2019), como, por exemplo, a expressão de peptídeos antimicrobianos diretamente no floema das plantas. Dentre eles, D4E1 (Attilio et al., 2013), *attacin* A (Tavano et al., 2015) e cecropina B (Zou et al., 2017) foram testados sem muita eficiência contra CLAs, semelhante ao que ocorreu com proteínas antimicrobianas como a tionina (Hao et al., 2016). Outra estratégia, também com efeito limitado até o momento, tem sido induzir em plantas afetadas pelo HLB genes de defesa relacionados a vias hormonais, como a dos brassinosteroides (Canales et al., 2016) ou do ácido salicílico (Dutt et al., 2015; Dutt & Grosser, 2017).

Pesquisadores da Universidade do Texas (EUA), juntamente com a empresa Southern Gardens Citrus, utilizaram uma defensina (peptídeo antimicrobiano) de espinafre para a produção de plantas de citros transgênicas (ISAAA, 2016; Mirkov & Mandadi, 2017), cuja função é quebrar a parede celular do patógeno e impedir seu crescimento e estabelecimento nos tecidos do floema. Estas plantas foram liberadas pela Agência de Proteção Ambiental (EPA) dos EUA para testes em campo através da concessão de uma licença de uso experimental visando à resistência ao HLB. Os resultados obtidos sugerem algum grau de proteção (Wang et al., 2017). Em estudo complementar, a empresa optou também pelo

uso do vírus da tristeza dos citros (CTV) modificado como vetor viral para expressar a mesma defensina do espinafre em substituição à transgenia dos citros (Ledford, 2017). Com isso, pretendem enxertar ramos de árvores infectados com o vírus e o gene da defensina nas árvores de citros para combater o HLB (Ledford, 2017). A estratégia é interessante, pois a aceitação dos consumidores poderia ser maior, uma vez que as árvores cítricas não seriam geneticamente modificadas. Além disso, o vetor viral é estável e há contínua replicação do CTV com quantidades suficientes da defensina no floema, sugerindo elevada chance de sucesso na resistência ao HLB. Esta abordagem tem sido utilizada com diversos outros genes que poderiam conferir resistência à doença, principalmente de peptídeos antimicrobianos visando ao efeito direto sobre CLAs (Hajeri et al., 2014; El-Mohtar & Dawson, 2014; Ng et al., 2016).

No entanto, o processo regulatório para a comercialização de transgênicos é longo. Desta forma, a aplicação de novas tecnologias como a edição de genoma através do sistema *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR), ou repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente interespaçadas, apresenta grande potencial na obtenção de novos cultivares visando à resistência ao HLB por terem, ao menos nos EUA, o processo de regulamentação menos exigente que o de organismos geneticamente modificados (Wang et al., 2017).

Este sistema ocorre de forma natural em organismos procariontes, proveniente do sistema de defesa contra invasores e pode ser aplicado em estudos funcionais de genes de plantas (Ma et al., 2016). A edição de genoma através do sistema CRISPR/CAS9 pelo uso da enzima nuclease denominada CAS9 permite o silenciamento gênico direcionado a genes específicos, tanto na planta quanto na bactéria.

Alguns pesquisadores fizeram o uso desta tecnologia visando à obtenção de plantas resistentes ao HLB (Li, 2017; Zhang et al., 2017) ou ao controle direto do patógeno (Zheng et al., 2016; Fagen et al., 2017). Nesse último caso, a hipótese é que seria possível editar genes responsáveis pelo mecanismo de patogenicidade da bactéria (liberação de moléculas efetoras) durante o processo de reconhecimento/interação inicial com a planta e bloquear a infecção. O pesquisador da Universidade da Flórida, Nian Wang, por exemplo, já produziu laranjeiras via edição de genoma com esta abordagem visando obter materiais resistentes ao cancro cítrico (Ledford, 2017). A mesma estratégia posteriormente pode ser aplicada ao HLB. No Brasil, esta linha de pesquisa também tem sido



Figura 1. Obtenção das plantas transgênicas de citros expressando o gene de Bt. (A) Explantes de citros contendo brotações positivas para o gene de Bt selecionado; (B) Aclimatação dos eventos positivos em casa de vegetação; (C) Plantas de citros Bt estabelecidas em casa de vegetação; (D) Propagação por borbulha das plantas de citros Bt para o desafio contra ninfas de *Diaphorina citri*.

estudada em citros visando ao controle de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Hasse) Dowson (Bernardi, 2018; Souza, 2018 - comunicação pessoal¹) e CLas (Machado, 2018 - comunicação pessoal²).

