

Huanglongbing: O Que Se Sabe até Agora Sobre a Maior Ameaça para a Citricultura Mundial?

Huanglongbing: What is Known So Far About the Greatest Threat to the World's Citrus Industry?

João Guilherme de Moraes Pontes,^a Hellen Bertoletti Barbieri,^a Alana Kelyene Pereira,^a Marina Ferreira Maximo,^a Aline Midori Kanashiro,^a Nelson Arno Wulff,^b Taicia Pacheco Fill^{a,*}

^a Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Instituto de Química, Laboratório de Biologia Química Microbiana (LaBioQuiMi), CEP 13083-872, Campinas-SP, Brasil.

^b Fundo de Defesa da Citricultura (FUNDECITRUS), Departamento de Pesquisa & Desenvolvimento, CEP 14807-040, Araraquara-SP, Brasil.

*E-mail: taicia@unicamp.br

Recebido em: 30 de Outubro de 2022

Aceito em: 18 de Fevereiro de 2023

Publicado online: 24 de Abril de 2023

Huanglongbing (or HLB) is the most devastating citrus disease that is widespread throughout the world, causing enormous economic damage to the citrus industry and making oranges and the juice produced with them of lower quality for consumption. The presumptive causal agent of the disease is the bacteria *Candidatus Liberibacter* spp. that has not yet been cultivated *in vitro*, with three species: *Ca. L. asiaticus*, *Ca. L. americanus* and *Ca. L. africanus*. Currently, there is no cure for HLB disease. The disease has been managed by the use of healthy nursery trees; monitoring and controlling the psyllid vector; and scouting and eradication of symptomatic trees. One of the alternatives to reduce the problem, currently in use in Florida, USA, has been the prolonged use of antibiotics; however, the long-term practice may be harmful to human health and to the environment. In this sense, the main objective of the present review is to discuss strategies applied to gain deeper understanding concerning chemical and biochemical aspects of HLB disease and review different methodologies to be potentially applied to control the spreading of the disease in the fields and to avoid the increase of the incidence in the orchards.

Keywords: Huanglongbing; *Candidatus Liberibacter* spp.; *Citrus sinensis*; diagnosis; biomarkers; virulence factors.

1. Introdução

Huanglongbing (HLB) também conhecida popularmente como *Greening* é uma doença de citros causada pelos agentes etiológicos *Ca. Liberibacter asiaticus*, *Ca. Liberibacter americanus* e *Ca. Liberibacter africanus* (Taxonomia: 34019), que são alfa-proteobactérias gram-negativas, e que encontram-se restritas ao floema da planta afetada.¹⁻² Atualmente, a HLB é a doença mais devastadora da citricultura mundial, sendo reportada pela primeira vez no Brasil em 2004 por Coletta-Filho *et al.*³⁻⁴ A Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) contabilizou que cerca de 40% da produção global é perdida anualmente para pragas, resultando em um prejuízo econômico superior a 220 bilhões de dólares.⁵ No Brasil, foi estimado que 55,5 milhões de laranjeiras tenham sido eliminadas no estado de São Paulo entre 2005 a 2019 devido a doença HLB.⁶ Em 2022, 48,67 milhões (24,42%) de laranjeiras no cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste de Minas Gerais foram diagnosticadas com os sintomas dessa doença.⁷

A HLB é caracterizada pelo amarelecimento do limbo foliar de forma irregular e assimétrica, conhecido como mosqueado e ocorrência de frutos assimétricos, com columela amarelecida e sementes abortadas. O nome tem origem chinesa e significa doença do ramo amarelo. Enquanto que o nome *Greening* foi originado pela inversão da coloração dos frutos durante o estágio de maturação.⁸⁻⁹ Outros sintomas desenvolvidos durante a infecção são: a falta de nutrientes minerais das plantas tais como o cálcio, magnésio, zinco e enxofre;¹⁰ nervuras mais salientes em relação às folhas saudáveis;¹¹ os frutos nascem deformados e com o albedo de maior espessura. Além disso, o suco torna-se mais ácido e amargo, com alteração de paladar perceptível para o consumo.¹²

A transmissão da bactéria *Candidatus Liberibacter* spp. ocorre quando o psíldeo infectado se alimenta da planta.¹³ *Diaphorina citri* Kuwayama é o responsável pela disseminação da doença em países dos continentes asiáticos e americanos, enquanto o *Trioza erytreae* (Del Guercio 1918) é o psíldeo disseminador da doença nos países africanos.¹⁴⁻¹⁵ No entanto, *Trioza erytreae* (Del Guercio 1918) foi encontrado na Europa continental em 2014, na Espanha e em Portugal, e isso tem preocupado citricultores e pesquisadores que buscam encontrar métodos de controle da doença.¹⁶

Atualmente, não existe cura para o HLB. Uma forma de tentar aumentar a vida útil de plantas infectadas, aplicada nos EUA, tem sido a aplicação prolongada de combinações de antibióticos tais como a ampicilina, carbenicilina e oxitetraciclina.¹⁷⁻¹⁸ No entanto, o uso excessivo desses antibióticos é prejudicial para a saúde humana e para o meio ambiente.¹⁹ Além disso, o uso prolongado de antibióticos como, por exemplo, a oxitetraciclina vem tornando-os cada vez mais ineficazes contra o fitopatógeno.²⁰ Nesse sentido, o presente trabalho de revisão tem como principal objetivo discutir estratégias de estudos para a maior compreensão dos aspectos biológicos, químicos e bioquímicos da doença, assim como revisar estratégias de tentar controlar a doença HLB e evitar que extensos pomares sejam erradicados, causando graves prejuízos econômicos para o citricultor. As estratégias abordadas nesta revisão foram divididas nos seguintes tópicos: 1-) tentativas de cultivo *in vitro* da *Candidatus Liberibacter* spp.; 2-) Identificação dos fatores de virulência da *Candidatus Liberibacter* spp.; 3-) estudos das interações fitopatógeno-planta para a busca de biomarcadores; 4-) Abordagens ômicas como estratégia de compreensão da doença Huanglongbing 5-) análises do metabolismo dos insetos psílídeos; e 6-) métodos alternativos para mitigar a doença HLB.

2. Tentativas de cultivo *in vitro* da bactéria *Candidatus Liberibacter* spp.

Um dos maiores desafios em estudar a HLB é o pouco conhecimento relacionado ao metabolismo e a constituição bioquímica das bactérias *Candidatus Liberibacter* spp. associadas ao HLB e essa dificuldade é uma consequência direta do fato deste fitopatógeno ainda não ter sido cultivado *in vitro*. Diferentes composições de meios de cultura têm sido testadas por diversos grupos de pesquisa para tentar isolar a bactéria. Atualmente, as hipóteses sobre o metabolismo da *Candidatus Liberibacter* spp. são feitas baseadas em testes experimentais que são realizados usando como modelo a *Liberibacter crescens*, a única espécie do gênero *Liberibacter* que foi cultivada de modo reprodutível em laboratório.²¹⁻²² A *L. crescens* teve seu genoma sequenciado em 2012 por Leonard *et al.*²³ e foi descrita em 2014 por Fagen *et al.*,²² cultivada a partir de mamão babaco (*Carica x pentagona* Heilborn) em meio BM7, constituído de α -cetoglutarato, hidróxido de potássio, tampão de ácido *N*-(2-acetamido)-2-aminoetanossulfônico (tampão ACES) e água em um pH ajustado para 6.5.²²

Em 2008, Davis *et al.*²⁴ descreveram o co-cultivo da bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) com a *Propionibacterium acnes*, uma espécie de actinobactéria que comumente habita árvores cítricas e psílídeos, independente desses hospedeiros estarem infectados ou não com a CLas. Eles observaram que tanto a CLas quanto a *P. acnes* formaram uma colônia isolada das demais espécies microbianas durante muito tempo, sugerindo que ambas

bactérias se beneficiam mutuamente para a sobrevivência delas em cultura.²⁴ Esse co-cultivo foi preparado em um meio de cultura similar ao caldo BM7 reportado por Fagen *et al.*²²⁻²³ junto com o caldo infusão cérebro coração (meio BHI).²⁴ Posteriormente, em 2009, Sechler *et al.*²⁵ relataram o cultivo de *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Candidatus Liberibacter americanus* (CLam) e *Candidatus Liberibacter africanus* (CLaf) através de um meio de cultura de composição complexa, onde alguns dos componentes são usados no cultivo da *Xylella fastidiosa*, tais como o meio de cultura PW (*periwinkle wilt agar*) junto com extratos de plantas cítricas. Contudo, esses resultados não foram reproduzidos pela comunidade científica.²⁵⁻²⁷

Em 2014, Parker *et al.*²⁸ testaram quatro meios de cultura líquidos diferentes: o meio de cultura K (ou KB)²⁹⁻³⁰ (Tabela 1); o meio J50 composto por partes iguais do meio K e um suco preparado usando as sementes de frutas cítricas maceradas que estavam infectadas pela CLas como fonte de inóculo; o meio G50 composto por partes iguais de meio K e suco de toranja comercial esterilizado; e o meio G contendo apenas o suco de toranja esterilizado.²⁸ Através da técnica de Reação de Cadeia Polimerase quantitativa com monoazida etídio (qPCR-EMA), Parker *et al.*²⁸ puderam comparar a viabilidade das células de CLas nos diferentes meios de cultura. Eles observaram que a adição de suco de toranja industrializado no meio de cultura permitiu uma maior viabilidade da cultura de CLas por um período entre duas a três semanas. Além disso, eles observaram que a maioria dos elementos químicos minerais (Ca, K, Mg, B, Cu, Fe, Mn, Ni, e Zn) e aminoácidos (alanina, serina, prolina e ácido aspártico) foram encontrados em maior concentração nos meios de cultura suplementados com suco cítrico (meios G, G50 e J50) e esses contribuíram mais com a viabilização do cultivo da CLas em relação ao meio de cultura controle (meio de cultura K).²⁸

Mais recentemente, em 2019, Ha *et al.*²⁷ reportaram a composição de um meio de cultura adaptado àquele usado no cultivo da *Liberibacter crescens* (Tabela 1), onde eles relatam ter mantido durante 2 anos o cultivo da CLas, ao qual passou por mais de 12 subculturas durante esse período de tempo. Os autores relatam a presença da CLas em biofilmes derivados de tecidos cítricos infectados, fora do hospedeiro. O biofilme descrito foi mantido em um sistema reator (Figura 1) para o crescimento bacteriano e esse reator foi mantido em condições atmosféricas específicas: N₂ para condições anaeróbicas; N₂ e O₂ (90:10) para baixa tensão de oxigênio; e O₂ para aeração, sendo que o crescimento da CLas foi favorecido em pH neutro com baixa tensão de oxigênio.²⁷

O crescimento da CLas durante todo esse período só é possível se a bactéria tiver os nutrientes necessários que são provindos, ou do próprio meio de cultura, ou de microorganismos que têm associação mutualista com a CLas. Além disso, é necessário também isolar a CLas de outros microrganismos competidores.^{21,27} Desta forma, um estudo metagenômico da comunidade microbiana auxilia

nos estudos do cultivo da CLas.^{21,27,31}

A Tabela 1 apresenta a composição dos diferentes meios de cultura que já foram testados na tentativa de cultivar a *Candidatus Liberibacter* spp. e a Figura 1 sumariza os resultados experimentais obtidos até então.

Outros estudos, têm indicado que a CLas tem a habilidade de biossintetizar *de novo* apenas seis aminoácidos proteinogênicos (lisina, serina, glicina, glutamina, treonina e arginina), sendo assim, a CLas precisa obter a maioria dos aminoácidos do ambiente e ela faz isso através de transportadores do tipo ABC para que esses aminoácidos possam ser usados como uma fonte de energia.^{2,32} Nesse sentido, a composição metabólica de algumas plantas têm sido estudadas para serem usadas no cultivo de

microrganismos fastidiosos e/ou ainda não cultivados como a CLas. Um exemplo disso, é a análise da vinca ou Rosa de Madagascar (*Catharanthus roseus*) que tem melhorado a compreensão sobre as necessidades nutricionais de bactérias fastidiosas e que pode ser usado em planejamento de meios de cultivo da CLas.^{2,33-34}

Recentemente, Merfa *et al.* desenvolveram um sistema *ex vivo* (elementos são extraídos de um organismo) para o crescimento da CLas usando a vinca, substituindo o hospedeiro cítrico, uma vez que nela é possível de se obter uma maior população de CLas em comparação com plantas cítricas e também, de se conseguir obter sintomas semelhantes ao da HLB em um curto período de tempo. Desta forma, com essa planta é possível propagar o inóculo

Tabela 1. Tentativas de cultivo da *Candidatus Liberibacter* spp. em ordem cronológica

Entrada	Meio de Cultura	Composição	Referências
1	BBM (<i>babaco basal medium</i>)	Caldo BHI (20,34 g), α -cetogluturato (3,39 g), KOH (6,37 g), tampão ACES (16,95 g), manitol (33,9 g) em pH 6.9 + <i>P. acnes</i> (co-cultivo)	Davis <i>et al.</i> , 2008 ²⁴
2	Liber A	K ₂ HPO ₄ (1,5 g), KH ₂ PO ₄ (1,0 g), agar purificado (15 g/L), autoclavagem, banho-maria (55 °C), seguido por adição de NADP (10 mg), extrato de veia cítrica (20 mL) e cicloheximida (25 mg)	Sechler <i>et al.</i> , 2009 ²⁵
3	meio J50	Meio K (K ₂ HPO ₄ (0,15%), MgSO ₄ ·7H ₂ O (0,15%), polipeptona (2%), glicerina (1,5%), e ágar (1,5%) em pH 7,0) + suco da fruta infectada por CLas	Parker <i>et al.</i> , 2014 ²⁸
4	meio G50	Meio K + suco de toranja comercial purificado (1:1)	Parker <i>et al.</i> , 2014 ²⁸
5	meio G	Suco de toranja	Parker <i>et al.</i> , 2014 ²⁸
6	caldo BM7	α -cetogluturato (2 g), KOH (3,75 g), tampão ACES (10 g) e água (550 mL) em pH 6.5 a 27°C. Posteriormente, autoclavado a 121 °C e foi adicionado soro bovino fetal (150 mL) e TNM-FH (300 mL)	Fagen <i>et al.</i> , 2014 ²²
7	MBR	α -cetogluturato (2 g), tampão ACE (10 g), KOH (3,75 g), Mistura salina 100x (10 mL), tampão fosfato, 1 mol.L ⁻¹ , pH 7,0 (10 mL), água (880 mL). Posteriormente, ajustou pH 7,0 a 121 °C e foi adicionado soro bovino fetal (25 mL) e TNM-FH (75 mL), mistura de vitamina 100x (10 mL) e mistura de minerais (traço) 100x (10 mL)	Ha <i>et al.</i> , 2019 ²⁷

