



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

LUIZ FELIPE FRANCO DE LIMA

OLIGONUCLEOTÍDEOS ANTISENSENÇO PARA
SILENCIAMENTO TRANSIENTE DE GENES DE
CITRUS SINENSIS E APLICAÇÃO PARA TOLERÂNCIA AO
CANCRO CÍTRICO

ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES FOR TRANSIENT
SILENCING OF CITRUS SINENSIS GENES AND
APPLICATION FOR TOLERANCE TO CITRUS CANCER
DISEASE

CAMPINAS
2024

LUIZ FELIPE FRANCO DE LIMA

**OLIGONUCLEOTÍDEOS ANTISENSE PARA SILENCIAMENTO
TRANSIENTE DE GENES DE *CITRUS SINENSIS* E APLICAÇÃO
PARA TOLERÂNCIA AO CANCRO CÍTRICO**

**ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES FOR TRANSIENT SILENCING OF
CITRUS SINENSIS GENES AND APPLICATION FOR TOLERANCE
TO CITRUS CANCER DISEASE**

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do Título de
Mestre em Genética e Biologia Molecular,
na área de Genética Vegetal e
Melhoramento*

*Dissertation presented to the Institute of
Biology of the State University of Campinas
in partial fulfillment of the requirements for
obtaining the degree of Master in Genetics
and Molecular Biology, in the area of Plant
Genetics and Breeding*

Orientador: ALESSANDRA ALVES DE SOUZA

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA
PELO ALUNO LUIZ FELIPE FRANCO DE LIMA E
ORIENTADA PELA DRA ALESSANDRA ALVES
DE SOUZA.

**CAMPINAS
2024**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

L628o Lima, Luiz Felipe Franco, 1990-
 Oligonucleotídeos antisense para silenciamento transiente de genes de
Citrus sinensis e aplicação para tolerância ao cancro cítrico / Luiz Felipe
Franco de Lima. – Campinas, SP : [s.n.], 2024.

 Orientador: Alessandra Alves de Souza.
 Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP),
Instituto de Biologia.

 1. Inativação gênica. 2. *Citrus sinensis*. 3. *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.
4. Oligonucleotídeo antisense. 5. Suscetibilidade a doenças. I. Souza,
Alessandra Alves de, 1970-. II. Universidade Estadual de Campinas
(UNICAMP). Instituto de Biologia. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Antisense oligonucleotides for transient silencing of *Citrus sinensis* genes and application for tolerance to citrus canker disease

Palavras-chave em inglês:

Gene silencing

Citrus sinensis

Xanthomonas citri subsp. *citri*

Antisense oligonucleotides

Disease susceptibility

Área de concentração: Genética Vegetal e Melhoramento

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Alessandra Alves de Souza [Orientador]

Jorge Mauricio Costa Mondego

Ricardo Harakava

Data de defesa: 01-07-2024

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-6426-5230>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/0040549287729764>

Campinas, 01 DE JULHO DE 2024.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof.(a) Dr.(a). ALESSANDRA ALVES DE
SOUZA

Prof.(a). Dr.(a) JORGE MAURÍCIO COSTA
MONDEGO

Prof.(a) Dr(a). RICARDO HARAKAVA

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Unidade Instituto de Biologia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por guiar meu caminho, e me dar forças para continuar lutando pelos meus sonhos.

Aos meus pais José Carlos e Vanderly, por toda educação, paciência, amor, carinho, suporte, conselhos e por toda dedicação em suas vidas que me fizeram ter condições de chegar aonde estou hoje. O mais sincero obrigado por tudo na minha vida.

Aos meus primos Wolney, Rosana, Pedro e Roberta, tios Wagner, Isabel, Wolney, Ana e Vanderley e minha avó Dolores por toda torcida, preocupação, carinho e suporte em toda a vida.

À minha orientadora Dra. Alessandra Alves de Souza pela orientação, ensinamentos e paciência. Principalmente por ter me dado a oportunidade de realizar esse mestrado em conjunto de sua equipe de pesquisa. Valiosas lições foram ensinadas nesse percurso. Por tudo isso, muito obrigado.

Aos doutores Dr. Marco Takita, Dra. Ângela Mehta, Dr. Fabiano Távora e Dra. Simone C. Picchi pelos ensinamentos, auxílios, discussões e colaborações com o projeto.

A todos os pesquisadores do Centro de Citricultura Sylvio Moreira pelo convívio, suporte e companheirismo.

Aos funcionários do Centro de Citricultura Sylvio Moreira por todo apoio técnico científico e companheirismo.

Aos meus amigos da pós-graduação, Dhiôvanna, Marianas, Lidia, Lucas, Bruno, Natálias, Giovana, Maju, Guilherme, Paulo, Cristina e Helena pela amizade, apoio, convívio e especialmente Reinaldo, Ísis, César e Larissa pela ajuda e colaboração nesse trabalho.

Aos meus amigos de Ourinhos, Bruno, Franciele, Rodolfo, Heloá, Gustavo, Diéssica, Mauro, Ana Luiza, Eduardo, Alexandre, Thiago R, Thiago P, Guilherme P, Victor, Jéssica, Diego, Guilherme B, Ana Lara, Diogo, Vanessa, Rodrigo, Joyce, por toda ajuda, conversas, suporte, apoio emocional, momentos de descontração e anos de amizade.

Aos meus amigos de Curitiba Tina, Leonardo e Thiago por manterem a amizade após a faculdade, por todos os momentos juntos, parceria e companheirismo.

À Dra. Myriam Ferreira pelos anos de acompanhamento, ensinamentos, paciência e discussões que só me fizeram crescer emocionalmente, pessoalmente e racionalmente.

À minha professora Thais Ferreira por toda a paciência e ensinamentos, além de amizade, conversas e parcerias que me ajudaram a ter momentos de relaxamento mental, diversão e desenvolvimento na arte.

Ao Instituto de Biologia da Unicamp, em especial ao Programa de Genética e Biologia Molecular e ao Centro de Citricultura Sylvio Moreira pela oportunidade de desenvolver esse trabalho.

A todos que em algum momento e de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo fomento do projeto (FAPESP 19/23217-1) e concessão de bolsa BCO - Treinamento Técnico / Fluxo Contínuo (2021/01602-0).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 – Processo 88887.641688/2021-00

RESUMO

O agronegócio vem sendo impulsionado a produzir de maneira mais eficiente e consciente, uma vez que a exigência da sociedade e dos mercados internacionais é por uma produção agrícola mais sustentável. O Brasil é o maior produtor mundial de laranja doce (*Citrus sinensis*), porém a produtividade vem sofrendo perdas significativas devido a problemas fitossanitários, sendo uma das mais importantes, o cancro cítrico, causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*). Atualmente a principal forma de controle dessa bactéria é o uso de compostos a base de cobre, que se usado em excesso provoca danos ao meio ambiente, além de induzir estirpes resistentes. Desta forma, novas tecnologias mais sustentáveis são necessárias para serem incorporadas no manejo do cancro cítrico. Neste trabalho foi testado a tecnologia dos oligonucleotídeos antisense (ASO) com modificações de fosforotioato, visando seu uso no silenciamento de genes de *C. sinensis* que possam minimizar os danos causados pelo patógeno. Inicialmente, foi desenvolvido um pipeline para desenho dos ASOs em *C. sinensis* para silenciamento do gene *PHYTOENE DESATURASE* (*CsPDS*). O gene *CsPDS* foi utilizado como prova de conceito do efeito dos ASOs no silenciamento do gene alvo. Posteriormente o pipeline foi aplicado para desenho dos ASOs para silenciamento do gene de suscetibilidade ao cancro cítrico, *LATERAL ORGAN BOUNDARY 1* (*CsLOB1*). Foram sintetizadas e validadas três sequências potenciais de ASO, que apresentaram uma redução significativa dos sintomas do cancro cítrico em comparação com os controles. O ASO3-*CsLOB1* foi selecionado como o mais promissor por reduzir significativamente o nível de expressão genica de *CsLOB1* e redução dos sintomas do cancro cítrico. Notavelmente, as plantas tratadas com ASO3 não exibiram aumento no desenvolvimento de sintomas do cancro cítrico durante o período de avaliação, indicando estabilidade da molécula para silenciamento do gene alvo. Este estudo destaca a eficácia da tecnologia ASO, como uma ferramenta promissora para estudo funcional de genes e aplicação no controle de fitopatógenos, sem a necessidade de transformação genética ou regeneração vegetal.

ABSTRACT

The agribusiness has been driven to produce in a more efficient and conscious manner, given that the demand from society and international markets is for a more sustainable agricultural production. Brazil is the world's largest producer of sweet oranges (*Citrus sinensis*), but productivity has been suffering significant losses due to phytosanitary problems, with one of the most important being citrus canker, caused by the bacterium *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*). Currently, the main method of controlling this bacterium is the use of copper-based compounds, which, when used excessively, cause environmental damage, and induce resistant strains. Therefore, more sustainable technologies are needed to be incorporated into citrus canker management. In this study, the technology of antisense oligonucleotides (ASOs) with phosphorothioate modifications was tested, aiming to use them in the silencing of genes in *C. sinensis* that could minimize the damage caused by the pathogen. Initially, a pipeline was developed for designing ASOs in *C. sinensis* to silence the PHYTOENE DESATURASE (*CsPDS*) gene. The *CsPDS* was used as a proof of concept for the effect of ASOs on the silencing of the target gene. Subsequently, the pipeline was applied to design ASOs for silencing the gene associated with susceptibility to citrus canker, LATERAL ORGAN BOUNDARY 1 (*CsLOB1*). Three potential ASO sequences were synthesized and validated, showing a significant reduction in citrus canker symptoms compared to controls. ASO3-*CsLOB1* was selected as the most promising, reducing *CsLOB1* gene expression significantly, with a reduction in leaf symptoms ranging from approximately 15% to 83%. Remarkably, plants treated with ASO3 did not exhibit an increase in the development of citrus canker symptoms during the evaluation period. This study highlights the effectiveness of ASO technology, as a promising tool for controlling phytopathogens without the need for genetic transformation or plant regeneration. Our results demonstrate the potential of ASOs in developing alternative strategies for citrus canker management.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	5
RESUMO	7
ABSTRACT	8
SUMÁRIO.....	9
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1. IMPORTÂNCIA DA CITRICULTURA BRASILEIRA E IMPACTO DAS DOENÇAS BACTERIANAS	13
2.2. CANCRO CÍTRICO – HISTÓRICO E AUMENTO DA INCIDÊNCIA EM SÃO PAULO.....	15
2.3. CONTROLE DA DOENÇA E ALTERNATIVAS SUSTENTÁVEIS.....	21
2.4. TECNOLOGIAS INOVADORAS DE MELHORAMENTO DE PRECISÃO	22
3. HIPÓTESE	27
4. OBJETIVO GERAL	27
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
Capítulo 1 – Estabelecimento de um pipeline para desenho dos ASOs em <i>Citrus sinensis</i> e utilização do gene <i>PHYTOENE DESATURASE (CsPDS)</i> como prova de conceito.....	28
Resumo.....	28
1. INTRODUÇÃO.....	29
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
2.1. ESTABELECIMENTO DO PIPELINE PARA DESENHO DOS ASOS	30
2.2. FORMAS DE <i>DELIVERY</i> DOS ASOS	32
2.3. AVALIAÇÃO DA ABSORÇÃO DOS ASOS VIA RAIZ	32
2.4. AVALIAÇÃO DA ABSORÇÃO DOS ASOS VIA CAULINAR	33
2.5. AVALIAÇÃO DA ABSORÇÃO DOS ASOS VIA PECÍOLO DE FOLHAS DESTACADAS	34

2.6. ANÁLISE DAS IMAGENS DAS PLÂNTULAS UTILIZADAS NOS EXPERIMENTOS DE ABSORÇÃO DOS ASOS VIA RAIZ E CAULINAR	34
2.7. ANÁLISE DO TEOR DE CLOROFILA NOS EXPERIMENTOS DE ABSORÇÃO DOS ASOS VIA RAIZ E CAULINAR	35
2.8. AVALIAÇÃO DO TEOR DE CLOROFILA DOS EXPERIMENTOS DE ABSORÇÃO DOS ASOS VIA PECÍOLO DE FOLHAS DESTACADAS.....	35
2.9. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DO GENE <i>CSPDS</i> EM PLANTAS TRATADAS COM O ASO_PDS2.....	36
3. RESULTADOS	38
3.1. OBTENÇÃO DOS ASOS	38
3.2. AVALIAÇÃO DA ABSORÇÃO DOS ASOS VIA RAIZ	38
3.3. AVALIAÇÃO DA ABSORÇÃO DOS ASOS VIA CAULINAR	40
3.4. AVALIAÇÃO DA ABSORÇÃO DOS ASOS VIA PECÍOLO DE FOLHAS DESTACADAS	42
3.5. EXPRESSÃO GENICA DE PLANTAS TRATADAS COM O ASO_PDS2	44
4. DISCUSSÃO.....	46
5. CONCLUSÃO.....	47
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
Capítulo 2 - Antisense oligonucleotide as a new technology application for <i>CsLOB1</i> gene silencing aiming citrus canker resistance.....	54
Abstract.....	55
Introduction.....	56
Materials and Methods.....	58
Design and Synthesis of ASOs.....	58
Foliar petiole ASO absorption assay	59
Effect of ASOs by absorption in detached leaves	60
Effect of ASOs by leaves infiltration <i>in planta</i>.	61
Bacterial inoculation by pin-roller device.....	61
Quantitative real-time PCR.....	62
Results.....	63

ASOs design and plant absorption	63
Effect of the ASOs on citrus canker development.	64
CsLOB1 post-transcriptional gene silencing in <i>C. sinensis</i> by ASO3	67
ASO3 treatment reduces citrus canker symptoms.	68
Discussion	70
Acknowledgement.....	73
References	74
CONCLUSÃO GERAL.....	78
REFERÊNCIA GERAL	79
ANEXOS	87
Anexo 1	87
Anexo 2	88
Anexo 3	89
Anexo 4	90
Anexo 5	91
Anexo 6	96
Anexo 7	97
Anexo 8.	98
Anexo 9	99

1. INTRODUÇÃO

No contexto da citricultura brasileira, que ostenta a posição de maior produtora de laranjas do mundo, a safra de laranja 2023/24 na região do cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro assume um papel de destaque. Estimada em 309,34 milhões de caixas de 40,8 kg, essa safra reflete a magnitude da produção de citros no país (FUNDECITRUS, 2023). No entanto, a citricultura enfrenta desafios consideráveis que resultam em perdas econômicas significativas, sendo os problemas fitossanitários, incluindo pragas e doenças, um dos principais vilões. Entre essas doenças, o cancro cítrico se destaca como uma das doenças mais antigas que impacta a produtividade citrícola brasileira e mundial (BEHLAU, 2021).

O cancro cítrico, doença que afeta laranjeiras (*Citrus sinensis*) e outras espécies de citros é causada pela bactéria Gram-negativa *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Sua prevalência global e potencial para causar danos consideráveis têm sido motivo de preocupação não apenas em regiões onde a doença já é endêmica, mas também em áreas que buscam ativamente evitar sua disseminação (BEHLAU, 2021).

No contexto agrônomo do estado de São Paulo, a emergência da incidência de patógenos demandou a implementação de estratégias de controle visando mitigar a propagação desses agentes. A evolução dessas abordagens de controle reflete uma adaptação às mudanças nas dinâmicas ambientais e patogênicas ao longo do tempo (BEHLAU, 2021). O método de manejo adotado para culturas de citros, efetivado na legislação de 2013, sugere a erradicação de plantas sintomáticas, complementada pela aplicação de bactericidas à base de cobre num raio de 30 metros ao redor do foco infeccioso identificado (SÃO PAULO, 2015). Entretanto, a aplicação recorrente de compostos cúpricos, induz danos ambientais e agrônômicos significativos. Estudos apontam que a presença exacerbada de cobre no solo perturba a mineralização e o ciclo biogeoquímico de macronutrientes essenciais, enquanto nas plantas, o acúmulo deste metal implica em danos substanciais, especialmente nas raízes, interferindo no desenvolvimento radicular e na homeostase nutricional. (PEDERSEN; KJÆR; ELMEGAARD, 2000; REHMAN et al., 2019; XU et al., 2006).

Além disso, a concentração elevada de metais como o cobre no solo afeta a produtividade agrícola e os rendimentos de colheita (REHMAN et al., 2019). Além das

consequências para o ecossistema e para a fisiologia vegetal, relatos científicos indicam que a utilização intensiva de cobre pode fomentar a resistência em *Xanthomonas citri*, devido a mecanismos moleculares da bactéria que promovem a oxidação do íon Cobre(I) a Cobre(II), reduzindo a toxicidade do elemento para o patógeno (LADOMERSKY; PETRIS, 2015; MARIN et al., 2019). Desta forma, devido aos problemas mencionados, existe atualmente a necessidade de estudos de novas tecnologias mais inovadoras e sustentáveis a ser incorporadas no manejo.

Nesse sentido, o presente trabalho visa estudar o uso de oligonucleotídeos antisense (ASO) como uma estratégia biotecnológica para silenciar o gene de suscetibilidade *LATERAL ORGAN BOUNDARIES 1* (*CsLOB1*) de *C. sinensis* ao cancro cítrico. Os ASOs são moléculas sintéticas de DNA ou RNA com o potencial de silenciar seletivamente a expressão gênica, fornecendo uma nova tecnologia para bloquear a interação compatível planta-patógeno.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. IMPORTÂNCIA DA CITRICULTURA BRASILEIRA E IMPACTO DAS DOENÇAS BACTERIANAS

Há registros que a laranja é originária do sudeste asiático e cultivada desde 4.000 anos atrás (XU Q, 2013). Foi demonstrado que a laranja doce, de nome científico *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, é originária de hibridizações interespecíficas entre *Citrus grandis* (pomelo) e *Citrus reticulata* (mandarim), que deram origem aos frutos primitivos da laranja doce atualmente consumida (XU Q, 2013). Através dos comércios e negociações da época, a laranja foi sendo disseminada, inicialmente na Europa, e chegando futuramente no continente americano.

Devido as melhores condições climáticas e propriedades do solo, em 1960 a indústria de suco de laranja obteve um maior sucesso, em relação ao seu país de origem, o que levou, após alguns anos, ao estabelecimento dos primeiros núcleos de citricultura (NEVES et al., 2020). Juntando todas as regiões envolvidas no cinturão citrícola brasileiro, a estimativa de safra para 2023/24 foi de aproximadamente 309,34 milhões de caixas (40,8 kg cada caixa), onde destas, cerca de 282 milhões de caixas são produzidas em São Paulo (Figura 1) (FUNDECITRUS, 2023).

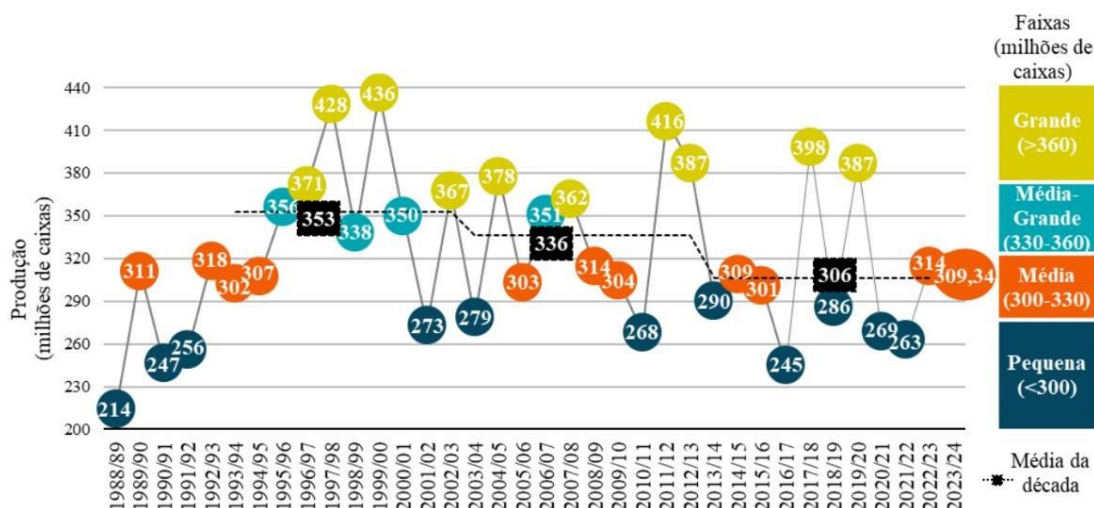


Figura 1. Gráfico demonstrando a produção de laranja em milhões de caixa, de 1988/89 à estimativa 2023/24 (Fundecitrus, 2023).

De acordo com dados levantados pelo Cadastro Geral de Empregados e Desempregados (CAGED), analisados e compilados pela Associação Nacional dos Exportadores de Sucos Cítricos (CitrusBR), em 2022 a área da citricultura gerou mais de 27 mil empregos no Brasil (CITRUSBR, 2023). Além disso, a receita de exportação de suco de laranja concentrado e congelado do Brasil (FCOJ) cresceu em 16% no ano de 2023, totalizando aproximadamente US\$ 2,04 bilhões (CITRUSBR, 2023).

Apesar das razões climatológicas envolvidas, o acréscimo constante de pragas e doenças devido à falta de controle efetivo, aliado aos fatores climáticos adversos, resulta em prejuízos cada vez maiores na produção (BEHLAU, 2021). Dentre as doenças que afetam a citricultura, as doenças bacterianas causadas pelas bactérias *Candidatus liberibacter asiaticus*, causadora do Huanglongbing ou Greening, e da *Xanthomonas citri* subsp. *citri* causadora do cancro cítrico, são as que mais impactam a produtividade citrícola a nível mundial (BEHLAU, 2021; BEOZZO BASSANEZI et al., 2024; MARTINS et al., 2020).

Como o presente trabalho tem como foco o uso de ASOs para controle do cancro cítrico, a revisão bibliográfica será voltada ao estado da arte desse patossistema.

2.2. CANCRO CÍTRICO – HISTÓRICO E AUMENTO DA INCIDÊNCIA EM SÃO PAULO

O cancro cítrico é amplamente reconhecido como uma das doenças que mais afetam as plantas de citros cultivadas em todo o mundo. Essa fitopatologia atinge os citros e suas espécies relacionadas, impactando diversas variedades de grande importância comercial, como laranjas, limões e tangerinas, entre outras (DE CARVALHO et al., 2015). Os primeiros relatos da presença da doença surgiram na década de 50 na região de Presidente Prudente, fruto da introdução de material vegetativo contaminado oriundo do Japão (BITANCOURT, 1957), desde então, teve sua presença relatada nos estados do Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Paraná, Rio Grande do Sul, Minas Gerais, Santa Catarina, Roraima e São Paulo, e vem ressurgindo sempre nos pomares, fazendo com que o manejo seja cada vez mais intenso para o seu controle (BEHLAU, 2021).

Dentro da legislação brasileira, o cancro cítrico era considerado uma praga quarentenária A2, devido ao fato de ser presente no país. Devido a gravidade e potencial destrutivo da doença, em 1957, o governo de São Paulo estabeleceu estratégia para erradicação do patógeno, similar a realizada nos Estados Unidos. Esta estratégia se baseava em erradicar plantas sintomáticas e demais plantas em um raio de 30 metros desta primeira (BEHLAU, 2021). Apesar dos esforços envolvidos, essa ação acabou não tendo os resultados esperados e o governo, então, entrou com medidas emergenciais, visando a total erradicação da doença. Dentro destas medidas estavam, eliminação de todos os viveiros cítricos, infectados ou não; Interdição de novos plantios nos municípios afetados; Restrição do comércio de frutos, e início de uma campanha de divulgação alertando sobre a existência do cancro cítrico (BEHLAU, 2021).

Mesmo com as medidas, novos casos da doença foram detectados, levando em 1962 o governo adotar uma nova estratégia, onde erradicariam em um raio de mil metros a partir do foco da doença, as plantações de laranja. Em 1966 a coordenação da campanha de erradicação foi assumida pela Coordenadoria de Assistência Técnica Integral (CATI), e perdurou até 1975 onde foi criada a Campanha Nacional de Erradicação do Cancro Cítrico (CANECC). A estratégia de manejo da doença sofreu algumas mudanças com o passar do tempo, mas se mantinham em torno da

eliminação da planta sintomática, juntamente com plantas em um determinado raio em seu entorno (BEHLAU, 2021). Posteriormente ocorreram mudanças na legislação do estado de São Paulo, no que se diz respeito ao controle da doença. A primeira ocorreu em 2009, onde deixou-se de eliminar todas as plantas de uma área com incidência superior a 0,5%, e o raio adotado era de 30 metros. Em 2013, a Resolução SAA-147 entrou em vigor, mudando as regras para que somente as plantas sintomáticas fossem eliminadas, e as em um raio de 30 metros pulverizadas com bactericida cúprico a cada nova brotação, regulamento adotado até os dias atuais (SÃO PAULO, 2015).

Em abril de 2018, entrou em vigor no Brasil, a nova Instrução Normativa nº 21, que definiu novos critérios para abordagens de estratégias do controle do cancro cítrico, de acordo com o status fitossanitário em que o cultivo citrícola se encontra. Segundo a Instrução Normativa, as opções de status fitossanitários da doença na área são (BRASIL, 2018):

- I. Área Sem Ocorrência - Estados do Brasil, onde não ocorre a doença. No caso destas áreas, a abordagem é mais focada na prevenção da entrada do cancro cítrico.
- II. Área Livre de Praga – ALP – Áreas delimitadas onde o cancro cítrico não está presente, porém podendo pertencer a um estado em que haja a ocorrência da doença. Neste caso também são adotadas medidas preventivas contra a entrada do patógeno.
- III. Área sob Sistema de Mitigação de Risco – SMR – Áreas que apresentam a ocorrência do cancro cítrico com alta incidência. Nestas áreas de cultivo citrícola, a erradicação de plantas sintomáticas não é mais uma alternativa viável, então adotam-se medidas para reduzir o impacto da doença na produção.
- IV. Área sob Erradicação – Áreas onde existe a ocorrência do cancro cítrico, porém com baixa incidência. Nos pomares que apresentam essa classificação, é feito o controle da doença através de plantio de mudas sadias e erradicação de plantas sintomáticas.

Desta forma, atualmente a Instrução Normativa 21 definiu alterações no SMR, dentre elas as principais sendo uma flexibilização quanto ao aproveitamento de frutos provenientes de áreas sintomáticas, onde estes frutos depois de terem o cancro removidos, podem ser redirecionados à indústria de sucos (BRASIL, 2018); Autorização para o uso de frutos provenientes de regiões SMR em estados vizinhos, contanto que estes também façam parte do programa, e reconhecimento de novas propriedades dentro de áreas SMR, que comprovem a não incidência do cancro cítrico.

No caso das áreas que adotam a erradicação como estratégia de controle, duas novas metodologias foram adotadas dentro da nova Instrução Normativa: Erradicação das plantas doentes, seguido por pulverização de bactericida cúprico em um raio de 30 metros e inspeções mensais, e remoção da planta doente e de todas as plantas num raio de 30 metros (BRASIL, 2018).

Atualmente a incidência do cancro cítrico vem aumentando no cinturão citrícola (Figura 2), uma vez que a evolução e disseminação da doença cresce anualmente. Esse cenário demonstra que as medidas atualmente utilizadas não estão sendo suficientes para conter o avanço da doença.