A produção de citros transgênicos intensificou-se nos últimos anos em função da crescente importância do HLB na cultura. Devido à relevância do vetor para o patossistema, nosso grupo adaptou para citros estratégias utilizadas para o manejo de insetos em outras culturas, como o uso da bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* Berliner (Eubacteriales: Bacillaceae) (Bt) (Dorta et al., 2019). Desta forma, relatamos pela primeira vez a ação patogênica de algumas estirpes de Bt a *D. citri* e sua capacidade de se translocar endofiticamente para a parte aérea de *seedlings* de citros, quando inoculadas próximo ao substrato (Dorta et al., 2019). Posteriormente, selecionamos um gene para a produção de plantas transgênicas de laranja doce, sob a direção de dois promotores (um de floema e um constitutivo), visando à expressão da proteína em diferentes tecidos da planta (Figura 1, dados não publicados) com o objetivo de controlar as ninfas de *D. citri* (Dorta, 2018). Testes iniciais foram conduzidos com alguns eventos e mostraram potencial no controle do psilídeo.

Este é o primeiro esforço em produzir plantas de laranja doce expressando proteína de Bt para o controle de *D. citri*. Caso seja confirmada sua efetividade, esta estratégia poderá ser considerada como mais uma ferramenta a ser utilizada no controle da doença, isoladamente ou em associação com outras tecnologias, como a edição de genoma ou o RNAi, visando a aumentar a eficiência do controle.

Esforços pela busca de medidas que possam conter o HLB têm se intensificado nos últimos anos por parte de pesquisadores, órgãos do governo, empresas e universidades, juntamente com os produtores. Infelizmente, ainda não temos a cura para a doença, e o processo de regulamentação para a liberação de plantas transgênicas é demorado. Por outro lado, a ação conjunta das medidas de manejo atualmente utilizadas e as potenciais estratégias de controle citadas nesta revisão podem manter a doença em níveis baixos. Esperamos que no futuro possamos aplicar medidas de controle mais eficazes e com menor custo para o citricultor e o meio ambiente.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) (Processo n°: 88882.157045/2017-01). Os autores agradecem a esta instituição e à Embrapa (03.13.03.006.00.00) pela concessão da bolsa de estudo a

¹ Alessandra Alves de Souza, Centro de Citricultura Sylvio Moreira, comunicação pessoal, outubro 2018.

² Marcos Antonio Machado, Instituto Agronômico de Campinas, comunicação pessoal, abril 2019.

S.O. Dorta e recursos para o desenvolvimento do trabalho. Agradecem também à Dra. Valdenice Novelli pela cessão de espaço de estufa e laboratório para os trabalhos com Bt.