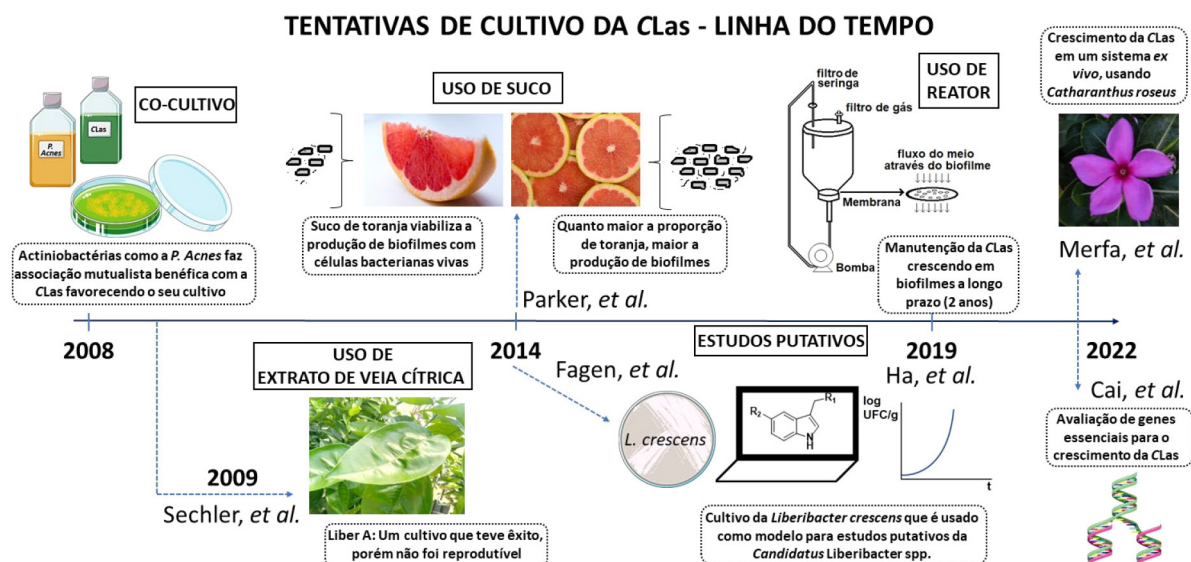


Figura 1. Linha do tempo que apresenta as diferentes tentativas de cultivo *in vitro* da *Candidatus Liberibacter* spp. e os resultados experimentais que indicam informações sobre as características bioquímicas do fitopatógeno

da CLas em condições laboratoriais, podendo vir a ser esse uma composição de nutrientes necessária para se conseguir um aumento do crescimento axênico dessa bactéria. No entanto, ainda não foi possível conseguir o crescimento exponencial sustentado da CLas e nem de desenvolver colônias em meio sólido.³⁴

Ainda em 2022, uma avaliação comparativa do genoma da *Liberibacter crescens* e da CLas através de modelagem computacional foi feita por Cai *et al.*, além da comparação com outras espécies de bactérias que não são cultiváveis.³⁵ O estudo teve por finalidade discutir os genes essenciais para o crescimento da CLas, baseando-se em pesquisas como o de Lai *et al.*³⁶ Os autores sugerem que o cultivo bem sucedido da CLas exigirá a transferência e a expressão de um conjunto completo de pelo menos 95 genes da *Liberibacter crescens*. Além disso, o modelo tem sido aperfeiçoado a fim de compreender melhor as redes reguladoras de genes e as proteínas hipotetizadas pelo modelo. Com relação aos nutrientes de cultivo, o modelo indicou que todas as cepas de CLas avaliadas foram classificadas como dependentes de metabólitos adicionais, tais como: carboidratos, aminoácidos, nucleotídeos, vitaminas, entre outros.³⁵

O cultivo axênico da *Candidatus Liberibacter asiaticus*, bem como de outras bactérias desse mesmo gênero possibilitaria: avaliar completamente a sua virulência através dos diferentes genótipos da CLas; identificar compostos produzidos pela CLas e poder avaliar com maior exatidão a sua natureza bioquímica; realizar estudos para a compreensão da patogenicidade da CLas e como ocorre o processo de transmissão entre o inseto e a planta; desenvolver novos métodos de controle da doença baseado nas interações biológicas que o fitopatógeno realiza com os insetos e os hospedeiros, bem como avaliar os compostos anti-CLas; preencher a todos os critérios do postulado de Koch, para que possa ser estabelecido definitivamente a relação causal entre o agente etiológico e a doença.²

3. Identificação dos fatores de virulência da bactéria *Candidatus Liberibacter spp.*

Durante uma infecção, a planta hospedeira produz uma série de estratégias de defesa para impedir a invasão e frear as estratégias usadas pelo patógeno para subverter ou enganar o seu sistema de defesa.³⁷ As fitotoxinas produzidas por um fitopatógeno, assim como componentes celulares microbianos, que auxiliam na colonização e tornam o hospedeiro mais suscetível ao ataque, são classificados como fatores de virulência.³⁸ A investigação dos fatores de virulência é importante para o entendimento do metabolismo do fitopatógeno durante a infecção e também um passo para a tentativa de encontrar formas de controlar a doença.

Como mencionado anteriormente, pouco se sabe a respeito do metabolismo da *Candidatus Liberibacter spp.*, logo, são escassas as informações sobre os fatores de

virulência destas bactérias. Assim, alguns componentes estruturais bacterianos e compostos envolvidos nos mecanismos de colonização do hospedeiro e aqueles que garantem a sobrevivência da bactéria na planta, são atribuídos como potenciais fatores de virulência. Dentre eles, destacam-se flagelos bacterianos, sistemas secretores de proteínas, profagos, lipopolissacarídeos e a enzima ácido salicílico hidroxilase.³⁹⁻⁴⁰

Os flagelos bacterianos são organelas responsáveis pela motilidade do organismo em meio líquido, mas também podem ser descritos como potenciais fatores de virulência em bactérias patógenas.⁴¹ A motilidade é importante na interação patógeno-hospedeiro, contribuindo para a invasão e aderência do agente infeccioso no hospedeiro.⁴² Muitas vezes, a expressão de genes que codificam os flagelos bacterianos é suprimida em fitopatógenos, evitando desencadear a resposta de defesa da planta contra o patógeno.⁴¹ De fato, a expressão de genes flagelares na CLas é consideravelmente maior nos insetos psílídeos do que na planta hospedeira, sugerindo que os flagelos possam ter diferentes funções dependendo do ambiente.⁴³⁻⁴⁴ Isso sustenta a ideia que o movimento da CLas na planta não é mediado por flagelos, mas através da seiva do floema da planta.^{39,43} Assim, após a transmissão da bactéria através do psílídeo, ela permanece no broto infectado por um período de 10 a 15 dias, já que sua mobilidade é reduzida, até que as folhas se tornem infecciosas.⁴³ O intervalo de tempo entre a transmissão e o aparecimento dos sintomas da HLB pode representar uma possibilidade para um controle mais direcionado da doença.^{40,43}

Sistemas secretores de proteínas estão entre os mais importantes componentes celulares bacterianos que conferem virulência ao patógeno.⁴⁵ Através deles, a bactéria secreta efetores e toxinas que facilitam a invasão no hospedeiro, causam os sintomas da doença e eliminam competidores.⁴⁵⁻⁴⁶ Genes que codificam aparatos de secreção proteica tripartida do tipo I (T1SS) foram putativamente identificados em sequências gênicas de *Liberibacter*s, inclusive da CLas.⁴⁵ O T1SS é composto por três componentes proteicos e é comum em outras bactérias patógenas Gram-negativas para aquisição de nutrientes e secreção de fatores de virulência.^{39-40,45,47} A contribuição deste sistema para a secreção de fatores de virulência da CLas ainda deve ser determinada.³⁹⁻⁴⁰

A CLas também possui uma via secretora geral completa (Sec).³⁹ A via Sec é capaz de transportar proteínas em seu estado desnaturado através da membrana citoplasmática.⁴⁶ As proteínas transportadas podem ser de diferentes funções, inclusive aquelas importantes para a virulência do patógeno.⁴⁵ Algumas bactérias patógenas Gram-negativas já foram descritas na literatura por usar a via Sec para o transporte de fatores de virulência, como *Vibrio cholerae*, *Klebsiella pneumoniae* e *Yersinia enterocolitica*, além de outras bactérias fitopatogênicas.^{39,46} O genoma da CLas também contém genes que codificam um sistema de secreção autotransportador do tipo V (T5SS), geralmente

responsável por secretar fatores de virulência.^{40,48}

Na bactéria *Ca. Liberibacter solanacearum* foram observadas vesículas de membrana externas (VME).⁴⁷ Como VMEs já foram descritas por secretar fatores de virulência em outros patógenos, acredita-se que elas possam estar envolvidas na secreção de efetores Sec-dependentes em liberibactérias.³⁹ Pitino *et al.*, 2016 identificaram putativamente 16 efetores da CLas através de análises de bioinformática e promoveram a expressão transitória desses efetores em *Nicotiana benthamiana* e reportaram os fenótipos observados.⁴⁹ Entre os 16 efetores, o Las5315mp, localizado em vesículas ao redor do cloroplasto da planta, induziu necrose ou morte celular nas folhas de *Nicotiana benthamiana*, além de causar deposição do polissacarídeo calose nas células da planta.⁴⁹ Estes resultados sugerem que o Las5315mp causa uma interferência no sistema imunológico do hospedeiro, mas seu papel na virulência da CLas ainda deve ser melhor investigado. Não foram encontrados homólogos do Las5315mp no genoma de outras liberibactérias.³⁹

Apesar dos sistemas de secreção presentes em liberibactérias estarem bem descritos na literatura, os mecanismos envolvidos no transporte de proteínas e fatores de virulência da CLas para o hospedeiro ainda são desconhecidos.

Um profago é um genoma de bacteriófago integrado no genoma bacteriano. Eles podem ser uma fonte de genes que confirmam novas funções, como produção de fatores de virulência e resistência a antibióticos ao hospedeiro.⁵⁰ Já foram identificados, putativamente, quatro tipos de profagos nas sequências de CLas e acredita-se que alguns genes codificados por esses profagos sejam responsáveis por auxiliar a CLas a vencer a resposta imune do planta.³⁹ Por exemplo, o gene de profago SC2-gp095 codifica uma enzima peroxidase, responsável por degradar espécies reativas de oxigênio.⁴⁰ Na expressão transitória do gene SC2-gp095 em *Nicotiana benthamiana* houve a degradação de H₂O₂, o que regulou negativamente a expressão de uma importante oxidase de sinalização de defesa em plantas.⁴⁰ Hao *et al.*, 2019 fizeram expressão transitória da proteína putativa LASP₂₃₅, a qual é codificada por gene de profago em uma cepa de CLas, em *Nicotiana benthamiana*.⁵¹ Os autores observaram sintomas relacionados ao HLB, como clorose foliar e retardamento de crescimento da planta.⁵¹

O envolvimento de lipopolissacarídeos (LPS) na virulência de liberibactérias também é investigado. LPSs são macromoléculas compostas por um lipídio A, um oligossacarídeo e um antígeno O que se encontram em membranas externas de bactérias Gram-negativas. Os LPSs são importantes para a manutenção da membrana celular das bactérias, além de protegê-las de estresses químicos. LPSs de bactérias fitopatógenas podem desencadear respostas imunes de plantas, como a deposição de calose, um sintoma comum causado pela CLas.⁵² Yan *et al.* fizeram uma avaliação detalhada da expressão de genes da CLas no psilídeo *Diaphorina citri* e na planta *Citrus sinensis* e

reportaram uma superexpressão dos genes que codificam LPS *in planta*, mas não no inseto.⁴²

O ácido salicílico (AS) é um importante mediador de respostas imunes em plantas, atuando, principalmente, como um sinal de defesa endógeno.³⁹ Seu derivado salicilato de metila, por exemplo, é um importante sinalizador químico para a resistência sistêmica adquirida de plantas.⁵³ O gene *sahA*, o qual codifica a enzima ácido salicílico hidroxilase, é conservado em todas as liberibactérias e é altamente expresso na bactéria em hospedeiros citros.⁴⁰ Acredita-se que a CLas utiliza a AS hidroxilase para degradar o AS produzido pela planta, suprimindo a sinalização de defesa desta.³⁹

Wang *et al.*, 2017 sugeriram um modelo de mecanismo de virulência de liberibactérias. Segundo os autores, a bactéria secreta efetores e outros fatores de virulência através de seus sistemas de secreção no floema da planta, que atacam ou suprimem o sistema imune do hospedeiro, causando morte celular, necrose, mal funcionamento do floema e outros sintomas da HLB.³⁹ As liberibactérias podem desencadear a resposta imune da planta através da interação entre LPS e outras proteínas de membrana da bactéria com as células do floema, o que pode provocar a produção de metabólitos secundários e deposição e acúmulo de calose e proteínas no floema, afetando o funcionamento do transporte da seiva.³⁹ Os autores acreditam que os sintomas posteriores da HLB, como transporte reduzido de nutrientes, declínio das raízes e manchas, são decorrentes do mau funcionamento do floema e não da infecção por liberibactérias *in si*.³⁹