Figura 2. Cancro cítrico: Percentual das árvores de laranja com incidência de sintomas (Fundecitrus, 2023).

2.2. MECANISMO DE PATOGENICIDADE DE *XANTHOMONAS CITRI SUBSP. CITRI*

Xanthomonas citri subsp. citri pertence à família *Xanthomonadaceae*, considerada uma família muito significativa em termos de patógenos bacterianos de plantas (CARDOSO; SOUZA; VIEIRA, 2022). *X. citri* se dissemina entre plantas sadias através de chuvas e ventos, podendo também ser transportadas por intermédio de ação humana, como por exemplo ferramentas, máquinas e vestuários contaminados, porém entre estes fatores, a água acaba sendo o fator ambiental de maior importância.

Quando aliada com ventos, as chuvas acabam por disseminar a bactéria

por maiores (MARTINS et al., 2020a). A infecção da bactéria, ocorre uma vez que a bactéria penetra no interior da planta por aberturas naturais, ferimentos ou por aberturas causados por insetos mastigadores, como é o caso da larva minadora (Figura 3).

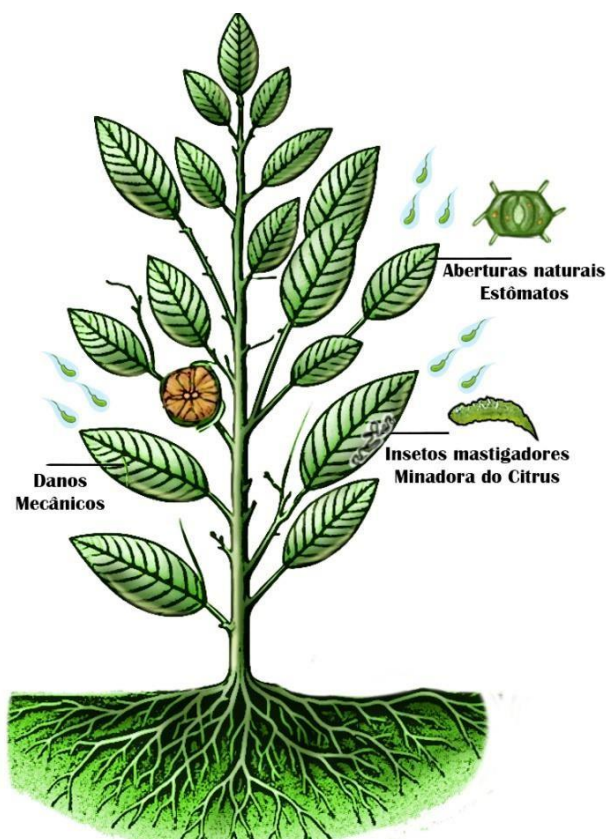


Figura 3. Formas de entrada da bactéria *Xanthomonas citri* nas células da planta hospedeira. Autoria própria

Após a manifestação inicial da doença, sintomas distintos tornam-se aparentes nas estruturas aéreas da planta. A interrupção contínua da integridade celular resulta na pigmentação escura do tecido vegetal, formando lesões necróticas denominadas pústulas (DUAN et al., 2018). Estas áreas necrosadas e escurecidas representam o sintoma indicativo mais característico da doença (Figura 4). Tal fenômeno é atribuído à atividade de enzimas secretadas pela bactéria, induzindo hiperplasia no mesófilo foliar e consequente ruptura da epiderme, resultando em erupções. Adicionalmente, observa-se a ocorrência de outros sintomas associados à doença, tais como a desfolha das plantas e queda prematura dos frutos (ALI et al., 2023).



Figura 4. Formação de pústulas na superfície de frutos (Martins et al, 2020).

Uma vez dentro da planta, a bactéria utiliza seu sistema de secreção de tipo III (T3SS), uma estrutura proteica que funciona como uma agulha para injetar efetores nas células da planta hospedeira (ABE; BENEDETTI, 2016). Uma classe desses efetores é conhecida como Transcription Activator-Like Effector (TALE) (MOORE; CHANDRAHAS; BLERIS, 2014). Este grupo de proteínas desempenham um papel fundamental no desenvolvimento de doenças, funcionando como fatores de transcrição nas células vegetais para a expressão de genes específicos que favoreçam o patógeno de alguma forma (ABE; BENEDETTI, 2016; MARTINS et al., 2020). Os TALEs possuem um domínio de ligação de DNA (DBD), composto de uma sequência repetitiva de resíduos, cada repetição contendo entre 33 - 34 aminoácidos, e a região formada pelo par de resíduos nas posições 12 e 13 define a especificidade de nucleotídeos, chamada di-resíduo com variável de repetição (RVD) (MOORE; CHANDRAHAS; BLERIS, 2014). Estudos estruturais demonstraram que o domínio de ligação dos TALEs, se modifica em uma estrutura helicoidal, envolvendo o DNA, e que o resíduo RVD de número 13 de cada repetição faz um contato direto com uma base específica do DNA (ABE; BENEDETTI, 2016). O conjunto destas RVDs se liga na região Effector Binding Elements (EBE) situada na região promotora do gene alvo para ativar a expressão gênica (BOCH; BONAS; LAHAYE, 2014). A *X. citri*, estirpe 306, possui quatro TALEs em seu genoma denominados de *pthA*'s (DA SILVA et al., 2002).

Embora os *pthA1-3* possuem função aditiva para a indução do cancro

cítrico, o *pthA4* é o principal fator de virulência para a indução da doença (ABE; BENEDETTI, 2016). Estudos já demonstraram que na ausência de genes *pthA*, exista uma menor presença de sintomas característicos do cancro, como pústulas, e uma redução do crescimento bacteriano. Além de quando é feita a deleção do *pthA4*, ocorre a abolição dos sintomas (SWARUP, 1992; YAN; WANG, 2012).

No caso da progressão da doença do cancro cítrico, após a bactéria injetar efetores no interior da célula vegetal, o efector PthA4 reconhece EBE's no promotor do gene *LATERAL ORGAN BOUNDARIES 1* (*CsLOB1*) promovendo a transcrição desse gene e induzindo a suscetibilidade à doença (Figura 5) (HU et al., 2014). Todos os genes *pthA* estão associadas com um aumento na expressão do gene *CsLOB1* (DUAN et al., 2018). *CsLOB1* é um fator de transcrição da família Lateral Organ Boundaries (*LOB*), que induz a expressão de genes associados a expansão celular e remodelamento de parede celular (ZOU et al., 2021a). O *CsLOB1* é essencial para a formação do cancro cítrico. Esse gene é diretamente induzido pelo efector *pthA4* de *X. citri* e é capaz de ativar a expressão de outros genes da planta que promovem um afrouxamento da parede celular vegetal e a proliferação celular, facilitando assim a colonização do patógeno (DE SOUZA- NETO et al., 2023; DUAN et al., 2018; ZOU et al., 2021a). Além disso estudos demonstraram que plantas transformadas superexpressando *CsLOB1* apresentam sintomas similares ao do cancro cítrico (DUAN et al., 2018; ZOU et al., 2021a), enquanto plantas de citros com edição do gene *CSLOB1* por CRISPR-Cas9, apresentaram tolerância ao cancro cítrico (JIA et al., 2017; ZOU et al., 2021a).

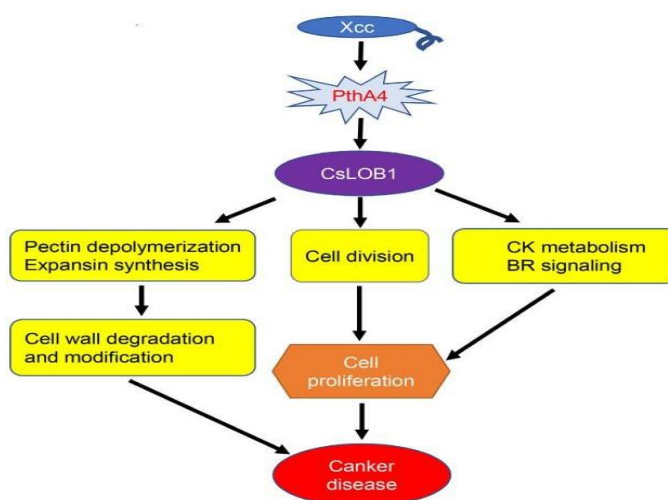


Figura 5. Modelo representativo do mecanismo de ação do efector *pthA4* na indução da expressão do gene de suscetibilidade *CSLOB1* (Adaptado de Zou et al 2021).

2.3. CONTROLE DA DOENÇA E ALTERNATIVAS SUSTENTÁVEIS

Controlar uma doença, consiste no emprego de estratégias e técnicas que visam prevenir ou reduzir danos causados por um patógeno em um cultivar (HE et al., 2021). No caso do cancro cítrico, emprega-se atualmente duas principais estratégias.

Uma delas consistindo na erradicação do patógeno, onde objetiva-se impedir a existência do agente causal em uma cultura, ou fazer com que a sua incidência seja e mantenha-se de baixo nível. Por um outro lado, para lidar com áreas onde a incidência da doença é maior, a estratégia consiste em adotar medidas para minimizar danos e perdas econômicas (HE et al., 2021).

Como já mencionado, a abordagem atual de manejo para a doença consiste na erradicação de plantas assim que os sintomas são detectados, além do uso de bactericidas à base de cobre. Estes produtos são utilizados para o controle do cancro cítrico durante os períodos climáticos mais favoráveis para a proliferação do patógeno, porém são descritos por serem um método preventivo, com nenhuma atividade curativa. Sua ação consiste em criar uma camada de partículas de cobre na superfície foliar de forma a agir como uma película protetora (HIPPLER et al., 2017). Contudo, esses métodos resultam em custos de produção mais elevados e podem levar à seleção bacteriana para resistência a metais, já constatado através de estudos que através de sequenciamento, identificaram ORFs no genome de *X.citri*, com alta homologia com genes associados a resistência ao cobre (MARIN et al., 2019), além de possuírem efeitos prejudiciais no solo (REHMAN et al., 2019).

Desta forma a busca de alternativas mais ecologicamente viáveis para controlar o cancro cítrico tem aumentado nos últimos anos.

O setor agroindustrial demanda métodos mais eficientes e sustentáveis a serem adotados na produção agrícola para o controle de doenças. Diversas metodologias alternativas vêm sendo estudadas para se adequar com técnicas que são consideradas sustentáveis. Essas práticas buscam diminuir a quantidade de resíduos químicos nos solos que as formas de manejo tradicional contra fitopatógenos acarreta ao meio ambiente. Dentre essas abordagens, existem estudos que se baseiam no controle biológico, com o auxílio da microrganismos como bactérias, bacteriófagos e fungos, para causarem um efeito antagônico à atividade da *X. citri*, como também o uso de compostos vegetais que possuem propriedades antibacterianas (MARTINS et al., 2020).

Além das diversas metodologias mencionadas, existe um conjunto de técnicas que se aproveitam da engenharia genética e biologia molecular para manipular genes de interesse, que estão sendo adotadas, uma vez que uma variedade de fitopatógenos possui uma dependência de mecanismos moleculares para causarem sua patogenicidade. Estas técnicas denominadas de Técnicas Inovadoras de Melhoramento de Precisão (TIMP), tem a proposta de atuar contra o patógeno, através do silenciamento de genes essenciais para o seu desenvolvimento, sem que cause alteração a demais genes do organismo hospedeiro.

2.4. TECNOLOGIAS INOVADORAS DE MELHORAMENTO DE PRECISÃO

Cada vez mais o agronegócio exige que métodos mais sustentáveis sejam adotados na produção agrícola para o controle de doenças. Desta forma, é de extrema importância que novas estratégias sejam estudadas. Dentre essas podemos citar as “Tecnologias Inovadoras de Melhoramento de Precisão” (TIMPs). Essas técnicas utilizam engenharia genética que não necessariamente envolvem grandes modificações de DNA/RNA e permitem que apenas os genes de interesse sejam silenciados, fazendo com que não haja modificações genéticas na planta (CENTRE et al., 2011). Dentre estas técnicas, encontra-se o RNAi, CRISPR, entre outras, sendo a última que ganhou maior visibilidade nos últimos anos.

O sistema CRISPR-Cas, consiste em um sistema imune adaptativo existente em espécies de bactérias e arqueas, que impede que sejam infectados por bacteriófagos (DEVEAU; GARNEAU; MOINEAU, 2010). O sistema se baseia no recrutamento de enzimas Cas, que identificam o material genético exógeno e os cliva em pequenos fragmentos, como se fosse a ação de uma tesoura, e estes fragmentos então são integrados ao sistema CRISPR, como uma forma de memória. Caso o mesmo tipo de bacteriófago venha a tentar uma nova infecção, o organismo já se lembrara dele e o reconhecimento será mais rápido (XU; LI, 2020).

No caso a utilização do sistema CRISPR como uma forma de edição de genomas, são utilizados dois elementos principais: o RNA guia (sgRNA) e a enzima endonuclease Cas, sendo o sistema mais bem caracterizado e, portanto, o mais utilizado em experimentos, o sistema CRISPR-Cas9 (JIANG; DOUDNA, 2017). Uma vez que o sgRNA recruta a enzima Cas9 para o local exato do genoma a ser clivado,

a enzima realiza sua ação, formando uma quebra na dupla fita alvo. Essa quebra poderá ser reparada por duas vias de reparo diferentes, onde a via do Reparo Dirigido por Homologia (HDR) possibilita a introdução de modificações precisas no local da clivagem (XU; LI, 2020).

Tendo em vista que o mecanismo de patogenicidade da bactéria *X. citri*, envolve a injeção de efetores *PthA4* que possuem como alvo a modulação da expressão do gene de suscetibilidade *CsLOB1*, a utilização de ferramentas para causar o silenciamento gênico do gene *CsLOB1*, apresenta a possibilidade de obtenção de plantas mais tolerantes a doença. Este potencial foi de fato comprovado via edição do gene *CsLOB1* por CRISPR-Cas, onde as plantas apresentaram resistência ao cancro cítrico (JIA et al., 2016, 2017; PENG et al., 2017; ZOU et al., 2021).

Entretanto a técnica de CRISPR-Cas9 possui algumas dificuldades para a obtenção das plantas em uso comercial, uma vez que o processo necessita da transformação/transfecção, regeneração e propagação da planta (GAN; LING, 2022).

Os ASOs apresentam a vantagem de existirem diversas estratégias de entrega para a introdução da molécula na planta, incluindo métodos de infiltração, pulverização e absorção (KRASNOĐEBSKI et al., 2023). Arelado a isso, considerando que citros é uma espécie perene, o processo pode demandar vários anos até disponibilidade de utilização em campo. Por outro lado, a tecnologia Oligonucleotídeos Antisense (Antisense Oligonucleotides - ASOs) demonstra-se muito promissora para o silenciamento transiente de genes de suscetibilidade como o *CsLOB1*.

Os ASOs são polímeros de DNA ou RNA sintéticos que consistem em um tamanho de 15 a 20 nucleotídeos (DINÇ et al., 2011). Teoricamente são capazes de afetar o metabolismo de ácidos nucleicos através de bloqueios físicos e químicos (DINÇ et al., 2011). Os ASOs são capazes de inibir a tradução de um mRNA alvo por via de duas estratégias principais (Figura 6) (BENIZRI et al., 2019). A primeira ao se ligarem ao mRNA alvo, irão causar um efeito estérico, uma repulsão física que impedirá que outros fatores moleculares deem continuidade a tradução (RINALDI; WOOD, 2018). O segundo mecanismo é mediado pela enzima endógena RNase H, uma enzima que reconhece a formação do heteroduplex formado na hibridização, promovendo então a clivagem do RNA (BENIZRI et al., 2019). Neste caso, o ASO se mantém intacto, e será reciclado para ativar a clivagem de outras moléculas de RNA

alvo.

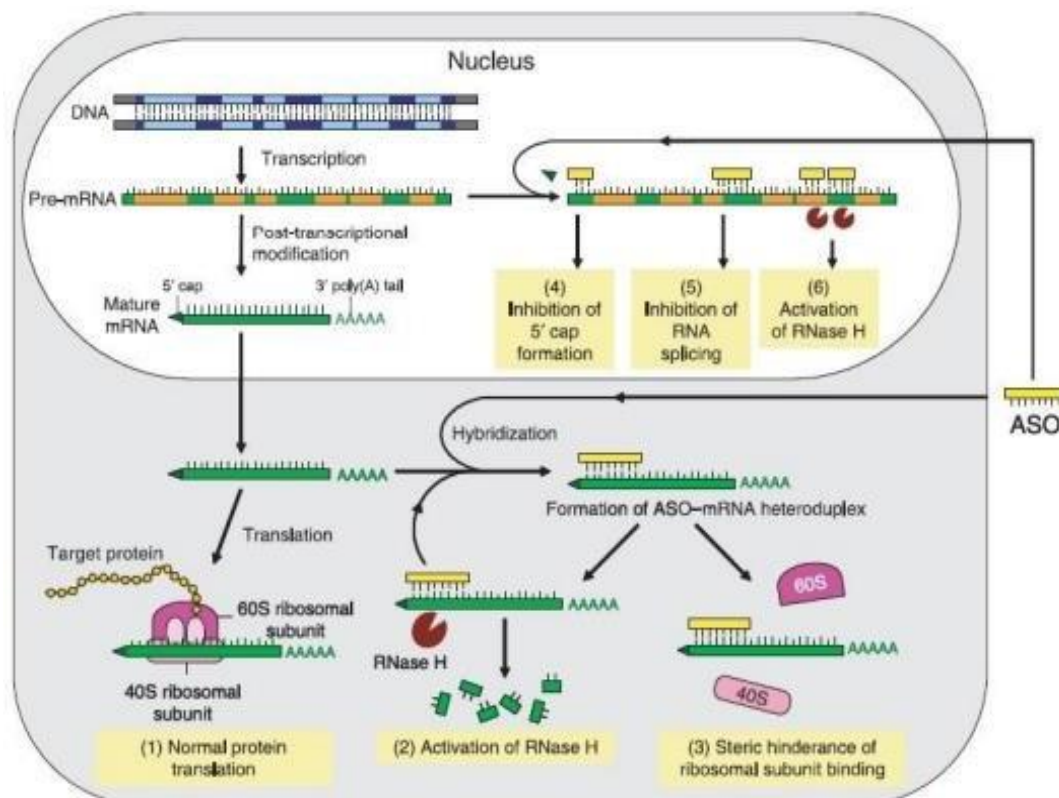


Figura 6. Mecanismos de ação da molécula oligonucleotídeo antisense. (1) Na ausência do ASO, a proteína será produzida normalmente. (2) Uma vez formado o complexo ASO-mRNA, a enzima RNaseH será recrutada, promovendo a clivagem do mRNA. (3) Bloqueio físico causado pelo ASO, impedindo subunidades ribossômicas a se ligarem. (4)(5) Inibição por via do ASO na continuação do processo de maturação do mRNA, ou também por via da enzima RNaseH (6) (Benizri et al 2019).

Por ser uma molécula exógena, um dos maiores desafios da aplicação e utilização do ASO é sua estabilização, uma vez que ele está sujeito a ação de endonucleases, como forma de defesa do organismo, e rapidamente serem degradados. Para evitar tal ação, são necessárias que modificações químicas em sua estrutura molecular sejam adotadas, para conferir resistência às nucleases. Por questões de estabilidade e custo, a modificação mais comumente empregada é a do fosforotíato (Figura 7), onde um oxigênio (O) do grupamento fosfato, não envolvido na ligação fosfodiéster, é substituído por um átomo de enxofre (S), garantindo que o ASO cumpra com seus 2 requisitos essenciais para a promoção do silenciamento gênico: serem resistentes a nucleases e ativar a via da RNaseH (BENIZRI et al., 2019).

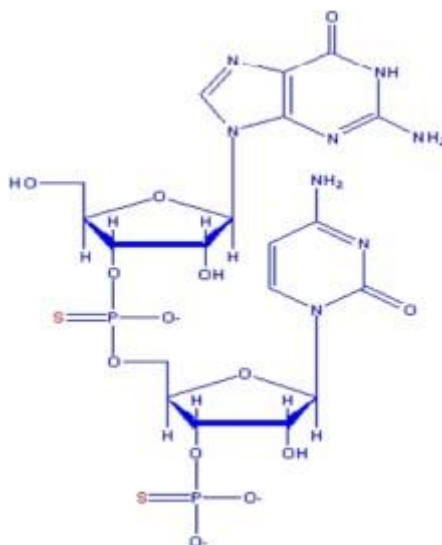


Figura 7 - Estrutura molecular do oligonucleotídeo antisense. Em vermelho, átomos de enxofre (S) são inseridos em substituição de átomos de oxigênio (O) do grupamento fosfato da molécula (Antisense oligos. Disponível em: <https://www.idtdna.com/pages/products/functional-genomics/antisense-oligos>).

Apesar de ser uma importante ferramenta terapêutica, o uso da tecnologia dos ASOs em conjunto com sistemas vegetais ainda é pouco explorado, mesmo que já em 1992, ter sido publicado um trabalho demonstrando que culturas de células vegetais em suspensão eram capazes de absorver os ASOs (TSUTSUMI; KANAYAMA; TANO, 1992). Um trabalho recente publicado por SANDOVAL-MOJICA et al, 2021 também demonstrou uma grande relevância sobre o estudo dos ASOs para combater fitopatógenos. Neste estudo, foi demonstrado a eficácia da ação de silenciamento dos ASOs para reduzir a população de bactérias *Candidatus liberibacter asiaticus* (CLas), causadoras da doença de Huanglongbing (HLB), tendo como alvo mRNAs dos genes *LigA* e *gyrA*, considerados essenciais para sobrevivência do patógeno. Além da demonstração do silenciamento gênico também foi demonstrado a absorção de ASOs marcados com fluorescência até o núcleo celular de células da bactéria *Alphaproteobacteria Wolbachia* (wDi), comprovando que o ASO é absorvido e translocado (SANDOVAL-MOJICA et al., 2021).

Uma classe de inibidores de metaloproteinases teciduais (TIMPs) comparável à tecnologia dos oligonucleotídeos antisense (ASOs) são os RNAs de interferência (RNAi). Similarmente aos ASOs, os RNAi exercem sua função de silenciamento gênico ao atuarem no mecanismo de transcrição, tendo como alvo o RNA mensageiro (mRNA) de uma proteína específica. Os RNAi são moléculas de ocorrência natural no ambiente celular, que servem para regular a expressão gênica e também atuam como

um mecanismo de defesa contra ácidos nucleicos exógenos (Fusco et al., 2019).

Diferentemente dos ASOs, o RNAi envolve um processo de silenciamento mediado por RNA de dupla fita (dsRNA). Este dsRNA é clivado por uma endonuclease chamada Dicer, gerando pequenos fragmentos de RNA de interferência (siRNA). Esses siRNAs são então incorporados no complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), que direciona o complexo para o mRNA alvo para a degradação ou inibição da tradução (Bilanges & Stokoe, 2005).

Embora possuam diferenças estruturais, os mecanismos de ação de ambas as tecnologias são similares. Além disso, ambas podem ser modificadas para melhorar o potencial de ação e a estabilidade das moléculas (Gareri et al., 2022).

Adicionalmente, foi relatado que os ASOs são mais fáceis e menos custosos de sintetizar em comparação aos RNAi (Gruber et al., 2023).

Diversas são as evidências que demonstraram a possível utilização dos ASOs como moléculas a serem incorporadas no controle de doenças em plantas. Por conta dos resultados promissores em outros patossistemas, sendo um deles utilizando plantas de citros (SANDOVAL-MOJICA et al., 2021), o presente estudo se propôs a testar a aplicação da tecnologia dos oligonucleotídeos antisense no silenciamento do gene *CsLOB1*, visando o controle do cancro cítrico.

3. HIPÓTESE

A aplicação de ASOs poderá reduzir a transcrição de genes de *Citrus sinensis*.

4. OBJETIVO GERAL

Validar o uso da tecnologia ASO e empregar no silenciamento do gene *CsLOB1* para tolerância ao cancro cítrico.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecimento de um pipeline para desenho dos ASOs em *Citrus sinensis*;
- Validar o uso dos ASOs no *knockdown* da expressão do gene *PDS* como prova de conceito;
- Validar o uso de oligonucleotídeos antisenso (ASOs) na redução dos sintomas do cancro cítrico e silenciamento do gene de suscetibilidade *CsLOB1*.

Capítulo 1 – Estabelecimento de um pipeline para desenho dos ASOs em *Citrus sinensis* e utilização do gene *PHYTOENE DESATURASE* (*CsPDS*) como prova de conceito.

Resumo

Tecnologias Inovadoras de Melhoramento de Precisão (TIMPs) estão sendo cada vez mais utilizadas para desenvolver métodos de modificação genética de características desejáveis em culturas de interesse. Dentre essas tecnologias estão os oligonucleotídeos antisense (ASOs). ASOs são polímeros sintéticos de DNA ou RNA de cadeia simples curta, que regulam a expressão de um gene-alvo através da ativação da enzima RNaseH, que cliva o transcrito, promovendo assim o silenciamento do gene. Considerando o efeito promissor da técnica, este estudo teve como objetivo desenvolver um pipeline para desenho dos ASOs e validar seu efeito utilizando um gene marcador de *Citrus sinensis*. Dessa forma, gene *PDS* foi escolhido, uma vez que é conhecido por estar associado a produção de clorofila, e seu silenciamento pode levar a um fenótipo de fotobranqueamento. Para desenho dos ASOs, a sequência do *PDS* foi submetida aos softwares Sfold e OligoWalk e três ASOs foram selecionados (chamados ASO_PDS1, 2 e 3), juntamente com uma sequência de ASO aleatório (ASO Random) para ser usada como controle negativo. Todos foram validados através do BLAST no NCBI para evitar possíveis *off-targets* no genoma de *Citrus sinensis*. Esses ASOs foram sintetizados e utilizados nos procedimentos experimentais desse trabalho. Para avaliar a absorção e o efeito do ASO na planta, plântulas estioladas foram transferidas para um recipiente contendo a solução de ASO em 2 configurações experimentais: i. absorção da plântula pela raiz e ii. absorção por epicótilos variando o tempo de luz/escuro. As imagens dos epicótilos e das plântulas foram analisadas e quantificadas pelo software de análise de pixels QUANT. Nenhum dos ASOs-PDS induziram fotobranqueamento nas folhas, porém o ASO_PDS2 reduziu significativamente o teor de clorofila foliar e a expressão do gene *pds*. Esses resultados indicam que possivelmente o ASO_PDS2 foi eficiente para reduzir a expressão do gene *CsPDS*, porém não estável suficiente até o período necessário para observação do fenótipo visual de branqueamento foliar.

1. INTRODUÇÃO

O gene *phytoene desaturase* (*PDS*) foi primeiramente estudado devido ao fenótipo de fotobranqueamento obtido após seu silenciamento com a técnica de “silenciamento gênico induzido por vírus” (VIGS)(KUMAGAI et al., 1995; NAING et al., 2019). Os VIGS representam uma ferramenta de genética reversa na análise em larga escala das funções biológicas de genes específicos em plantas, onde se utilizam de sua capacidade de degradar rapidamente o mRNA dos genes-alvo e pela rapidez dos resultados obtidos. O processo de ação dos VIGS se divide em três etapas principais: modificação dos genomas virais para incluir fragmentos de genes hospedeiros a serem silenciados, infecção das plantas hospedeiras apropriadas e o subsequente silenciamento dos genes-alvo como parte do mecanismo de defesa da planta contra infecções virais (SENTHIL-KUMAR; MYSORE, 2011).