REFERÊNCIAS

- Albrecht, U., & Bowman, K. D. (2011). Tolerance of the trifoliolate citrus hybrid US-897 (*Citrus reticulata* Blanco × *Poncirus trifoliata* L. Raf.) to Huanglongbing. *HortScience*, 46(1), 16-22.
- Allen, Q., Rogers, K. L., & Chaparro, J. X. (2017). Evidence for a dominant huanglongbing tolerance gene in citrus. Abstracts from the 5th IRCHLB, Orlando, FL. *Journal of Citrus Pathology*, 4(1), 2.
- Alquézar, B., Volpe, H. X. L., Magnani, R. F., Miranda, M. P., Santos, M. A., Wulff, N. A., Bento, J. M. S., Parra, J. R. P., Bouwmeester, H., & Peña, L. (2017). β -caryophyllene emitted from a transgenic *Arabidopsis* or chemical dispenser repels *Diaphorina citri*, vector of *Candidatus Liberibacter*. *Scientific Reports*, 7(1), 5639.
- Andrade, E. C., & Hunter, W. B. (2017). RNAi feeding bioassay: development of a non-transgenic approach to control Asian citrus psyllid and other hemipterans. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 162(3), 389-396.
- Associação Brasileira de Exportadores de Citrus – CitrusBR. (2018). *Safra de laranjas 18/19 deve ser de 288,29 mi de caixas*. São Paulo: Citrusbr. Recuperado em 15 de abril de 2019, de <http://www.citrusbr.com.br/destaques/?id=312547>
- Attílio, L. B., Mourão Filho, F. A. A., Harakava, R., Silva, T. L., Miyata, L. Y., Stipp, L. C. L., & Mendes, B. M. J. (2013). Genetic transformation of sweet oranges with the *D4E1* gene driven by the AtPP2 promoter. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 48(7), 41-47.
- Aubert, B. (1987). *Trioza erytrae* (del Guercio) and *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psylloidea), the two vectors of citrus greening disease: Biological aspects and possible control strategies. *Fruits*, 42(3), 149-162.
- Ausique, J. J. S., D'Alessandro, C. P., Conceschi, M. R., Mascarin, G. M., & Delalibera Júnior, I. (2017). Efficacy of entomopathogenic fungi against adult *Diaphorina citri* from laboratory to field applications. *Journal of Pest Science*, 90(3), 947-960.
- Bassanezi, R. B., Lopes, A. S., Belasque Júnior, J., Spósito, M. B., Yamamoto, P. T., Miranda, M. P., Teixeira, D. C., & Wulff, N. A. (2010). Epidemiologia do *huanglongbing* e suas implicações para o manejo da doença. *Citrus Research & Technology*, 31(1), 11-23.
- Bassanezi, R. B., Montesino, L. H., Gimenes-Fernandes, N., Yamamoto, P. T., Gottwald, T. R., Amorim, L., & Bergamin Filho, A. (2013). Efficacy of area-wide inoculum reduction and vector control on temporal progress of huanglongbing in young sweet orange plantings. *Plant Disease*, 97(6), 789-796.
- Belasque Junior, J., Bassanezi, R. B., Yamamoto, P. T., Ayres, A. J., Tachibana, A., Violante, A. R., Tank Júnior, A., Di Giorgi, F., Tersi, F. E. A., Menezes, G. M., Dragone, J., Jank Júnior, R. H., & Bové, J. M. (2010). Lessons from huanglongbing management in São Paulo state, Brazil. *Journal of Plant Pathology*, 92(10), 285-302.
- Beloti, V. H., Alves, G. R., Araújo, D. F. D., Picoli, M. M., Moral, R. A., Demétrio, C. G. B., & Yamamoto, P. T. (2015). Lethal and Sublethal Effects of Insecticides Used on Citrus, on the Ectoparasitoid *Tamarixia radiata*. *PLoS One*, 10(7), e0132128.
- Beloti, V. H., Santos, F., Alves, G. R., Bento, J. M. S., & Yamamoto, P. T. (2017). Curry leaf smells better than citrus to females of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). *Arthropod-Plant Interactions*, 11(5), 709-716.
- Bernardi, A. (2018). *Otimização de parâmetros para edição de genoma via CRISPR/CAS9 em citros* (Dissertação de mestrado). Universidade Federal de São Carlos, Araras.
- 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*, 107(5), 590-599.
- Boava, L. P., Sagawa, C. H. D., Cristofani-Yaly, M., & Machado, M. A. (2015). Incidence of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*'-Infected Plants Among Citrandarins as Rootstock and Scion Under Field Conditions. *Phytopathology*, 105(4), 518-524.
- Boina, D. R., & Bloomquist, J. R. (2015). Chemical control of the Asian citrus psyllid and of huanglongbing disease in citrus. *Pest Management Science*, 71(6), 808-823.
- Boscariol-Camargo, R. L., Cristofani-Yaly, M., Malosso, A., Coletta-Filho, H. D., & Machado, M. A. (2010). Avaliação de diferentes genótipos de citros à infecção