4. Análises das interações fitopatógeno-planta e a busca por biomarcadores da doença HLB

As interações fitopatógeno-planta podem ser também estudadas a partir de uma outra perspectiva. O estudo pode ser direcionado em análises de moléculas sinalizadoras ou de compostos que são produzidos durante o processo de defesa das plantas, essas moléculas são chamadas de biomarcadores e podem ser detectados e quantificados de modo reproduzível, indicando assim o estado de saúde do organismo.^{34,54} Nesse sentido, o avanço das pesquisas ômicas (metabolômica, proteômica, genômica, *etc.*) possibilitou o aumento do número de novos biomarcadores identificados de diferentes doenças tanto em plantas, quanto em animais e humanos.⁵⁵⁻⁵⁷

No caso da HLB, a detecção dos biomarcadores durante o estágio assintomático, aquele em que a planta ainda não manifestou nenhum sintoma da doença, abre caminho para a detecção da HLB nesse estágio. Nesse sentido, a descoberta de biomarcadores pode tornar viável o desenvolvimento de ferramentas de trabalho agropecuário (biosensor, kit, *etc.*) que possa ser usado em campo para o monitoramento do estado de saúde dos pomares.⁵⁸ A Tabela 2 apresenta os biomarcadores que foram identificados para a doença HLB e a Figura 2 mostra a estrutura química dos diferentes

Tabela 2. Biomarcadores da progressão da doença HLB identificados por diferentes técnicas analíticas

Entrada	Biomarcadores	Técnicas Analíticas ^a	Níveis em plantas infectadas	Referências
1	Ácido cítrico	GC-MS e LC-MS	Aumenta em frutos	Hung & Wang, 2018 ⁵⁹
2	Ácido málico	GC-MS e LC-MS NMR	Diminui em frutos e folhas (no estágio sintomático) Aumenta em folhas durante período de inóculo	Hung & Wang, 2018 ⁵⁹ Jones <i>et al.</i> , 2012 ⁶⁰ Freitas <i>et al.</i> , 2015 ⁶¹
3	Ácido quínico	GC-MS DESI-MSI	Aumenta em folhas	Jones <i>et al.</i> , 2012 ⁶⁰ Pontes <i>et al.</i> , 2020 ⁶²
4	<i>trans</i> -Cariofileno	GC-MS	Diminui em folhas	Cevallos-Cevallos <i>et al.</i> , 2010 ⁶³
5	β -Elemeno	GC-MS	Diminui em folhas	Cevallos-Cevallos <i>et al.</i> , 2010 ⁶³
6	Fenilalanina	GC-MS e LC-MS DESI-MSI	Diminui em frutos e aumenta em folhas	Hung & Wang, 2018 ⁵⁹ Pontes <i>et al.</i> , 2020 ⁶²
7	α -Humuleno	GC-MS	Diminui em folhas	Cevallos-Cevallos <i>et al.</i> , 2010 ⁶³
8	Kaempferol-3-O-Soforosídeo	MS	Aumenta em folhas e raízes	Li <i>et al.</i> , 2019 ⁶⁴
9	Nobiletina	GC-MS e LC-MS DESI-MSI	Aumenta em frutos e folhas	Hung & Wang, 2018 ⁵⁹ Pontes <i>et al.</i> , 2020 ⁶²
10	Prolina	GC-MS	Aumenta em folhas	Cevallos-Cevallos <i>et al.</i> , 2010 ⁶³
11	Sacarose	DESI-MSI MS NMR	Aumenta em folhas e raízes	Pontes <i>et al.</i> , 2020 ⁶² Li <i>et al.</i> , 2019 ⁶⁴ Freitas <i>et al.</i> , 2015 ⁶¹

^a As abreviaturas e acrônimos das técnicas estão escritas em inglês, assim temos: DESI-MSI - Electrospray por Dessorção acoplado ao Imageamento Químico por Espectrometria de Massas; GC-MS - Cromatografia Gasosa hifenada a Espectrometria de Massas e LC-MS - Cromatografia Líquida hifenada a Espectrometria de Massas; NMR - Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear.

biomarcadores que foram identificados em diferentes tipos de amostra das plantas - fruto, folha, ramos e raízes.

Hung & Wang fizeram um estudo metabolômico usando GC-MS e LC-MS para determinar metabólitos diferenciais do HLB a partir de amostras de sucos que foram obtidas de 30 laranjas da variedade Hamlin. Após análises estatísticas e quimiométricas (PLS-DA, *Partial Least Square-Discriminant Analysis*) foi concluído que quatro metabólitos tiveram diferenças significativas em frutos assintomáticos e sintomáticos, sendo que nobiletina (1) e ácido cítrico (2) tiveram um aumento na concentração conforme a progressão da doença, enquanto que o ácido málico (3) e a fenilalanina (4) diminuíram (Figura 2a).⁵⁹

A nobiletina (1), assim como outros flavonoides presentes em frutas cítricas atuam no processo de defesa da planta contra diferentes fitopatógenos através de mecanismos não totalmente conhecidos, causando o acúmulo desses compostos nas frutas e formando uma barreira de defesa.⁶⁵⁻⁶⁶ Já o ácido cítrico (2), assim como outros ácidos orgânicos, tais como o ácido quínico e ácido ascórbico, apresentam uma maior concentração em frutas infectadas, com exceção do ácido málico (3), ao qual a diminuição na concentração pode indicar um maior consumo desse metabólito para poder manter as funções normais da via do ácido cítrico e também manter o sistema de defesa da planta através do consumo de outros substratos.^{59,61} No

entanto, não existe um consenso geral na literatura científica entre os valores de pH dos sucos infectados pela CLAs e uma compreensão aprofundada sobre essas variações,⁶⁷ o que se sabe é que o aumento de ácidos orgânicos normalmente está associado tanto com o estresse biótico como abiótico da planta.⁶⁸ Durante o processo de infecção ocorre também a diminuição da concentração de fenilalanina (4) na fruta, pois esse aminoácido é convertido a ácido *trans*-cinâmico, um precursor de vários fenilpropanóides, tais como ligninas, cumarinas e flavonoides.⁶⁹ A conversão de fenilalanina a ácido *trans*-cinâmico é uma reação mediada pela fenilalanina amônia liase, enzima que tem a sua síntese estimulada durante o ataque do patógeno.⁵⁹

Análises de amostras de folhas de *Citrus sinensis* (Figura 2b) por imageamento químico por espectrometria de massas (DESI-MSI) indicou uma maior concentração de diferentes metabólitos no estágio mais avançado da doença HLB. Ao todo foram 21 metabólitos de diferentes classes químicas putativamente anotados e considerados potenciais biomarcadores da HLB, entre esses destacam-se ácidos orgânicos, carboidratos, fitohormônios, aminoácidos e flavonoides.⁶²

O imageamento químico possibilita identificar qualitativamente a distribuição de íons de diferentes valores de *m/z* em amostras planas tais como tecidos vegetais,⁷⁰ cascas de frutas,⁷¹ culturas de microrganismos⁷² e tecidos

BIOMARCADORES IDENTIFICADOS NOS DIFERENTES TIPOS DE AMOSTRA

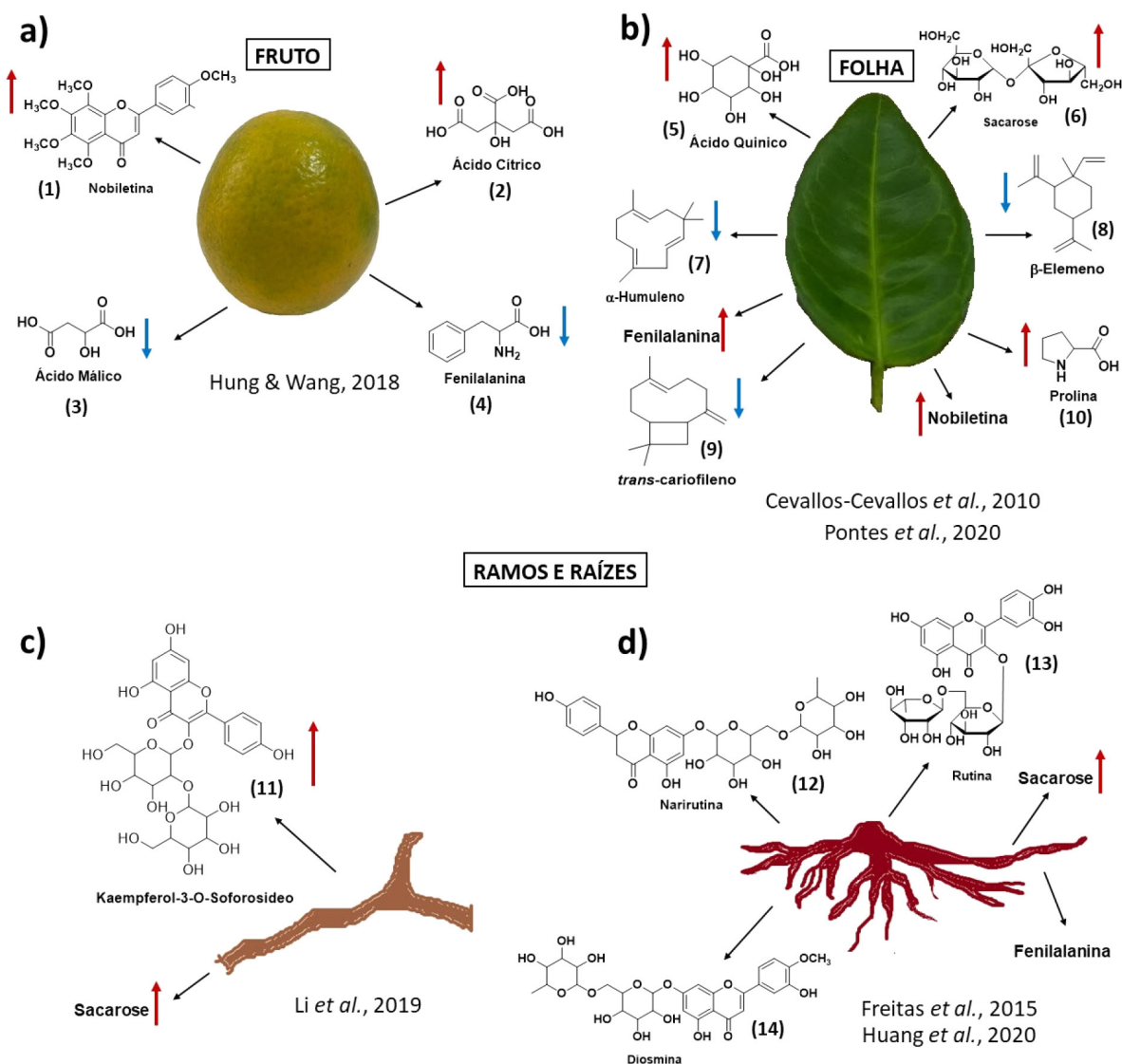


Figura 2. Biomarcadores do HLB identificados em diferentes tipos de amostras que foram coletadas de *Citrus sinensis*: (a) frutos; (b) folhas; (c) galhos; (d) raízes. As setas de coloração azul indicam a diminuição da concentração dos metabólitos com o progresso do processo de infecção e as setas em vermelho indicam o aumento. Os metabólitos que não estão acompanhados da seta são biomarcadores relacionados à qualidade do sabor das frutas

humanos.⁷³ Apesar de DESI-MSI não ser uma técnica quantitativa, o imageamento químico permite identificar onde existe um maior acúmulo do íon na superfície da amostra. Além disso, como as anotações foram feitas através de comparações dos espectros de LC-MS/MS com bancos de dados,⁷⁴ DESI-MSI é considerada uma potencial técnica para ser utilizada em método de diagnóstico da HLB, sendo então necessárias pesquisas futuras para poder validar esse método. Sendo assim, entre os 21 compostos que foram anotados, foram destacados apenas 4 metabólitos (ácido quínico (5), sacarose (6), fenilalanina e nobiletina) como biomarcadores da HLB, uma vez que esses já haviam sido anteriormente reportados na literatura como biomarcadores da HLB.^{59,60,75-76}

O ácido quínico é um ácido orgânico pertencente ao

metabolismo primário presente nas folhas das laranjeiras que pode ser convertido a ácido chiquímico, que por sua vez intermedia a biossíntese de vários metabólitos secundários que participam no processo de defesa da planta.⁷⁷⁻⁷⁸ O aumento da concentração de ácido quínico em plantas infectadas pela CLAs tem sido reportado em vários resultados de pesquisas.^{59,60,62} Enquanto que a sacarose, assim como outros açúcares, além de exercer determinadas funções biológicas (metabólica e estruturais), pode vir a participar também, em algumas situações, como um composto sinalizador que pode alterar a expressão de genes relacionados ao desenvolvimento da planta.⁷⁶ O aumento da concentração de açúcares como a sacarose e a glicose induz a inibição do processo de fotossíntese, reprime os genes relacionados a este processo e também causa a diminuição

da clorofila, por isso as folhas perdem gradualmente a sua coloração esverdeada.^{64,76,79}

Vários trabalhos têm reportado o aumento da concentração de fenilalanina em folhas em função do processo de infecção da CLAs,^{62,75,80} diferentemente do que tem sido observado nos frutos.⁵⁹ A fenilalanina é um dos precursores do ácido salicílico, um fitormônio que participa como sinalizador no processo de defesa da planta.⁸¹ Slisz *et al.* sugeriram que a maior concentração de fenilalanina em folhas infectadas pela CLAs esta relacionada à inibição da via biossintética dos fenilpropanóides, desta forma a produção de ácido *trans*-cinâmico é afetada.³² Contudo, Killiny & Nehela acreditam que a CLAs não consegue suprimir a resposta de defesa da planta pela inibição da fenilalanina amônia liase, uma vez que os seus resultados de pesquisa indicaram um aumento nas concentrações de ácido benzóico e ácido salicílico junto com um aumento de nível de seus genes biossintéticos (*CitPAL* e *CitICS*).⁸⁰

A atividade enzimática da fenilalanina amônia liase aumenta após o processo de infecção pela CLAs, além disso essa atividade é dependente dos fatores abióticos e bióticos sofridos pela planta.⁸² No entanto, uma comparação direta da atividade enzimática da fenilalanina amônia liase em diferentes partes da planta não foi determinada. Talvez, isso poderia esclarecer as diferentes concentrações de fenilalanina encontradas em folhas e frutos após o processo de infecção pela CLAs.