O gene *CsPDS* codifica a enzima ligada à membrana tilacoidal *PHYTOENE DESATURASE*, a qual é necessária para a biossíntese de pigmentos carotenóides, que protegem a clorofila da foto-oxidação, e a inibição desse gene é esperada resultar em um fenótipo de fotobranqueamento (DINÇ et al., 2011). Foi demonstrado por Dinç et al 2011, a utilização do gene *PDS* como um gene modelo para testar a eficácia de silenciamento de ASOs, assim como a seleção de suas sequencias alvo em plantas de trigo, onde observaram um leve fenótipo de fotobranqueamento. (Dinç et al., 2011). Em citros, o gene *CsPDS* tem sido muito estudado para investigações científicas relacionadas ao silenciamento gênico, comumente realizado por meio da técnica de VIGS, que se estabeleceu como uma ferramenta valiosa para explorar as funções dos genes em plantas(AGÜERO et al., 2014; KILLINY, 2022). A notável suscetibilidade do gene *PDS* ao silenciamento o tornou uma escolha preferencial em uma variedade de culturas, incluindo *Capsicum annuum* e *Solanum lycopersicum*, onde tem sido amplamente empregado para validar a eficácia de sistemas de silenciamento gênico e técnicas de edição de genoma(KIM et al., 2017; ORZAEZ et al., 2009).

Além disso, o gene *PDS* emergiu como uma ferramenta crucial para avaliar a precisão e eficiência do silenciamento induzido pelo CRISPR, promovendo mutações específicas nesse gene repórter (DUTT et al., 2020; LEBLANC et al., 2018). Além disso estudos utilizando a técnica CRISPR em *C.sinensis* utilizam o gene *CsPDS* devido a fácil identificação do fenótipo causado pelo silenciamento, assim promovendo uma crítica avaliação da eficácia da técnica (PRADO et al., 2024).

Devido a semelhança de facilidade de obtenção do fenótipo quando comparado a técnica de silenciamento por VIGS, e por ser um gene bem descrito e utilizado com outras técnicas de silenciamento, esse gene foi selecionado para ser utilizado como prova de conceito no presente estudo usando ASO. Do ponto de vista metodológico sabe-se que folhas estioladas não apresentem clorofila, e que quando expostas à luz, ocorre a indução dos genes associado a síntese de clorofila, incluindo *PDS*, o que resulta em um aumento no conteúdo de carotenoides (VON LINTIG et al., 1997). Com base nessas observações, foi avaliado o potencial dos ASOs em silenciar o gene *CsPDS*, logo após as plantas estioladas entrarem com contato com a luz, e assim verificar se poderiam retardar ou impedir o processo de produção de clorofila, consequentemente obtendo o fenótipo de fotobranqueamento.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. ESTABELECIMENTO DO PIPELINE PARA DESENHO DOS ASOS

Os ASOs foram desenhados seguindo as etapas do pipeline desenvolvido no projeto (Figura 1). A sequência fasta do gene *CsPDS* foi obtida do banco de dados Citrus Genome Database (<https://www.citrusgenomedb.org/> - pds, AJ319761.1-pds.m1) que contém a sequência fasta do genoma de duas variedades de laranja doce, Valência e Pineapple. Uma vez obtida a sequência fasta, a mesma foi utilizada como input dos softwares Sfold (<https://sfold.wadsworth.org/cgi-bin/index.pl>) e Oligowalk (http://rna.urmc.rochester.edu/cgi-bin/server_exe/oligowalk/oligowalk_form.cgi), ambos softwares utilizam algoritmos para calcular os parâmetros termodinâmicos da hibridização antisenso por predizer as mudanças na energia livre da ligação dos oligonucleotídeos ao RNA alvo (DING; CHAN; LAWRENCE, 2004; LU; MATHEWS, 2008).

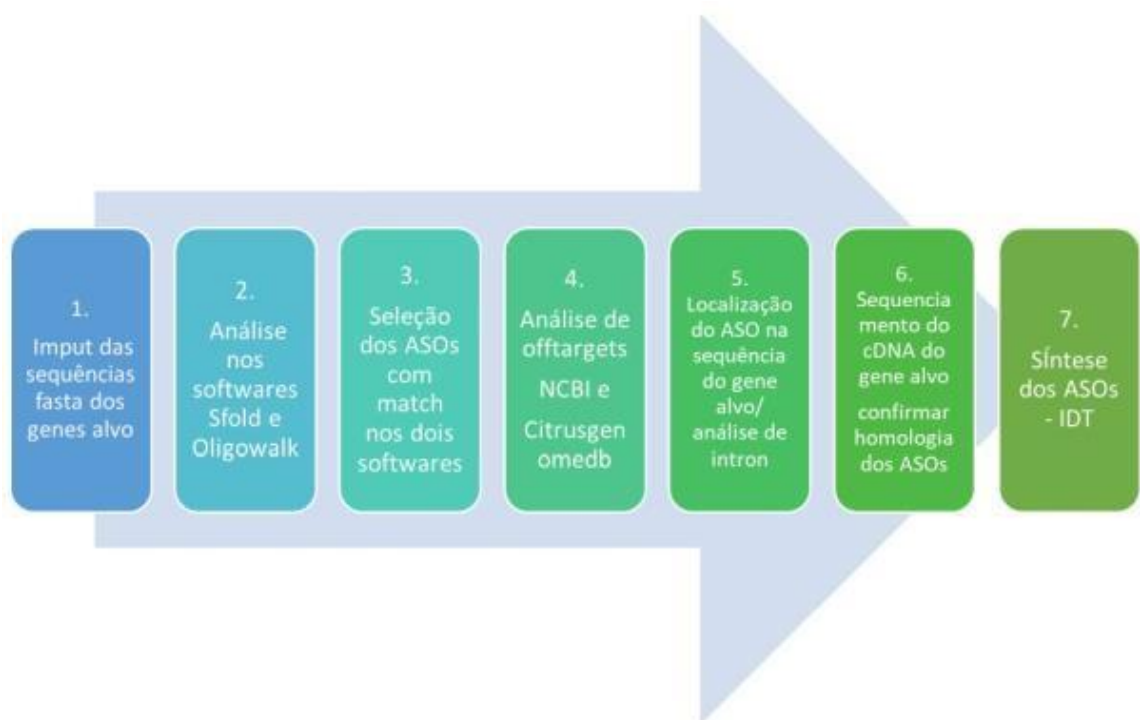


Figura 1 – Pipeline para desenho dos ASOs para silenciamento de genes de *Citrus sinensis*.

O tamanho de ASO selecionado foi de 19 nucleotídeos. Cada software gerou uma tabela com os ASOs detectados para o gene alvo. Após a obtenção das tabelas, os resultados foram manualmente comparados e escolhidos aqueles em comum em ambos os softwares, com maior chance de serem considerados um ASO efetivo pelos dois softwares. Para certificar a ausência de possíveis *off-targets* (cutoff – abaixo de 16 nucleotídeos de identidade), as sequências foram analisadas por BLASTn com o genoma de *Citrus sinensis*. A segunda checagem foi feita por BLAST no Citrus Genome Database, uma vez que o website dispõe a sequência fasta do mRNA, para conferir se o ASO candidato não se encontra em uma região de *splicing* alternativo, ou regiões não traduzidas (UTR). A região contendo os ASOs para os genes alvos foram amplificados e sequenciados no sequenciador ABI PRISM 3730, para confirmação da homologia entre os nucleotídeos do ASO e respectivo gene alvo. Por fim, foram selecionados 3 ASOs para o gene *CsPDS*, para serem sintetizados. Além dos ASOs selecionados, um ASO de sequência aleatória denominado “random”, foi desenhado para servir de controle negativo. Essa sequência foi desenhada a partir de um dos ASOs previamente estipulado, e de forma aleatória, alterando a posição dos nucleotídeos da sequência. Essa randomização foi feita utilizando o software Shuffle DNA. Após isso, a análise por BLASTn foi feita novamente para o ASO random, a fim

de conferir se o mesmo não estava alinhando com nenhum outro gene da planta. Os ASOs por fim foram sintetizados pela empresa Integrated DNA Technologies (IDT) utilizando a modificação de fosforotioato.

2.2. FORMAS DE *DELIVERY* DOS ASOS

Diferentes métodos de aplicação dos ASOs - ASO_PDS1, ASO_PDS 2 e ASO_PDS3, além de um mix dos 3 ASOs PDS juntos, foram testados nas plantas, visando à observação do fenótipo esperado.

2.3. AVALIAÇÃO DA ABSORÇÃO DOS ASOS VIA RAIZ

A absorção dos ASOs via raiz foi realizada utilizando sementes de *Citrus sinensis* variedade Hamlin, as quais foram inseridas em meio de cultura Murashige & Skoog (MURASHIGE; SKOOG, 1962), meia força composto por sacarose, sais MS e ágar. Este meio de cultura, foi aferido para o pH de 5,8 e acondicionado em tubos de ensaio. Para cada tubo, duas sementes foram tratadas em um protocolo de desinfestação, onde são desinfestadas utilizando 10% de hipoclorito de sódio e para evitar a contaminação. Após feito o tratamento das sementes, elas são colocadas no meio já solidificado. Os tubos foram então armazenados em um ambiente sem luz para promover o estiolamento das plântulas. As plântulas estioladas foram transferidas para tubos de ensaio, onde suas raízes foram imersas em 300 µL de uma solução de água de torneira autoclavada contendo os ASOs previamente diluídos a uma concentração de 10 µM.

Os três ASOs para o gene *CsPDS*, além de um mix contendo os três juntos (ASO_PDSMix) foram utilizadas para conduzir os experimentos. Um ASO com sequência aleatória (controle random), mencionado anteriormente, bem como água foram utilizados como controle negativo para os experimentos. Esses tratamentos foram aplicados consistentemente em todos os experimentos conduzidos. As plântulas foram mantidas em uma sala de crescimento por uma semana, sob luz branca, com um fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro na temperatura de 27°C, e posteriormente os fenótipos foram avaliados. O esquema experimental está demonstrado na figura 2. O ensaio foi repetido 3 vezes.

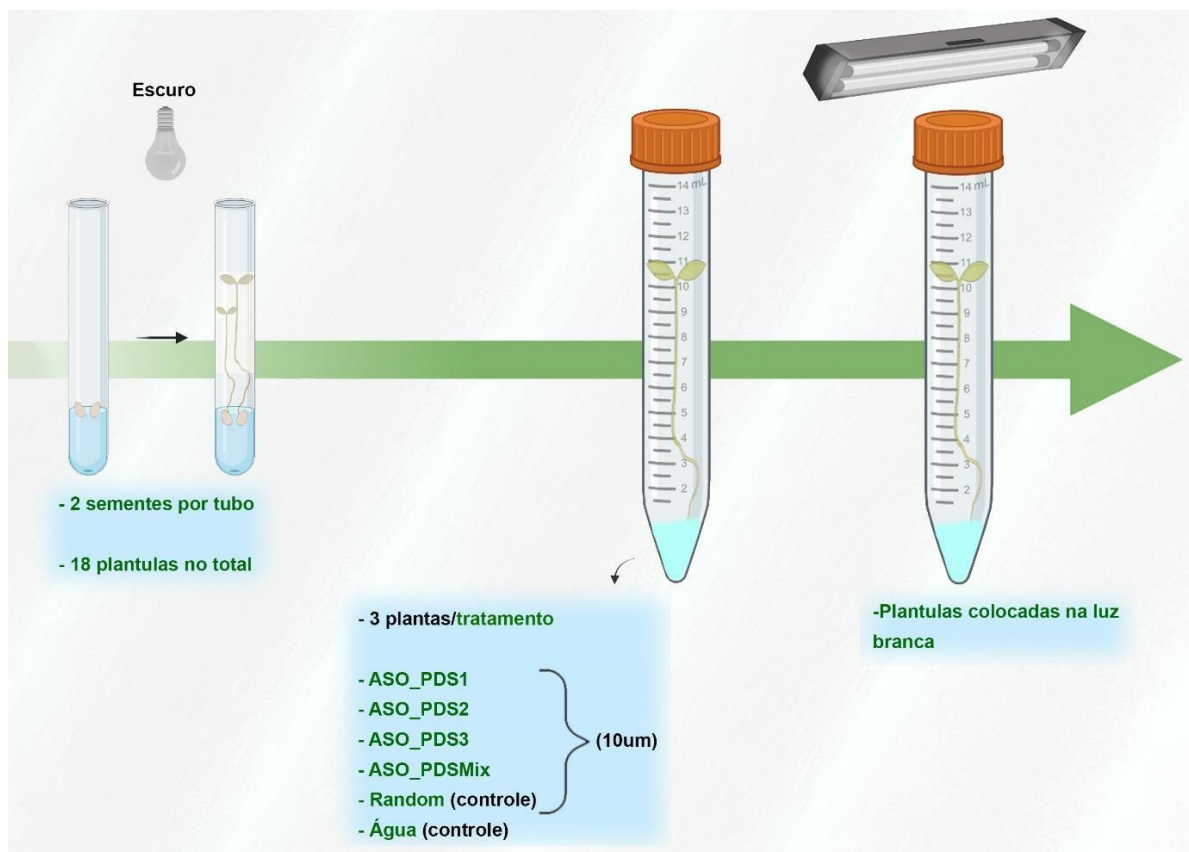


Figura 2 – Esquema da montagem do experimento de absorção dos ASOs por absorção.

2.4. AVALIAÇÃO DA ABSORÇÃO DOS ASOS VIA CAULINAR

Inicialmente, as plântulas estioladas, como mencionado no tópico 2.3 com um corte realizado 2 cm abaixo do ápice caulinar, foram expostas a 250 µL de uma solução contendo os ASOs diluídos a uma concentração de 10 µM. Em seguida, essas plântulas foram mantidas em uma sala de crescimento sob luz branca, com um ciclo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro na temperatura de 27°C por 24h.

Posteriormente, utilizando as mesmas plântulas estioladas, epicótilos de 2 cm foram novamente inoculados e mantidos por 1 semana para a extração de clorofila.

Para isso, o material foi triturado e incubado com dimetilsulfóxido (DMSO) em um banho-maria a 70°C por 5 horas, seguindo a metodologia descrita por Wellburn (WELLBURN, 1994). O experimento foi repetido utilizando caules de 1 cm, que foram mantidos em contato com os ASOs por 24 horas.

2.5. AVALIAÇÃO DA ABSORÇÃO DOS ASOS VIA PECÍOLO DE FOLHAS DESTACADAS

Neste experimento, foram utilizadas 21 folhas jovens da variedade Hamlin de laranja doce (*Citrus sinensis*). Cada folha passou por um processo de desinfestação, onde foram tratadas com hipoclorito de sódio na concentração de 10% por 15 min.

Após o tratamento, as folhas foram lavadas com água destilada autoclavada e colocadas em tubos Falcon de 50 ml contendo 250 µL de uma solução de ASOs com uma molaridade de 10 µM. O experimento foi realizado com três repetições para cada tipo de ASO e três repetições para cada controle negativo: água e random. A água foi utilizada como controle negativo geral do experimento, enquanto o random serviu como controle negativo específico dos ASOs. Os tubos foram incubados no escuro por 48 horas.

Após esse período, as folhas foram infiltradas com 100 µL da solução de ASO 10 µM utilizando uma seringa de 1 mL e, em seguida, foram expostas à luz a uma temperatura de 26° C. Durante um período de 4 dias, as folhas foram fotografadas e avaliadas para observação de quaisquer alterações ou respostas aos tratamentos aplicados.

2.6. ANÁLISE DAS IMAGENS DAS PLÂNTULAS UTILIZADAS NOS EXPERIMENTOS DE ABSORÇÃO DOS ASOS VIA RAIZ E CAULINAR

Para determinar possíveis alterações na tonalidade verde das plântulas, as imagens capturadas dos experimentos foram analisadas utilizando o software QUANT® (VALE; FERNANDES-FILHO; LIBERATO, 2003). Esse programa foi especificamente desenvolvido para quantificar sintomas em plantas, utilizando a associação de pixels com tonalidades semelhantes às cores monocromáticas e, posteriormente, calculando a proporção das cores identificadas. Neste contexto, o software foi empregado para quantificar os sintomas de fotobranqueamento induzidos pelos ASOs.

O software QUANT® reduz as cores totais da imagem submetidas, a ponto de obter uma quantidade mais simplificada de cores, e permitir a organização dos pixels da imagem de acordo com o que eles representam, seja área verde da planta, ou área

sintomática. Dessa forma, foi possível obter valores que indicam a proporção da imagem que representa a área verde da planta, e a proporção da área contendo o sintoma de fotobranqueamento. Os valores obtidos das foram submetidos à avaliação estatística por meio do teste *t-Student*, com um nível de significância estabelecido em $p<0,05$.

2.7. ANÁLISE DO TEOR DE CLOROFILA NOS EXPERIMENTOS DE ABSORÇÃO DOS ASOS VIA RAIZ E CAULINAR

Os epicótilos e caules que passaram pelo processo de absorção via caulinar foram posteriormente submetidos a um procedimento de maceração e incubação com Dimetilsulfóxido (DMSO) em um banho-maria a 70°C por 5 horas. Após esse procedimento, as soluções resultantes foram analisadas utilizando um espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 665 nm e 649 nm, os quais correspondem, respectivamente, à absorbância da Clorofila a e Clorofila b.

Inicialmente, no caso dos epicótilos, a avaliação concentrou-se apenas na medida da absorbância. No entanto, no experimento envolvendo caules de 1 cm, o mesmo procedimento foi realizado, e os valores de absorbância foram utilizados para calcular a quantidade total de clorofila presente nas amostras, conforme descrito por Wellburn em 1994 (WELLBURN, 1994).

Os resultados obtidos a partir das repetições foram submetidos à análise estatística utilizando o teste *t-Student* ($p<0,05$).

2.8. AVALIAÇÃO DO TEOR DE CLOROFILA DOS EXPERIMENTOS DE ABSORÇÃO DOS ASOS VIA PECÍOLO DE FOLHAS DESTACADAS

Essa avaliação foi realizada em diferentes tempos com o auxílio do clorofilômetro (atLEAF CHL PLUS). Este equipamento possui uma espécie de pinça contendo sensores que conseguem medir de uma forma não invasiva, comprimentos de onda específicos relativos à quantidade de clorofila da folha. Os tubos permaneceram no escuro para que as folhas absorvessem a solução com os ASOs PDS, e após 48h no escuro foi medida a clorofila de cada folha e essa medição chamamos de T1. Após a infiltração dos ASOs e 24h de exposição à luz, foi feita uma nova medição da clorofila a qual foi denominada de T2 e uma última medição após 48h de exposição à luz, denominada T3. Os valores obtidos das repetições foram

avaliados pelo teste t-Student ($p < 0,05$).

2.9. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DO GENE *CSPDS* EM PLANTAS TRATADAS COM O ASO_PDS2

As plantas utilizadas, foram mantidas um mês no escuro antes da infiltração do ASO_PDS2 nas folhas. Foram utilizadas folhas jovens de *Citrus sinensis* (*C. sinensis*) da variedade Hamlin. Foi infiltrado 100uL de ASO_PDS2 com molaridade de 10μM com o auxílio de uma seringa de 1ml em todas as folhas. Esse experimento foi realizado com três repetições. Após infiltração as plantas foram mantidas nas primeiras 24h no escuro e depois foram expostas à luz. A primeira amostra coletada (T0) foi realizada antes das folhas serem infiltradas com o ASO_PDS2. Depois que os vasos permaneceram 24h com o ASO_PDS2, foi coletada uma segunda amostra (T1) e outra após 72 horas (T2). As amostras foram utilizadas para extração de RNA pelo método de cloreto de lítio. Para avaliar que todo o DNA foi degradado com o tratamento com DNase, foi realizado uma PCR com as amostras de RNA. A reação procedeu da seguinte forma: 8 μL de água milli- Q autoclavada, 10 μL do GOTAQ Master Mix (Promega), 0,5 μL de cada primer para o gene ciclofilina (*forward* 5' - AGAGTATGCAGAGGAATGG - 3' e *reverse* 5' – GTCCTTAACAGAAGTCCGT - 3') e 1 μL da amostra de RNA. As amostras que não apresentaram amplificação foram utilizadas nas próximas etapas. A síntese de cDNA foi realizada pelo sistema "GoScript™ Reverse Transcription System" (Promega) utilizando OligodT para a síntese. Nesse procedimento foram utilizados 500 ng de RNA de cada tratamento. Os cDNAs obtidos foram armazenados para análise de expressão gênica. As reações de PCR quantitativo (qPCR) foram realizadas em placas de 96 poços no sistema de detecção de sequências QuantStudio 5 (ThermoFischer), utilizando SYBR Green para detecção. Essas análises permitiram quantificar a expressão do gene *PDS1*. O controle endógeno (normalizador) usado foi o gene da ciclofilina (primers *forward* AGAGTATGCAGAGGAATGG e *reverse* GTCCTTAACAGAAGTC CGT). O cálculo da expressão relativa foi feito através do método do *Cycle Threshold* (CT) comparativo. Para normalização foi utilizada a seguinte equação: $\Delta CT = CT (\text{gene alvo}) - CT (\text{gene normalizador})$. A expressão relativa do gene alvo para cada condição foi calculada através da equação: $\Delta\Delta CT = \Delta CT (\text{amostra}) - \Delta CT (\text{calibrador})$. Através do $\Delta\Delta CT$ foi calculado o *fold change* e em seguida o calculado o Log10 do *fold change*. O

calibrador utilizado nessas análises foi o tempo T0.

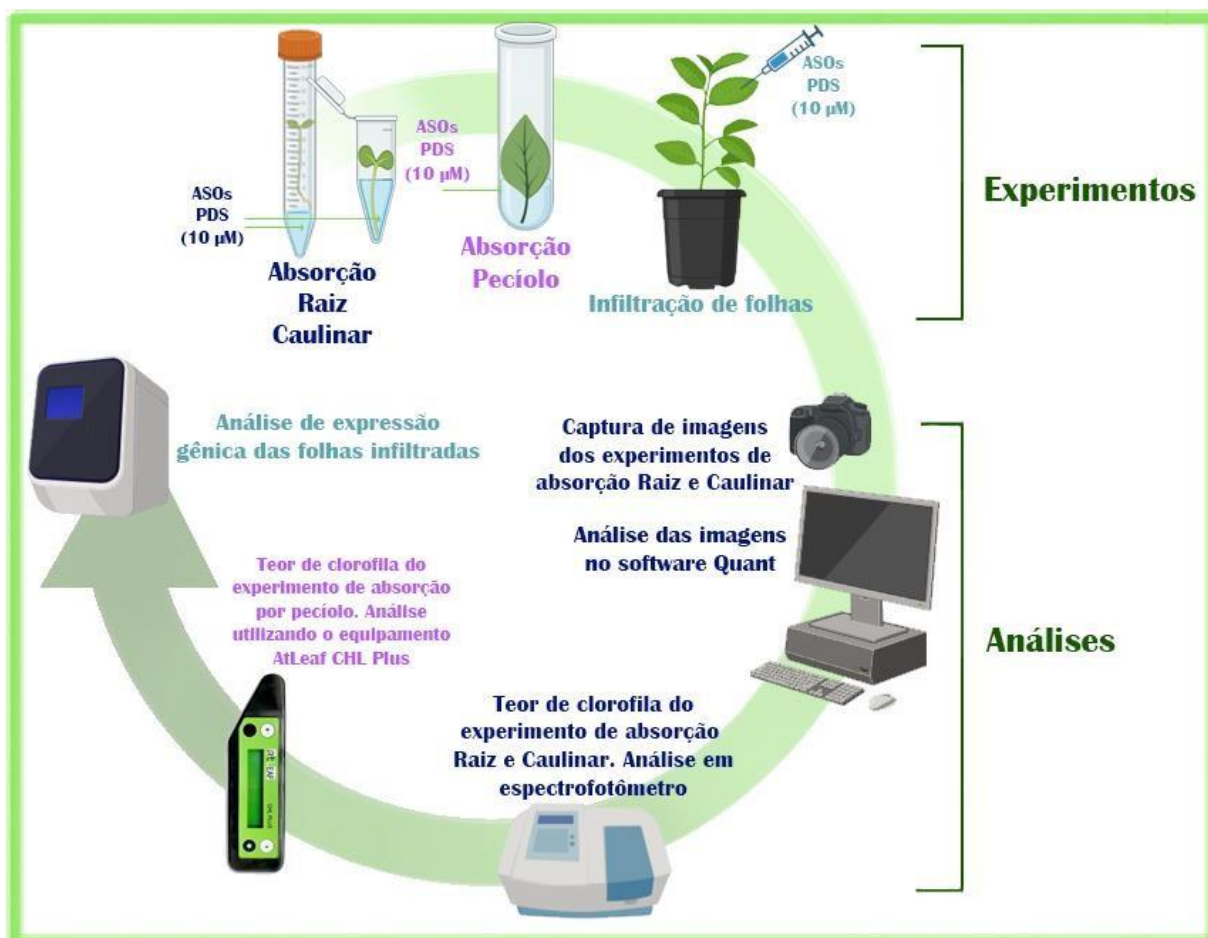


Figura 3 – Esquema da montagem e análises dos experimentos realizados com os ASOs PDS

3. RESULTADOS

3.1. OBTENÇÃO DOS ASOS

Após análises da sequência do *CsPDS1* dentro do pipeline seguido nesse trabalho (Figura 1), foram selecionados 3 candidatos foram denominados ASO_PDS1, ASO_PDS2 e ASO_PDS3 (Tabela 1). Cada ASO posicionado em uma região da sequência do gene, mais próximo ao terminal 5', região central, e mais próximo ao terminal 3'. Além de um ASO aleatorizado denominado Random para servir como controle negativo.

Tabela 1 – ASOs sintetizados para silenciamento do gene *CsPDS*.

ASO	Starting target position	Ending target position	target sequence (5' -> 3')	ASO (5' -> 3')	GC content	Average unpaired probability for target site nucleotides	Binding site disruption energy (kcal/mol) (ΔG)	Oligo Binding Energy (kcal/mol)
ASO_PDS1	8	26	AGAGCCUGAAAAUUCGAGU	A*C*TCGAATTTTCAGGCT*C*T	42.10%	0.662	8.2	-8.9
ASO_PDS2	396	414	UCGGUUGCAGUGGAAGGAG	C*T*CCTTCCACTGCAACC*G*A	57.90%	0.587	10.7	-9.3
ASO_PDS3	1133	1151	GAAGUCCCCUUCUAAGUGU	A*C*ACTTAGAAGGGAAGT*T*C	42.10%	0.604	9.2	-7.2
Random	-	-	-	C*G*CCGACGCAAACGCTT*T*A				

3.2. AVALIAÇÃO DA ABSORÇÃO DOS ASOS VIA RAIZ

As plântulas inoculadas com os ASOs e os controles foram avaliadas quanto a presença do fenótipo de fotobranqueamento após duas semanas de inoculação (Figura 4). A avaliação foi realizada tanto por registros fotográficos do fenótipo, quanto pela quantificação de pixels de sua imagem que apresentassem cores representativas do sintoma desejado.