- por *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Citrus Research & Technology*, 31(1), 85-90.
- Bové, J. M. (2006). Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology*, 88(1), 7-37.
- Bowman, K. D., & McCollum, G. (2015). Five new citrus rootstocks with improved tolerance to Huanglongbing. *HortScience*, 50(11), 1731-1734.
- Bowman, K. D., McCollum, G., & Albrecht, U. (2016). Performance of 'Valencia' orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] on 17 rootstocks in a trial severely affected by Huanglongbing. *Scientia Horticulturae*, 201, 355-361.
- Brar, G. S., Martini, X., & Stelinski, L. L. (2017). Lethal and sub-lethal effects of a novel sulfoximine insecticide, sulfoxaflor, against Asian citrus psyllid and its primary parasitoid under laboratory and field conditions. *International Journal of Pest Management*, 63(4), 299-308.
- Canales, E., Coll, Y., Hernández, I., Portieles, R., García, M. R., López, Y., Aranguren, M., Alonso, E., Delgado, R., & Luis, M. (2016). '*Candidatus Liberibacter asiaticus*', causal agent of citrus huanglongbing, is reduced by treatment with brassinosteroids. *PLoS One*, 11, e0146223.
- Capoor, S. P. (1963). Decline of citrus trees in India. *Bulletin of the National Institute of Sciences of India*, 24, 48-64.
- Chen, X. D., Gill, T. A., Pelz-Stelinski, K. S., & Stelinski, L. L. (2017a). Risk assessment of various insecticides used for management of Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* in Florida citrus, against honey bee, *Apis mellifera*. *Ecotoxicology (London, England)*, 26(3), 351-359.
- Chen, X. D., Seo, M., & Stelinski, L. L. (2017b). Behavioral and hormetic effects of the butenolide insecticide, flupyradifurone, on Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*. *Crop Protection (Guildford, Surrey)*, 98, 102-107.
- Clark, K., Franco, J. Y., Schwizer, S., Pang, Z., Hawara, E., Liebrand, T. W. H., Pagliaccia, D., Zeng, L., Gurung, F. B., Wang, P., Shi, J., Wang, Y., Ancona, V., Van der Hoorn, R. A. L., Wang, N., Coaker, G., & Ma, W. (2018). An effector from the Huanglongbing-associated pathogen targets citrus proteases. *Nature Communications*, 9, 1718.
- Coletta-Filho, H. D., Targon, M. L. P. N., Takita, M. A., De Negri, J. D., Pompeu Junior, J., Amaral, A. M., Muller, G. W., & Machado, M. A. (2004). First report of the causal agent of huanglongbing ("*Candidatus Liberibacter asiaticus*") in Brazil. *Plant Disease*, 88(12), 1382.
- Cristofani-Yaly, M. (2017). *Portas-enxerto que podem contribuir no controle do Huanglongbing (HLB)*. Recuperado em 15 de outubro de 2018, de <http://www.paginarural.com.br/noticia/251788/pesquisa-do-iac-no-desenvolvimento-de-novos-porta-enxertos-busca-controlar-o-hlb>
- Dorta, S. O. (2018). *Produção de plantas transgênicas de citros expressando toxina de Bacillus thuringiensis visando ao controle de Diaphorina citri, inseto vetor do agente causal do huanglongbing (HLB)* (Tese de doutorado). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Dorta, S. O., Balbinotte, J., Monnerat, R., Lopes, J. R. S., Cunha, T., Zanardi, O. Z., Miranda, M. P., Machado, M. A., & Freitas-Astúa, J. (2019). Selection of *Bacillus thuringiensis* strains in citrus and their pathogenicity to *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) nymphs. *Insect Science*, 1-12. Ahead of print.
- Doud, M. M., Wang, Y., Hoffman, M. T., Latza, C. L., Luo, W., Armstrong, C. M., Gottwald, T. R., Dai, L., Luo, F., & Duan, Y. (2017). Solar thermotherapy reduces the titer of *Candidatus Liberibacter asiaticus* and enhances canopy growth by altering gene expression profiles in HLB-affected citrus plants. *Horticulture Research*, 4, 17054.
- Dutt, M., & Grosser, J. W. (2017). Can engineered trees protect citrus against huanglongbing (HLB)? Abstracts from the 5th IRCHLB, Orlando, FL. *Journal of Citrus Pathology*, 4(1), 10.
- Dutt, M., Barthe, G., Irely, M., & Grosser, J. (2015). Transgenic citrus expressing an *Arabidopsis* NPR1 gene exhibit enhanced resistance against huanglongbing (HLB; citrus greening). *PLoS One*, 10(9), e0137134.
- El-Mohtar, C., & Dawson, W. O. (2014). Exploring the limits of vector construction based on Citrus tristeza virus. *Virology*, 448, 274-283.
- El-Shesheny, I., Hajeri, S., El-Hawary, I., Gowda, S., & Killiny, N. (2013). Silencing abnormal wing disc gene of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* disrupts adult wing development and increases nymph mortality. *PLoS One*, 8(5), e65392.
- Fagen, J., Braswell, E., & Beisel, C. (2017). Engineering a CRISPR-based antimicrobial system for the treatment of *Liberibacter* infections. Abstracts from the 5th IRCHLB, Orlando, FL. *Journal of Citrus Pathology*, 4(1), 11.