Em análises metabolômicas por GC-MS em folhas de *Citrus sinensis* saudáveis, folhas portadoras de deficiência em zinco e folhas infectadas por CLAs foi observado que a prolina, α -humuleno (7), β -elemeno (8) e *trans*-cariofileno (9) foram metabólitos diferenciais para separar as plantas infectadas dos demais grupos.⁶³ A prolina (10) apresentou uma maior concentração no grupo das infectadas, sendo esse aminoácido um biomarcador relacionado a estresses biológicos e fisiológicos e, portanto, não é considerado um biomarcador específico da doença HLB.^{63,83} Os sesquiterpenos α -humuleno, β -elemeno e *trans*-cariofileno apresentaram uma menor concentração no grupo das folhas sintomáticas, sugerindo que existe um efeito de inibição dos sesquiterpenos nos estágios mais avançados da doença, aumentando a suscetibilidade da planta à HLB, uma vez que esses compostos apresentam atividade antimicrobiana contra diferentes fitopatógenos e eles podem estar associados ao processo de defesa da planta contra a CLAs.^{63,84}

Amostras de ramos e folhas (Figura 2c) foram analisadas através de espectrometria de massas por ionização direta e análises quimiométricas. As análises em modo positivo indicaram que dois íons de m/z 381 [$C_{12}H_{22}O_{11} + K$]⁺ e 649 [$C_{27}H_{30}O_{16} + K$]⁺ estavam presentes em uma maior concentração nas amostras infectadas pela CLAs, sugerindo esses dois compostos como possíveis biomarcadores da doença HLB. Os íons foram respectivamente anotados putativamente como sendo a sacarose e um flavonóide ionizado com potássio [$M + K$]⁺; sendo sugerido o

kaempferol-3-O-soforosídeo (11) ou seu isômero luteolina-7-O-soforosídeo como um dos possíveis flavonoides. As anotações foram feitas baseadas na literatura e no fato de que dissacarídeos e flavonoides são metabólitos importantes em frutas cítricas. Além disso, eles foram reportados como biomarcadores da HLB, uma vez que o metabolismo de açúcares e amido, bem como os genes relacionados, são diretamente afetados durante o processo de infecção.^{64,85}

Freitas *et al.* também identificaram através de espectros de RMN de ¹H um acúmulo de sacarose em amostras de raízes (Figura 2d) de *Citrus sinensis* infectadas pela CLAs.⁶¹ A concentração elevada de sacarose corrobora com os resultados encontrados em amostras de folhas⁶² e ramos⁶⁴ e pode indicar também que existe um colapso no transporte de floema da planta infectada pela CLAs.⁶¹

Muitas das pesquisas relacionadas à doença HLB usando amostras de raízes (Figura 2d) estão associadas com a tolerância de diferentes variedades de plantas cítricas frente ao fitopatógeno e com a qualidade da fruta.⁸⁶⁻⁸⁸ Nesse sentido, Huang *et al.* analisaram por LC-MS amostras de raízes e enxertos combinados de *Citrus* sp. (“Laranja-3”) e outros dois pares de um cruzamento de híbridos somáticos alotetraplóides complexos chamados de “Laranja-14” e “Laranja-16” [(*Citrus clementina* × (*Citrus paradisi* × *Citrus reticulata*)) + *Citrus maxima*] × [*Citrus reticulata* + *Poncirus trifoliata*], sendo quatro amostras de cada um desses grupos (Laranja-3, 14 e 16) que foram enxertados com dois soma clones regenerados diferentes (OLL-4 e OLL-8) durante os anos de 2018 e 2019. As análises indicaram alguns metabólitos que foram considerados biomarcadores relacionados à qualidade da fruta, entre esses foram encontrados: a fenilalanina, narirutina (12), rutina (13) e diosmina (14).⁸⁶ Pela análise do gráfico de *VIP score* (*variable importance projection*) da Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) foi possível correlacionar esses metabólitos com as características das frutas. Desta forma, a concentração de diosmina foi associada com o gosto do suco, enquanto que o teor de narirutina foi associado ao amargor primário da fruta.⁸⁸ Esses resultados são importantes para a indústria, uma vez que pode ajudar no monitoramento da qualidade do sabor das frutas e a desenvolver estratégias de otimização através da enxertia para manter a qualidade do suco.⁸⁶

5. Abordagens ômicas como estratégia de compreensão da doença Huanglongbing

Entender a resposta dos citros ao patógeno pode contribuir com a compreensão sobre como as bactérias *Candidatus Liberibacter* spp. afetam seus hospedeiros. Nesse sentido, as abordagens ômicas permitem uma investigação completa de cada aspecto de um organismo, seja gene (genômica), transcritos (transcriptômica), proteínas (proteômica) e metabólitos (metabolômica).⁸⁹ A combinação de diversas abordagens ômicas permitem, por

consequente, um entendimento abrangente dos sistemas de um organismo. Por isso, diversos estudos têm usado tecnologias ômicas para investigar o efeito da CLas no metabolismo de seus hospedeiros.⁹⁰

Análises metabolômicas de laranjas Valência desenvolvidas por Slisz *et al.* revelaram diferenças no metabolismo de frutas saudáveis e infectadas com CLas (assintomáticas e sintomáticas), com ênfase em alterações nas concentrações de açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos, limonina glicosídeo e limonina. Aminoácidos como a prolina e arginina foram observados infraregulados nos frutos afetados pela HLB. A diminuição das concentrações de prolina e arginina sugere um mecanismo da bactéria para suprimir os mecanismos de defesa da planta e, consequentemente, contribuir para a sua patogenicidade.³²

Martinelli *et al.* realizaram análises transcriptômicas de folhas e frutos de laranja Valência (saudáveis e infectadas por CLas, sintomáticas e assintomáticas). Os dados revelaram alterações transcriptômicas de genes relacionados com reações fotodependentes (infraregulação), com o metabolismo de sacarose (supreregulação) e com a biossíntese de amido (supreregulação) em plantas afetadas pela CLas. Além disso, o estudo de Martinelli *et al.* indicou a supreregulação de genes (*lox1*, *opr2*, *jaz10* e *jar1*) relacionados com a via de biossíntese de ácido jasmônico, ao qual é responsável pela resistência sistêmica da planta e normalmente é produzido em resposta à ataques de necrotróficos.⁹¹ Outro estudo transcriptômico desenvolvido por Martinelli *et al.* indicou o aumento da transcrição de genes associados com as reações fotossintéticas, dos níveis de transcritos envolvidos na degradação de proteínas e nas vias do ácido salicílico e do ácido jasmônico na casca de frutos de laranja Valência infectados pela bactéria CLas. Além disso, o estudo também indicou que a HLB afetou as vias envolvidas na comunicação fonte-dreno,⁹² ou seja, a relação existente entre um órgão fotossintético/reserva da planta (fonte) com o tecido vegetal em crescimento (dreno) que é dependente da primeira, sendo essa uma das abordagens utilizadas em diferentes tipos de culturas de plantas como na citricultura.⁹³⁻⁹⁴ Neste caso, a HLB afetou o metabolismo de sacarose e amido (fonte) levando ao acúmulo de amido em folhas (dreno) e consequente diminuição da fotossíntese.⁹²

Chin *et al.* combinaram análises transcriptômicas, proteômicas e metabolômicas para entender mudanças metabólicas em folhas de laranja Washington Navel (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) infectadas por CLas durante o período de progressão da doença. Através desse estudo, os resultados indicaram que os níveis de proteínas e de expressão de genes ligados à fotossíntese eram baixos em plantas infectadas durante os estágios mais avançados da doença. Os níveis baixos de proteínas ligadas à fotossíntese foram identificados 8 semanas após a inoculação do patógeno. Além disso, os resultados indicaram um acúmulo de açúcar durante a progressão da HLB, bem como o aumento dos níveis de

proteínas e de expressão de genes ligados à degradação e modificação da parede celular nas amostras infectadas durante os estágios mais avançados.⁹⁰ Na literatura, existem estudos que reportaram tanto o aumento quanto a diminuição da expressão gênica relacionada à fotossíntese da planta em plantas sintomáticas, ao qual pode variar com a maturidade do fruto e quantidade de semanas que se passaram pós-inóculo da CLas.^{90,92}

Um estudo metabolômico comparando cultivares de *C. reticulata* saudáveis e infectadas com diferentes sensibilidades a HLB realizado por Suh *et al.* revelou diferenças metabólicas entre os grupos. As amostras deste estudo foram divididas em quatro grupos: um grupo saudável e tolerante a HLB, um grupo saudável e sensível a HLB, um grupo infectado e tolerante, e por fim, um grupo infectado e sensível a HLB. As vias metabólicas de aspartato e glutamato, de purinas e de biossíntese de hormônios vegetais se mostraram reguladas positivamente nas amostras tolerantes a HLB. Metabólitos da via das purinas são derivados da via metabólica do aspartato e glutamato, enquanto alguns metabólitos intermediários são utilizados como substratos na biossíntese de hormônios vegetais.⁹⁵ Os autores verificaram que os metabólitos asparagina e glutamina estavam supreregulados nos cultivares tolerantes e sensíveis, em ambos os grupos (saudável/infectado), indicando que a asparagina e a glutamina apresentam funções associadas às respostas dos citros à doença, e possivelmente de tolerância à doença. O estudo associou os níveis elevados desses aminoácidos com a utilização deles como substratos na via metabólica de purinas, visto que alguns metabólitos intermediários supreregulados estariam envolvidos na biossíntese e no metabolismo de degradação de purina. Os produtos da biossíntese de purina acumulados, como adenosina 5'-monofosfato (AMP) e adenosina 5'-difosfato (ADP), por sua vez, seriam utilizados para sintetizar citocininas e regular auxinas na via de biossíntese de hormônios vegetais. Os níveis elevados de purinas como AMP, ADP e guanosina 5'-monofosfato (GMP) nos cultivares tolerantes pode contribuir nas vias catabólicas visto que os produtos finais dessas vias requerem de adenosina 5'-trifosfato (ATP) e guanosina 5'-difosfato (GDP), os quais são derivados dos precursores AMP e GMP, respectivamente. Sendo assim, os resultados do estudo de Suh *et al.* indicam que o catabolismo é possivelmente regulado positivamente em cultivares tolerantes a HLB.⁹⁵

Suh *et al.* também correlacionaram através de estudos metabolômicos a supreregulação de auxinas e citocininas em cultivares tolerantes a HLB com a supreregulação do metabolismo de purinas e das vias catabólicas, visto que tais vias podem produzir ATP e, consequentemente, gerar e regular hormônios vegetais como auxinas e citocinas. A presença de auxinas aumenta significativamente o crescimento de frutas cítricas, promove o desenvolvimento e, quando presente em conjunto com citocininas, promove a regeneração do tecido vascular da planta. Metabólitos de degradação de purinas, como xantina e ácido úrico, também

podem contribuir para o crescimento da planta, pois são fontes de nitrogênio através de processos de degradação para obtenção de amônia.⁹⁵ Estudos anteriores apontaram que a infecção por CLas gera uma deficiência de nitrogênio em seus hospedeiros cítricos,⁹⁶ por isso o acúmulo de metabólitos como xantina e ácido úrico em cultivares tolerantes a HLB podem auxiliar a prevenir a deficiência de nitrogênio em hospedeiros infectados.⁹⁵

Em contrapartida, o estudo de Suh *et al.* indicou que metabólitos ligados à via de sinalização do ácido salicílico estavam regulados negativamente em cultivares tolerantes a HLB. Os resultados sugerem que os cultivares tolerantes a HLB priorizam o crescimento com a regeneração do floema frente a ativação das respostas de defesa para enfrentar a infecção, enquanto o mecanismo oposto parece ocorrer nos cultivares sensíveis.⁹⁵

Também já foram realizadas análises metabolômicas de raízes de plantas infectadas por HLB. Apesar de a infecção por CLas se iniciar nas folhas dos citros, sabe-se que a bactéria também migra para as raízes da planta e que elas são danificadas antes mesmo do aparecimento dos sintomas foliares da doença.⁹⁷⁻⁹⁸ Entretanto, pouco se sabe a respeito do impacto causado no metabolismo das raízes devido a infecção.