Não houve alteração significativa da média de porcentagem de áreas verdes das plântulas quando comparados com os controles negativos random e água (Figura 5).

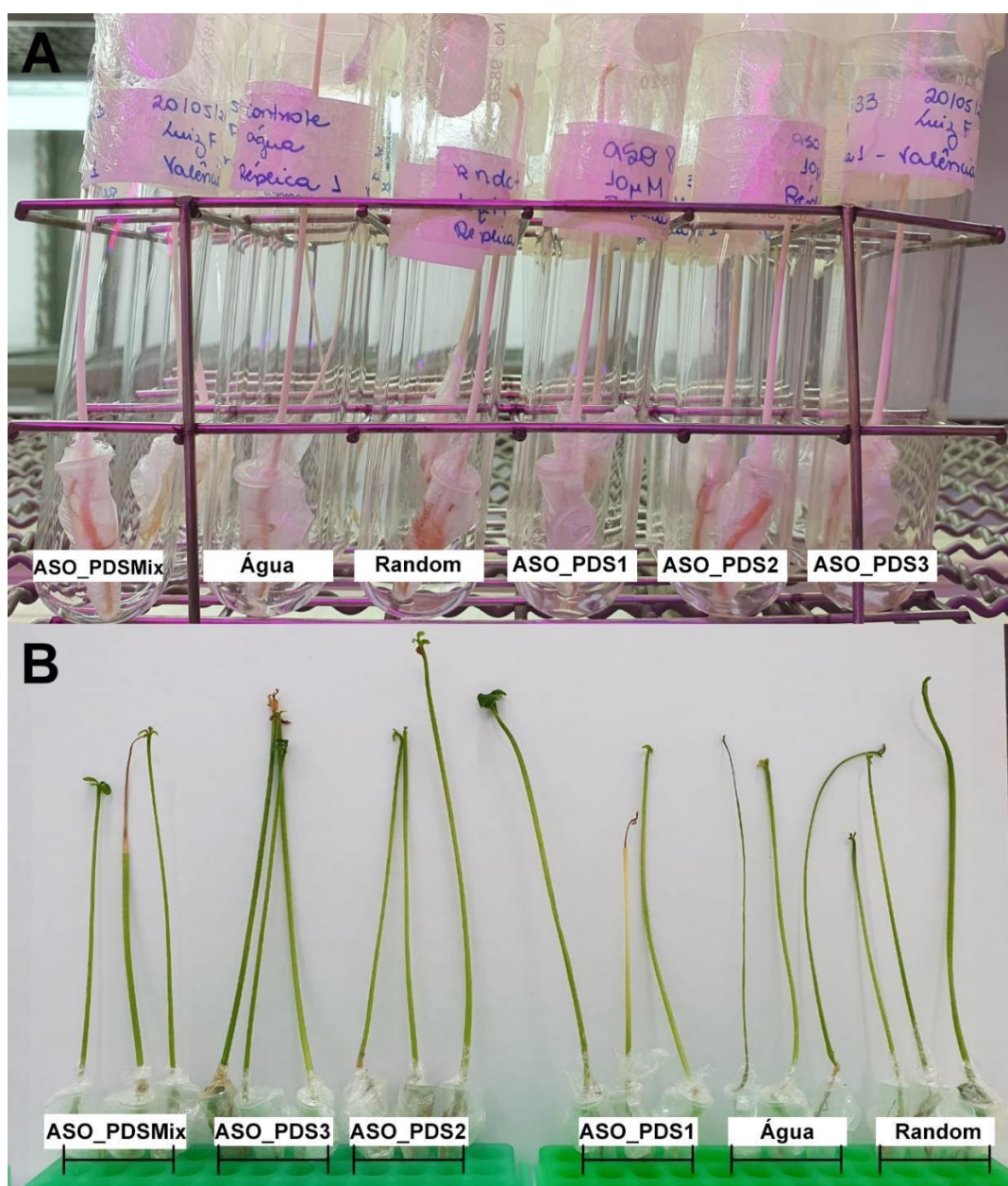


Figura 4 – Experimento de inoculação dos ASOs via raiz. A. Antes da inoculação dos ASOs. B. Duas semanas após inoculação. Em B, da esquerda para a direita, 3 repetições de cada tratamento – ASO_PDSMix, ASO_PDS3, ASO_PDS2, ASO_PDS1, Controle Água, Controle Random

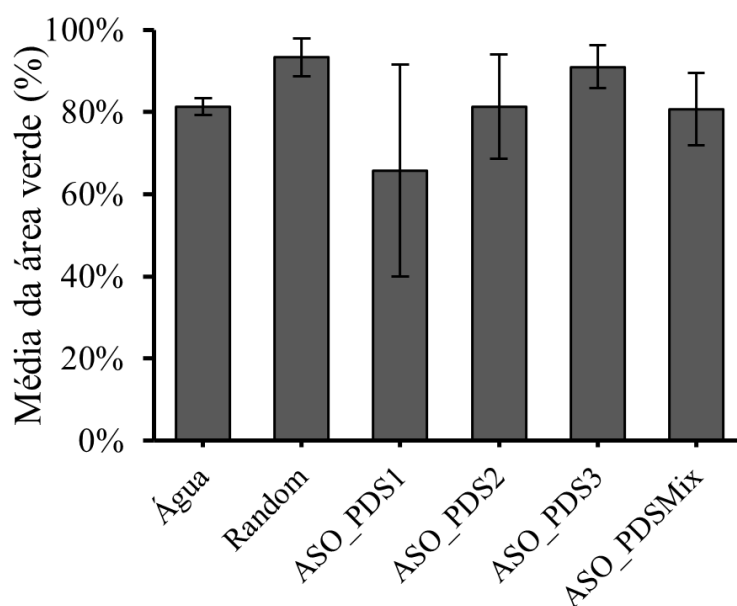


Figura 5 – Média da porcentagem de área verde das plântulas analisadas através do software QUANT. Não houve diferença significativa pelo teste *t-student* ($P < 0,05$).

3.3. AVALIAÇÃO DA ABSORÇÃO DOS ASOS VIA CAULINAR

Os epicótilos foram analisados por registros fotográficos utilizando um microscópio estereoscópio. Foi possível observar um leve fenótipo de branqueamento nos epicótilos tratados com o ASO_PDS1 e ASO_PDS2, quando comparado com os que foram tratados com o controle Random (Figura 6 A e B)

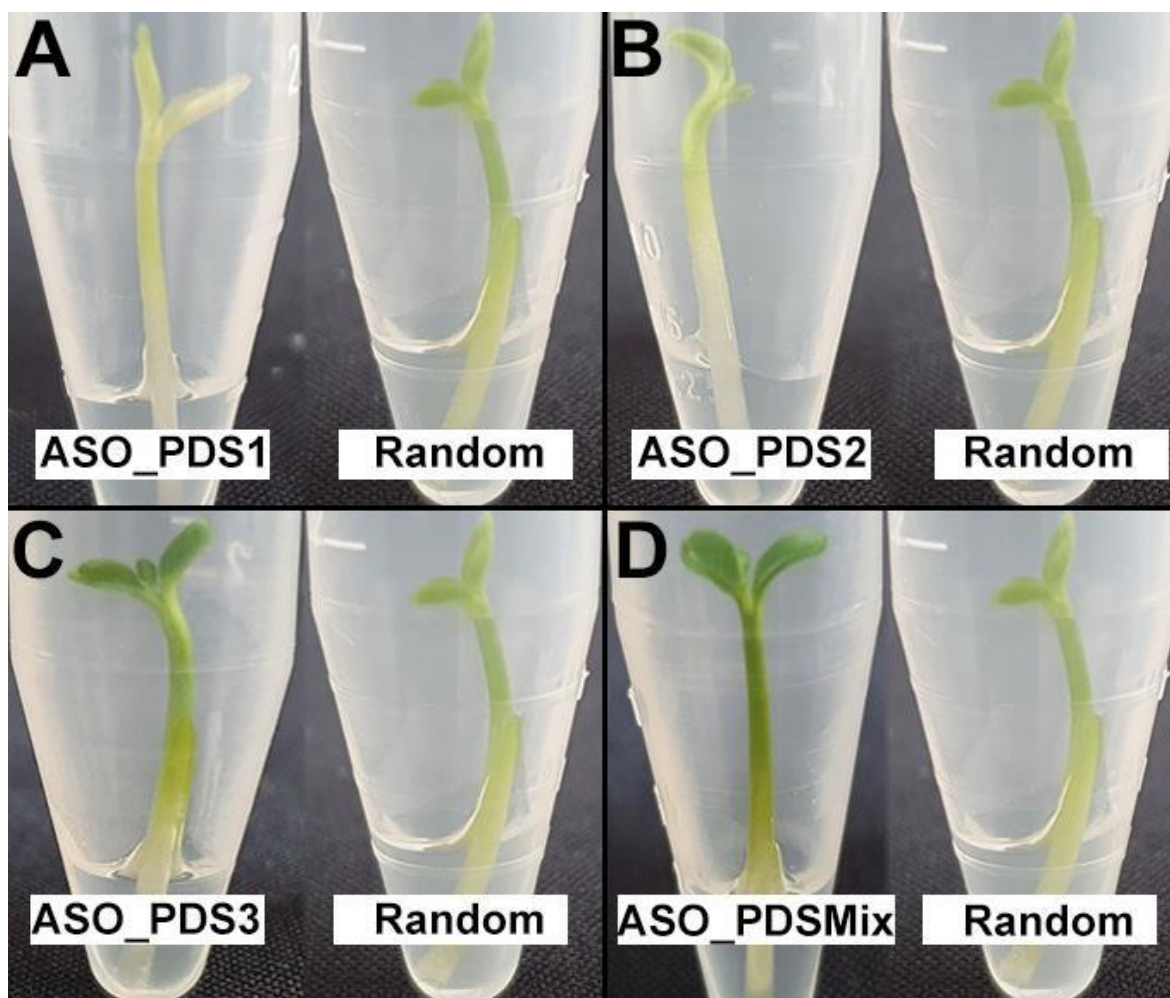


Figura 6. Avaliação dos epicótilos de *C. sinensis* em contato com os ASOs para silenciamento do gene *CsPDS*. Foram utilizadas 3 sequências diferentes de ASOs (ASO_PDS1, ASO_PDS2, ASO_PDS3) e o ASO com sequência aleatória (Controle Random) como controle negativo, na concentração de 10 μ M para cada tratamento. A. ASO_PDS1 x Random. B. ASO_PDS2 x Random. C. ASO_PDS3 x Random. D. ASO_PDSMix x Random.

Além da observação visual do fenótipo, os epicótilos foram avaliados quanto aos valores de absorbância dos comprimentos de onda relativos à clorofila **a** e clorofila **b**. Foi observada diferença significativa do tratamento ASO_PDS2 com o controle Random para as ambas as clorofilas (Figura 7). Nenhuma diferença significativa foi observada para os demais tratamentos. Esses resultados sugerem que o ASO_PDS2 pode estar interferindo na expressão do gene *CsPDS*, e consequentemente com o teor de clorofila.

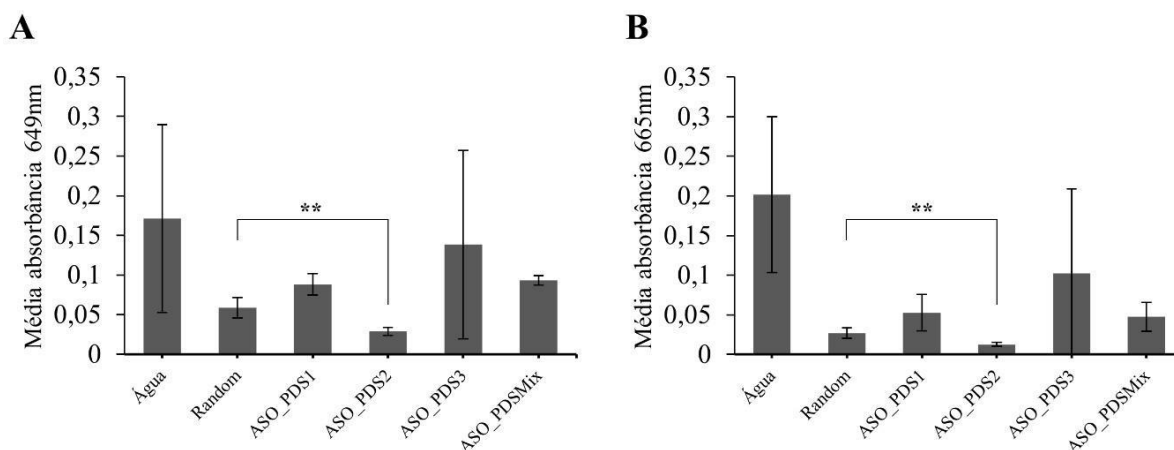


Figura 7. Avaliação do teor de clorofila nas plantas tratadas com ASOs. A. Média da absorbância do comprimento de onda relativo à Clorofila a. B. Média da absorbância do comprimento de onda relativo à Clorofila b em epicótilos após 1 semana de inoculação com ASOs para o gene *CsPDS*. Asteriscos (**) indicam significância estatística pelo teste *t-student* ($p < 0,01$).

3.4. AVALIAÇÃO DA ABSORÇÃO DOS ASOS VIA PECÍOLO DE FOLHAS DESTACADAS

Ao todo, foram empregadas 21 folhas jovens de *Citrus sinensis* para cada tratamento, fotografadas e monitoradas durante um período de 4 dias. Visualmente, não foram identificadas diferenças na coloração das folhas (Figura 8). No entanto, realizamos análises do teor de clorofila utilizando o clorofilômetro (atLEAF CHL PLUS) para investigar se, mesmo sem mudanças fenotípicas visíveis, poderia haver alguma alteração no teor de clorofila. Os resultados das medições de clorofila dos tratamentos com os ASOs e controles estão representados na Figura 9. O ASO_PDS2 apresentou uma diminuição significativa no teor de clorofila 24 horas após a infiltração foliar. Essa diminuição foi mantida após 48 horas, embora com uma significância marginal, com um valor de $P = 0,053$. Por outro lado, identificamos um aumento significativo e temporal no teor de clorofila no tratamento Random (Figura 9). Em relação aos demais tratamentos, não houve diferença significativa entre o tempo inicial antes do tratamento (T1) e após a aplicação dos ASOs (Figura 9). Esses resultados, juntamente com os resultados de absorção via caulinar, demonstraram que o ASO_PDS2 reduziu a produção de clorofila, devido possivelmente ao silenciamento do gene *CsPDS*.

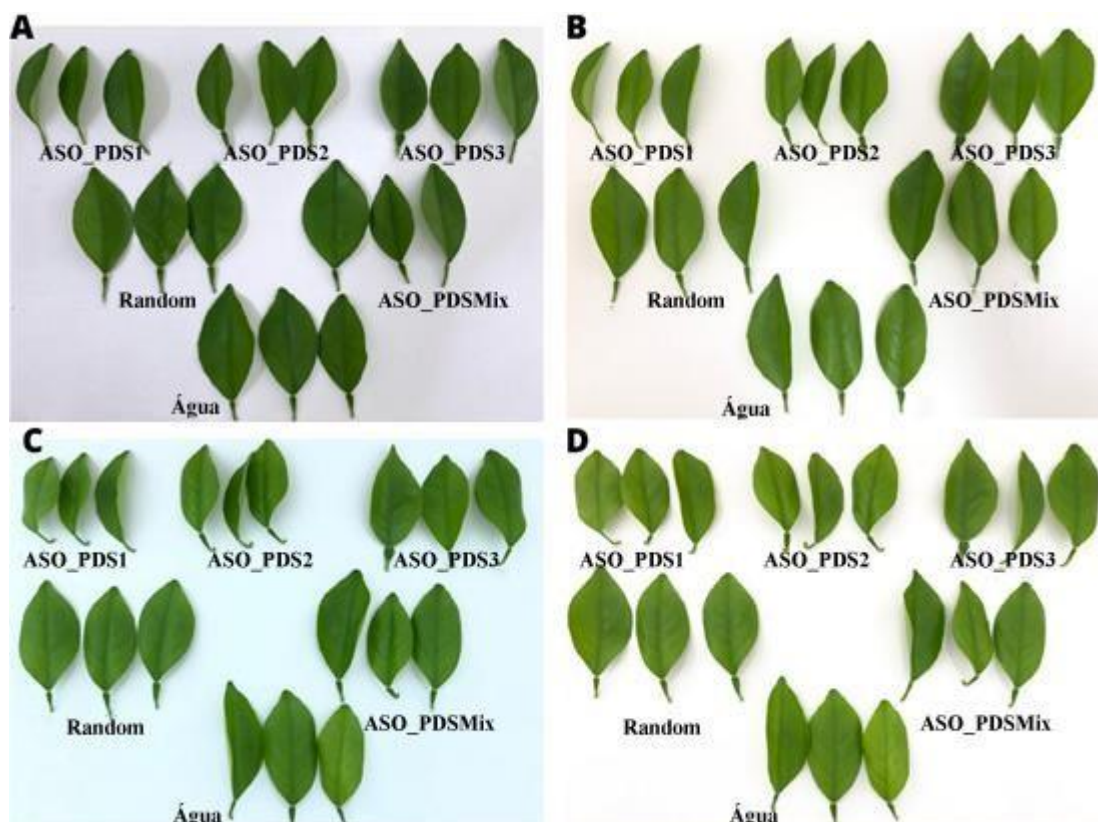


Figura 8. Foto das folhas representativas destacadas para cada tratamento. A. Antes da inoculação dos ASOs. B. 48h após absorção no escuro (T1); C. 24h após infiltração foliar e exposição à luz (T2); D. 48h após infiltração foliar e exposição à luz (T3). Água: água de torneira autoclavada. Random: controle negativo dos ASOs. ASO_PDSMix: Combinação dos ASOs (ASO_PDS1, 2 e 3).

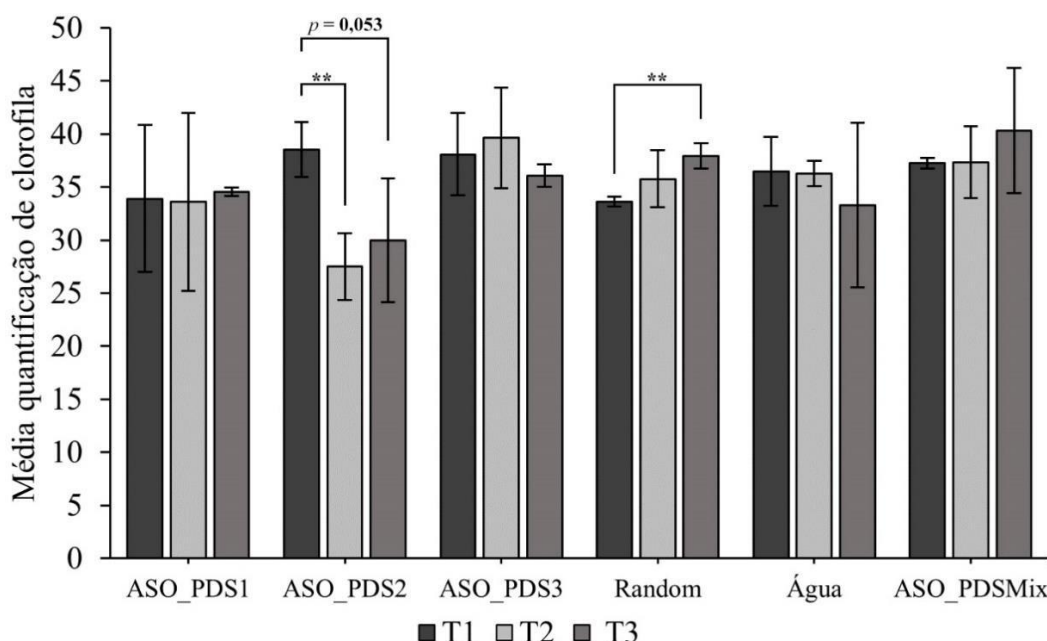


Figura 9. Média da quantificação de clorofila para cada tratamento em diferentes tempos. ASOs: ASO_PDS1, 2, 3 e Random; Random: controle negativo dos ASOs; Água: água de torneira autoclavada. ASO_PDSMix: combinação dos ASOs (ASO_PDS1, 2 e 3); Tempos de exposição aos ASOs (T1: 48h após absorção no escuro; T2: 24h após infiltração foliar na presença de luz; T3: 48h após infiltração foliar na presença de luz). *Houve diferença estatística significativa baseada no teste *t-student* (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$).

3.5. EXPRESSÃO GENICA DE PLANTAS TRATADAS COM O ASO_PDS2

Uma vez que foi observada diminuição do teor de clorofila na presença do ASO_PDS2, a próxima etapa foi verificar se essa diminuição foi decorrente do silenciamento do gene *CsPDS*. Dessa forma, a expressão do gene foi avaliada por qPCR nas amostras submetidas ao ASO_PDS2. Os resultados demonstraram que após 24 horas de exposição a luz, não houve diferença significativa entre os tratamentos, porém uma redução significativa na expressão de *CsPDS* foi observada após 72h no tratamento com ASO_PDS2, enquanto uma indução na expressão foi observada no controle (Figura 10). Esses resultados sugerem que o ASO_PDS2 interferiu na expressão do gene *CsPDS*, uma vez que, esse gene é fundamental para produção de clorofila em presença de luz, o que de fato foi observado na amostra controle, sem o ASO, onde uma indução do gene foi observada após exposição a luz.

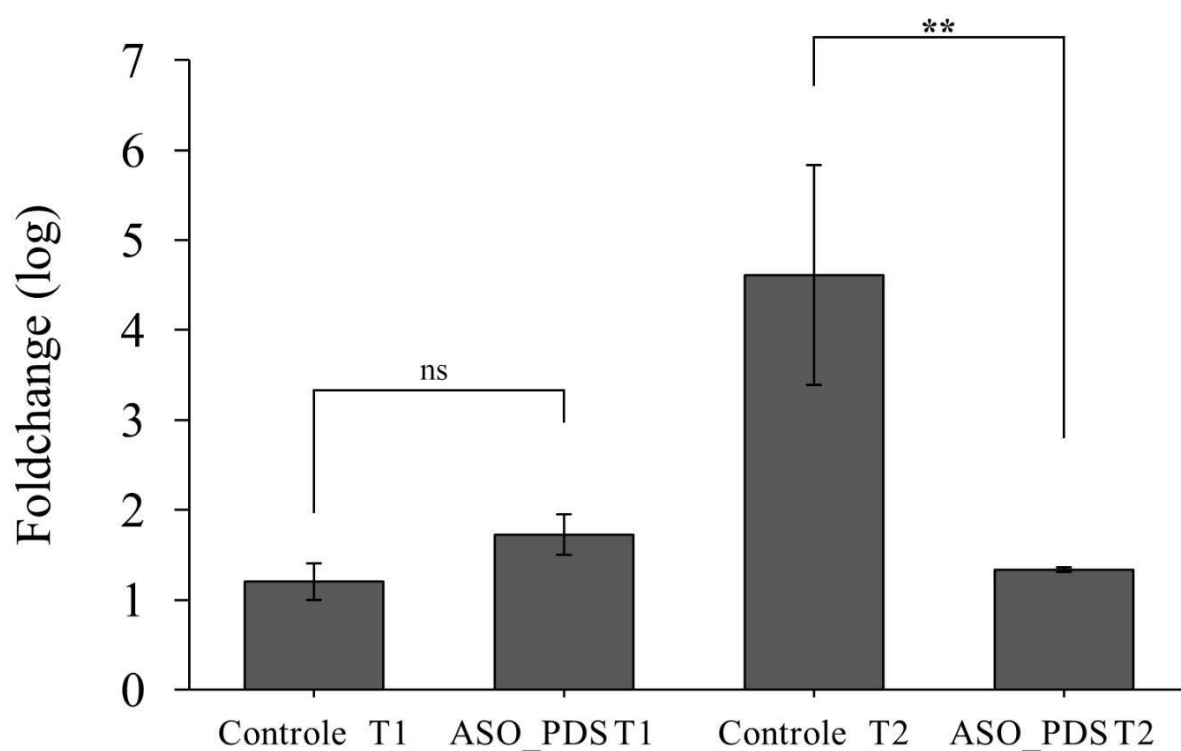


Figura 10. Expressão do gene *CsPDS* avaliada por qRT-PCR 24 (T1) e 48 horas (T2) após exposição a luz comparados com o tempo 0 (antes da exposição a luz). Os asteriscos mostram diferenças estatisticamente significativas para repressão do gene nos tratamentos com o ASO_PDS em comparação com o controle usando *t*-Student ($*p < 0,05$). Ns – não significativo.

4. DISCUSSÃO

Os ASOs foram desenhados utilizando ferramentas *in silico* que baseado em uma sequência FASTA de um gene alvo desejado, predizem dentro de um tamanho do específico, quais seriam os melhores candidatos a terem uma maior eficiência no silenciamento gênico (DING; CHAN; LAWRENCE, 2004). Estas predições são feitas baseadas em parâmetros termodinâmicos que indicam a quantidade de energia livre disposta ao ASO para realizar suas principais funções (SHAO et al., 2006). No presente projeto foram desenhados 3 ASOs candidatos para o gene *CsPDS*, selecionados conforme sua taxa de eficiência. Em alguns trabalhos utilizando ASOs, são desenhados mais de 10 ASOs candidatos para serem testados quanto a eficiência de silenciamento (SUN et al., 2005).

Através do pipeline desenvolvido nesse estudo, utilizando dois diferentes softwares e escolhas das sequências preditas comuns em ambas as análises, possibilitaram a redução do número de sequências para testes *in vivo* e identificação de um ASO com comprovada redução da expressão do gene alvo.

Embora todas as projeções *in silico* determinam quais seriam os ASOs com maior potencial para o silenciamento baseado nas sequências de DNA/RNA, é necessário validar *in vivo* essas moléculas, uma vez que o comportamento dentro do ambiente celular pode variar, visto os resultados obtidos nesse trabalho, onde apenas o ASO_PDS2 induziu a significativa redução no teor de clorofila foliar e redução da expressão gênica, enquanto os ASOs ASO_PDS1, 3 e o Mix não promoveram nenhum tipo de alteração. Em um estudo recente conduzido por TANG et al. (2021), utilizando a técnica CRISPR, três sequências de guias de RNA foram desenvolvidas, visando a edição do gene *CsPDS*. Apenas após 10 meses da enxertia dos brotos transformados, observou-se um fenótipo parcial de fotobranqueamento (TANG et al., 2021). Com base nos resultados do estudo utilizando CRISPR, em que os guias de RNA foram expressos constitutivamente e mesmo assim levaram meses para manifestar o fenótipo esperado, é possível inferir que, apesar da eficiência do ASO no silenciamento do gene *CsPDS*, essa tecnologia talvez não seja estável o suficiente ao longo do tempo para evidenciar o fenótipo visual de fotobranqueamento.

5. CONCLUSÃO

O ASO ASO_PDS2 reduziu a quantidade de clorofila e redução da expressão do gene *CsPDS*, validando essa tecnologia para o silenciamento de genes de laranja doce. Baseado nesses resultados, esse trabalho abre perspectivas para o uso de ASOs para o silenciamento de outros genes, como o gene *CsLOB1* associado a susceptibilidade da laranja doce ao cancro cítrico.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, V. Y.; BENEDETTI, C. E. Additive roles of PthAs in bacterial growth and pathogenicity associated with nucleotide polymorphisms in effector-binding elements of citrus canker susceptibility genes. **Molecular Plant Pathology**, v. 17, n. 8, p. 1223–1236, out. 2016.