- Fan, G. C., Xia, Y. L., Lin, X. J., Hu, H. Q., Wang, X. D., Ruan, C. Q., Lu, L. M., & Liu, B. (2016). Evaluation of thermotherapy against Huanglongbing (citrus greening) in the greenhouse. *Journal of Integrative Agriculture*, 15(1), 111-119.
- Fancelli, M., Borges, M., Laumann, R. A., Pickett, J. A., Birkett, M. A., & Blassioli-Moraes, M. C. (2018). Attractiveness of host plant volatile extracts to the Asian citrus Psyllid, *Diaphorina citri*, is reduced by terpenoids from the non-host cashew. *Journal of Chemical Ecology*, 44(4), 397-405.
- Flores, D., & Ciomperlik, M. (2017). Biological control using the Ectoparasitoid, *Tamarixia radiata*, against the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, in the lower Rio Grande Valley of Texas. *Southwestern Entomologist*, 42(1), 49-59.
- Folimonova, S. Y., Robertson, C. J., Garnsey, S. M., Gowda, S., & Dawson, W. O. (2009). Examination of the responses of different genotypes of citrus to Huanglongbing (citrus greening) under different conditions. *Phytopathology*, 99(12), 1346-1354.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAO. (2015). Agricultural outlook (145 p.). Paris: OECD Publishing. Recuperado em 11 de outubro de 2018, de <http://www.fao.org/3/a-i4738e.pdf>
- Fundo de Defesa da Citricultura – Fundecitrus. (2016). Relatório de Atividades Jun/2015 a Mai/2016. Araraquara: Fundecitrus. Recuperado em 24 de outubro de 2018, de <http://www.fundecitrus.com.br/pdf/relatorios/2016.pdf>
- Fundo de Defesa da Citricultura – Fundecitrus. (2017a). *Greening causou incremento de 85% nos custos de produção de citros da Flórida (EUA)*. Araraquara: Fundecitrus. Recuperado em 21 de setembro de 2018, de <http://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/noticias/integra/greening-causou-incremento-de-85-nos-custos-de-producao-de-citros-da-florida-eua/556>
- Fundo de Defesa da Citricultura – Fundecitrus. (2017b). *Fundecitrus lança campanha “Unidos contra o greening” para incentivar o controle da pior doença da citricultura*. Araraquara: Fundecitrus. Recuperado em 22 de julho de 2018, de <http://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/noticias/integra/fundecitrus-lanca-campanha-unidos-contra-o-greening-para-incentivar-o-controle-da-pior-doenca-da-citricultura/557>
- Fundo de Defesa da Citricultura – Fundecitrus. (2017c). Relatório de Atividades Jun/2016 a Mai/2017. Araraquara: Fundecitrus. Recuperado em 22 de julho de 2018, de <http://www.fundecitrus.com.br/pdf/relatorios/2017.pdf>
- Fundo de Defesa da Citricultura – Fundecitrus. (2018a). *Incidência do greening no cinturão citrícola*. Araraquara: Fundecitrus. Recuperado em 21 de setembro de 2018, de <http://www.fundecitrus.com.br/levantamentos/greening>
- Fundo de Defesa da Citricultura – Fundecitrus. (2018b). *Citricultura brasileira já conta com inovador bioinseticida aliado no controle do vetor do greening*. Araraquara: Fundecitrus. Recuperado em 22 de julho de 2018, de <http://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/noticias/integra/citricultura-brasileira-ja-counta-com-inovador-bioinseticida-aliado-no-controle-do-vetor-do-greening/687>
- Fundo de Defesa da Citricultura – Fundecitrus. (2018c). *Manejo do Greening: 10 mandamentos para o sucesso no controle da doença*. Araraquara: Fundecitrus. Recuperado em 15 de outubro de 2018, de http://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/manual_detalhes/manejo-do-greening/64
- Fundo de Defesa da Citricultura – Fundecitrus. (2018d). *Pesquisa e desenvolvimento*. Recuperado em 15 de outubro de 2018, de <http://www.fundecitrus.com.br/pesquisa/projetos>
- Fundo de Defesa da Citricultura – Fundecitrus. (2019). Reestimativa da safra de laranja 2018/19 do cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro – fechamento em abril/2019. Araraquara: Fundecitrus. Recuperado em 10 de abril de 2019, de https://www.fundecitrus.com.br/pdf/pes_relatorios/0419_Reestimativa_da_Safra_de_Laranja.pdf
- Galdeano, D. M., Breton, M. C., Lopes, J. R. S., Falk, B. W., & Machado, M. A. (2017). Oral delivery of double-stranded RNAs induces mortality in nymphs and adults of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*. *PLoS One*, 12(3), e0171847.
- George, J., Ammar, E. D., Hall, D. G., Shatters Junior, R. G., & Lapointe, S. L. (2018). Prolonged phloem ingestion by *Diaphorina citri* nymphs compared to adults is correlated with increased acquisition of citrus greening pathogen. *Scientific Reports*, 8(1), 10352.
- Ghosh, D. K., Motghare, M., & Gowda, S. (2018). Citrus greening: overview of the most severe disease of citrus. *Advanced Agricultural Research & Technology Journal*, 2(1), 83-100.
- Girardi, E. A. (2018). *23º Dia do Viveirista – Atualização sobre estudos de resistência ao HLB em citros*. Cordeirópolis:

- Centro de Citricultura Sylvio Moreira. Recuperado em 29 de outubro de 2018, de <http://ccsm.br/wp-content/uploads/2018/09/2018ViveiristaGirardi.pdf>
- Gottwald, T. R. (2010). Current epidemiological understanding of citrus huanglongbing. *Annual Review of Phytopathology*, 48, 119-139.
- Graça, J. V. (1991). Citrus greening disease. *Annual Review of Phytopathology*, 29, 109-136.
- Graça, J. V., Douhan, G. W., Halbert, S. E., Keremane, M. L., Lee, R. F., Vidalakis, G., & Zhao, H. (2016). Huanglongbing: An overview of a complex pathosystem ravaging the world's citrus. *Journal of Integrative Plant Biology*, 58(4), 373-387.
- Graça, J. V., Kunta, M., Sétamou, M., Rascoe, J., Li, W., Nakhla, M. K., Salas, B., & Bartels, D. W. (2015). Huanglongbing in Texas: report on the first detections in commercial citrus. *Journal of Citrus Pathology*, 2(1), 27939.
- Grafton-Cardwell, B., Stelinski, L. L., & Stansly, P. A. (2013). Biology and management of Asian citrus psyllid, vector of huanglongbing pathogens. *Annual Review of Entomology*, 58, 413-432.
- Hajeri, S., Killiny, N., El-Mohtar, C., Dawson, W. O., & Gowda, S. (2014). Citrus tristeza virus-based RNAi in citrus plants induces gene silencing in *Diaphorina citri*, a phloem-sap sucking insect vector of citrus greening disease (Huanglongbing). *Journal of Biotechnology*, 176, 42-49.
- Halbert, S. (2005). The discovery of huanglongbing in Florida. In W. N. Dixon, T.R. Gottwald, J. Graham, P. Berger, & A. LaVigne. *Proceedings of the 2nd International Citrus Canker and Huanglongbing Research Workshop* (p. 50). Orlando: USDA.
- Hall, D. G., Richardso, M. L., El-Desouky, A. & Halbert, S. E. (2012). Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, vector of citrus huanglongbing disease. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 146, 207-223.
- Hao, G., Stover, E., & Gupta, G. (2016). Overexpression of a modified plant thionin enhances disease resistance to Citrus Canker and Huanglongbing (HLB). *Frontiers of Plant Science*, 7, 1078.
- Hoffman, M. T., Doud, M. S., Williams, L., Zhang, M. Q., Ding, F., Stover, E., Hall, D., Zhang, S., Jones, L., Gooch, M., Fleites, L., Dixon, W., Gabriel, D., & Duan, Y. P. (2013). Heat treatment eliminates 'Candidatus Liberibacter asiaticus' from infected citrus trees under controlled conditions. *Phytopathology*, 103(1), 15-22.
- Hu, J., Jiang, J., & Wang, N. (2018). Control of citrus Huanglongbing via trunk injection of plant defense activators and antibiotics. *Phytopathology*, 108(2), 186-195.
- Inoue, H., Ohnishi, J., Ito, T., Tomimura, K., Miyata, S., Iwanami, T., & Ashihara, W. (2009). Enhanced proliferation and efficient transmission of *Candidatus Liberibacter asiaticus* by adult *Diaphorina citri* after acquisition feeding in the nymphal stage. *Annals of Applied Biology*, 155(1), 29-36.
- International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications – ISAAA. (2016). *Beyond promises: facts about Biotech/GM Crops in 2016*. In: International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications – ISAAA. *Global Status of Biotech/GM Crops*. Ithaca: ISAAA. Recuperado em 28 de outubro de 2018, de http://www.isaaa.org/resources/publications/biotech_booklets/beyondpromises/download/2017%20Beyond%20Promises%20Booklet_For%20Uploading_July202017.pdf
- Jones, J. D. G., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323-329.
- Khan, A. A., Afzal, M., Qureshi, J. A., Khan, A. M., & Raza, A. M. (2014). Botanicals, selective insecticides, and predators to control *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) in citrus orchards. *Insect Science*, 21(6), 717-726.
- Killiny, N., & Kishk, A. (2017). Delivery of dsRNA through topical feeding for RNA interference in the citrus sap piercing-sucking hemipteran, *Diaphorina citri*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 95(2), e21394.
- Lavagi, I., Christiano, R., Greer, G., Grosser, J., Gmitter, F., Bowman, K., Stover, E., Mccollum, G., Rosson, B., Sieburth, P., Polek, M., Krueger, R., & Vidalakis, G. (2017). Introducing new and licensed huanglongbing tolerant citrus varieties into California. A case study – Florida. Abstracts from the 5th IRCHLB, Orlando, FL. *Journal of Citrus Pathology*, 4(1), 23.
- Ledford, H. (2017). Geneticists enlist engineered virus and CRISPR to battle citrus disease. *Nature*, 545(7654), 277-278.
- 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. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 30(8), 620-630.
- Li, Y. (2017). Production of non-transgenic mutant plants via *Agrobacterium-mediated* transient CRISPR expression.