Padhi *et al.* estudaram copas de limoeiro (*Citrus limon* L. Burm. f.) e laranjeira (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), enxertadas em Carrizo, infectadas com CLas e reportaram diferenças notáveis nos metabólitos das raízes de limoeiros saudáveis em comparação com as infectadas. Nas raízes da copa do limoeiro foi observada uma redução na produção de ácido quínico, ácido málico, metanol, etanol, citidina, sinefrina, aminoácidos, como alanina, treonina, leucina e valina, e o aminoácido não-proteico, GABA, o qual pode atuar como um sinalizador entre plantas e outros organismos, mas também como um modulador de crescimento de plantas, regulando o complexo proteico do transportador de ácido málico.^{97,99-100} Enquanto que as raízes das copas de laranjeiras não apresentaram muita alteração metabólica entre os dois grupos e houve um aumento na produção de ácido málico e ácido quínico com o processo de infecção pela CLas.⁹⁷

Em ambas frutas cítricas do estudo de Padhi *et al.*, houve uma redução da produção de açúcares, como sacarose, glicose e maltose, e de aminoácidos, como prolina e asparagina, e um aumento de trigonelina. A prolina está envolvida em respostas de defesa de plantas contra invasores,¹⁰¹ entretanto, a HLB causa uma redução da concentração deste aminoácido não só nos frutos,³² mas também nas raízes de citros, o que novamente pode sugerir uma relação com algum mecanismo da CLas de subversão do sistema de defesa da planta. A asparagina é um aminoácido envolvido no transporte e armazenamento de nitrogênio em plantas, e já foi reportado que a concentração deste aminoácido em raízes pode diminuir quando as fontes de nitrogênio do ambiente são escassas.^{97,102} A trigonelina é um metabólito secundário que se acumula e atua como

osmoprotetor durante condições de estresse em plantas.¹⁰³ Apesar das poucas semelhanças observadas no metabolismo de raízes de limoeiros e laranjeiras infectadas neste estudo, ficou claro que a variedade da planta hospedeira tem grande importância na resposta metabólica das raízes, o que mostra que estratégias de manejo da doença devem levar as variedades das plantas cítricas infectadas em consideração.⁹⁷

6. Análises do metabolismo dos insetos psílídeos

A rápida disseminação da doença HLB pode ser facilmente relacionada a dispersão da bactéria CLas realizada pelo inseto vetor psílídeo, da espécie *Diaphorina citri*. O psílídeo é o vetor primário da bactéria CLas, sendo o agente causador da doença HLB (ou greening) em citros.¹⁰⁴ O inseto vetor se alimenta do floema das plantas infectadas com a CLas, e a bactéria coloniza o psílídeo de forma circulativa e após o período de latência, o inseto tem competência para inocular a bactéria através da sua alimentação em plantas saudáveis. Diversos estudos sobre o comportamento dos psílídeos já foram realizados, levando a conclusões sobre a maior capacidade de voos de longa distância pelos insetos infectados e também a maior atração dos insetos machos pelas fêmeas da espécie.¹⁰⁵

Dessa forma, é possível perceber que a infecção causada pela CLas no inseto vetor afeta o comportamento dos insetos, o desenvolvimento da ninfa e o metabolismo. Entretanto, existem poucos estudos na literatura sobre as alterações metabólicas do psílídeo, comparando os insetos saudáveis e infectivos, assim como um estudo sobre o metabolismo das ninfas (Figura 3a).¹⁰⁵

Liu *et al.*¹⁰⁶ realizaram uma comparação entre os dados de transcriptômica e metabolômica, de insetos não infectivos e infectados com CLas utilizando LC-MS/MS. Eles conseguiram anotar mais de 300 metabólitos das análises gerais, e após análises mais detalhadas dos dados, como OPLS-DA (*Ortho-Partial Least Square-Discriminant Analysis*), 105 metabólitos foram indicados como sendo importantes na diferenciação de ambos os grupos de interesse. Os resultados mostraram que houve um aumento no nível de esteróides, como o ergosterol (15), flavonoides, como o castavinol (16), e nucleosídeos, como citocina (17) e 20-metilguanosina (18) nos insetos infectivos, quando comparados aos insetos sem a bactéria. Também observaram um aumento na produção de ácidos graxos e diminuição de amidas graxas, como oleamida (19) (Figura 3b). De maneira geral, as análises de transcriptômica apontaram que a infecção causada pela bactéria afeta o metabolismo de aminoácidos e lipídios.

Um outro estudo conduzido por Killiny *et al.*¹⁰⁷ reportou um estudo metabolômico não-alvo utilizando GC-MS, com insetos saudáveis e infectivos com CLas. O estudo foi realizado com as ninfas dos insetos, o que corresponde a um estágio imaturo do desenvolvimento do psílídeo. Diversos

metabólitos relacionados ao ciclo de Krebs mostraram-se em maior concentração nas ninfas infectadas com CLas, como ácidos graxos de 16 e 18 carbonos, o ácido hexadecanoico (20) e ácido esteárico (21), respectivamente, glicose, sacarose (6), L-prolina (10), L-serina (22), ácido piroglutâmico (23), ácido sacárico (24), ácido treonico e *myo*-inositol. Diversas classes foram anotadas, incluindo aminoácidos (AA), ácidos orgânicos (AO) e ácidos graxos (AG), e dentro dos AG, cinco dos seis metabólitos encontrados aumentaram nas amostras relacionadas aos insetos adultos, o que sugere um aumento de produção de ácidos graxos ou da atividade de lipases (Figura 3c).

Outra abordagem nesse mesmo trabalho de Killiny *et al.* também mostrou uma comparação metabolômica entre os insetos adultos e as ninfas. Embora seja o mesmo inseto apenas em estágios diferentes de vida, o metabolismo apresentou algumas distinções. Metabólitos como o ácido piroglutâmico, ácido málico e ácido succínico apresentaram menores níveis nos insetos adultos. Enquanto L-alanina, glicina, eritról, lixose apresentaram níveis mais baixos nas ninfas.¹⁰⁷ Embora exista uma diferença entre os níveis dos metabólitos nos insetos adultos comparados às ninfas, diversos metabólitos aumentaram em ambos os casos, quando compararam os insetos infectivos com os saudáveis, indicando fortemente como a presença da CLas pode afetar o metabolismo dos insetos, aumentando a produção de diversos metabólitos importantes para diversas vias metabólicas, como o do ciclo de Krebs e de ácidos graxos, por exemplo (Figura 3c).¹⁰⁷

7. Métodos alternativos para mitigar a doença HLB

A HLB é uma doença cítrica que não tem cura.¹⁷⁻¹⁸ Desta forma, citricultores e pesquisadores buscam por diferentes métodos para controlar a doença. Atualmente, alguns países

como o Brasil fazem esse controle através de uma ação tripla: 1-) O controle do vetor *Diaphorina citri* com o uso de inseticidas ou controle biológico com a *Tamarixia radiata*; 2-) a remoção das árvores infectadas; 3-) a realização de novos plantios usando mudas sadias. Por outro lado, alguns produtores da Flórida, por exemplo, optam por continuarem com as plantas infectadas sintomáticas e coletam apenas os frutos que são aproveitáveis.¹⁰⁸ No entanto, outros métodos de controle precisam ser elaborados, pois nem todos os países adotam o tipo de programa como o do Brasil, devido ao alto custo envolvido no processo. Além disso, os inseticidas utilizados contra a *Diaphorina citri* têm uma limitação de efetividade e podem inclusive selecionar populações resistentes.¹⁰⁹⁻¹¹¹ Uma vez observado esses problemas, muitos estudos estão sendo realizados com o objetivo de encontrar métodos alternativos aos utilizados atualmente que sejam menos nocivos que o uso dos inseticidas.

Um dos métodos que tem sido pesquisado atualmente, é o uso de nanocompostos. A nanotecnologia é capaz de modificar as propriedades físico-químicas de compostos pulverizados nas folhas, tornando-os mais absorvíveis, o que potencialmente permitiria uma ação mais eficiente no tratamento da HLB, embora estudos mais avançados sejam ainda necessários.¹¹² A proteína albumina nano-ZnO-2S, por exemplo, conseguiu inibir significativamente o crescimento de CLas, sendo mais solúvel e eficiente do que o composto similar com o mesmo agente metálico, o ZnO-nCuSi.¹¹³ Outro uso que está sendo estudado pelo grupo de pesquisa de Li *et al.* (2021)¹¹⁴ é a transferência de genes resistentes para os hospedeiros via nanomateriais.

Outro estudo preliminar relacionado a nanotecnologia é o uso de solução contendo nanopartículas de prata (AgNPs), chamada de ArgovitTM.¹¹⁵ Stephano-Hornedo *et al.* testaram a aplicação da solução de AgNPs em plantas cítricas e compararam com a eficiência de antibióticos comerciais a base de β -lactama. Eles reportaram uma maior

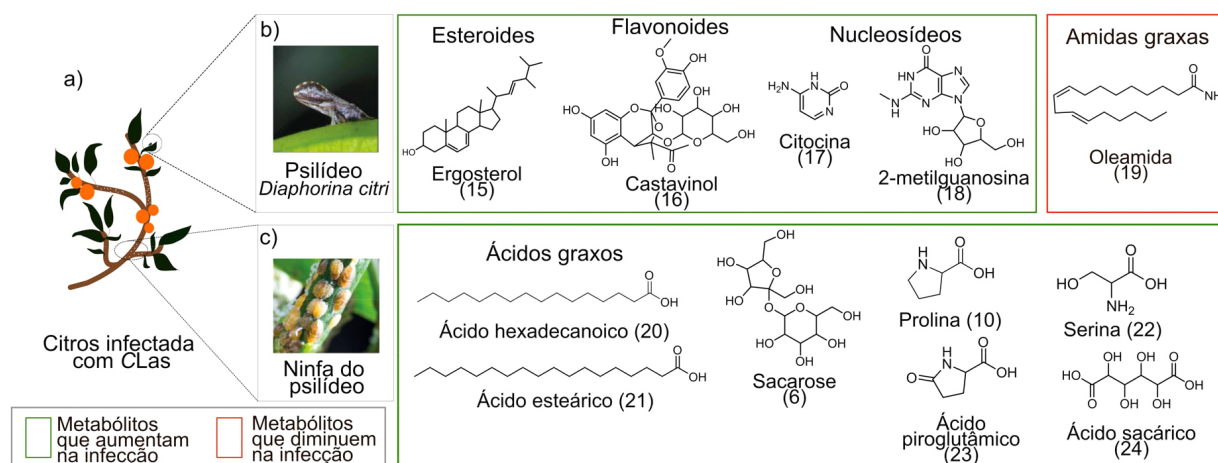


Figura 3. (a) Planta de citros infectada com CLas em diferentes estágios, com o inseto vetor e a ninfa. (b) Estudos metabolômicos com o inseto mostraram a variação de alguns metabólitos quando comparados os insetos infectivos e os saudáveis. Metabólitos como esteróides, flavonoides e nucleosídeos aumentaram nos insetos detectados com CLas, enquanto amidas graxas diminuíram. (c) Estudos sobre o metabolismo da ninfa também foram realizados, detectando diversas classes de metabólitos primários que aumentaram consideravelmente nas ninfas infectivas com a bactéria

eficiência da solução de AgNPs frente aos antibióticos, sendo essa eficiência da ordem 3 a 60 vezes maior, quando a solução foi aplicada nas folhas e 75 a 750 vezes maior, quando injetado nos troncos das árvores. Nesse estudo, foi observado através de análises por microscopia eletrônica de varredura que houve um acúmulo de amido nos vasos do floema de plantas infectadas pela CLAs, o qual não foi observado no grupo controle, enquanto que nas plantas tratadas com AgNPs, o acúmulo de amido foi reduzido e as bactérias não estavam presentes.¹¹³ A prata é conhecida por exibir atividade antibacteriana desde a antiguidade e as nanopartículas de prata, por sua vez, têm sido usadas para tratamento de diferentes infecções.¹¹⁶⁻¹¹⁷ Compostos de revestimento que são usados na preparação das nanopartículas de prata fornecem uma maior estabilidade a essas partículas e diminui a toxicidade dos íons pratas sem prejudicar sua atividade bactericida.¹¹⁵ Existem discussões na literatura sobre os riscos das nanopartículas de prata no meio ambiente,¹¹⁸ no entanto, no estudo de Stephano-Hornedo *et al.*¹⁰⁸ eles observaram que uma concentração de 50 mg/L de ArgovitTM, que é o equivalente a 27,8 µM de prata metálica, foi suficiente para causar efeitos benéficos em baunilha e cana-de-açúcar contra diferentes espécies microbianas, tais como: *Bacillus* sp., *Cladosporium cladosporioides* e *Penicillium* sp.^{115,119}

Outro método que vem sendo pesquisado, mas ainda com resultados preliminares, é o uso de indutores imunológicos químicos. Esses têm por objetivo ativar a imunidade vegetal para serem substitutos do ácido salicílico, que são facilmente degradados pelas enzimas ácido salicílico hidroxilases secretadas pelas bactérias patogênicas. Dentre os reagentes químicos exógenos que possuem essa função, estão sendo estudados o imidaclopride, ácido β-aminobutírico, 2,3-benzotiadiazol, 2,6-dicloroisoniazida e o acibenzolar S-metil (ASM) em que constatou-se que a pulverização ou injeção desses indutores no tronco do citros podem induzir a expressão de genes que aumentam a resistência da planta por determinado período de tempo.¹²⁰⁻¹²¹

Considerando que a falta de oligoelementos como zinco e fósforo na nutrição da planta estão associados a sintomatologia do HLB, melhorar a nutrição do citros na fase inicial da infecção pode mitigar os sintomas da doença e prolongar a vida das plantas.¹²² Contudo, apenas o aumento da nutrição não é capaz de controlar a doença, sendo necessário a utilização conjunta de fertilizantes nitrogenados ou mistos, bem como ativadores de defesa como um método paliativo que melhora o aspecto da planta.¹²³ Além disso, é necessário o cuidado em manter essas plantas que estão em estágio inicial de infecção isoladas das demais para que não ocorra a transmissão da doença HLB.