AGÜERO, J. et al. Effectiveness of gene silencing induced by viral vectors based on Citrus leaf blotch virus is different in *Nicotiana benthamiana* and citrus plants. **Virology**, v. 460–461, n. 1, p. 154–164, 2014.

ALI, S. et al. Citrus Canker: A Persistent Threat to the Worldwide Citrus Industry—An Analysis. **Agronomy**, v. 13, n. 4, p. 1112, 13 abr. 2023.

BEHLAU, F. An overview of citrus canker in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 46, n. 1, p. 1–12, 24 fev. 2021.

BENIZRI, S. et al. Bioconjugated Oligonucleotides: Recent Developments and Therapeutic Applications. **Bioconjugate Chemistry**, v. 30, n. 2, p. 366–383, 20 fev. 2019.

BEOZZO BASSANEZI, R. et al. HLB Progress and Yield Sustainability in Mature Sweet Orange Orchards Treated with Nutritional and Elicitor Products. <https://doi.org/10.1094/PHYTOFR-02-23-0025-R>, 16 jan. 2024.

BILANGES B, STOKOE D. Direct Comparison of the Specificity of Gene Silencing Using Antisense Oligonucleotides and RNAi. **Biochemical Journal**, n. 388, p. 573–583, 24 mai. 2005

BITANCOURT, A. A. **O cancro cítrico**. [s.l.: s.n.]. v. 23

BOCH, J.; BONAS, U.; LAHAYE, T. TAL effectors – pathogen strategies and plant resistance engineering. **New Phytologist**, v. 204, n. 4, p. 823–832, 1 dez. 2014.

CARDOSO, J. L. S.; SOUZA, A. A.; VIEIRA, M. L. C. Molecular basis for host responses to *Xanthomonas* infection. **Planta** **2022** **256:4**, v. 256, n. 4, p. 1–21, 16 set. 2022.

CENTRE, J. R. et al. **New plant breeding techniques : state-of-the-art and prospects for commercial development**. [s.l.] Publications Office, 2011.

CITRUSBR. **Receita das exportações de suco de laranja cresceu 16% na safra**

2022/23. Disponível em: <<https://citrusbr.com/noticias/receita-das-exportacoes-de-suco-de-laranja-cresceu-16-na-safra-2022>

23/#:~:text=A%20receita%20das%20exporta%C3%A7%C3%B5es%20de,Com%C3%A9rcio%20Exterior%20compilados%20pela%20CitrusBR.>. Acesso em: 15 jan. 2024.

DA SILVA, A. C. R. et al. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature** **2002 417:6887**, v. 417, n. 6887, p. 459–463, 23 maio 2002.

DE CARVALHO, S. A. et al. Comparison of Resistance to Asiatic Citrus Canker Among Different Genotypes of Citrus in a Long-Term Canker-Resistance Field Screening Experiment in Brazil. **Plant disease**, v. 99, n. 2, p. 207–218, 2015.

DE SOUZA-NETO, R. R. et al. The expansin gene *CsLlEXP1* is a direct target of CsLOB1 in citrus. **Phytopathology®**, 23 fev. 2023.

DEFESA AGROPECUÁRIA DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Compêndio de legislações/normas**. São Paulo: [s.n.].

DEVEAU, H.; GARNEAU, J. E.; MOINEAU, S. CRISPR/Cas System and Its Role in Phage-Bacteria Interactions. **Annual Review of Microbiology**, v. 64, n. 1, p. 475–493, 13 out. 2010.

DINÇ, E. et al. Synthetic Antisense Oligodeoxynucleotides to Transiently Suppress Different Nucleus- and Chloroplast-Encoded Proteins of Higher Plant Chloroplasts. **Plant Physiology**, v. 157, n. 4, p. 1628–1641, 1 dez. 2011.

DING, Y.; CHAN, C. Y.; LAWRENCE, C. E. Sfold web server for statistical folding and rational design of nucleic acids. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. Web Server, p. W135–W141, 1 jul. 2004.

DUAN, S. et al. Functional characterization of the citrus canker susceptibility gene *CsLOB1*. **Molecular Plant Pathology**, v. 19, n. 8, p. 1908–1916, ago. 2018.

DUTT, M. et al. Efficient CRISPR/Cas9 genome editing with Citrus embryogenic cell cultures. **BMC Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 1–7, 1 dez. 2020.

FUNDECITRUS. Sumário Executivo da Estimativa da Safra de Laranja 2023- 2024. **FUNDECITRUS**, 2023.

FUSCO D, et al. Antisense Oligonucleotide: Basic concepts and therapeutic application in inflammatory bowel disease. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, 2019.

GAN, W. C.; LING, A. P. K. CRISPR/Cas9 in plant biotechnology: applications and

challenges. **BioTechnologia**, v. 103, n. 1, p. 81, 2022.

GARERI C, et al. Antisense Oligonucleotides and Small Interfering RNA for the Treatment of Dyslipidemias. **Journal of Clinical Medicine**, 11(13), 3884, 2022.

GRUBER C, et al. Effective Antiviral Application of Antisense in Plants by Exploiting Accessible Sites in the Target RNA. **International Journal of Molecular Sciences**, 24(24), 17153, 2023

HE, D. C. et al. Biological Control of Plant Diseases: An Evolutionary and Eco-Economic Consideration. **Pathogens**, v. 10, n. 10, 1 out. 2021.

HIPPLER, F. W. R. et al. Copper in Citrus production: required but avoided. **Citrus Research & Technology**, v. 38, n. 1, p. 99–106, 22 dez. 2017.

HU, Y. et al. *Lateral organ boundaries 1* is a disease susceptibility gene for citrus bacterial canker disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 4, 28 jan. 2014.

JIA, H. et al. Modification of the PthA4 effector binding elements in Type I CsLOB1 promoter using Cas9/sgRNA to produce transgenic Duncan grapefruit alleviating XccΔpthA4: DCsLOB1.3 infection. **Plant Biotechnology Journal**, v. 14, n. 5, p. 1291–1301, 1 maio 2016.

JIA, H. et al. Genome editing of the disease susceptibility gene CsLOB1 in citrus confers resistance to citrus canker. **Plant biotechnology journal**, v. 15, n. 7, p. 817–823, 1 jul. 2017.

JIANG, F.; DOUDNA, J. A. CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms. 2017.

KILLINY, N. Better together: the use of virus-induced gene silencing technique to repress the expression of two endogenous citrus genes simultaneously. **Plant Signaling & Behavior**, v. 17, n. 1, 2022.

KIM, J. et al. Harnessing anthocyanin-rich fruit: A visible reporter for tracing virus-induced gene silencing in pepper fruit. **Plant Methods**, v. 13, n. 1, p. 1–10, 3 jan. 2017.

KRASNODEBSKI, C. et al. Oligo—Not Only for Silencing: Overlooked Potential for Multidirectional Action in Plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 5, p. 4466, 24 fev. 2023.

KUMAGAI, M. H. et al. Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-

derived RNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 5, p. 1679–1683, 28 fev. 1995.

LADOMERSKY, E.; PETRIS, M. J. Copper tolerance and virulence in bacteria. **Metallomics**, v. 7, n. 6, p. 957–964, 2015.

LEBLANC, C. et al. Increased efficiency of targeted mutagenesis by CRISPR/Cas9 in plants using heat stress. **The Plant Journal**, v. 93, n. 2, p. 377–386, 22 jan. 2018.

LU, Z. J.; MATHEWS, D. H. Efficient siRNA selection using hybridization thermodynamics. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. 2, p. 640–647, 1 fev. 2008.

MARIN, T. G. S. et al. Description of copper tolerant *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and genotypic comparison with sensitive and resistant strains. **Plant Pathology**, v. 68, n. 6, p. 1088–1098, 17 ago. 2019.

MARTINS, P. M. M. et al. *Xanthomonas citri* subsp. *citri*: host interaction and control strategies. **Tropical Plant Pathology**, v. 45, n. 3, p. 213–236, 8 jun. 2020a.

MOORE, R.; CHANDRAHAS, A.; BLERIS, L. Transcription Activator-like Effectors: A Toolkit for Synthetic Biology. **ACS Synthetic Biology**, v. 3, n. 10, p. 708–716, 17 out. 2014.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473–497, 1 jul. 1962.

NAING, A. H. et al. Silencing of the phytoene desaturase (PDS) gene affects the expression of fruit-ripening genes in tomatoes. **Plant Methods**, v. 15, n. 1, p. 110, 4 dez. 2019.

NEVES, M. F. et al. Global orange juice market: a 16-year summary and opportunities for creating value. **Tropical Plant Pathology**, v. 45, n. 3, p. 166–174, 1 jun. 2020.

ORZAEZ, D. et al. A Visual Reporter System for Virus-Induced Gene Silencing in Tomato Fruit Based on Anthocyanin Accumulation. **Plant Physiology**, v. 150, n. 3, p. 1122, 2009.

PEDERSEN, M. B.; KJÆR, C.; ELMGAARD, N. Toxicity and Bioaccumulation of Copper to Black Bindweed (*Fallopia convolvulus*) in Relation to Bioavailability and the Age of Soil Contamination. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 39, n. 4, p. 431–439, 14 nov. 2000.

PENG, A. et al. Engineering canker-resistant plants through CRISPR/Cas9- targeted editing of the susceptibility gene CsLOB1 promoter in citrus. **Plant biotechnology journal**, v. 15, n. 12, p. 1509–1519, 1 dez. 2017.

PRADO, G. S. et al. CRISPR technology towards genome editing of the perennial and semi-perennial crops citrus, coffee and sugarcane. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, 8 jan. 2024.

REHMAN, M. et al. Copper environmental toxicology, recent advances, and future outlook: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 18, p. 18003–18016, 3 jun. 2019.

RINALDI, C.; WOOD, M. J. A. Antisense oligonucleotides: the next frontier for treatment of neurological disorders. **Nature Reviews Neurology**, v. 14, n. 1, p. 9–21, 1 jan. 2018.

SANDOVAL-MOJICA, A. F. et al. Antibacterial FANA oligonucleotides as a novel approach for managing the Huanglongbing pathosystem. **Scientific Reports** |, v. 11, p. 2760, 2021.

SENTHIL-KUMAR, M.; MYSORE, K. S. New dimensions for VIGS in plant functional genomics. **Trends in Plant Science**, v. 16, n. 12, p. 656–665, dez. 2011.

SHAO, Y. et al. Rational design and rapid screening of antisense oligonucleotides for prokaryotic gene modulation. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. 19, p. 5660–5669, nov. 2006.

SUN, C. et al. Antisense oligodeoxynucleotide inhibition as a potent strategy in plant biology: identification of SUSIBA2 as a transcriptional activator in plant sugar signalling. **The Plant Journal**, v. 44, n. 1, p. 128–138, 1 out. 2005.

SWARUP, S. An *Xanthomonas citri* Pathogenicity Gene, *pthA*, Pleiotropically Encodes Gratuitous Avirulence on Nonhosts. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 5, n. 3, p. 204, 1992.

TANG, X. et al. Development of a gRNA–tRNA array of CRISPR/Cas9 in combination with grafting technique to improve gene-editing efficiency of sweet orange. **Plant Cell Reports**, v. 40, n. 12, p. 2453–2456, 23 dez. 2021.

TSUTSUMI, N.; KANAYAMA, K.; TANO, S. Suppression of ALPHA.-amylase gene expression by antisense oligodeoxynucleotide in barley cultured aleurone layers. **The Japanese Journal of Genetics**, v. 67, n. 2, p. 147–154, 1992.

VALE, F.; FERNANDES-FILHO, E.; LIBERATO, J. **Quant – A Software for Plant Disease Severity Assessment**. [s.l.: s.n.]. v. 8. VON LINTIG, J. et al. Light-dependent regulation of carotenoid biosynthesis occurs at the level of phytoene synthase expression and is mediated by phytochrome in *Sinapis alba* and *Arabidopsis thaliana* seedlings. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, v. 12, n. 3, p. 625–634, set. 1997.

WELLBURN, A. R. The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. **Journal of Plant Physiology**, v. 144, n. 3, p. 307–313, 1 set. 1994.

XU, J. et al. Toxicity of copper on rice growth and accumulation of copper in rice grain in copper contaminated soil. **Chemosphere**, v. 62, n. 4, p. 602–607, jan. 2006.

XU, Y.; LI, Z. CRISPR-Cas systems: Overview, innovations and applications in human disease research and gene therapy. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 18, p. 2401–2415, 2020.

YAN, Q.; WANG, N. High-Throughput Screening and Analysis of Genes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* Involved in Citrus Canker Symptom Development. / **69 MPMI**, v. 25, n. 1, p. 69–84, 2012.

ZOU, X. et al. CsLOB1 regulates susceptibility to citrus canker through promoting cell

proliferation in citrus. **The Plant Journal**, v. 106, n. 4, p. 1039–1057, 23 maio 2021.

Capítulo 2 - Antisense oligonucleotide as a new technology application for *CsLOB1* gene silencing aiming citrus canker resistance.

Esse capítulo foi publicado na revista internacional *Phytopathology* e disponível no site <https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-24-0058-KC>

Antisense oligonucleotide as a new technology application for *CsLOB1* gene silencing aiming citrus canker resistance

Luiz Felipe Franco de Lima^{1,2}, Isis Gabriela Barbosa Carvalho¹, Reinaldo Rodrigues de Souza-Neto^{1,2}, Larissa da Silva dos Santos¹, César Augusto Nascimento¹, Marco Aurélio Takita¹, Fabiano Touzjdjian Pinheiro Kohlrausch Távora³, Angela Mehta³ and Alessandra Alves de Souza^{1*}

¹ Citrus Research Center “Sylvio Moreira”, Agronomic Institute – IAC, Cordeirópolis, Brazil.

² Department of Genetics, Evolution and Bioagents, Institute of Biology, University of Campinas – UNICAMP, Campinas, Brazil,

³ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PBI, Av. W/5 Norte Final, CEP 70770917, Brasília, Brazil.

* *Corresponding author*: E-mail: desouza@ccsm.br

Running title: ASO decrease citrus canker disease by *CsLOB1* silencing.

Keywords: susceptibility gene, *Xanthomonas citri*.

Abstract

Citrus canker disease, caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, poses a significant threat to global citrus production. The control of the disease in the field relies mainly on the use of conventional tools such as copper compounds, which are harmful to the environment and could lead to bacterial resistance. This scenario stresses the need for new and sustainable technologies to control phytopathogens, representing a key challenge in developing studies that translate basic into applied knowledge. During infection, *X. citri* subsp. *citri* secretes a transcriptional activator-like effector that enters the nucleus of plant cells, activating the expression of the canker susceptibility gene LATERAL ORGAN BOUNDARIES 1 (*LOB1*). In this study, we explored the use of antisense oligonucleotides (ASOs) with phosphorothioate modifications to transiently inhibit the gene expression of *CsLOB1* in *Citrus sinensis*. We designed and validated three potential ASO sequences, which led to a significant reduction in disease symptoms compared to the control. The selected ASO3*CsLOB1* significantly decreased the expression level of *CsLOB1* when delivered through two distinct delivery methods and the reduction of the symptoms ranged from approximately 15% to 83%. Notably, plants treated with ASO3 did not exhibit an increase in symptoms development over the evaluation period. This study highlights the efficacy of ASO technology, based on short oligonucleotide chemically modified sequences, as a promising tool for controlling phytopathogens without the need for genetic transformation or plant regeneration. Our results demonstrate the potential of ASOs as a biotechnological tool for the management of citrus canker disease.

Introduction

Citrus canker, a severe bacterial disease caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, poses a significant global threat to commercial citrus production, resulting in substantial economic losses (Behlau et al. 2020; Martins et al. 2020). Currently, copper-based chemicals are the main compounds for controlling citrus canker. However, their extensive use raises concerns about environmental impact, plant stress, and bacterial resistance (Lamichhane et al. 2018; Behlau et al. 2020; Heydarpanah et al. 2020). To overcome these challenges, biotechnology-based approaches have emerged as promising alternatives, offering sustainable methods to enhance plant resistance against citrus canker disease (Caserta et al. 2019; Huang et al. 2022a; Prado et al. 2024).

To induce citrus canker symptoms, *X. citri* subsp. *citri* secretes PthA4, a transcriptional activator-like effector that enters the nucleus and activates the expression of the canker susceptibility gene LATERAL ORGAN BOUNDARIES 1 (LOB1), causing hypertrophy and hyperplasia on citrus tissues (Martins et al. 2020; Yan and Wang 2012; An et al. 2020). Activation of the LOB1 transcription factor induces the expression of plant genes associated with cell expansion, remodeling of the cell wall, and the development of citrus canker symptoms (Roeschlin et al. 2019; Hu et al. 2014; Zou et al. 2021). Recently, resistance to citrus canker was achieved in different citrus species by using CRISPR-Cas technology to target LOB1 genes (Jia et al. 2022, 2017; Huang et al. 2022b; Peng et al. 2017; Jia and Wang 2020; Su et al. 2023). These different studies demonstrated the importance of *LOB1* as a target gene for citrus canker control. While conventional transgenics or CRISPR genome editing are relevant strategies for building more durable disease resistance, both require plant

transformation or regeneration techniques, in addition to propagation, to produce seedlings, making these approaches laborious and time-consuming (Krasnodębski et al. 2023). Recently, the use of antisense oligonucleotides has been highlighted as a potential biotechnological tool to transiently silence genes of interest without modifying the plant genome (Krasnodębski et al. 2023; Dinç et al. 2011).

Antisense oligonucleotides (ASOs) are short synthetic DNA or RNA polymers capable of affecting nucleic acid metabolism through physical and chemical alteration (Dinç et al. 2011; Benizri et al. 2019; Rinaldi and Wood 2018). ASOs reversely complement their target mRNA, consequently inducing a gene silencing effect (Oberemok et al. 2022). Once within the cellular environment, they hybridize with their target transcript, forming a duplex structure (Chan et al. 2006). This process disrupts the mRNA's conformation and rearranges their own structure, ultimately leading to the establishment of a heteroduplex (Shao et al. 2006). The major silencing activity arises from recruiting the endogenous nuclease RNase H, which identifies the newly formed hybridized structure. This recognition event triggers the mRNA's cleavage, thereby exerting a negative regulatory effect (Dinç et al. 2011; Oberemok et al. 2022; Chan et al. 2006). Recently, the use of ASO was employed to silence specific genes from *Candidatus Liberibacter asiaticus*, a citrus-pathogen bacterium that causes citrus greening disease, also known as Huanglongbing (HLB). In this study, the authors demonstrated the potential of ASO to be integrated into the management of agricultural pathogens aiming HLB control (Sandoval-Mojica et al. 2021).

Although the potential use of ASO in plants, its application is limited when compared to mammalian cells (Korobeynikov et al. 2022; Horwich and Zamore 2008; McMahon et al. 2023). Thus, aiming to extend the application of ASO in plants we focused on *CsLOB1* as a target to reduce citrus canker disease. In this study, we developed a pipeline to design ASO sequences in citrus genome and validate its

interference in citrus canker development. The selected ASO3-*CsLOB1* were evaluated in detached leaves and whole plants using two ways of ASO delivery and bacteria inoculation. In both methods, ASO3-*CsLOB1* significantly reduced *CsLOB1* gene expression and citrus canker development. Together, this study confirms the potential use of ASOs as a potential technology for plant-pathogen control which encompasses genetic manipulation without alterations in the plant genome (Lusser et al. 2011; Dhuri et al. 2020).

Materials and Methods

Design and Synthesis of ASOs

The ASOs were designed following the pipeline developed for *C. sinensis* in this study, based on Pliego et al. (2013) and Tavora et al. (2021). In the first step the fasta sequence orange1.1g026556m) of the *CsLOB1* gene was obtained from Citrus Genome Database (<https://www.citrusgenomedb.org/>). Subsequently, the Blast tool (NCBI - <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> - Global Align) was used to detect conserved homologous regions between *C. sinensis* varieties for ASO design. After selecting the fasta sequence, it was analyzed using both Sfold (<https://sfold.wadsworth.org/cgibin/index.pl>) and Oligowalk (http://rna.urmc.rochester.edu/cgibin/server_exe/oligowalk/oligowalk_form.cgi) software. Sfold and Oligowalk use algorithms to calculate the thermodynamic parameters of antisense hybridization by predicting changes in the free energy of oligonucleotide binding to the target RNA. The algorithms predict the best regions for accessing the target mRNA structure by evaluating the variation in the molecule's free energy. Thus, based on the input sequence, the software selects ASOs with a probability of successfully silencing the target mRNA. By default, Sfold generated a list of the top 20 ASOs, whereas Oligowalk produced a list of 140 oligos.

(Supplementary Table S1 and S2). Subsequently, the ASOs generated by each software were compared, and those common to both software were chosen (Supplementary Table S3). The oligonucleotides were then analyzed by BLASTn with the citrus genome to ensure there were no similarities with sequences of non-specific genes, to avoid possible off-targets (cutoff - below 16 nucleotides of identity). The second check was performed by BLAST in the Citrus Genome Database to verify the location of the ASO sequence on the target mRNA and to ensure they are not located in a splicing region or untranslated regions. Third, the ASO target site in the Citrus genome was amplified and sequenced on the ABI PRISM 3730 sequencer (Applied Biosystems) to confirm homology between the ASO nucleotides and their respective genome target sequences. Finally, three ASOs for each gene were selected for synthesis (Supplementary Fig. S1). In addition to the selected ASOs, a random sequence ASO (random) was designed to serve as a negative control. This sequence was designed by randomizing the ASOs using the Shuffle DNA software (https://www.bioinformatics.org/sms2/shuffle_dna.html). Afterwards, a BLASTn analysis was performed again for the Random ASO to ensure it did not align with any other plant gene. The ASOs were ultimately synthesized by Integrated DNA Technologies (IDT), using phosphorothioate modification in all ASOs (Integrated DNA Technologies 2015). The modifications were introduced at both the 5' and 3' ends, with two modifications at each end.

Foliar petiole ASO absorption assay

Aiming to confirm the ASO absorption by plant vascular tissues, the random ASO was labeled with the fluorochrome 5'6-FAM (495nm excitation, 520nm green emission) (Integrated DNA Technologies n.d.). For fluorescence microscopy analysis, a total of five sequential sectioned slices were performed using a LEICA SM2010R

microtome. The slices were done 1 cm above the region of contact between the petiole and the ASO solution. The cross-sections were examined with a BX6 fluorescence microscope (Olympus) at magnifications of x 40. GFP fluorescence was captured using the U-MWB2/WB3 (Olympus) filter (band pass of 520 nm).

Effect of ASOs by absorption in detached leaves

Eighteen young leaves from *C. sinensis* Hamlin variety were used in the experiment. Each leaf was incubated in a 50 mL Falcon tube with 250 μ L of 10 μ M ASO solution (10 μ M ASO diluted in autoclaved water). This experiment was conducted with three biological replicates for each ASO (ASO1, ASO2, and ASO3) and controls (water and random). The leaves were incubated for 24 hours with the ASO solution before inoculation with *X. citri* subsp. *citri* strain 306. In parallel, the *X. citri* subsp. *citri* _GFP strain 306(Rigano et al. 2007) was grown on NBY (Nutrient Broth Yeast extract) culture medium containing ampicillin (100 mg/L) and gentamicin (100 mg/L). The plates were incubated at 28°C. A colony was used to prepare the pre-inoculum, which was inoculated in 10 mL of liquid NBY medium + 100 mg/L gentamicin in a 50 mL Falcon tube and placed under agitation at 180 rpm at 28°C overnight. This inoculum was used for leaf infiltration, where 100 μ L of the bacterial suspension (10^4 CFU/mL) was applied on each side of the leaf using a needleless syringe. A total of 3 leaves were used for each ASO. The leaves were collected for RNA extraction at specific time points T0 - Before ASO infiltration and T1, T2, and T3 – 1, 2 and 3 days after ASO infiltration. The symptoms were evaluated through photographic records and symptomatic area using the Quant® software (Vale et al. 2003). The experiment was repeated twice with three internal replicates, and the statistical significance of the means was analyzed using Student's *t*-test ($p < 0.05$).

Effect of ASOs by leaves infiltration *in planta*.

The bacterium was harvested from solid NBY medium and incubated for 2 days at 28°C. The inoculum was prepared as described above. The inoculum was infiltrated into young leaves in whole plant of *Citrus sinensis* and kept in a plastic chamber for improve humidity condition. After 48 hours solutions containing 10 µM of ASO1, 2 or 3 were infiltrated. This time point was chosen based on studies that demonstrated that *CsLOB1* is highly induced 48 hours after *X. citri* subsp. *citri* inoculation (Abe and Benedetti 2016; An et al. 2020). As controls, water and random ASO infiltrations were used. The treatments and their respective controls were inoculated in the same leaf totalizing three infiltration per leaf (see Supplementary Fig. S2). At least three independent experiments were performed with five replicates, and the statistical significance of the means was analyzed using Student's *t*-test ($p < 0.05$).

Bacterial inoculation by pin-roller device

For experiments with ASO3, infiltration in whole plant was performed as described above. The bacteria were inoculated by pin-roller, as described by Nascimento et al. (2022). This methodology induces microinjuries that facilitate bacterial entry while minimizing mechanical damage, thus reducing experimental variation. Moreover, as *X. citri* subsp. *citri* naturally enters plant cells through natural openings or microinjuries, this methodology closely mimics what occurs under natural conditions (Nascimento et al. 2022). Briefly, the inoculations were performed using a pin-roller device (Dermaroller 540 System—ELONYC, China) containing 540 microneedles 0.5 mm in length rolled over the leaves. Subsequently, a sterile cotton soaked in a bacterial solution (10^8 CFU/mL) was applied to the top of the microinjuries on all the leaves. The leaves were collected for RNA extraction at specific time points

T0 - Before ASO infiltration and T1, T2 and T3 – 1, 2 and 3 days after ASO infiltration. Symptomatology of canker lesions were photographed and analyzed using an Olympus MVX10 (U-MGFPHQ filter) stereomicroscope and pustule analysis were performed using Image J software (Schneider et al. 2012). Samples containing canker pustules were collected from both treatments (ASO3 and control) at 5, 7, 9, 11 and 14 days after inoculation. For CFU counting the samples were collected at 7 and 14 days after bacteria inoculation. The experiment was repeated three times for symptoms analysis and twice for CFU counting and RNA extraction. Three internal replicates were used for each experiment and the statistical significance of the means was analyzed using Student's *t*-test ($p < 0.05$).

Quantitative real-time PCR

To access the gene expression of *CsLOB1*, the mRNA was reverse transcribed following quantitative real-time PCR (RT-qPCR) analysis. Total RNA of the leaves samples was extracted using the Mini Kit RNA PureLink™ (Invitrogen). The RNA quality and concentration were determined by spectrophotometry NanoDrop ND-8000 (Thermo Fisher Scientific) and electrophoresis. One microgram of total RNA was used for cDNA synthesis with a Reverse Transcription GoScript Kit™ (Promega). The reactions were performed using GoTaq® qPCR Master Mix (Promega), 120 nm of each *CsLOB1*-specific primer pair (*CsLOB1_F* - 5' - TCC TTC ACA ATC CTC TCC AAA TCT - 3' and *CsLOB1_R* 5'- AAG AAG TGC ATA CCT GCA AGA AC - 3') (Jia et al. 2017), and actin (*Actin_F*- 5' - CCC TTC CTC ATG CCA TTC TTC – 3' and *Actin_R*- 5' – CGG CTG TGG TGG TAA ACA TGT – 3'), as the reference gene (Shimo et al. 2019). The qPCR reaction was performed in QuantStudio 5 (ThermoFischer) using the default program. Dissociation curves were analyzed to confirm the primer specificity. The relative gene expression was determined by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (Livak

and Schmittgen 2001).