- Abstracts from the 5th IRCHLB, Orlando, FL. *Journal of Citrus Pathology*, 4(1), 24.
- Ma, X., Zhu, Q., Chen, Y., & Liu, Y.-G. (2016). CRISPR/Cas9 Platforms for genome editing in plants: developments and applications. *Molecular Plant*, 9(7), 961-974.
- Miranda, M. P., Yamamoto, P. T., Garcia, R. B., Lopes, J. P. A., & Lopes, J. R. S. (2016). Thiamethoxam and imidacloprid drench applications on sweet orange nursery trees disrupt the feeding and settling behavior of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). *Pest Management Science*, 72, 1785-1793.
- Mirkov, T. E., & Mandadi, K. K. (2017). *Pathogen resistant citrus compositions, organisms, systems, and methods* (United States Patent Application; no. 15/212,041). Recuperado em 24 de setembro de 2018, de <https://patentimages.storage.googleapis.com/ed/92/d8/cc22ebaa432686/US20170159069A1.pdf>
- Miyata, L. Y., Harakava, R., Atílio, L. B., Mendes, B. M. J., Lopes, J. R. S., Coletta-Filho, H. D., Souza, A. A., & Mourão Filho, F. A. A. (2017). Phloem promoters in transgenic sweet orange are differentially triggered by *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 39(3), 1-9.
- Munir, S., He, P., Wu, Y., He, P., Khan, S., Huang, M., Cui, W., He, P., & He, Y. (2018). Huanglongbing control: perhaps the end of the beginning. *Microbial Ecology*, 76, 192.
- Neves, M. F., & Trombin, V. G. (2017). *Anuário da citricultura* (1 ed., 60 p.). São Paulo: CitrusBR.
- Ng, J., Chen, A., & Yokomi, R. (2016). Fighting HLB with a citrus tristeza virus-based vector. *Citrograph*, 7(1), 76-81.
- Parra, J. R. P., Lopes, J. R. S., Torres, M. L. G., Nava, D. E., & Paiva, P. E. B. (2010). Bioecologia do vetor *Diaphorina citri* e transmissão de bactérias associadas ao *Huanglongbing*. *Citrus Research & Technology*, 31(1), 37-51.
- Pelz-Stelinski, K. S., Brlansky, R. H., Ebert, T. A., & Rogers, M. E. (2010). Transmission Parameters for *Candidatus Liberibacter asiaticus* by Asian citrus psyllid (Hemiptera: Psyllidae). *Journal of Economic Entomology*, 103(5), 1531-1541.
- Pitino, M., Allen, V., & Duan, Y. (2018). Las Δ 5315 Effector induces extreme starch accumulation and chlorosis as *Ca. Liberibacter asiaticus* infection in *Nicotiana benthamiana*. *Frontiers of Plant Science*, 9, 113.
- Pitino, M., Armstrong, C. M., Cano, L. M., & Duan, Y. (2016). Transient expression of *Candidatus Liberibacter asiaticus* effector induces cell death in *Nicotiana benthamiana*. *Frontiers of Plant Science*, 7, 982.
- Portalanza, D. E., Sanchez, L., Plúas, M., Felix, I., Costa, V. A., Dias-Pinic, N. S., Ferreira-Stafanous, S., & Gómez-Torres, M. L. (2017). First records of parasitoids attacking the Asian citrus psyllid in Ecuador. *Revista Brasileira de Entomologia*, 61(2), 107-110.
- Ribas, P. P., & Matsumura, A. T. S. (2009). A química dos agrotóxicos: impacto sobre a saúde e meio ambiente. *Revista Liberato*, 10(14), 149-158.
- Robertson, C. J., Zhang, X., Gowda, S., Orbović, V., Dawson, W. O., & Mou, Z. (2018). Overexpression of the Arabidopsis NPR1 protein in citrus confers tolerance to Huanglongbing. *Journal of Citrus Pathology*, 5(1), 38911.
- Silva, J. A. A., Hall, D. G., Gottwald, T. R., Andrade, M. S., Maldonado Junior, W., Alessandro, R. T., Lapointe, S. L., Andrade, E. C., & Machado, M. A. (2016). Repellency of selected *Psidium guajava* cultivars to the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*. *Crop Protection (Guildford, Surrey)*, 84, 14-20.
- Singh, N. V., & 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.
- Stover, E., Inch, S., Richardson, M. L., & Hall, D. G. (2016). Conventional citrus of some scion/rootstock combinations show field tolerance under high Huanglongbing disease pressure. *HortScience*, 51(2), 127-132.
- Stuchi, E. S., & Girardi, E. A. (2010). *Utilização de práticas culturais na citricultura frente ao Huanglongbing* (1. ed., 77 p.). Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura.
- Sulzbach, M., Oliveira, R. P., Girardi, E. A., Schwarz, S. F., Bertolini, E., Schneider, L. A., & Gonzatto, M. P. (2017). *Huanglongbing (HLB) dos citros e estratégias de manejo visando prevenção e controle* (1 ed., 36 p.). Pelotas: Embrapa Clima Temperado.
- Tabachnick, W. J. (2015). *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) vector competence for the citrus greening pathogen '*Candidatus Liberibacter asiaticus*'. *Journal of Economic Entomology*, 108(3), 839-848.
- Tavano, E. C. R., Erpen, L., Aluisi, B., Harakava, R., Lopes, J. R. S., Vieira, M. L. C., Piedade, S. M. S., Mendes, B. M. J., & Mourão Filho, F. A. A. (2019). Sweet orange genetic transformation with the *attacin* A gene under the