Em paralelo ao trabalho anteriormente citado, outro método químico utilizado por alguns citricultores é a implementação da aplicação foliar de macro e micronutrientes e isso tem dado resultados positivos contra doenças fúngicas e bacterianas.⁶⁵ Nesse sentido, Inoue *et al.* testaram a aplicação foliar de diferentes

soluções de íons ferro em plantas cítricas, uma vez que o ferro faz parte da nutrição da planta e é naturalmente absorvido pelas células vegetais por um mecanismo não conhecido.¹²⁴ Dessa forma, eles testaram as soluções de: Fe²⁺-citrato (1:3) denominada solução FC3; a solução de Fe²⁺-citrato (1:7) diluída em 15 mg/L de Fe denominada solução FC7, ao qual foi posteriormente dissolvida em Fe²⁺-citrato, Fe³⁺-citrato, sulfato ferroso e complexo Fe³⁺-EDTA. A aplicação foliar dessas soluções foi feita em plantas saudáveis e infectadas pela CLAs e os sintomas foram avaliados visualmente em diferentes períodos de tratamento: antes da aplicação foliar e 19, 102, 150 e 192 dias após a aplicação. Além disso, eles também fizeram o monitoramento do gene bacteriano por PCR e do índice de clorofila presente nas folhas durante os seguintes períodos: antes da aplicação foliar e 14, 54, 160, 192, 292, 575 e 1428 dias após o tratamento. As medidas de índice da clorofila da planta serviram para mostrar que as soluções de sulfato ferroso e do complexo Fe³⁺-EDTA não foram tão efetivas para o tratamento da doença HLB.¹²⁴ Neste mesmo estudo, os pesquisadores observaram visualmente que das 20 plantas, apenas três plantas infectadas que receberam o tratamento com as soluções FC3 e FC7 apresentaram o surgimento de novos brotos de caules após 19 dias da aplicação foliar. Enquanto que, as 5 plantas infectadas que não receberam o tratamento com o Fe continuaram amarelas e com um aspecto mais debilitado. Além disso, eles observaram que após 225 dias da aplicação foliar a altura das plantas infectadas e saudáveis que passaram pelo tratamento diferiram significativamente.¹²⁴

Os resultados obtidos por Inoue *et al.*¹²⁴ indicaram que a aplicação foliar da solução FC7 nas amostras controle e àquelas infectadas pela CLAs, contribuiu para acelerar o crescimento da planta, o que provavelmente pode indicar que a absorção de íons Fe²⁺ pelas folhas é preferível em relação ao Fe³⁺. Além disso, a luz solar foi um fator que contribuiu aumentando a concentração de Fe²⁺ na solução FC7, de tal modo que o processo de absorção de Fe²⁺ pelas plantas pode vir a ser otimizado em campo. O estudo da aplicação foliar de íons ferro fez-se necessária, uma vez que em determinadas condições e tipos de solo (calcário, por exemplo), a absorção de Fe²⁺ pela planta é prejudicada.¹²⁴

Embora muitos desses métodos tenham apresentado resultados promissores, ainda são necessários mais estudos voltados para sua aplicabilidade em larga escala, buscando diminuir a toxicidade ao meio ambiente e a saúde humana, e visando aumentar a eficácia de combate a HLB, ao mesmo tempo que controle a transmissão da doença sem interferir negativamente no ecossistema em que o inseto psílídeo está inserido.

Conclusões

Várias estratégias de pesquisa têm sido abordadas visando uma maior compreensão dos aspectos químicos e

bioquímicos da doença na busca de estratégias de controle para a doença HLB. Este trabalho de revisão abordou pesquisas relacionadas à tentativa de cultivo da CLas, a busca por fatores de virulência e biomarcadores em plantas, abordagens ômicas para maior compreensão da interação patógeno-hospedeiro e o estudo do metabolismo do inseto vetor *Diaphorina citri*.

Certamente, a tentativa de cultivo axênico da CLas tem sido a estratégia mais desafiadora e a que poderia proporcionar uma maior compreensão da natureza bioquímica do fitopatógeno e dos mecanismos pelos quais ele opera durante o processo de infecção. Nesse sentido, alguns avanços sobre o conhecimento das variáveis experimentais que melhor simulam o ambiente microbiano da CLas tem sido realizados. Nesse aspecto, pode ser destacado a melhor adaptação da CLas em meios mais ácidos como em sucos das frutas²⁸ ou em pH neutro com baixa tensão de gás oxigênio.²⁷ Além disso, as tentativas de co-cultivo e as análises metagenômicas têm indicado os microrganismos que exercem uma relação simbiótica mutualista favorável ao crescimento da CLas, como é o caso da *Propionibacterium acnes*²⁴ e aqueles que são competidores tais como o *Cladosporium cladosporioides*.²¹

Por outro lado, se o cultivo *in vitro* da CLas ainda não se tornou possível, a busca por biomarcadores da HLB tem ajudado a compreender mais sobre os mecanismos de defesa que as plantas *Citrus* spp. desenvolveram frente ao ataque da CLas. Nesta revisão, foram destacados 11 metabólitos (Tabela 2) reportados na literatura que foram considerados como biomarcadores da HLB. Contudo, existem outros compostos que são considerados potenciais biomarcadores da doença e que ainda precisam ser melhor avaliados. Nesse contexto, diferentes técnicas analíticas (GC-MS, LC-MS, DESI-MSI, NMR, *etc.*) têm sido empregadas para a detecção desses biomarcadores durante o estágio assintomático de modo a tentar viabilizar um método de controle em campo que seja efetivo.

Apesar de muitas pesquisas terem contribuído para a identificação de biomarcadores da HLB, muito pouco é conhecido sobre os compostos oriundos ou produzidos pela CLas e sobre os seus fatores de virulência, uma vez que a maioria dos compostos detectados nas diferentes abordagens ômicas estão relacionados à fisiologia da planta. Isso tem limitado os avanços relacionados ao tratamento da doença, de modo que muitos esforços acabam sendo realizados para tentar conter a dispersão da HLB nos pomares. Métodos físicos como a liberação de VOCs que repelem os psílídeos e a criação e liberação de parasitóides; ou, métodos biológicos, como a incorporação de resistência através da hibridação ou engenharia genética; assim como métodos químicos, como a melhoria na nutrição da planta, com soluções de íons ferro¹²⁴ e a utilização de nanotecnologia como as nanopartículas de prata¹¹⁵ são alguns exemplos reportados na literatura na busca do controle da doença, porém nenhum deles ainda se mostrou efetivo, e estudos mais avançados são necessários. Além disso, estudos sobre os impactos ecológicos que a

aplicação desses métodos pode vir a acarretar no ambiente a longo prazo são indispensáveis.

Agradecimentos

Nós agradecemos a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil – Código de Financiamento 001; a Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo (FAPESP) [número de concessão: FAPESP 2019/06359-7, 2021/00728-0, bolsa de pós-graduação: 2021/08947-3] e ao Instituto Serrapilheira (Serra-1912-31626) pelo suporte financeiro.

Referências Bibliográficas

- Teixeira, D. C.; Wulff, N. A.; Lopes, S. A.; Yamamoto, P. T.; de Miranda, M. P.; Spósito, M. B.; Júnior, J. B.; Bassanezi, R. B.; Caracterização e etiologia das bactérias associadas ao Huanglongbing. *Citrus Research & Technology* **2010**, *31*, 115. [Crossref]
- Merfa, M. V.; Pérez-López, E.; Naranjo, E.; Jain, M.; Gabriel, D. W.; De La Fuente, L.; Progress and obstacles in culturing ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’, the bacterium associated with Huanglongbing. *Phytopathology* **2019**, *109*, 1092. [Crossref] [PubMed]
- Washington State University, What is HLB and why should you care? Disponível em: <<https://lcme.wsu.edu/what-is-hlb-and-why-should-you-care>>. Acesso em: 07 março 2022.
- Coletta-Filho, H. D.; Targon, M. L. P. N.; Takita, M. A.; De Negri, J. D.; Pompeu Jr. J.; Machado, M. A.; Amaral, A. M.; Muller, G. W.; First report of the causal agent of Huanglongbing (“*Candidatus Liberibacter asiaticus*”) in Brazil. *Plant Disease* **2004**, *88*, 1382. [Crossref] [PubMed]
- Zeng, C.; Liu, Y.; Yan, S.; Fu, W.; Global dynamics of a new Huanglongbing transmission model with quarantine measures. *Journal of Applied Mathematics and Physics* **2022**, *10*, 360.
- Bassanezi, R. B.; Lopes, S. A.; Miranda, M. P.; Wulff, N. A.; Volpe, H. X. L.; Ayres, A. J.; Overview of citrus Huanglongbing spread and management strategies in Brazil. *Tropical Plant Pathology* **2020**, *45*, 251. [Crossref]
- Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus), Levantamento da incidência de doenças dos citros. Disponível em: <https://www.fundecitrus.com.br/levantamentos>. Acesso em: 27 outubro 2022.
- Bové, J. M.; Huanglongbing or yellow shoot, a disease of Gondwanan origin: Will it destroy citrus worldwide? *Phytoparasitica* **2014**, *42*, 579. [Crossref]
- Centro APTA Citros Sylvio Moreira, Brasil é destaque no Workshop Internacional sobre Huanglongbing. Disponível em: <https://ccsm.br/wp-content/uploads/2017/04/INFORMATIVO_CCMSM_07_2006.pdf>. Acesso em: 07 março 2022.
- Spann, T. M.; Schumann, A. W.; The role of plant nutrients in disease development with emphasis on citrus and Huanglongbing. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* **2009**, *122*, 169.

11. Padhi, E. M. T.; Araujo, K. J.; Mitrovic, E.; Polek, M.; Godfrey, K. E.; Slupsky, C. M.; The impact of *Diaphorina citri*-vectored ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ on Citrus metabolism. *Phytopathology* **2022**, *112*, 197. [Crossref] [PubMed]
12. Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus), Greening Huanglongbing. Disponível em: <<https://www.fundecitrus.com.br/doencas/greening>>. Acesso em: 07 março 2022.
13. Bové, J. M.; Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology* **2006**, *88*, 7.
14. Aidoo, O. F.; Tanga, C. M.; Khamis, F. M.; Rasowo, B. A.; Mohamed, S. A.; Badii, B. K.; Salifu, D.; Sétamou, M.; Ekesi, S.; Borgemeister, S.; Host suitability and feeding preference of the African citrus triozid *Trioza erytrae* Del Guercio (Hemiptera: Triozidae), natural vector of “*Candidatus Liberibacter africanus*”. *Journal of Applied Entomology* **2019**, *143*, 262. [Crossref]
15. Urbaneja, A.; Grout, T. G.; Gravena, S.; Wu, F.; Cen, Y.; Stansly, P. A.; Em *The genus Citrus*; Talon, M.; Caruso, M.; Gmitter Jr., F. G., eds.; Woodhead Publishing: Sawston, 2020, cap. 16. [Crossref]
16. Cocuzza, G. E. M.; Alberto, U.; Hernández-Suárez, E.; Silverio, F.; Di Silvestro, S.; Tena, A.; Carmelo, R.; A review on *Trioza erytrae* (African citrus psyllid), now in mainland Europe, and its potential risk as vector of huanglongbing (HLB) in citrus. *Journal of Pest Science* **2017**, *90*, 1. [Crossref]
17. Hussain, S.; Rao, M. J.; Anjum, M. A.; Ejaz, S.; Umar, U.; Ali, M. A.; Khalid, M. F.; Sohail, M.; Ercisli, S.; Zia-Ul-Haq, M.; Ahmad, S.; Naqvi, S. A. H.; Effect of different combinations of antibiotics on fruit quality and antioxidant defense system in Huanglongbing infected Kinnow orchards. *AMB Express* **2019**, *9*, 147. [Crossref] [PubMed]
18. Hu, J.; Wang, N.; Evaluation of the spatiotemporal dynamics of oxytetracycline and its control effect against citrus huanglongbing via trunk injection. *Phytopathology* **2016**, *106*, 1495. [Crossref] [PubMed]
19. Dorta, S. O.; Machado, M. A.; Freitas-Astúa, J.; Desenvolvimento de estratégias alternativas visando ao controle do huanglongbing. *Citrus Research & Technology* **2019**, *40*, e1045. [Crossref]
20. Li, J.; Pang, Z.; Duan, S.; Lee, D.; Kolbasov, V. G.; Wang, N.; The in planta effective concentration of oxytetracycline against ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ for suppression of citrus Huanglongbing. *Phytopathology* **2019**, *109*, 2046. [Crossref] [PubMed]
21. Blacutt, A.; Ginnan, N.; Dang, T.; Bodaghi, S.; Vidalakis, G.; Ruegger, P.; Peacock, B.; Viravathana, P.; Vieira, F. C.; Drozd, C.; Jablonska, B.; Borneman, J.; McCollum, G.; Cordoza, J.; Meloch, J.; Berry, V.; Salazar, L. L.; Maloney, K. N.; Rolshausen, P. E.; Roper, M. C.; An *in vitro* pipeline for screening and selection of citrus-associated microbiota with potential anti-“*Candidatus Liberibacter asiaticus*” properties. *Applied and Environmental Microbiology* **2020**, *86*, e02883-19. [Crossref] [PubMed]
22. Fagen, J. R.; Leonard, M. T.; Coyle, J. F.; McCullough, C. M.; Davis-Richardson, A. G.; Davis, M. J.; Triplett, E. W. *Liberibacter crescens* gen. nov., sp. nov., the first cultured member of the genus *Liberibacter*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **2014**, *64*, 2461. [Crossref] [PubMed]
23. Leonard, M. T.; Fagen, J. R.; Davis-Richardson, A. G.; Davis, M. J.; Triplett, E. W.; Complete genome sequence of *Liberibacter crescens* BT-1. *Standards in Genomic Sciences* **2012**, *7*, 271. [Crossref] [PubMed]
24. Davis, M. J.; Mondal, S. N.; Chen, H.; Rogers, M. E.; Brilansky, R. H.; Co-cultivation of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ with Actinobacteria from Citrus with Huanglongbing. *Plant Disease* **2008**, *92*, 1547. [Crossref] [PubMed]
25. Sechler, A.; Schuenzel, E. L.; Cooke, P.; Donnua, S.; Thaveechai, N.; Postnikova, E.; Stone, A. L.; Schneider, W. L.; Damsteegt, V. D.; Schaad, N. W.; Cultivation of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’, ‘*Ca. L. africanus*’, and ‘*Ca. L. americanus*’ associated with Huanglongbing. *Phytopathology* **2009**, *99*, 480. [Crossref] [PubMed]
26. do Nascimento, F. E.; Estudos sobre aquisição e concentração de “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” e “*Candidatus Liberibacter americanus*” em *Diaphorina citri* Kuwayama. *Dissertação de Mestrado*, Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), 2010.
27. Ha, P. T.; He, R.; Killiny, N.; Brown, J. K.; Omsland, A.; Gang, D. R.; Beyenal, H.; Host-free biofilm culture of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*,” the bacterium associated with Huanglongbing. *Biofilm* **2019**, *1*, 100005. [Crossref] [PubMed]
28. Parker, J. K.; Wisotsky, S. R.; Johnson, E. G.; Hijaz, F. M.; Killiny, N.; Hilf, M. E.; De La Fuente, L.; Viability of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ prolonged by addition of citrus juice to culture medium. *Phytopathology* **2014**, *104*, 15. [Crossref] [PubMed]
29. King, E. O.; Ward, M. K.; Raney, D. E.; Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **1954**, *44*, 301. [PubMed]
30. Wang, X.; Zhang, X.; Lu, B. H.; Gao, J.; The periplasmic chaperone protein Psg_2795 contributes to the virulence of *Pseudomonas savastanoi* pv. glycinea: the causal agent of bacterial blight of soybean. *Journal of Microbiology* **2022**, *60*, 478. [Crossref] [PubMed]
31. Molki, B.; Call, D. R.; Ha, P. T.; Omsland, A.; Gang, D. R.; Lindemann, S. R.; Killiny, N.; Beyenal, H. Growth of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ in a host-free microbial culture is associated with microbial community composition. *Enzyme and Microbial Technology* **2020**, *142*, 109691. [Crossref] [PubMed]
32. Slisz, A. M.; Breksa, A. P.; Mishchuk, D. O.; McCollum, G.; Slupsky, C. M.; Metabolomic analysis of citrus infection by ‘*Candidatus Liberibacter*’ reveals insight into pathogenicity. *Journal of Proteome Research* **2012**, *11*, 4223. [Crossref] [PubMed]
33. Killiny, N. Generous hosts: What makes Madagascar periwinkle (*Catharanthus roseus*) the perfect experimental host plant for fastidious bacteria? *Plant Physiology and Biochemistry* **2016**, *109*, 28. [Crossref] [PubMed]
34. Merfa, M. V.; Naranjo, E.; Shantharaj, D.; De La Fuente, L.; Growth of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ in commercial