Results

ASOs design and plant absorption

Our pipeline utilized two distinct software tools Oligowalk and Sfold. Subsequently, the intersection of these lists yielded 5 common oligos (Supplementary Table S3), which underwent a blast analysis against the citrus genome to verify potential off-target effect and confirm their presence within coding regions. Three oligos meeting these stringent criteria were selected for utilization in this study, constituting our approach for ASO selection. However, it is worth noting that an alternative approach, utilizing the full set of 20 ASOs from Sfold and the 140 from Oligowalk, could also be considered valid, representing an alternative criterion for selection. Three different sequences were obtained as potential candidates to silence *CsLOB1* (Table 1; Supplementary Fig. S1). The sequences targeted the coding sequence of the *CsLOB1* transcript (Citrus genome ID: 18129398) at positions 212 to 230 (ASO1), 304 to 322 (ASO2), and 487 to 505 (ASO3). In addition, a randomly designed ASO was used as a negative control. The ASO absorption by the plant was confirmed by diluting fluorescence labeled ASO in water and placing the leaf petiole in contact with the solution. The labeled ASO was detected in the xylem region of the leaves after 24 hours posabsorption (Fig. 1A). No signal was detected in untreated leaves (Fig. 1B).

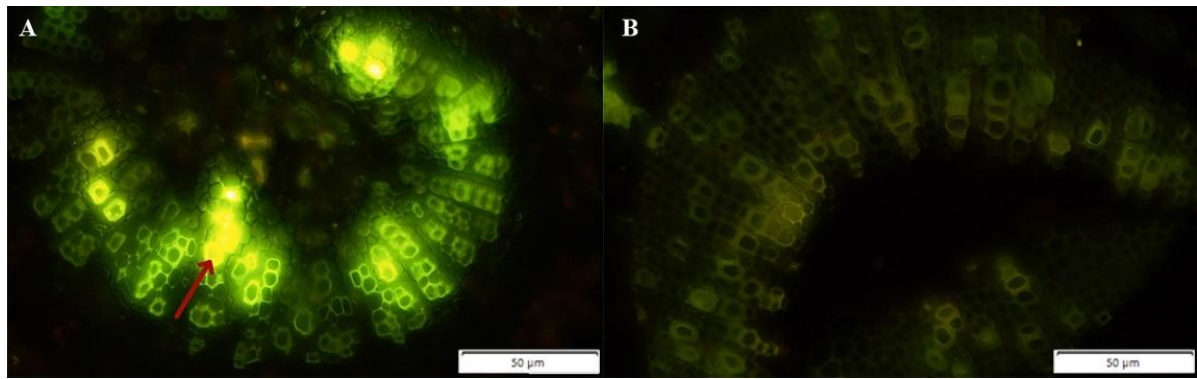


Fig. 1. Fluorescence-labeled ASO localization in *C. sinensis* cells. Images were acquired using fluorescence microscopy with the WB3 filter (495nm excitation, 520nm emission). (A) Cells after absorbing 10 μ M of ASO-5'6-FAM solution. Red arrow indicates the presence of fluorescent ASO in the xylem vessels. (B) Untreated cells showing absence of fluorescence.

Effect of the ASOs on citrus canker development.

To assess the ability in reducing citrus canker symptoms by ASO1, ASO2, and ASO3, detached leaves were first treated with ASOs through petiole absorption and then infiltrated with *X. citri*-GFP. In general, leaves inoculated with ASO1, ASO2, and ASO3 showed lower symptom severity (Fig. 2A) and bacterial colonization, assessed through GFP fluorescence from infiltrated leaves (Fig. 2B), compared to the water and random controls. The ASO treatments resulted in an average of symptomatic area in leaves between 15% to 17% (ASO1 $p = 0.06$; 0.08), 13% to 16% (ASO2 $p = 0.04$; 0.07), and 15% to 18% (ASO3 $p = 0.008$; 0.04) lower compared with the water and random controls, respectively. Although the symptomatic leaf areas treated with ASO1, ASO2, and ASO3 were smaller compared to the controls, significant differences for both controls were observed only for ASO3 (Fig. 2C).

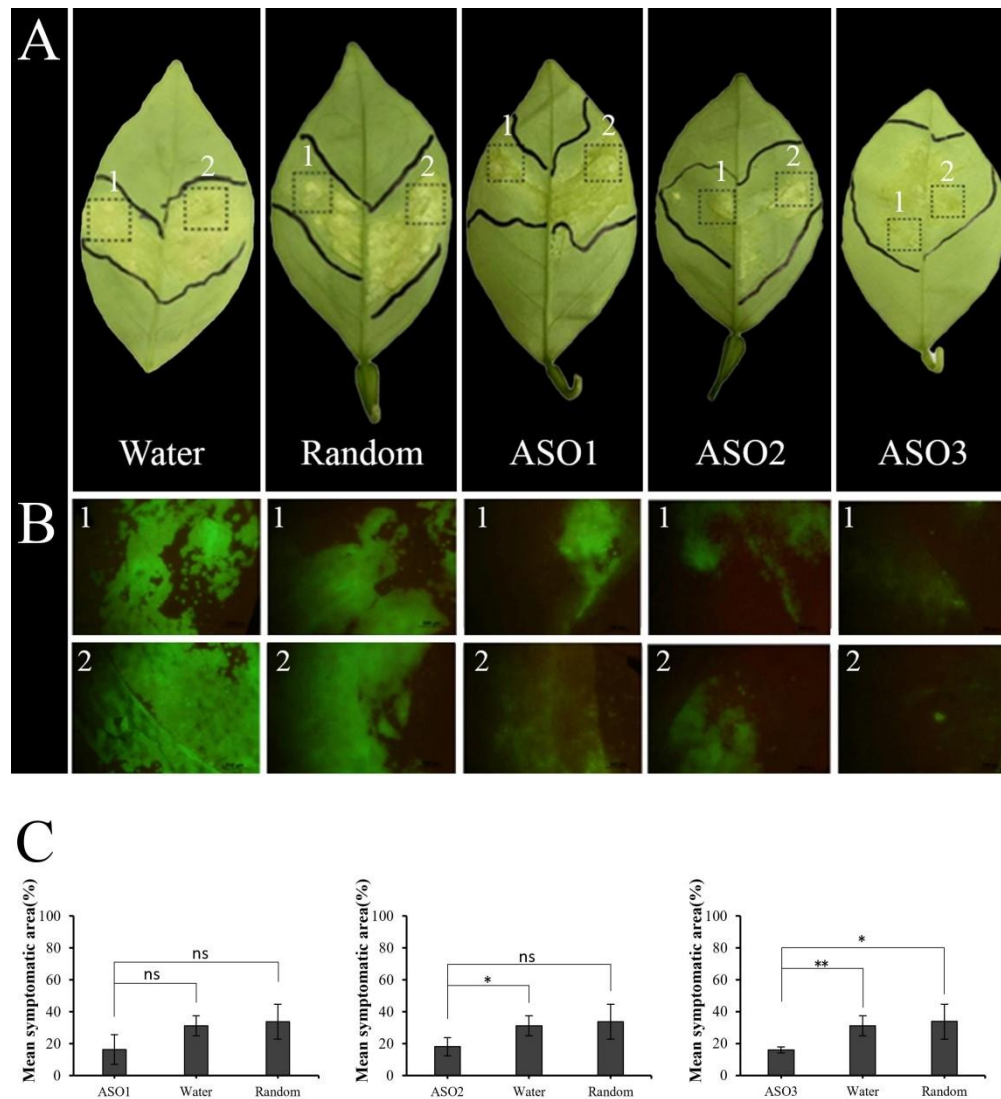


Fig. 2. Analysis of citrus canker and bacterial colonization after ASO absorption and *X. citri*_GFP infiltration.

(A) Representative leaves infiltrated with *X. citri*_GFP in the area circled in black. (B) Images of *X. citri*_GFP infiltrated areas using GFP filter in different treatments. Numbers 1 and 2 in B correspond to the respective squad area in A. Water - *C. sinensis* leaf inoculated with water as control. Random - *C. sinensis* leaf inoculated with random ASO control. ASO1, ASO2, and ASO3 - *C. sinensis* leaf inoculated with respective ASOs. (C) Symptomatic area analysis performed in Quant® software to determine the percentage area exhibiting citrus canker symptoms. Asterisks (*) indicate significant differences based on Student's *t*-test ($p < 0.05$) (**) ($p < 0.01$) comparing ASO1, ASO2, and ASO3 treatments with controls (water and random ASO). Error bars represent the standard deviation of the means. Three independent experiments were performed with five biological repeats.

To select the best ASO sequence for further analysis, new experiments were carried out using whole plant instead of detached leaves and ASOs infiltration instead

of absorption. The controls and ASOs were inoculated in the same leaf and evaluated daily for 14 days (Supplementary Fig. S2). Similarly, as observed for the detached leaves, only leaves treated with ASO3 showed the average of symptomatic lesions significantly reduced compared to both controls (Fig. 3A, B and C). This reduction led to 34% to 18% ($p = 0.002$; 0.01) decrease in the symptomatic canker lesions compared to water and random controls, respectively (Fig. 3C).

These results (Fig. 2 and 3) indicated ASO3 as the best sequence to interfere on citrus canker disease probably to target *CsLOB1*. Additionally, since both controls (water and random) showed the same results, only water was used as control in the subsequent experiments.

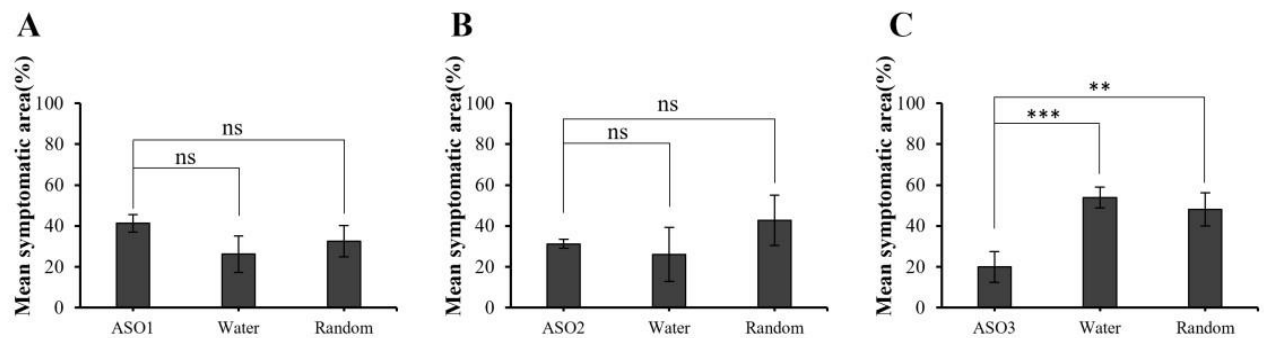


Fig. 3. Quantification of citrus canker symptomatic area (%) in planta. Symptomatic area analysis was performed using the Quant® software to determine the percentage of leaves area exhibiting citrus canker symptoms. Results are the mean of triplicate experiments $\pm$ SD. Asterisks (*) indicate significant differences based on Student's *t*-test ($p < 0.05$) (**) ($p < 0.01$) (***) ($p < 0.001$) comparing ASO treatment with controls (water and random). Error bars represent the standard deviation of the means. (A), (B) and (C) are leaves infiltrated with *X. citri*_GFP followed by infiltration with ASO1, ASO2 and ASO3, respectively. Three independent experiments were performed with three biological repeats.

***CsLOB1* post-transcriptional gene silencing in *C. sinensis* by ASO3**

To verify the effect of ASO3 in silencing *CsLOB1*, the two different ASO3 delivery methods used in previous experiments were tested. *X. citri* subsp. *citri* was inoculated in two different ways, by infiltration, when ASO3 delivery was done by absorption, or pin-roller microlesions when ASO3 delivery was carried by infiltration. Samples were collected for gene expression analysis using RT-qPCR at 1, 2, and 3 days after inoculation with *X. citri*. For both ASO3 delivery methods, a significant reduction of *CsLOB1* transcript levels was observed at all evaluated time points compared to the control (Fig. 4A and B). The significant reduction of *CsLOB1* transcripts was 8.9, 3.8 and 12.8-fold when ASO3 was applied by absorption (Fig. 4A), and 5.4, 15.9 and 10.5 when ASO3 was applied by infiltration (Fig. 4B) in T1, T2 and T3 compared to their respective controls. Altogether, our results demonstrate that ASO3 was able to suppress transcripts in both methods of delivery and bacterial inoculation, suggesting a positive correlation with the reduction of citrus canker symptoms observed in previous experiments.

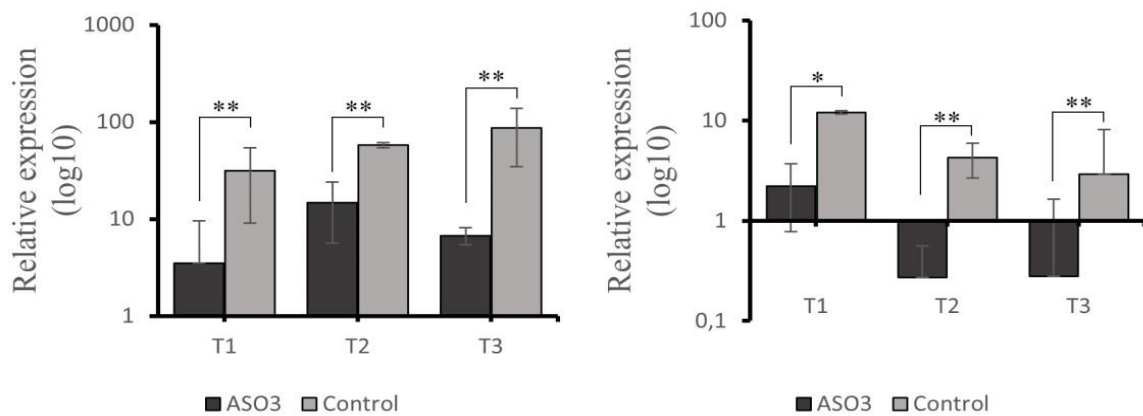


Fig. 4. Transcript level of *CsLOB1* in leaves treated or not with ASO 3 at 1, 2, and 3 days after inoculation with *X. citri*. A. ASO 3 delivery by petiole absorption and *X. citri* subsp. *citri* inoculated by infiltration. B. ASO 3 delivery by leaf infiltration and *X. citri* subsp. *citri* inoculated by pin-roller. Results are the mean of duplicate experiments with three replicates compared to time 0 (before inoculation). Asterisks (*) indicate significant differences based on Student's *t*-test ($p < 0.05$) (**) ($p < 0.01$). Error bars represent the standard deviation of the means. T1, T2 and T3 means 1, 2 and 3 days after *X. citri* subsp. *citri* inoculation.

ASO3 treatment reduces citrus canker symptoms.

To confirm the potential of ASO3 to decrease citrus canker symptoms, new experiments using whole plants were performed. In agreement with previous results, all plants treated with ASO3 exhibited a substantial reduction in canker symptoms at all evaluated time points compared to the WT (Fig. 5A). Notably, canker lesions in ASO3-treated leaves remained restricted and did not expand over time, in contrast to control leaves where symptoms developed into large spongy pustules (Fig. 5A). Canker lesions were quantified by analyzing four areas of each leaf ($n=3$) at each time point, (Fig. 5B and Supplementary Fig. S3). An increase in canker pustules size was only observed in leaves treated with water, while no such increase occurred in leaves treated with ASO3. Indeed, the reduction of the pustules size induced by ASO3 was of 60.3% ($p = 0.033$), 80.1% ($p = 0.002$), 50.6% ($p = 0.020$), and 82.7% ($p < 0.0001$),

respectively, for 7, 9, 11, and 14, demonstrating a significant decrease in citrus canker symptoms. Furthermore, the *X. citri* subsp. *citri* bacterial population was significantly lower in leaves treated with ASO3 compared to the untreated control at 14 days after inoculation (Fig. 5C). The decrease in symptom development, together with the delay in bacterial growth and the reduction of *CsLOB1* transcript level, indicates that ASO3 silences *CsLOB1*, thereby affecting the interaction of *X. citri* subsp. *citri* and *C. sinensis*, resulting in attenuated disease symptoms.

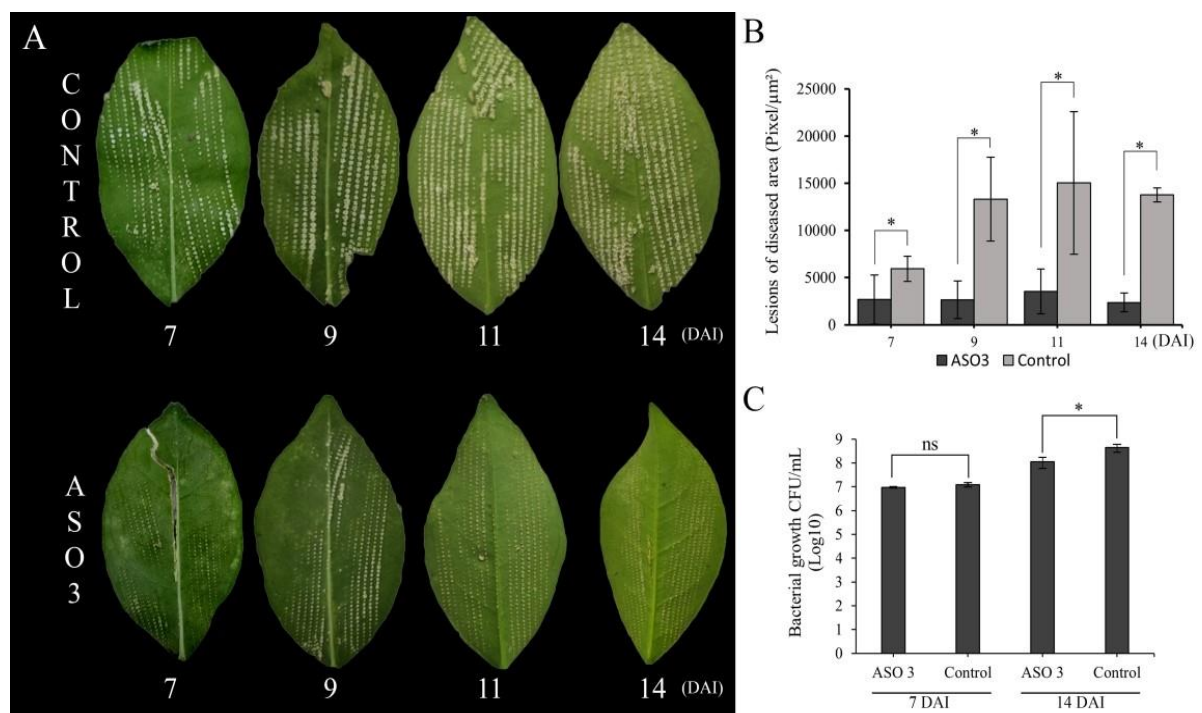


Fig. 5. Effect of ASO 3 on citrus canker disease in *Citrus sinensis*. (A) Representative images of citrus canker in leaves treated with ASO3 or water control followed by *X. citri* subsp. *citri* inoculation using the pin-roller technique. (B) Quantitative evaluation of diseased area in leaves treated with ASO3 and water control. Each leaf was divided into four quadrants and the symptomatic area was quantified using Image J software. 7, 9, 11 and 14 correspond to days after inoculations (DAI). The experiment was repeated three times with three replicates. (C) Bacterial populations (CFU/mL) were evaluated from leaves infiltrated with ASO3 and water control followed by *X. citri* subsp. *citri* inoculation by pin-roller and collected at 7 and 14 DAI. Asterisks (*) indicate significant differences based on Student's *t*-test ($p < 0.05$) comparing ASO3 treatment and their respective control at each time point. Error bars represent the standard deviation of the means. The experiment was repeated twice with three internal replicates used for each experiment.

Discussion

Citrus is one of the most important fruit crops worldwide (Neves et al. 2020). However, citrus production is facing many diseases such as citrus canker caused by *X. citri* subsp. *citri* (Martins et al. 2020), that increase economic losses and environmental impact. Due to the importance to promote sustainable agricultural production, the development of new technologies to control phytopathogens is urgently needed. In this study we applied a pipeline to design ASO sequences to silence the susceptibility gene *CsLOB1* in *C. sinensis*. In our pipeline, three ASOs were selected for functional validation, among which ASO1 and ASO2 exhibited lower effectiveness compared to ASO3 in reducing citrus canker symptoms. This could be attributed to the ASO sequences prediction by bioinformatics tools, which generate sequences along with a probability percentage of their efficacy (Lu and Mathews 2008). In agreement with this result, ASO3 showed the highest probability of being efficient as pointed by Oligowalk (Table 1). In any event, functional experiments are imperative to validate the efficacy of the designed ASOs in targeting mRNA sequences (Mizuta and Higashiyama 2014; Sandoval-Mojica et al. 2021; Távora et al. 2021; De Sousa et al. 2023).

In our study, different methods of ASO delivery and bacteria inoculation demonstrated the efficiency of ASO3 in reducing the level of *CsLOB1* transcripts, reducing citrus canker disease. The symptoms reduction ranged from approximately 15% to 83%, and it is likely attributed to the method of ASO delivery. Curiously, despite the reduction in the canker pustule sizes, we still observed bacterial growth in the plant tissues even with ASO3, which agrees with the previous studies where *CsLOB1* was edited using CRISPR-Cas (Duan et al. 2018; Su et al. 2023).

The *CsLOB1* is a transcriptional factor that is known to play a key role as a susceptibility gene in *C. sinensis* - *X. citri* subsp. *citri* interaction, where the bacterial effector positively regulates *CsLOB1* gene expression, which induces morphological

modification favoring a compatible interaction and bacterial colonization (Barnes and Anderson 2018; Zou et al. 2021). Recent studies employing CRISPR-mediated *LOB1* gene editing have produced citrus plants with increased resistance to citrus canker disease (Jia et al. 2022, 2017; Huang et al. 2022a; Peng et al. 2017; Jia and Wang 2020; Su et al. 2023). Our data aligns with these findings, demonstrating that enhanced citrus canker resistance can be achieved by silencing *CsLOB1*. Notably, to achieve such results we used ASO technology to target *CsLOB1*, which has the advantage to induce gene silencing without transgeny or the use of plant transformation and regeneration techniques, known to be time-consuming and laborious (Turnbull et al. 2021; Krasnodębski et al. 2023). In addition, ASO can also be used for different citrus species or cultivars. The use of ASO for gene silencing in plants is relatively recent (Dinç et al. 2011; Krasnodębski et al. 2023; Sandoval-Mojica et al. 2021; Távora et al. 2021) compared to their use as biotherapeutics (Krasnodębski et al. 2023). As well pointed by Krasnodębski et al (2023), this technology is a low-cost and easy-to-implement method for direct manipulation of gene activity, and although predominantly applied in animal cells, its utilization in plants seems to be even more straightforward and should be better explored. Moreover, ASO has been used to increase the basic knowledge regarding gene function in plant-pathogen interactions. Recently, the use of ASO was applied for assessing the behavior of susceptibility genes in tomato triggered by *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* during the plant-pathogen interaction (de Sousa et al. 2023). According to the authors, screening these genes is essential to implement alternative management strategies capable of silencing target genes that play a key role in symptom induction. Consequently, these applications can be expanded to other pathosystems.

The application of ASO in citrus was recently showed to control *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), a bacterium transmitted by *Diaphorina citri*, and the

causal agent of citrus greening or HLB, considered the worst disease affecting citrus groves worldwide (Sandoval-Mojica et al. 2021). In this work, the authors modified the ASO sequences by incorporating 2'-deoxy-2'-fluoro-d-arabinonucleic acid (FANA). According to the authors, these chemical modifications increased the resistance of the FANA-ASO to degradation and enhanced its binding to targeted mRNA. The study demonstrated that FANA-ASOs silence bacterial essential genes, indicating the potential utility of FANAASOs in current HLB management strategies.

In other studies, using ASO for plant silencing approaches, it was necessary to dilute ASO in a sugar solution (Krasnodębski et al. 2023; Sun et al. 2007; Xie et al. 2014) for its absorption by leaf vascular system. However, we were able to observe the presence of the labelled random ASO in the vascular tissue using a dilution in water. It is likely that the efficiency of absorption might vary depending on many aspects such as plant species, tissues, age, and method of ASO delivery. Additionally, using ASO with the established phosphorothioate modification to improve stability and avoid molecule degradation, we were able to confirm its uptake and effect. Taken together, as the use of ASO application in plants is still little explored for biotechnology purposes, improvement in the technique can be made to optimize its absorption, stability, and efficiency.

Based on our results, we assume that the stability of ASO3 probably persists for at least 14 days after bacterial inoculation, as significant decrease of citrus canker symptoms is still observed in treated plants during this period. This finding is noteworthy, considering that citrus canker symptoms typically manifest shortly after bacterial infection, and considering that the application of copper in a shorter spray interval (7, 14, 21, or 28 days) is required to significantly reduce yield loss of citrus canker diseases (Behlau et al. 2010), the stability of ASO during this critical period could potentially prevent the development of citrus canker. Furthermore, we verified

that the efficiency of ASO silencing mechanism greatly relies on the rate level the target mRNA transcripts and the ASO concentration in the cell. The efficacy of antisense oligonucleotides is predominantly hampered by challenges in cellular delivery.

The primary molecular and cellular hurdles to maximizing antisense effectiveness lie in intracellular trafficking (Roth, 2005). Given that, exploring other ASO targets in both plant and bacteria, along with formulations incorporating adjuvants and/or nanotechnology to enhance ASO penetration into plant cells, holds promise for improving its application and ushering in new biotechnological approaches to control plant pathogens.