- control of phloem-specific promoters and inoculation with *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *The Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 94(2), 210-219.
- Tavano, E. C. R., Vieira, M. L. C., Mourão Filho, F. A. A., Harakava, R., & Mendes, B. M. J. (2015). Genetic transformation of *Citrus sinensis* 'Hamlin' with *Attacin A* driven by a phloem tissue-specific promoter for resistance to *Candidatus Liberibacter* spp. *Acta Horticulturae*, (1065), 695-702.
- Teixeira, D. C., Ayres, J., Kitajima, E. W., Danet, L., Jagoueix-Eveillard, S., Saillard, C., & Bove, J. M. (2005). First report of a Huanglongbing-like disease of Citrus in São Paulo State, Brazil and association of a new *Liberibacter* species, "*Candidatus Liberibacter americanus*", with the disease. *Plant Disease*, 89(1), 107.
- The United States Department of Agriculture – USDA. (2018). Crop production. Washington: USDA. Recuperado em 15 de outubro de 2018, de <https://release.nass.usda.gov/reports/crop1018.pdf>
- Tiwari, S., Mann, R. S., Rogers, M. E., & Stelinski, L. L. (2011). Insecticide resistance in field populations of Asian citrus psyllid in Florida. *Pest Management Science*, 67(10), 1258-1268.
- Wang, N., & 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 Junior, J. (2017). The *Candidatus Liberibacter*-host interface: insights into pathogenesis mechanisms and disease control. *Annual Review of Phytopathology*, 55, 451-482.
- Wu, F., Huang, J., Xu, M., Fox, E. G. P., Beattie, G. A. C., Holford, P., Cen, Y., & Deng, X. (2018). Host and environmental factors influencing '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' acquisition in *Diaphorina citri*. *Pest Management Science*, 74(12), 2738-2746.
- Wulff, N. A. (2018). Perspectivas biotecnológicas no controle do greening. In *Anais do Simpósio Internacional de Greening*. Araraquara: Fundecitrus. Recuperado em 24 de outubro de 2018, de <http://www.fundecitrus.com.br/pdf/palestras/NelsonZWulffZ-ZperspectivasZbiotecnologicas.pdf>
- Yamamoto, P. T., Felipe, M. R., Sanches, A. L., Coelho, J. H. C., Garbim, L. F., & Ximenes, N. L. (2009). Eficácia de inseticidas para o manejo de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) em citros. *BioAssay*, 4(4), 1-9.
- Yang, C., Powell, C. A., Duan, Y., Shatters, R. G., Lin, Y., & Zhang, M. (2016). Mitigating citrus huanglongbing via effective application of antimicrobial compounds and thermotherapy. *Crop Protection (Guildford, Surrey)*, 84, 150-158.
- Yu, X., & Killiny, N. (2018). Effect of silencing a *boule* homologue on the survival and reproduction of Asian citrus psyllid *Diaphorina citri*. *Physiological Entomology*, 43(4), 268-275.
- Zanardi, O. Z., Volpe, H. X. L., Favaris, A. P., Silva, W. D., Luvizotto, R. A. G., Magnani, R. F., Esperança, V., Delfino, J. Y., Freitas, R., Miranda, M. P., Parra, J. R. P., Bento, J. M. S., & Leal, W. S. (2018). Putative sex pheromone of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, breaks down into an attractant. *Scientific Reports*, 8, 455.
- Zhang, M., Guo, Y., Powell, C. A., Doud, M. S., Yang, C., & Duan, Y. (2014). Effective antibiotics against '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' in HLB-affected citrus plants identified via the graft-based evaluation. *PLoS One*, 11, e111032.
- Zhang, M., Powell, C. A., Zhou, L., He, Z., Stover, E., & Duan, Y. (2011). Chemical compounds effective against the citrus Huanglongbing bacterium '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' in planta. *Phytopathology*, 101, 1097-1103.
- Zhang, S., Shi, Q., Duan, Y., & Stover, E. (2017). Editing *DMR6* orthologs in citrus via a CRISPR/Cas9 system. Abstracts from the 5th IRCHLB, Orlando, FL. *Journal of Citrus Pathology*, 4(1), 44.
- Zheng, Z., Bao, M., Wu, F., Chen, J., & Deng, X. (2016). Predominance of single prophage carrying a CRISPR/Cas system in "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" strains in southern China. *PLoS One*, 11(1), e0146422.
- Zou, X., Jiang, X., Xu, L., Lei, T., Peng, A., He, Y., Yao, L., & Chen, S. (2017). Transgenic citrus expressing synthesized *cecropin B* genes in the phloem exhibits decreased susceptibility to Huanglongbing. *Plant Molecular Biology*, 93, 341-353.

Recebido: Novembro 27, 2018
Aceito: Maio 07, 2019

Como citar: Dorta, S. O., Machado, M. A. & Freitas-Astúa, J. (2019). Desenvolvimento de estratégias alternativas visando ao controle do huanglongbing. *Citrus Research & Technology*, 40, e1045, <https://doi.org/10.4322/crt.17519>