- grapefruit juice-based media formulations reveals common cell density-dependent transient behaviors. *Phytopathology* **2022**, *112*, 131. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Cai, L.; Jain, M.; Munoz-Bodnar, A.; Huguet-Tapia, J. C.; Gabriel, D. W.; A synthetic ‘essentialome’ for axenic culturing of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’. *BMC Research Notes* **2022**, *15*, 125. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
 36. Lai, K.-K.; Davis-Richardson, A. G.; Dias, R.; Triplett, E. W.; Identification of the genes required for the culture of *Liberibacter crescens*, the closest cultured relative of the *Liberibacter* plant pathogens. *Frontiers in Microbiology* **2016**, *7*, 547. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
 37. Pontes, J. G. M.; Fernandes, L. S.; dos Santos, R. V.; Tasic, L.; Fill, T. P.; Virulence factors in the phytopathogen–host interactions: An overview. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2020**, *68*, 7555. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
 38. Casadevall, A.; Pirofski, L.; Virulence factors and their mechanisms of action: the view from a damage–response framework. *Journal of Water and Health* **2009**, *7*, S2. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
 39. Wang, N.; Pierson, E. A.; Setubal, J. C.; Xu, J.; Levy, J. G.; Zhang, Y.; Li, J.; Rangel, L. T.; Martins Jr., J.; The *Candidatus Liberibacter*–host interface: Insights into pathogenesis mechanisms and disease control. *Annual Review of Phytopathology* **2017**, *55*, 451. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
 40. Andrade, M.; Li, J.; Wang, N.; *Candidatus Liberibacter asiaticus*: virulence traits and control strategies. *Tropical Plant Pathology* **2020**, *45*, 285. [\[Crossref\]](#)
 41. Haiko, J.; Westerlund-Wikström B.; The role of the bacterial flagellum in adhesion and virulence. *Biology* **2013**, *2*, 1242. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
 42. Duan, Q.; Zhou, M.; Zhu, L.; Zhu, G.; Flagella and bacterial pathogenicity. *Journal of Basic Microbiology* **2013**, *53*, 1. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
 43. Andrade, M. O.; Pang, Z.; Achor, D. S.; Wang, H.; Yao, T.; Singer, B. H.; Wang, N.; The flagella of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ and its movement in planta. *Molecular Plant Pathology* **2020**, *21*, 109. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
 44. Yan, Q.; Sreedharan, A.; Wei, S.; Wang, J.; Pelz-Stelinski, K.; Folimonova, S.; Wang, N.; Global gene expression changes in *Candidatus Liberibacter asiaticus* during the transmission in distinct hosts between plant and insect. *Molecular Plant Pathology* **2013**, *14*, 391. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
 45. Costa, T. R. D.; Felisberto-Rodrigues, C.; Meir, A.; Prevost, M. S.; Redzej, A.; Trokter, M.; Waksman, G.; Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. *Nature Reviews Microbiology* **2015**, *13*, 343. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
 46. Green, E. R.; Meccas, J.; Bacterial secretion systems: an overview. *Microbiology Spectrum* **2016**, *4*, 10.1128/microbiolspec.VMBF-0012-2015. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
 47. Spitz, O.; Erenburg, I. N.; Beer, T.; Kanonenberg, N.; Holland, B.; Schmitt, L.; Type I secretion systems—one mechanism for all? *Microbiology Spectrum* **2019**, *7*, 10.1128/microbiolspec.PSIB-0003-2018. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
 48. Leo, J. C.; Grin, I.; Linke, D.; Type V secretion: mechanism(s) of autotransport through the bacterial outer membrane. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **2012**, *367*, 1088. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
 49. Pitino, M.; Armstrong, C. M.; Cano, L. M.; Duan, Y.; Transient expression of *Candidatus Liberibacter asiaticus* effector induces cell death in *Nicotiana benthamiana*. *Frontiers in Plant Science* **2016**, *7*, 982. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
 50. Tinsley, C. R.; Bille, E.; Nassif, X.; Bacteriophages and pathogenicity: more than just providing a toxin? *Microbes and Infection* **2006**, *8*, 1365. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
 51. Hao, G.; Ammar, D.; Duan, Y.; Stover, E.; Transgenic citrus plants expressing a ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ prophage protein LasP235 display Huanglongbing-like symptoms. *Agri Gene* **2019**, *12*, 100085. [\[Crossref\]](#)
 52. Zipfel, C.; Robatzek, S.; Pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity: veni, vidi...? *Plant Physiology* **2010**, *154*, 551. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
 53. Park, S.-W.; Kaimoyo, E.; Kumar, D.; Mosher, S.; Klessig, D. F.; Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science* **2007**, *318*, 113. [\[PubMed\]](#)
 54. Strimbu, K.; Tavel, J. A.; What are Biomarkers? *Current Opinion in HIV and AIDS* **2010**, *5*, 463.
 55. Pontes, J. G. M.; Brasil, A. J. M.; Cruz, G. C. F.; de Souza, R. N.; NMR-based metabolomics strategies: plants, animals and humans. *Analytical Methods* **2017**, *9*, 1078. [\[Crossref\]](#)
 56. Agrawal, G. K.; Timperio, A. M.; Zolla, L.; Bansal, V.; Shukla, R.; Rakwal, R.; Biomarker discovery and applications for foods and beverages: Proteomics to nanoproteomics. *Journal of Proteomics* **2013**, *93*, 74. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
 57. Holmes, M. V.; Richardson, T. G.; Ference, B. A.; Davies, N. M.; Smith, G. D.; Integrating genomics with biomarkers and therapeutic targets to invigorate cardiovascular drug development. *Nature Reviews Cardiology* **2021**, 435. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
 58. Wang, H.; Ramnani, P.; Pham, T.; Villarreal, C. C.; Yu, X.; Liu, G.; Mulchandani, A.; Gas biosensor arrays based on single-stranded DNA-functionalized single-walled carbon nanotubes for the detection of volatile organic compound biomarkers released by Huanglongbing disease-infected citrus trees. *Sensors* **2019**, 4795. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
 59. Hung, W. L.; Wang, Y.; Metabolite profiling of *Candidatus Liberibacter* infection in Hamlin sweet oranges. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2018**, *66*, 3983. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
 60. Jones, S. E.; Hijaz, F.; Davis, C. L.; Foliminova, S. Y.; Manthey, J. A.; Reyes-De-Corcuera, J. I.; GC-MS analysis of secondary metabolites in leaves from orange trees infected with HLB: A 9-month course study. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* **2012**, *125*, 75.
 61. Freitas, D. S.; Carlos, E. F.; Souza Gil, M. C. S.; Vieira, L. G. E.; Alcantara, G. B.; NMR-based metabolomic analysis of Huanglongbing-asymptomatic and -symptomatic citrus trees. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2015**, *63*, 7582. [\[Crossref\]](#)
 62. Pontes, J. G. M.; Vendramini, P. H.; Fernandes, L. S.; de Souza, F. H.; Pilau, E. J.; Eberlin, M. N.; Magnani, R. F.; Wulff, N. A.;

- Fill, T. P.; Mass spectrometry imaging as a potential technique for diagnostic of Huanglongbing disease using fast and simple sample preparation. *Scientific Reports* **2020**, *10*, 13457. [Crossref]
63. Cevallos-Cevallos, J. M.; García-Torres, R.; Exteberria, E.; Reyes-De-Corcuera, J. I.; GC-MS analysis of Headspace and liquid extracts for metabolomic differentiation of citrus Huanglongbing and Zinc Deficiency in leaves of 'Valencia' sweet orange from commercial groves. *Phytochemical Analysis* **2010**, *22*, 236. [Crossref] [PubMed]
64. Li, W.; Yao, Y. N.; Wu, L.; Hu, B.; Detection and seasonal variations of Huanglongbing disease in Navel orange trees using Direct Ionization Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2019**, *67*, 2265. [Crossref] [PubMed]
65. Ortuño, A.; Báidez, A.; Gómez, P.; Arcas, M. C.; Porras, I.; García-Lidon, A.; Del Río, J. A. *Citrus paradisi* and *Citrus sinensis* flavonoids: Their influence in the defence mechanism against *Penicillium digitatum*. *Food Chemistry* **2006**, *98*, 351. [Crossref]
66. Costa, J. H.; Bazioli, J. M.; Pontes, J. G. M.; Fill, T. P. *Penicillium digitatum* infection mechanisms in citrus: What do we know so far? *Fungal Biology* **2019**, *123*, 584. [Crossref] [PubMed]
67. Dala-Paula, B. M.; Plotto, A.; Bai, J.; Manthey, J. A.; Baldwin, E. A.; Ferrarezi, R. S.; Gloria, M. B. A. Effect of Huanglongbing or Greening disease on orange juice quality, a review. *Frontiers in Plant Science* **2019**, *9*, 1976. [Crossref] [PubMed]
68. Timpa, J. D.; Burke, J. J.; Qisenberry, J. E.; Wendt, C. W. Effects of water stress on the organic acid and carbohydrate compositions of cotton plants. *Plant Physiology* **1986**, *82*, 724. [Crossref] [PubMed]
69. Kostenyuk, I. A.; Zoň, J.; Burns, J. K.; Phenylalanine ammonia lyase gene expression during abscission in citrus. *Physiologia Plantarum* **2002**, *116*, 106. [Crossref] [PubMed]
70. Kumara, P. M.; Shaanker, R. U.; Pradeep, T.; UPLC and ESI-MS analysis of metabolites of *Rauvolfia tetraphylla* L. and their spatial localization using desorption electrospray ionization (DESI) mass spectrometric imaging. *Phytochemistry* **2019**, *159*, 20. [Crossref] [PubMed]
71. Araújo, E. V.; Vendramini, P. H.; Costa, J. H.; Eberlin, M. N.; Montagner, C. C.; Fill, T. P. Determination of tryptoguanines A and C produced by *Penicillium digitatum* in oranges: Are we safe? *Food Chemistry* **2019**, *301*, 125285. [Crossref] [PubMed]
72. Costa, J. H.; Wassano, C. I.; Angolini, C. F. F.; Scherlach, K.; Hertweck, C.; Fill, T. P. Antifungal potential of secondary metabolites involved in the interaction between citrus pathogens. *Scientific Reports* **2019**, *9*, 18647. [Crossref] [PubMed]
73. Santoro, A. L.; Drummond, R. D.; Silva, I. T.; Ferreira, S. S.; Juliano, L.; Vendramini, P. H.; Lemos, M. B. C.; Eberlin, M. N.; Andrade, V. P.; *In situ* DESI-MSI lipidomic profiles of breast cancer molecular subtypes and precursor lesions. *Cancer Research* **2020**, *80*, 1246. [Crossref] [PubMed]
74. Sumner, L. W.; Amberg, A.; Barrett, D.; Beale, M. H.; Beger, R.; Daykin, C. A.; Fan, T. W. M.; Fiehn, O.; Goodacre, R.; Griffin, J. L.; Hankemeier, T.; Hardy, N.; Harnly, J.; Higashi, R.; Kopka, J.; Lane, A. N.; Lindon, J. C.; Marriott, P.; Nicholls, A. W.; Reilly, M. D.; Thaden, J. J.; Viant, M. R.; Proposed minimum reporting standards for chemical analysis. Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI). *Metabolomics* **2007**, *3*, 211. [Crossref] [PubMed]
75. Chin, E. L.; Mishchuk, D. O.; Breksa, A. P.; Slupsky, C. M.; Metabolite signature of *Candidatus Liberibacter asiaticus* infection in two citrus varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2014**, *62*, 6585. [Crossref] [PubMed]
76. Fan, J.; Chen, C.; Brlansky, R. H.; Gmitter Jr., R. G.; Li, Z. G.; Changes in carbohydrate metabolism in *Citrus sinensis* infected with 'Candidatus Liberibacter asiaticus'. *Plant Pathology* **2010**, *59*, 1037. [Crossref]
77. Bennett, R. N.; Wallsgrave, R. M.; Tansley Review No. 72 Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *The New Phytologist* **1994**, *127*, 617. [PubMed]
78. Killiny, N.; Metabolite signature of the phloem sap of fourteen citrus varieties with different degrees of tolerance to *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **2017**, *97*, 20. [Crossref]
79. Smeekens, S.; Sugar-induced signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **2000**, *51*, 49. [Crossref] [PubMed]
80. Killiny, N.; Nehela, Y.; Metabolomic response to Huanglongbing: Role of carboxylic compounds in *Citrus sinensis* response to 'Candidatus Liberibacter asiaticus' and its vector, *Diaphorina citri*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **2017**, *30*, 666. [Crossref] [PubMed]
81. Nehela, Y.; Hijaz, F.; Elzaawely, A. A.; El-Zahaby, H. M.; Killiny, N.; Citrus phytohormonal response to *Candidatus Liberibacter asiaticus* and its vector *Diaphorina citri*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **2018**, *102*, 24. [Crossref]
82. Flores-Torres, L. M.; Flores-Olivas, A.; Ochoa-Fuentes, Y. M.; López-Arroyo, J. I.; Olalde-Portugal, V.; Benevides-Mendoza, A.; González-Morales, S.; Zamora-Villa, V. M.; Comparison of enzymes and phenolic compounds in three citrus species infected with *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Mexican Journal of Phytopathology* **2017**, *35*, 314. [Crossref]
83. Gimeno, J.; Gadea, J.; Forment, J.; Pérez-Valle, J.; Santiago, J.; Martínez-Godoy, M. A.; Yenush, L.; Bellés, J. M.; Brumós, J.; Colmenero-Flores, J.-M.; Talón, M.; Serrano, R.; Shared and novel molecular responses of mandarin to drought. *Plant Molecular Biology* **2009**, *70*, 403. [Crossref] [PubMed]
84. Lacerda Leite, G. M.; Barbosa, M. O.; Lopes, M. J. P.; Delmondes, G. A.; Bezerra, D. S.; Araújo, I. M.; Alencar, C. D. C.; Coutinho, H. D. M.; Peixoto, L. R.; Barbosa-Filho, J. M.; Felipe, C. F. B.; Barbosa, R.; Menezes, I. R. A.; Kerntof, M. R.; Pharmacological and toxicological activities of α -humulene and its isomers: A systematic review. *Trends in Food Science & Technology* **2021**, *115*, 255. [Crossref]
85. Balan, B.; Ibáñez, A. M.; Dandekar, A. M.; Caruso, T.; Martinelli, F.; Identifying host molecular features strongly linked with responses to Huanglongbing disease in citrus leaves. *Frontiers in Plant Science* **2018**, *9*, 277. [Crossref] [PubMed]
86. Huang, L.; Grosser, J.; Gmitter, F. G.; Sims, C. A.; Wang, Y.; Effects of scion/rootstock combination on flavor quality of orange juice from Huanglongbing (HLB)-affected trees: A two-year study of the targeted metabolomics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2020**, *68*, 3286. [Crossref]