Acknowledgement

This study was supported by a research grant from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 19/23217-1). LFFL is a master student from the Graduate Program in Genetics and Molecular Biology (State University of Campinas/Unicamp) supported by fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Grant 001). IGBC, RRSN, LSS, CAN are supported by fellowship from FAPESP (20/04795-1, 17/13885-1, 21/09689-8, and 22/04112-7 respectively). AADS, AM and MAT are recipients of research fellowships from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

- Abe, V. Y., and Benedetti, C. E. 2016. Additive roles of PthAs in bacterial growth and pathogenicity associated with nucleotide polymorphisms in effector-binding elements of citrus canker susceptibility genes. *Mol Plant Pathol.* 17:1223–1236.
- An, S.-Q., Potnis, N., Dow, M., Vorhölter, F.-J., He, Y.-Q., Becker, A., et al. 2020. Mechanistic insights into host adaptation, virulence and epidemiology of the phytopathogen *Xanthomonas*. *FEMS Microbiol Rev.* 44:1–32.
- Barnes, W. J., Anderson, C. T. 2018. Release, Recycle, Rebuild: Cell-Wall Remodeling, Autodegradation, and Sugar Salvage for New Wall Biosynthesis during Plant Development. *Mol Plant.* 11(1):31-46.
- Behlau, F., Belasque, J., Graham, J. H., and Leite, R. P. 2010. Effect of frequency of copper applications on control of citrus canker and the yield of young bearing sweet orange trees. *Crop Protection.* 29:300–305.
- Behlau, F., Gochez, A. M., and Jones, J. B. 2020. Diversity and copper resistance of *Xanthomonas* affecting citrus. *Trop Plant Pathol.* 45:200–212.
- Benizri, S., Gissot, A., Martin, A., Vialet, B., Grinstaff, M. W., and Barthélémy, P. 2019. Bioconjugated Oligonucleotides: Recent Developments and Therapeutic Applications. *Bioconjug Chem.* 30:366–383.
- Caserta, R., Teixeira-Silva, N. S., Granato, L. M., Dorta, S. O., Rodrigues, C. M., Mitre, L. K., et al. 2019. Citrus biotechnology: What has been done to improve disease resistance in such an important crop? *Biotechnology Research and Innovation.* 3:95–109.
- Centre, J. R., Protection, I. for H. and C., Studies, I. for P. T., Rodriguez-Cerezo, E., Plan, D., Parisi, C., et al. 2011. *New plant breeding techniques: state-of-the-art and prospects for commercial development*. Publications Office.
- Chan, J. H., Lim, S., and Wong, W. F. 2006. Antisense oligonucleotides: from design to therapeutic application. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 33:533–540.
- Dhuri, K., Bechtold, C., Quijano, E., Pham, H., Gupta, A., Vikram, A., et al. 2020. Antisense Oligonucleotides: An Emerging Area in Drug Discovery and Development. *J Clin Med.* 9:2004.
- Dinç, E., Tóth, S. Z., Schansker, G., Ayaydin, F., Kovács, L., Dudits, D., et al. 2011. Synthetic Antisense Oligodeoxynucleotides to Transiently Suppress Different Nucleus- and Chloroplast-Encoded Proteins of Higher Plant Chloroplasts. *Plant Physiol.* 157:1628–1641.
- Heydarpanah, S., Rezaei, R., Taghavi, S. M., and Charehgani, H. 2020. Efficacy of different copper compounds in the control of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* pathotypes A and A*. *Journal of Phytopathology.* 168:73–80.
- Horwich, M. D., and Zamore, P. D. 2008. Design and Delivery of Antisense Oligonucleotides to Block microRNA Function in Cultured *Drosophila* and Human Cells. *Nat Protoc.* 3:1537.

Hu, Y., Zhang, J., Jia, H., Sosso, D., Li, T., Frommer, W. B., et al. 2014. *Lateral organ boundaries 1* is a disease susceptibility gene for citrus bacterial canker disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 111.

Huang, X., Wang, Y., and Wang, N. 2022a. Base Editors for Citrus Gene Editing. *Front Genome Ed*. 4.

Huang, X., Wang, Y., and Wang, N. 2022b. Highly Efficient Generation of Canker-Resistant Sweet Orange Enabled by an Improved CRISPR/Cas9 System. *Front Plant Sci*. 12:769907.

Integrated DNA Technologies. 5' 6-FAM (Fluorescein). Available at: <https://www.idtdna.com/site/Catalog/Modifications/Product/1108> [Accessed August 13, 2023].

Integrated DNA Technologies. 2015. Antisense Oligonucleotides (ASOs). Available at: [https://www.idtdna.com/pages/education/decoded/article/antisense-oligonucleotides-\(asos\)](https://www.idtdna.com/pages/education/decoded/article/antisense-oligonucleotides-(asos)) [Accessed August 13, 2023].

Jia, H., Omar, A. A., Orbovic, V., and Wang, N. 2022. Biallelic Editing of the LOB1 Promoter via CRISPR/Cas9 Creates Canker-Resistant “Duncan” Grapefruit. *Phytopathology*. 112:308–314.

Jia, H., and Wang, N. 2020. Generation of homozygous canker-resistant citrus in the T0 generation using CRISPR-SpCas9p. *Plant Biotechnol J*. 18:1990.

Jia, H., Zhang, Y., Orbović, V., Xu, J., White, F. F., Jones, J. B., et al. 2017. Genome editing of the disease susceptibility gene CsLOB1 in citrus confers resistance to citrus canker. *Plant Biotechnol J*. 15:817–823.

José de Sousa, L., Carolina Mendes Bezerra, A., Rocha Maximiano, M., T P K Távora, F., Faustino Cury, N., Brilhante de Oliveira Neto, O., et al. 2023. Expression of tomato susceptibility genes triggered by *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* and disease control by short antisense oligodeoxynucleotide gene silencing. *Physiol Mol Plant Pathol*. 128 :102163.

Korobeynikov, V. A., Lyashchenko, A. K., Blanco-Redondo, B., Jafar-Nejad, P., and Shneider, N. A. 2022. Antisense oligonucleotide silencing of FUS expression as a therapeutic approach in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Medicine* 2022 28:1. 28:104– 116

Krasnodębski, C., Sawuła, A., Kaźmierczak, U., and Żuk, M. 2023. Oligo—Not Only for Silencing: Overlooked Potential for Multidirectional Action in Plants. *Int J Mol Sci*. 24 :4466.

Lamichhane, J. R., Osdaghi, E., Behlau, F., Köhl, J., Jones, J. B., and Aubertot, J. N. 2018.

Thirteen decades of antimicrobial copper compounds applied in agriculture. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 2018 38:3. 38:1–18.

Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ Method. *Methods*. 25:402–408.

- Lu, Z. J., Mathews, D. H. OligoWalk: an online siRNA design tool utilizing hybridization thermodynamics. 2008. *Nucleic Acids Res.* 36(Web Server issue):W104-8.
- Martins, P. M. M., de Oliveira Andrade, M., Benedetti, C. E., and de Souza, A. A. 2020. *Xanthomonas citri* subsp. *citri*: host interaction and control strategies. *Trop Plant Pathol.* 45:213–236
- McMahon, M. A., Rahdar, M., Mukhopadhyay, S., Bui, H. H., Hart, C., Damle, S., et al. 2023. GOLGA8 increases bulk antisense oligonucleotide uptake and activity in mammalian cells. *Mol Ther Nucleic Acids.* 32:289–301.
- Mizuta Y, Higashiyama T. 2014. Antisense gene inhibition by phosphorothioate antisense oligonucleotide in *Arabidopsis* pollen tubes. *Plant J.* 78(3):516-26.
- Nascimento, C. A., Teixeira-Silva, N. S., Caserta, R., Marques, M. O. M., Takita, M. A., and de Souza, A. A. 2022. Overexpression of CsSAMT in *Citrus sinensis* Induces Defense Response and Increases Resistance to *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Front Plant Sci.* 13.
- Neves, M. F., Trombin, V. G., Marques, V. N., and Martinez, L. F. 2020. Global orange juice market: a 16-year summary and opportunities for creating value. *Trop Plant Pathol.* 45:166–174.
- Oberemok, V. V, Puzanova, Y. V, and Novikov, I. A. 2022. Controlled lavender field fragrance: the biotechnological “Pro-vence” of the future provided by antisense oligonucleotides and oligonucleotides. Available at: www.preprints.org.
- Peng, A., Chen, S., Lei, T., Xu, L., He, Y., Wu, L., et al. 2017. Engineering canker-resistant plants through CRISPR/Cas9-targeted editing of the susceptibility gene CsLOB1 promoter in citrus. *Plant Biotechnol J.* 15:1509–1519.
- Prado, G. S., Rocha, D. C., Santos, L. N. dos, Contiliani, D. F., Nobile, P. M., MartinatiSchenk, J. C., et al. 2024. CRISPR technology towards genome editing of the perennial and semi-perennial crops citrus, coffee and sugarcane. *Front Plant Sci.* 14.
- Rigano, L. A., Siciliano, F., Enrique, R., Sendín, L., Filippone, P., Torres, P. S., et al. 2007. Biofilm Formation, Epiphytic Fitness, and Canker Development in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Molecular Plant-Microbe Interactions.* 20:1222–1230.
- Rinaldi, C., and Wood, M. J. A. 2018. Antisense oligonucleotides: the next frontier for treatment of neurological disorders. *Nat Rev Neurol.* 14:9–21.
- Roeschlin, R. A., Uviedo, F., García, L., Molina, M. C., Favaro, M. A., Chiesa, M. A., et al. 2019. PthA4^{AT}, a 7.5-repeats transcription activator-like (TAL) effector from *Xanthomonas citri* ssp. *citri*, triggers citrus canker resistance. *Mol Plant Pathol.* 20:1394–1407.
- Roth, C. M. 2005. Molecular and cellular barriers limiting the effectiveness of antisense oligonucleotides. *Biophys J.* Oct;89(4):2286-95.
- Sandoval-Mojica, A. F., Hunter, W. B., Aishwarya, V., Bonilla, S., and Pelz-Stelinski, K.

S. 123AD. Antibacterial FANA oligonucleotides as a novel approach for managing the Huanglongbing pathosystem. *Scientific Reports*. 11:2760

Schneider, C. A., Rasband, W. S., and Eliceiri, K. W. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*. 9:671–675.

Shao, Y., Wu, Y., Chan, C. Y., McDonough, K., and Ding, Y. 2006. Rational design and rapid screening of antisense oligonucleotides for prokaryotic gene modulation. *Nucleic Acids Res*. 34:5660–5669.

Shimo, H. M., Terassi, C., Lima Silva, C. C., Zanella, J. de L., Mercaldi, G. F., Rocco, S. A., et al. 2019. Role of the *Citrus sinensis* RNA deadenylase CsCAF1 in citrus canker resistance. *Mol Plant Pathol*. 20:1105–1118.

Su, H., Wang, Y., Xu, J., Omar, A. A., Grosser, J. W., Calovic, M., et al. 2023. Generation of the transgene-free canker-resistant *Citrus sinensis* using Cas12a/crRNA ribonucleoprotein in the T0 generation. *Nat Commun*. 14:3957.

Sun, C., Ridderstråle, K., Höglund, A.-S., Larsson, L.-G., and Jansson, C. 2007. Sweet delivery - sugar translocators as ports of entry for antisense oligodeoxynucleotides in plant cells. *The Plant Journal*. 52:1192–1198.

Távora, F. T. P. K., Bevitori, R., Mello, R. N., Cintra, M. M. D. F., Oliveira-Neto, O. B., Fontes, W., et al. 2021. Shotgun proteomics coupled to transient-inducible gene silencing reveal rice susceptibility genes as new sources for blast disease resistance. *J Proteomics*. 241:104223.

Turnbull, C., Lillemo, M., and Hvoslef-Eide, T. A. K. 2021. Global Regulation of Genetically Modified Crops Amid the Gene Edited Crop Boom – A Review. *Front Plant Sci*. 12.

Vale, F., Fernandes-Filho, E., and Liberato, J. 2003. *Quant – A Software for Plant Disease Severity Assessment*.

Xie, Z., Sundström, J. F., Jin, Y., Liu, C., Jansson, C., and Sun, C. 2014. A selection strategy in plant transformation based on antisense oligodeoxynucleotide inhibition. *The Plant Journal*. 77:954–961.

Yan, Q., and Wang, N. 2012. High-Throughput Screening and Analysis of Genes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* Involved in Citrus Canker Symptom Development. / 69 *MPMI*. 25:69–84.

Zou, X., Du, M., Liu, Y., Wu, L., Xu, L., Long, Q., et al. 2021. CsLOB1 regulates susceptibility to citrus canker through promoting cell proliferation in citrus. *Plant J*. 106:1039–1057.

CONCLUSÃO GERAL

Em geral, baseado nos objetivos do presente trabalho, conclui-se que foi possível a validação da tecnologia dos ASOs. O emprego do pipeline desenvolvido para o desenho e síntese dos ASOs, gerou resultados que validaram a funcionalidade dos ASOs tanto para os experimentos com o gene *PDS* quanto para o gene *CsLOB1*.

Nesse estudo foi demonstrado a absorção do ASO pela folha através de marcação por fluorescência. No entanto, verificou-se nos experimentos utilizando os ASO_PDS, que houve a diminuição da expressão gênica do gene *PDS*, porém não houve alterações quanto ao fenótipo, sugerindo que o ASO deve ser melhorado para obter-se maior tempo de estabilidade. Já nos experimentos com os ASOs para o gene *CsLOB1*, foi demonstrado a eficácia do ASO3, por ter apresentado os melhores resultados tanto *in planta* quanto em folhas destacadas, na redução tanto da expressão do gene, quanto dos fenótipos característicos da doença do cancro cítrico, indicando uma promissora ferramenta biotecnológica sustentável para o manejo do cancro cítrico.

REFERÊNCIA GERAL

- ABE, V. Y.; BENEDETTI, C. E. Additive roles of PthAs in bacterial growth and pathogenicity associated with nucleotide polymorphisms in effector-binding elements of citrus canker susceptibility genes. **Molecular Plant Pathology**, v. 17, n. 8, p. 1223–1236, out. 2016.
- AGÜERO, J. et al. Effectiveness of gene silencing induced by viral vectors based on Citrus leaf blotch virus is different in *Nicotiana benthamiana* and citrus plants. **Virology**, v. 460–461, n. 1, p. 154–164, 2014.
- ALI, S. et al. Citrus Canker: A Persistent Threat to the Worldwide Citrus Industry—An Analysis. **Agronomy**, v. 13, n. 4, p. 1112, 13 abr. 2023.
- AN, S.-Q. et al. Mechanistic insights into host adaptation, virulence and epidemiology of the phytopathogen *Xanthomonas*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 44, n. 1, p. 1–32, 1 jan. 2020.
- BARNES, W. J.; ANDERSON, C. T. Release, Recycle, Rebuild: Cell-Wall Remodeling, Autodegradation, and Sugar Salvage for New Wall Biosynthesis during Plant Development. [s.d.].
- BEHLAU, F. et al. Effect of frequency of copper applications on control of citrus canker and the yield of young bearing sweet orange trees. **Crop Protection**, v. 29, n. 3, p. 300–305, mar. 2010.
- BEHLAU, F. An overview of citrus canker in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 46, n. 1, p. 1–12, 24 fev. 2021.
- BEHLAU, F.; GOCHEZ, A. M.; JONES, J. B. Diversity and copper resistance of *Xanthomonas* affecting citrus. **Tropical Plant Pathology**, v. 45, n. 3, p. 200–212, 1 jun. 2020.
- BENIZRI, S. et al. Bioconjugated Oligonucleotides: Recent Developments and Therapeutic Applications. **Bioconjugate Chemistry**, v. 30, n. 2, p. 366–383, 20 fev. 2019.
- BEOZZO BASSANEZI, R. et al. HLB Progress and Yield Sustainability in Mature Sweet Orange Orchards Treated with Nutritional and Elicitor Products. <https://doi.org/10.1094/PHYTOFR-02-23-0025-R>, 16 jan. 2024.
- BILANGES, B.; STOKOE, D. Direct comparison of the specificity of gene silencing using antisense oligonucleotides and RNAi. **Biochemical Journal**, v. 388, n. Pt 2, p. 573, 6 jun. 2005.
- BITANCOURT, A. A. **O cancro cítrico**. [s.l.: s.n.]. v. 23
- BOCH, J.; BONAS, U.; LAHAYE, T. TAL effectors – pathogen strategies and plant resistance engineering. **New Phytologist**, v. 204, n. 4, p. 823–832, 1 dez. 2014.

CARDOSO, J. L. S.; SOUZA, A. A.; VIEIRA, M. L. C. Molecular basis for host responses to *Xanthomonas* infection. **Planta** **2022** **256**:4, v. 256, n. 4, p. 1–21, 16 set. 2022.

CASERTA, R. et al. Citrus biotechnology: What has been done to improve disease resistance in such an important crop? **Biotechnology Research and Innovation**, v. 3, p. 95–109, 2019.

CENTRE, J. R. et al. **New plant breeding techniques : state-of-the-art and prospects for commercial development**. [s.l.] Publications Office, 2011.

CHAN, J. H.; LIM, S.; WONG, W. F. ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES: FROM DESIGN TO THERAPEUTIC APPLICATION. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 33, n. 5–6, p. 533–540, maio 2006.

CITRUSB. **Receita das exportações de suco de laranja cresceu 16% na safra 2022/23**. Disponível em: <<https://citrusbr.com/noticias/receita-das-exportacoes-de-suco-de-laranja-cresceu-16-na-safra-2022-23/#:~:text=A%20receita%20das%20exporta%C3%A7%C3%B5es%20de,Com%C3%A9rcio%20Exterior%20compilados%20pela%20CitrusBR.>>>. Acesso em: 15 jan. 2024.

DA SILVA, A. C. R. et al. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature** **2002** **417**:6887, v. 417, n. 6887, p. 459–463, 23 maio 2002.

DE CARVALHO, S. A. et al. Comparison of Resistance to Asiatic Citrus Canker Among Different Genotypes of Citrus in a Long-Term Canker-Resistance Field Screening Experiment in Brazil. **Plant disease**, v. 99, n. 2, p. 207–218, 2015.

DE SOUZA-NETO, R. R. et al. The expansin gene *CsLlEXP1* is a direct target of CsLOB1 in citrus. **Phytopathology**®, 23 fev. 2023.

DEFESA AGROPECUÁRIA DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Compêndio de legislações/normas**. São Paulo: [s.n.].

DEVEAU, H.; GARNEAU, J. E.; MOINEAU, S. CRISPR/Cas System and Its Role in Phage-Bacteria Interactions. **Annual Review of Microbiology**, v. 64, n. 1, p. 475–493, 13 out. 2010.

DHURI, K. et al. Antisense Oligonucleotides: An Emerging Area in Drug Discovery and Development. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 6, p. 2004, 26 jun. 2020.

DINÇ, E. et al. Synthetic Antisense Oligodeoxynucleotides to Transiently Suppress Different Nucleus- and Chloroplast-Encoded Proteins of Higher Plant Chloroplasts . **Plant Physiology**, v. 157, n. 4, p. 1628–1641, 1 dez. 2011.

DING, Y.; CHAN, C. Y.; LAWRENCE, C. E. Sfold web server for statistical folding and rational design of nucleic acids. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. Web Server, p. W135–W141, 1 jul. 2004.

DUAN, S. et al. Functional characterization of the citrus canker susceptibility gene *CsLOB1*. **Molecular Plant Pathology**, v. 19, n. 8, p. 1908–1916, ago. 2018.

DUTT, M. et al. Efficient CRISPR/Cas9 genome editing with Citrus embryogenic cell cultures. **BMC Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 1–7, 1 dez. 2020.

FUNDECITRUS. Sumário Executivo da Estimativa da Safra de Laranja 2023-2024. **FUNDECITRUS**, 2023.

FUNDECITRUS ARARAQUARA, S. P. Levantamento HLB, CVC, Cancro Fundecitrus 2023. [s.d.].

FUSCO, D. DI et al. Antisense oligonucleotide: Basic concepts and therapeutic application in inflammatory bowel disease. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, n. MAR, p. 440751, 29 mar. 2019.

GAN, W. C.; LING, A. P. K. CRISPR/Cas9 in plant biotechnology: applications and challenges. **BioTechnologia**, v. 103, n. 1, p. 81, 2022.

GARERI, C. et al. Antisense Oligonucleotides and Small Interfering RNA for the Treatment of Dyslipidemias. **Journal of Clinical Medicine**, v. 11, n. 13, p. 3884, 1 jul. 2022.

GRUBER, C. et al. Effective Antiviral Application of Antisense in Plants by Exploiting Accessible Sites in the Target RNA. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 24, p. 24, 1 dez. 2023.

HE, D. C. et al. Biological Control of Plant Diseases: An Evolutionary and Eco-Economic Consideration. **Pathogens**, v. 10, n. 10, 1 out. 2021.

HEYDARPANAH, S. et al. Efficacy of different copper compounds in the control of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* pathotypes A and A*. **Journal of Phytopathology**, v. 168, n. 2, p. 73–80, 1 fev. 2020.

HIPPLER, F. W. R. et al. Copper in Citrus production: required but avoided. **Citrus Research & Technology**, v. 38, n. 1, p. 99–106, 22 dez. 2017.

HORWICH, M. D.; ZAMORE, P. D. Design and Delivery of Antisense Oligonucleotides to Block microRNA Function in Cultured *Drosophila* and Human Cells. **Nature protocols**, v. 3, n. 10, p. 1537, 2008.

HU, Y. et al. *Lateral organ boundaries 1* is a disease susceptibility gene for citrus bacterial canker disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 4, 28 jan. 2014.

HUANG, X.; WANG, Y.; WANG, N. Highly Efficient Generation of Canker-Resistant Sweet Orange Enabled by an Improved CRISPR/Cas9 System. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 769907, 11 jan. 2022a.

HUANG, X.; WANG, Y.; WANG, N. Base Editors for Citrus Gene Editing. **Frontiers in Genome Editing**, v. 4, 28 fev. 2022b.

INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES. **Antisense Oligonucleotides (ASOs)**. Disponível em: <[https://www.idtdna.com/pages/education/decoded/article/antisense-oligonucleotides-\(asos\)>](https://www.idtdna.com/pages/education/decoded/article/antisense-oligonucleotides-(asos)>). Acesso em: 13 ago. 2023.

INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES. **5' 6-FAM (Fluorescein)**. Disponível em: <<https://www.idtdna.com/site/Catalog/Modifications/Product/1108>>. Acesso em: 13 ago. 2023.

JIA, H. et al. Modification of the PthA4 effector binding elements in Type I CsLOB1 promoter using Cas9/sgRNA to produce transgenic Duncan grapefruit alleviating XccΔpthA4: DCsLOB1.3 infection. **Plant Biotechnology Journal**, v. 14, n. 5, p. 1291–1301, 1 maio 2016.

JIA, H. et al. Genome editing of the disease susceptibility gene CsLOB1 in citrus confers resistance to citrus canker. **Plant biotechnology journal**, v. 15, n. 7, p. 817–823, 1 jul. 2017.

JIA, H. et al. Biallelic Editing of the LOB1 Promoter via CRISPR/Cas9 Creates Canker-Resistant “Duncan” Grapefruit. **Phytopathology**, v. 112, n. 2, p. 308–314, 1 fev. 2022.

JIA, H.; WANG, N. Generation of homozygous canker-resistant citrus in the T0 generation using CRISPR-SpCas9p. **Plant Biotechnology Journal**, v. 18, n. 10, p. 1990, 1 out. 2020.

JIANG, F.; DOUDNA, J. A. CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms. 2017.

JOSÉ DE SOUSA, L. et al. Expression of tomato susceptibility genes triggered by *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* and disease control by short antisense oligodeoxynucleotide gene silencing. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 128, p. 102163, 1 nov. 2023.

KIM, J. et al. Harnessing anthocyanin-rich fruit: A visible reporter for tracing virus-induced gene silencing in pepper fruit. **Plant Methods**, v. 13, n. 1, p. 1–10, 3 jan. 2017.

KOROBAYNIKOV, V. A. et al. Antisense oligonucleotide silencing of FUS expression as a therapeutic approach in amyotrophic lateral sclerosis. **Nature Medicine** 2022 **28:1**, v. 28, n. 1, p. 104–116, 24 jan. 2022.

KRASNODEBSKI, C. et al. Oligo—Not Only for Silencing: Overlooked Potential for Multidirectional Action in Plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 5, p. 4466, 24 fev. 2023.

KUMAGAI, M. H. et al. Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 5, p. 1679–1683, 28 fev. 1995.

LADOMERSKY, E.; PETRIS, M. J. Copper tolerance and virulence in bacteria. **Metallomics**, v. 7, n. 6, p. 957–964, 2015.

LAMICHHANE, J. R. et al. Thirteen decades of antimicrobial copper compounds applied in agriculture. A review. **Agronomy for Sustainable Development** 2018 **38:3**, v. 38, n. 3, p. 1–18, 24 maio 2018.

LEBLANC, C. et al. Increased efficiency of targeted mutagenesis by CRISPR/Cas9 in plants using heat stress. **The Plant Journal**, v. 93, n. 2, p. 377–386, 22 jan. 2018.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, dez. 2001.

LU, Z. J.; MATHEWS, D. H. Efficient siRNA selection using hybridization thermodynamics. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. 2, p. 640–647, 1 fev. 2008.

MARIN, T. G. S. et al. Description of copper tolerant *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and genotypic comparison with sensitive and resistant strains. **Plant Pathology**, v. 68, n. 6, p. 1088–1098, 17 ago. 2019.

MARTINS, P. M. M. et al. *Xanthomonas citri* subsp. *citri*: host interaction and control strategies. **Tropical Plant Pathology**, v. 45, n. 3, p. 213–236, 8 jun. 2020.

MCMAHON, M. A. et al. GOLGA8 increases bulk antisense oligonucleotide uptake and activity in mammalian cells. **Molecular therapy. Nucleic acids**, v. 32, p. 289–301, 13 jun. 2023.

MOORE, R.; CHANDRAHAS, A.; BLERIS, L. Transcription Activator-like Effectors: A Toolkit for Synthetic Biology. **ACS Synthetic Biology**, v. 3, n. 10, p. 708–716, 17 out. 2014.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473–497, 1 jul. 1962.

NAING, A. H. et al. Silencing of the phytoene desaturase (PDS) gene affects the expression of fruit-ripening genes in tomatoes. **Plant Methods**, v. 15, n. 1, p. 110, 4 dez. 2019.

NASCIMENTO, C. A. et al. Overexpression of CsSAMT in *Citrus sinensis* Induces Defense Response and Increases Resistance to *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, 24 mar. 2022.

NEVES, M. F. et al. Global orange juice market: a 16-year summary and opportunities for creating value. **Tropical Plant Pathology**, v. 45, n. 3, p. 166–174, 1 jun. 2020.

OBEREMOK, V. V.; PUZANOVA, Y. V.; NOVIKOV, I. A. Controlled lavender field

fragrance: the biotechnological “Pro-vence” of the future provided by antisense oligonucleotides and oligonucleotides. 2022.

ORZAEZ, D. et al. A Visual Reporter System for Virus-Induced Gene Silencing in Tomato Fruit Based on Anthocyanin Accumulation. **Plant Physiology**, v. 150, n. 3, p. 1122, 2009.

PEDERSEN, M. B.; KJÆR, C.; ELMGAARD, N. Toxicity and Bioaccumulation of Copper to Black Bindweed (*Fallopia convolvulus*) in Relation to Bioavailability and the Age of Soil Contamination. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 39, n. 4, p. 431–439, 14 nov. 2000.

PENG, A. et al. Engineering canker-resistant plants through CRISPR/Cas9-targeted editing of the susceptibility gene CsLOB1 promoter in citrus. **Plant biotechnology journal**, v. 15, n. 12, p. 1509–1519, 1 dez. 2017.

PRADO, G. S. et al. CRISPR technology towards genome editing of the perennial and semi-perennial crops citrus, coffee and sugarcane. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, 8 jan. 2024.

REHMAN, M. et al. Copper environmental toxicology, recent advances, and future outlook: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 18, p. 18003–18016, 3 jun. 2019.

RIGANO, L. A. et al. Biofilm Formation, Epiphytic Fitness, and Canker Development in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Molecular Plant-Microbe Interactions®**, v. 20, n. 10, p. 1222–1230, out. 2007.