87. Albrecht, U.; Fiehn, O.; Bowman, K. D.; Metabolic variations in different citrus rootstock cultivars associated with different responses to Huanglongbing. *Plant Physiology and Biochemistry* **2016**, *107*, 33. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
88. Deng, H.; Zhang, Y.; Reuss, L.; Suh, J. H.; Yu, Q.; Liang, G.; Wang, Y.; Gmitter Jr., F. G.; Comparative leaf volatile profiles of two contrasting Mandarin cultivars against *Candidatus Liberibacter asiaticus* infection illustrate Huanglongbing tolerance mechanisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2021**, *69*, 10869. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
89. Aizat, W. M.; Ismail, I.; Noor, N. M. Em: *Omics applications for systems biology. Advances in experimental medicine and biology*; Aizat, W.; Goh, H. H.; Baharum, S., eds.; vol. 1102. Springer, Cham., 2018, cap. 1. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
90. Chin, E. L.; Ramsey, J. S.; Mishchuk, D. O.; Saha, S.; Foster, E.; Chavez, J. D.; Howe, K.; Zhong, X.; Polek, M.; Godfrey, K. E.; Mueller, L. A.; Bruce, J. E.; Heck, M.; Slupsky, C. M.; Longitudinal transcriptomic, proteomic, and metabolomic analyses of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck graft-inoculated with „*Candidatus Liberibacter asiaticus*“. *Journal of Proteome Research* **2020**, *19*, 719. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
91. Martinelli, F.; Reagan, R. L.; Uratsu, S. L.; Phu, M. L.; Albrecht, U.; Zhao, W.; Davis, C. E.; Bowman, K. D.; Dandekar, A. M.; Gene regulatory networks elucidating Huanglongbing disease mechanisms. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e74256. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
92. Martinelli, F.; Uratsu, S. L.; Albrecht, U.; Reagan, R. L.; Phu, M. L.; Britton, M.; Buffalo, V.; Fass, J.; Leicht, E.; Zhao, W.; Lin, D.; D'Souza, R.; Davis, C. E.; Bowman, K. D.; Dandekar, A. M.; Transcriptome profiling of citrus fruit response to Huanglongbing disease. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e38039. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
93. Pereira, L. E. T.; Paiva, A. J.; O manejo de pastagens e as relações fonte/dreno na planta forrageira. *PUBVET*, **2008**, *2*, Art#244.
94. Ribeiro, R. V.; Machado, E. C. Some aspects of citrus ecophysiology in subtropical climates: re-visiting photosynthesis under natural conditions. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, **2007**, *19*, 393. [\[Crossref\]](#)
95. Suh, J. H.; Tang, X.; Zhang, Y.; Gmitter, Jr., F. G.; Wang, Y.; Metabolomic analysis provides new insight into tolerance of Huanglongbing in citrus. *Frontiers in Plant Science* **2021**, *12*, 710598. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
96. Mann, R. S.; Ali, J. G.; Hermann, S. L.; Tiwari, S.; Pelz-Stelinski, K. S.; Alborn, H. T.; Stelinski, L. L.; Induced release of a plant-defense volatile 'deceptively' attracts insect vectors to plants infected with a bacterial pathogen. *PLoS Pathogens* **2012**, *8*, e1002610. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
97. Padhi, E. M. T.; Maharaj, N.; Lin, S.-Y.; Mishchuk, D. O.; Chin, E.; Godfrey, K.; Foster, E.; Polek, M.; Leveau, J. H. J.; Slupsky, C. M.; Metabolome and microbiome signatures in the roots of citrus affected by huanglongbing. *Phytopathology* **2019**, *109*, 2022. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
98. Johnson, E. G.; Wu, J.; Bright, D. B.; Graham, J. H.; 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* **2014**, *63*, 290. [\[Crossref\]](#)
99. Roberts, M. R.; Does GABA act as a signal in plants? Hints from molecular studies. *Plant Signaling & Behavior* **2007**, *2*, 408. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
100. Ramesh, S. A.; Tyerman, S. D.; Xu, B.; Bose, J.; Kaur, S.; Conn, V.; Domingos, P.; Ullah, S.; Wege, S.; Shabala, S.; Feijó, J. A.; Ryan, P. R.; Gilliam, M.; GABA signaling modulates plant growth by directly regulating the activity of plant-specific anion transporters. *Nature Communications* **2015**, *6*, 7879. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
101. Qamar, A.; Mysore, K. S.; Senthil-Kumar, M.; Role of proline and pyrroline-5-carboxylate metabolism in plant defense against invading pathogens. *Frontiers in Plant Science* **2015**, *6*, 503. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
102. Lea, P. J.; Sodek, L.; Parry, M. A. J.; Shewry, P. R.; Halford, N. G.; Asparagine in plants. *Annals of Applied Biology* **2007**, *150*, 1. [\[Crossref\]](#)
103. Rajasekaran, L. R.; Aspinall, D.; Jones, G. P.; Paleg, L. G.; Stress metabolism. IX. Effect of salt stress on trigonelline accumulation in tomato. *Canadian Journal of Plant Science* **2001**, *81*, 487. [\[Crossref\]](#)
104. Ammar, E.-D.; George, J.; Sturgeon, K.; Stelinski, L. L.; Shatters, R. G.; Asian citrus psyllid adults inoculate huanglongbing bacterium more efficiently than nymphs when this bacterium is acquired by early instar nymphs. *Scientific Reports* **2020**, *10*, 18244. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
105. Martini, X.; Hoffmann, M.; Coy, M. R.; Stelinski, L. L.; Pelz-Stelinski, K. S.; Infection of an insect vector with a bacterial plant pathogen increases its propensity for dispersal. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0129373. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
106. Liu, K.; He, J.; Guan, Z.; Zhong, M.; Pang, R.; Han, Q.; Transcriptomic and metabolomic analyses of *Diaphorina citri* Kuwayama infected and non-infected with *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Frontiers in Physiology*, **2021**, *11*, 630037. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
107. Killiny, N.; Jones, S. E.; Metabolic alterations in the nymphal instars of *Diaphorina citri* induced by *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the putative pathogen of huanglongbing. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0191871. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
108. Alvarez, S.; Rohrig, E.; Solís, D.; Thomas, M. H.; Citrus Greening disease (Huanglongbing) in Florida: Economic impact, management and the potential for biological control. *Agricultural Research* **2016**, *5*, 109. [\[Crossref\]](#)
109. Tang, W.; Wang, D.; Wang, J.; Wu, Z.; Li, L.; Huang, M.; Xu, S.; Yan, D.; Pyrethroid pesticide residues in the global environment: An overview. *Chemosphere* **2018**, *191*, 990. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
110. Kaushal, J.; Khatri, M.; Arya, S. K.; A treatise on Organophosphate pesticide pollution: Current strategies and advancements in their environmental degradation and elimination. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **2021**, *207*, 111483. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
111. Hladik, M. L.; Main, A. R.; Goulson, D.; Environmental risks and challenges associated with neonicotinoid insecticides. *Environmental Science & Technology* **2018**, *52*, 3329. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
112. Young, M.; Ozcan, A.; Myers, M. E.; Johnson, E. G.; Graham, J. H.; Santra, S.; Multimodal generally recognized as safe ZnO/Nanocopper composite: A novel antimicrobial material for the

- management of citrus phytopathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2018**, *66*, 6604. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
113. Ghosh, D. K.; Kokane, S.; Kumar, P.; Ozcan, A.; Warghane, A.; Motghare, M.; Santra, S.; Sharma, A. K.; Antimicrobial nano-zinc oxide-2S albumin protein formulation significantly inhibits growth of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” in planta. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0204702. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
114. Li, X.; Ruan, H.; Zhou, C.; Meng, X.; Chen, W.; Controlling citrus Huanglongbing: green sustainable development route is the future. *Frontiers in Plant Science* **2021**, *12*, 760481. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
115. Stephano-Hornedo, J. L.; Torres-Gutiérrez, O.; Toledano-Magaña, Y.; Gradilla-Martínez, I.; Pestryakov, A.; Sánchez-González, A.; García-Ramos, J. C.; Bogdanchikova, N.; Argovit™ silver nanoparticles to fight Huanglongbing disease in Mexican limes (*Citrus aurantifolia* Swingle). *RSC Advances* **2020**, *10*, 6146. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
116. Stanisic, D.; Fregonesi, N. L.; Barros, C. H. N.; Pontes, J. G. M.; Fulaz, S.; Menezes, U. J.; Nicoleti, J. L.; Castro, T. L. P.; Seyffert, N.; Azevedo, V.; Durán, N.; Portela, R. W.; Tasic, L.; NMR insights on nano silver post-surgical treatment of superficial caseous lymphadenitis in small ruminants. *RSC Advances* **2018**, *8*, 40778. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
117. Rai, M.; Yadav, A.; Gade, A.; Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances* **2009**, *27*, 76. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
118. Yu, S.; Yin, Y.; Liu, J.; Silver nanoparticles in the environment. *Environmental Science: Processes & Impacts* **2013**, *15*, 78. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
119. Spinoso-Castillo, J. L.; Chavez-Santoscoy, R. A.; Bogdanchikova, N.; Pérez-Sato, J. A.; Morales-Ramos, V.; Bello-Bello, J. J.; Antimicrobial and hormetic effects of silver nanoparticles on in vitro regeneration of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) using a temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **2017**, *129*, 195. [[Crossref](#)]
120. Palmer, I. A.; Chen, H.; Chen, J.; Chang, M.; Fu, Z. Q.; Novel salicylic acid analogs induce a potent defense response in *Arabidopsis*. *International Journal of Molecular Sciences* **2019**, *20*, 3356. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
121. Darolt, J. C.; Fassini, C. M.; Wulff, N. A.; Di Piero, R. M.; Gene expression of salicylic acid and jasmonic acid pathways and photosynthesis parameters of sweet orange trees in response to acibenzolar-S-methyl. *Tropical Plant Pathology* **2020**, *45*, 691. [[Crossref](#)]
122. Pustika, A.; Subandiyah, S.; Holford, P.; Beattie, G.; Iwanami, T.; Masaoka, Y.; Interactions between plant nutrition and symptom expression in mandarin trees infected with the disease huanglongbing. *Australasian Plant Disease Notes* **2008**, *3*, 112. [[Crossref](#)]
123. Zhang, M.; Yang, C.; Powell, C. A.; Avery, P. B.; Wang, J.; Huang, Y.; Duan, Y.; Field evaluation of integrated management for mitigating citrus huanglongbing in Florida. *Frontiers in Plant Science* **2019**, *9*, 1890. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
124. Inoue, H.; Yamashita-Muraki, S.; Fujiwara, K.; Honda, K.; Ono, H.; Nonaka, T.; Kato, Y.; Matsuyama, T.; Sugano, S.; Suzuki, M.; Masaoka, Y.; Fe²⁺ ions alleviate the symptom of citrus greening disease. *International Journal of Molecular Sciences* **2020**, *21*, 4033. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]