RINALDI, C.; WOOD, M. J. A. Antisense oligonucleotides: the next frontier for treatment of neurological disorders. **Nature Reviews Neurology**, v. 14, n. 1, p. 9–21, 1 jan. 2018.

ROESCHLIN, R. A. et al. PthA4^{AT}, a 7.5-repeats transcription activator-like (TAL) effector from *Xanthomonas citri* ssp. *citri*, triggers citrus canker resistance. **Molecular Plant Pathology**, v. 20, n. 10, p. 1394–1407, 5 out. 2019.

SANDOVAL-MOJICA, A. F. et al. Antibacterial FANA oligonucleotides as a novel approach for managing the Huanglongbing pathosystem. **Scientific Reports**, v. 11, p. 2760, 2021.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 671–675, 28 jul. 2012.

SENTHIL-KUMAR, M.; MYSORE, K. S. New dimensions for VIGS in plant functional genomics. **Trends in Plant Science**, v. 16, n. 12, p. 656–665, dez. 2011.

SHAO, Y. et al. Rational design and rapid screening of antisense oligonucleotides for prokaryotic gene modulation. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. 19, p. 5660–5669, nov. 2006.

SHIMO, H. M. et al. Role of the *Citrus sinensis* RNA deadenylase CsCAF1 in citrus canker resistance. **Molecular Plant Pathology**, v. 20, n. 8, p. 1105–1118, 21 ago. 2019.

SU, H. et al. Generation of the transgene-free canker-resistant *Citrus sinensis* using Cas12a/crRNA ribonucleoprotein in the T0 generation. **Nature Communications**, v. 14, n. 1, p. 3957, 5 jul. 2023.

SUN, C. et al. Antisense oligodeoxynucleotide inhibition as a potent strategy in plant biology: identification of SUSIBA2 as a transcriptional activator in plant sugar signalling. **The Plant Journal**, v. 44, n. 1, p. 128–138, 1 out. 2005.

SUN, C. et al. Sweet delivery - sugar translocators as ports of entry for antisense oligodeoxynucleotides in plant cells. **The Plant Journal**, v. 52, n. 6, p. 1192–1198, dez. 2007.

SWARUP, S. An *Xanthomonas citri* Pathogenicity Gene, *pthA*, Pleiotropically Encodes Gratuitous Avirulence on Nonhosts. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 5, n. 3, p. 204, 1992.

TANG, X. et al. Development of a gRNA–tRNA array of CRISPR/Cas9 in combination with grafting technique to improve gene-editing efficiency of sweet orange. **Plant Cell Reports**, v. 40, n. 12, p. 2453–2456, 23 dez. 2021.

TÁVORA, F. T. P. K. et al. Shotgun proteomics coupled to transient-inducible gene silencing reveal rice susceptibility genes as new sources for blast disease resistance. **Journal of Proteomics**, v. 241, p. 104223, 15 jun. 2021.

TSUTSUMI, N.; KANAYAMA, K.; TANO, S. Suppression of .ALPHA.-amylase gene expression by antisense oligodeoxynucleotide in barley cultured aleurone layers. **The Japanese Journal of Genetics**, v. 67, n. 2, p. 147–154, 1992.

TURNBULL, C.; LILLEMO, M.; HVOSLEF-EIDE, T. A. K. Global Regulation of Genetically Modified Crops Amid the Gene Edited Crop Boom – A Review. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, 24 fev. 2021.

VALE, F.; FERNANDES-FILHO, E.; LIBERATO, J. **Quant – A Software for Plant Disease Severity Assessment**. [s.l: s.n.]. v. 8

WELLBURN, A. R. The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. **Journal of Plant Physiology**, v. 144, n. 3, p. 307–313, 1 set. 1994.

XIE, Z. et al. A selection strategy in plant transformation based on antisense oligodeoxynucleotide inhibition. **The Plant Journal**, v. 77, n. 6, p. 954–961, mar. 2014.

XU, J. et al. Toxicity of copper on rice growth and accumulation of copper in rice grain in copper contaminated soil. **Chemosphere**, v. 62, n. 4, p. 602–607, jan. 2006.

XU, Y.; LI, Z. CRISPR-Cas systems: Overview, innovations and applications in human disease research and gene therapy. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 18, p. 2401–2415, 2020.

YAN, Q.; WANG, N. High-Throughput Screening and Analysis of Genes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* Involved in Citrus Canker Symptom Development. / **69 MPMI**, v. 25, n. 1, p. 69–84, 2012.

ZOU, X. et al. CsLOB1 regulates susceptibility to citrus canker through promoting cell proliferation in citrus. **The Plant Journal**, v. 106, n. 4, p. 1039–1057, 23 maio 2021a.

ZOU, X. et al. CsLOB1 regulates susceptibility to citrus canker through promoting cell proliferation in citrus. **The Plant Journal**, v. 106, n. 4, p. 1039–1057, 23 maio 2021b.

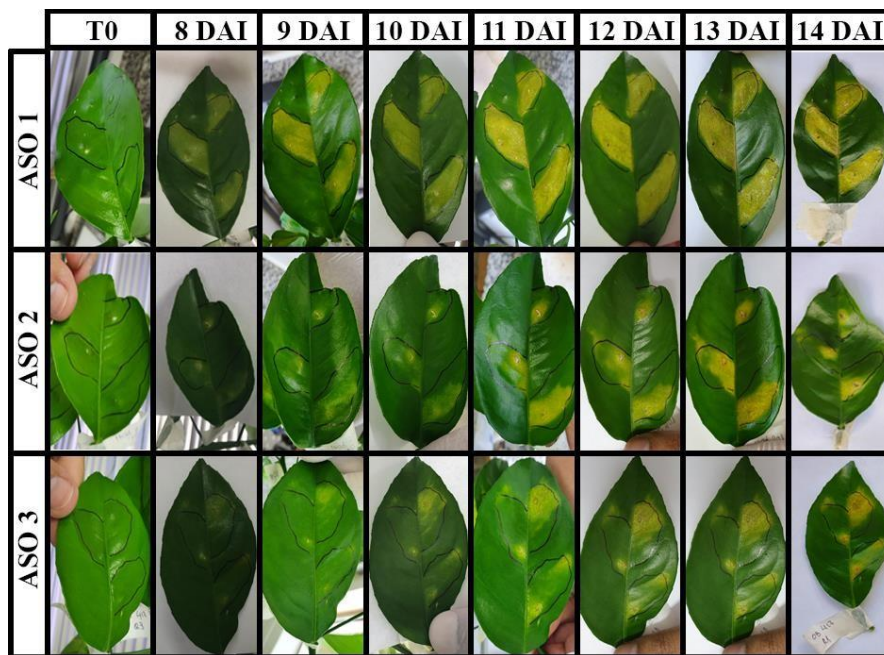
ANEXOS

Anexo 1. Supplementary Fig. S1. Representative *CsLOB1* arrangement and ASOs location. The three selected ASOs were located in the two exons of *CsLOB1*, two in the first and one in the second exon, as graphically represented in the chromosome coordinates and also in the gene sequence.

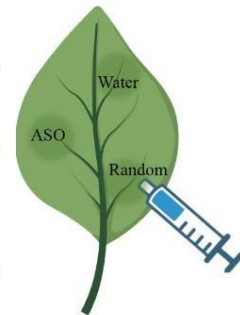


Anexo 2. **Supplementary Fig. S2. Representative leaves infiltrated with *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and ASOs treatments.** A. Panel showing the symptoms evolution during the time course after inoculation. T0 – time just after inoculation. DAI = Days after *X. citri* subsp. *citri* inoculation and ASO1, ASO2 and ASO3. B. Schematic representation of the leaf infiltration with the treatments.

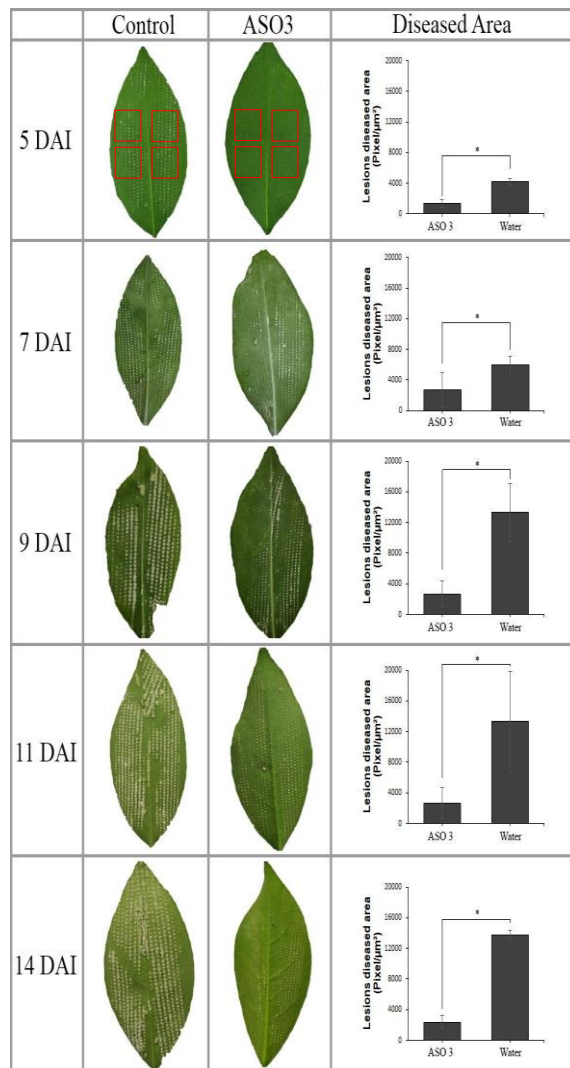
A



B



Anexo 3. Supplementary Fig. S3. Influence of ASO3 on the occurrence of citrus canker in *Citrus sinensis* leaves. Representative images of citrus canker in leaves treated with ASO3 or water control followed by *X. citri* subsp. *citri* inoculation using the pin-roller device. The red squares represent the areas used for quantifying the canker lesions using the Image J software. Asterisks (*) indicate significant differences based on Student's *t* test ($p < 0.05$) comparing ASO3 treatment and their respective control at each time point. Error bars represent the standard deviation of the means. DAI = Days after *X. citri* subsp. *citri* inoculation and treatments.



Anexo 4. Supplementary Table S1. Filtered output for design of antisense oligos obtained from the Sfold software. In yellow are the oligos also found in OligoWalk.

Column 1: starting target position
 Column 2: ending target position
 Column 3: target sequence (5p --> 3p)
 Column 4: antisense oligo (5p --> 3p)
 Column 5: GC content
 Column 6: average unpaired probability for target site nucleotides
 Column 7: binding site disruption energy (kcal/mol)
 FILTER CRITERIA: (" $\leq$ ": less than or equal to)
 (" $\geq$ ": greater than or equal to)
 A) 40% $\leq$ GC % $\leq$ 60%;
 B) No GGGG in the target sequence;
 C) Average unpaired probability for target site nucleotides $\geq$ 0.5; D) For each peak in the accessibility profile that is above the threshold probability of 0.5, all sites targeted to this same peak are ranked by their average unpaired probability (the higher the better) and at most n sites are selected for each peak, where n is determined by $\max([\text{width of peak/site length}], 2)$;
 E) Among sites satisfying criteria A-D, the top 20 unique ones with the highest average unpaired probability are listed.
 NOTE:
 i) The average unpaired probability is used in filter criteria C, D and E to cut down the number of reported sites in order to make the disruption energy calculation manageable on our web servers.

53	71	CACUCAAUUCUCAUCUCCA	TGGAGATGAGAATTGAGTG	42.1%	0.673	2.8
55	73	CUCAAUUCUCAUCUCCAUC	GATGGAGATGAGAATTGAG	42.1%	0.670	2.6
73	91	CUACUUUCUCUACUUCUCC	GGAGAAGTAGAGAAAGTAG	42.1%	0.982	0.1
75	93	ACUUUCUCUACUUCUCCUC	GAGGAGAAGTAGAGAAAGT	42.1%	0.982	0.2
142	160	CUUCUCCAGAAUCUUCUCC	GGAGAAGATTCTGGAGAAG	47.4%	0.815	4.2
143	161	UUCUCCAGAAUCUUCUCCA	TGGAGAAGATTCTGGAGAA	42.1%	0.827	1.7
173	191	UUCUCCUUCACAAUCCUCU	AGAGGATTGTGAAGGAGAA	42.1%	0.793	5.7
174	192	UCUCCUUCACAAUCCUCUC	GAGAGGATTGTGAAGGAGA	47.4%	0.797	7.7
180	198	UCACAAUCCUCUCCAAAUC	GATTTGGAGAGGATTGTGA	42.1%	0.677	6.4
181	199	CACAAUCCUCUCCAAAUCU	AGATTTGGAGAGGATTGTG	42.1%	0.682	6.5
211	229	UCUCUCCGCCGCCUAUAGU	ACTATAGGCGGCGGAGAGA	57.9%	0.679	6.1
212	230	CUCUCCGCCGCCUAUAGUU	AACTATAGGCGGCGGAGAG	57.9%	0.640	7.7
252	270	AAAAUCCUCCGCCGCAGAU	ATCTGCGGCGGAGGATTTT	52.6%	0.637	8.6
292	310	CUCCAUAUUUCCACCAAC	GTTGGTGGAAAATATGGAG	42.1%	0.653	5.0
293	311	UCCAUAUUUCCACCAACC	GGTTGGTGGAAAATATGGA	42.1%	0.671	5.7
303	321	CCACCAACCGAACCAUACA	TGTATGGTTCGGTTGGTGG	52.6%	0.675	4.7
304	322	CACCAACCGAACCAUACAA	TTGTATGGTTCGGTTGGTG	47.4%	0.682	7.0
487	505	GAAACAAGUCAGUGAGCUU	AAGCTCACTGACTTGTTTC	42.1%	0.657	5.6
486	504	AGAAACAAGUCAGUGAGCU	AGCTCACTGACTTGTTTCT	42.1%	0.632	4.8
488	506	AAACAAGUCAGUGAGCUUC	GAAGCTCACTGACTTGTTT	42.1%	0.623	6.7

Anexo 5. Supplementary Table S2. Output for design of antisense oligos obtained from the OligoWalk software. In yellow are the oligos also found in Sfold.

Position on target	Probability of being efficient siRNA	siRNA Sequence (5'→3')
657	0.937239	UUGUCAUCCAAAAACAGC
272	0.922727	UAAAACACAUUUCUCGACG
271	0.922433	AAAACACAUUUCUCGACGC
34	0.916777	UUCUUCAUAUUAGUGAUUG
69	0.912572	AAGUAGAGAAAGUAGAUGG
560	0.910863	UUAGAGUUAUUAUUUGCG
553	0.909146	UAUUAAAUUGCGUUGCUGG
355	0.906769	AAGAACUUGAUGAUUUGC
150	0.906066	UAAAGCUUGGAGAAGAUUC
336	0.905346	UAGCACCGAAGACUCUAUG
349	0.901619	UUGAUGAUUUGCUAGCAC
348	0.898327	UGAUGAUUUGCUAGCACC
33	0.897711	UCUUCAUAUUAGUGAUUGG
487	0.897697	AAGCUCACUGACUUGUUUC
237	0.896047	UUUUGCAAGCAGCACAAGG
638	0.895642	UAGUAUCCAUGAACUGUUG
27	0.89376	UAUUAGUGAUUGGGAUUGC
592	0.892543	UUGUUCUUGAGAUUGUGCC
177	0.892324	UUGGAGAGGAUUGUGAAGG
283	0.891576	AAAUUUGGAGCUAAAACAC
216	0.890837	UAAGAACUAUAGGCGGCGG
66	0.886115	UAGAGAAAGUAGAUGGAGA
342	0.884119	UAUUGCUAGCACCGAAGAC
40	0.88163	UGAGUGUUCUUCAUAUUAG
572	0.879322	UUUCCAUGCAAAUUGAGAGU
116	0.878414	UUGAUGAUUAGGAGAAGGG
554	0.874682	UUUUUUUUUUGCGUUGCUG
328	0.872499	AAGACUCUAUGAGCAAUGG
533	0.871344	UUUCCAUGGUGACAAGCUC
552	0.870175	AUUUUUUUUGCGUUGCUGGC
209	0.866461	UAUAGGCGGCGGAGAGAGG
3	0.865238	UAAUUUUUGUGUUUGCAUUC

586	0.859586	UUGAGAUUGUGCCAUUUCC
31	0.859317	UUCAUAUUAGUGAUUGGGA
438	0.858851	UAAACAGGAUCCCCGAUUC
222	0.851713	AAGGGCUAAGAACUAUAGG
323	0.85047	UCUAUGAGCAAUGGUGAAC
376	0.849056	UUGAGAUUCUGGCAGUUCU
13	0.842763	AUUGCUACAUAUAAUUUUGU

637	0.842517	AGUAUCCAUGAACUGUUGC
54	0.841617	AUGGAGAUGAGAAUUGAGU
8	0.8402	UACAUAUUUUUGUGUUUG
144	0.83916	UUGGAGAAGAUUCUGGAGA
135	0.838894	AUUCUGGAGAAGACAAUUG
422	0.837006	UUCUGGCACUUGCUUCAUA
385	0.833138	AUCUGCUCGUUGAGAUUCU
471	0.829999	UUCUGGAGAUGGCAAAUAG
304	0.825929	UUGUAUGGUUCGGUUGGUG
668	0.825215	AUCCAAUACCAUUGUCAUC
370	0.823677	UUCUGGCAGUUCUGCAAGA
646	0.823477	AAACAGCUAGUAUCCAUG
351	0.818585	ACUUGAUGAUUUGCUAGC
352	0.818531	AACUUGAUGAUUUGCUAG
658	0.815602	AUUGUCAUCCAAAAACAG
551	0.815329	UUAAAUUGCGUUGCUGGCU
84	0.814893	AUUGAGAAGGAGGAGAAGU
112	0.813097	UGAUUAGGAGAAGGGAAGC
630	0.813051	AUGAACUGUUGCUGCUGCU
164	0.809634	UGAAGGAGAAGCUUUAAAG
406	0.807267	AUAGACCAUGCUGCUCACU

282	0.795327	AAUAUGGAGCUAAAACACA
2	0.792017	AAUUUUGUGUUUGCAUUC
562	0.79137	AAUUAGAGUUAUUAAAUG
152	0.787095	UUUAAAAGCUUGGAGAAGAU
341	0.7856	AUUGCUAGCACCGAAGACU
320	0.783768	AUGAGCAAUGGUGAACUUG
25	0.780561	UUAGUGAUUGGGAUUGCUA
573	0.778612	AUUUCCAUGCAAAUAGAG
121	0.775311	AAUUGUUGAUGAUUAGGAG
371	0.773242	AUUCUGGCAGUUCUGCAAG
149	0.772762	AAAGCUUGGAGAAGAUUCU
479	0.771597	UGACUUGUUUCUGGAGAUG
118	0.770521	UGUUGAUGAUUAGGAGAAG
7	0.768169	ACAUUAAUUUUUGUGUUUGC
123	0.765889	ACAAUUGUUGAUGAUUAGG
284	0.764436	AAAAUAUGGAGCUAAAACA
38	0.763303	AGUGUUCUUCAUAUAGUG
268	0.763018	ACACAUUUCUCGACGCAUC
43	0.762029	AAUUGAGUGUUCUUCAUUAU
61	0.760757	AAAGUAGAUGGAGAUGAGA
627	0.759731	AACUGUUGCUGCUGCUGCU
26	0.756973	AUUAGUGAUUGGGAUUGCU
270	0.751817	AAACACAUUUCUCGACGCA
556	0.74878	AGUUAUUAAAUUGCGUUGC

275	0.746597	AGCUAAAACACAUUUCUCG
50	0.74393	AGAUGAGAAUUGAGUGUUC

238	0.740184	AUUUUGCAAGCAGCACAAG
120	0.73933	AUUGUUGAUGAUUAGGAGA
477	0.735864	ACUUGUUUCUGGAGAUGGC
307	0.735825	AACUUGUAUGGUUCGGUUG
643	0.73059	ACAGCUAGUAUCCAUGAAC
28	0.729879	AUAUUAGUGAUUGGGAUUG
645	0.726818	AAACAGCUAGUAUCCAUGA
110	0.723502	AUUAGGAGAAGGGAAGCGU
113	0.723261	AUGAUUAGGAGAAGGGAAG
649	0.720038	CAAAAAACAGCUAGUAUCC
212	0.715123	AACUAUAGGCGGCGGAGAG
273	0.71307	CUAAAAACACAUUUCUCGAC
269	0.712799	AACACAUUUCUCGACGCAU
327	0.712554	AGACUCUAUGAGCAAUGGU
472	0.709244	UUUCUGGAGAUGGC AAAUA
343	0.705408	AUAUUGCUAGCACCGAAGA
140	0.697845	AGAAGAUUCUGGAGAAGAC
647	0.693709	AAAAACAGCUAGUAUCCAU
306	0.691031	ACUUGUAUGGUUCGGUUGG
80	0.689879	AGAAGGAGGAGAAGUAGAG
182	0.68922	AAGAUUUGGAGAGGAUUGU
548	0.685204	AAUUGCGUUGCUGGCUUUC
346	0.683768	AUGAUAUUGCUAGCACCGA
171	0.683341	AGGAUUGUGAAGGAGAAGC
648	0.680466	AAAAACAGCUAGUAUCCA
437	0.674231	AAACAGGAUCCCCGGAUUCU

87	0.669011	AAGAUUGAGAAGGAGGAGA
415	0.662324	ACUUGCUUCAUAGACCAUG
641	0.646351	AGCUAGUAUCCAUGAACUG
266	0.644782	ACAUUUCUCGACGCAUCUG
1	0.632603	AUUUUGUGUUUGCAUUGCA
231	0.631127	AAGCAGCACAAAGGGCUAAG
458	0.63022	AAAUAGCCCCGGCGCAGCC
325	0.626084	ACUCUAUGAGCAAUGGUGA
215	0.62529	AAGAACUAUAGGCGGCGGA
671	0.617048	CUGAUCCAAUACCAUUGUC
156	0.61368	AAGCUUUAAGCUUGGAGA
63	0.605491	AGAAAGUAGAUGGAGAUGA
128	0.603951	AGAAGACAAUUGUUGAUGA
594	0.587798	ACUUGUUCUUGAGAUUGUG
652	0.569104	AUCCAAAAACAGCUAGUA
181	0.567522	AGAUUUGGAGAGGAUUGUG
56	0.554266	AGAUGGAGAUGAGAAUUGA
481	0.549622	ACUGACUUGUUUCUGGAGA
90	0.543233	GAGAAGAUUGAGAAGGAGG
581	0.508394	AUUGUGCCAUUCCAUGCA
89	0.508165	AGAAGAUUGAGAAGGAGGA
373	0.483206	AGAUUCUGGCAGUUCUGCA
583	0.480725	AGAUUGUGCCAUUCCAUG
117	0.476613	GUUGAUGAUUAGGAGAAGG
549	0.47498	AAAUUGCGUUGCUGGCUUU
23	0.474212	AGUGAUUGGGAUUGCUACA

241	0.461877	AGGAUUUUGCAAGCAGCAC
211	0.441746	ACUAUAGGCGGCGGAGAGA

Anexo 6. Supplementary table S3. Common oligos obtained from Oligowalk and Sfold.

Initial Position	Final Position	Target Sequence	ASO	GC Content	Oligo Binding Energy (Sfold)	Binding Site Disruption Energy (Sfold)	Probability of being efficient siRNA (OligoWalk)
181	199	CACAAUCCUCUCCAAAUCU	AGATTGGAGAGGATTGTG	42.1%	-10.8	6.5	0.567522
211	229	UCUCUCCGCCGCCUAUAGU	ACTATAGGCGGCGGAGAGA	57.9%	-10.9	6.1	0.441746
212	230	CUCUCCGCCGCCUAUAGUU	AACTATAGGCGGCGGAGAG	57.9%	-9.7	7.7	0.715123
304	322	CACCAACCGAACCAUACAA	TTGTATGGTTCGGTTGGTG	47.4%	-11.6	7.0	0.825929
487	505	GAAACAAGUCAGUGAGCUU	AAGCTCACTGACTTGTTTC	42.1%	-9.1	5.6	0.897697

ASO	Starting target position	Ending target position	target sequence (5' -> 3')	ASO (5' -> 3')	GC content (%)	Average unpaired probability for target site nucleotides	Binding site disruption energy (kcal/mol) (ΔG)	Oligo Binding Energy (kcal/mol)	Probability of being efficient siRNA (Oligowalk)
ASO1	212	230	CUCUCCGCCGCCUAUAGUU	A*A*CTATAGGCGGCGGAG*A*G	57.9	0.621	7.7	-9.7	0.715123
ASO2	304	322	CACCAACCGAACCAUACAA	T*T*GTATGGTTCGGTTGG*T*G	47.4	0.598	7.0	-11.6	0.825929
ASO3	487	505	GAAACAAGUCAGUGAGCUU	A*A*GCTCACTGACTTGTT*T*C	42.1	0.557	5.6	-9.1	0.897697
Random	-	-	-	C*G*CCGACGCAAACGCTT*T*A	57.9	-	-	-	-

Anexo 7. **Table 1** – Parameters of the Antisense oligonucleotides (ASO) used in this study. Asterisks (*) indicate the positions of the phosphorothioate modifications.



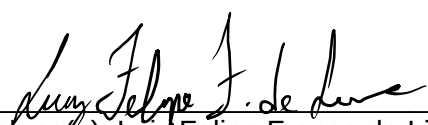
COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
Universidade Estadual de Campinas
Caixa Postal 6109. 13083-970, Campinas, SP, Brasil
Fone (19) 3521-6378. email: cpgeb@unicamp.br



Anexo 8. Declaração de Direitos Autorais

DECLARAÇÃO

Em observância ao **§5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15**, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Dissertação de Mestrado, intitulada ***“OLIGONUCLEOTÍDEOS ANTISENÇO PARA SILENCIAMENTO TRANSIENTE DE GENES DE CITRUS SINENSIS E APLICAÇÃO PARA TOLERÂNCIA AO CANCRO CÍTRICO”***, desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Assinatura: 
Nome do(a) aluno(a): Luiz Felipe Franco de Lima

Assinatura: 
Nome do(a) orientador(a): Alessandra Alves de Souza

Data: 21 de agosto de 2024



COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
Universidade Estadual de Campinas
Caixa Postal 6109. 13083-970, Campinas, SP, Brasil
Fone (19) 3521-6378. email: cpgib@unicamp.br

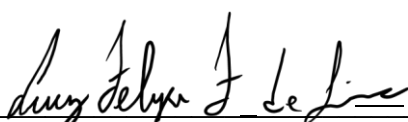


Anexo 9 Declaração de Bioética e Biossegurança

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **OLIGONUCLEOTÍDEOS ANTISENÇO PARA SILENCIAMENTO TRANSIENTE DE GENES DE CITRUS SINENSIS E APLICAÇÃO PARA TOLERÂNCIA AO CANCRO CÍTRICO**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 21 de agosto de 2024

Assinatura : 

Nome do(a) autor(a): **Luiz Felipe Franco de Lima**

RG n.º 47.800.836-3 SSP-SP

Assinatura : 

Nome do(a) orientador(a): **Alessandra Alves de Souza**

RG n.º 3533370 SSP-PE