



Huanglongbing de los cítricos

Eliane Locali-Fabris,
J. Freitas-Astúa, M.A. Machado

?Lo que el HLB trajo a la citricultura?

La seguridad de que realmente es una enfermedad destructiva

- Sin perspectiva de ‘convivencia pacífica’
- El negocio citrícola sob riesgo

La seguridad de que se trata de una enfermedad de rápida diseminación

- Reducción del potencial de inóculo debe ser inmediata y constante

La seguridad de que su manejo debe ser cooperativo

- Su vecino es su parcerero

La inseguridad acerca del material propagativo

- Inspecciones son esenciales



Daños

Caída de hojas y frutos

Reducción de la productividad y calidad de los frutos

Declinio general de la planta

Muerte





?Lo que el HLB trajo a la citricultura?

La seguridad de que realmente es una enfermedad destructiva

- Sin perspectiva de ‘convivencia pacífica’
- El negocio citrícola sob riesgo

La seguridad de que se trata de una enfermedad de rápida diseminación

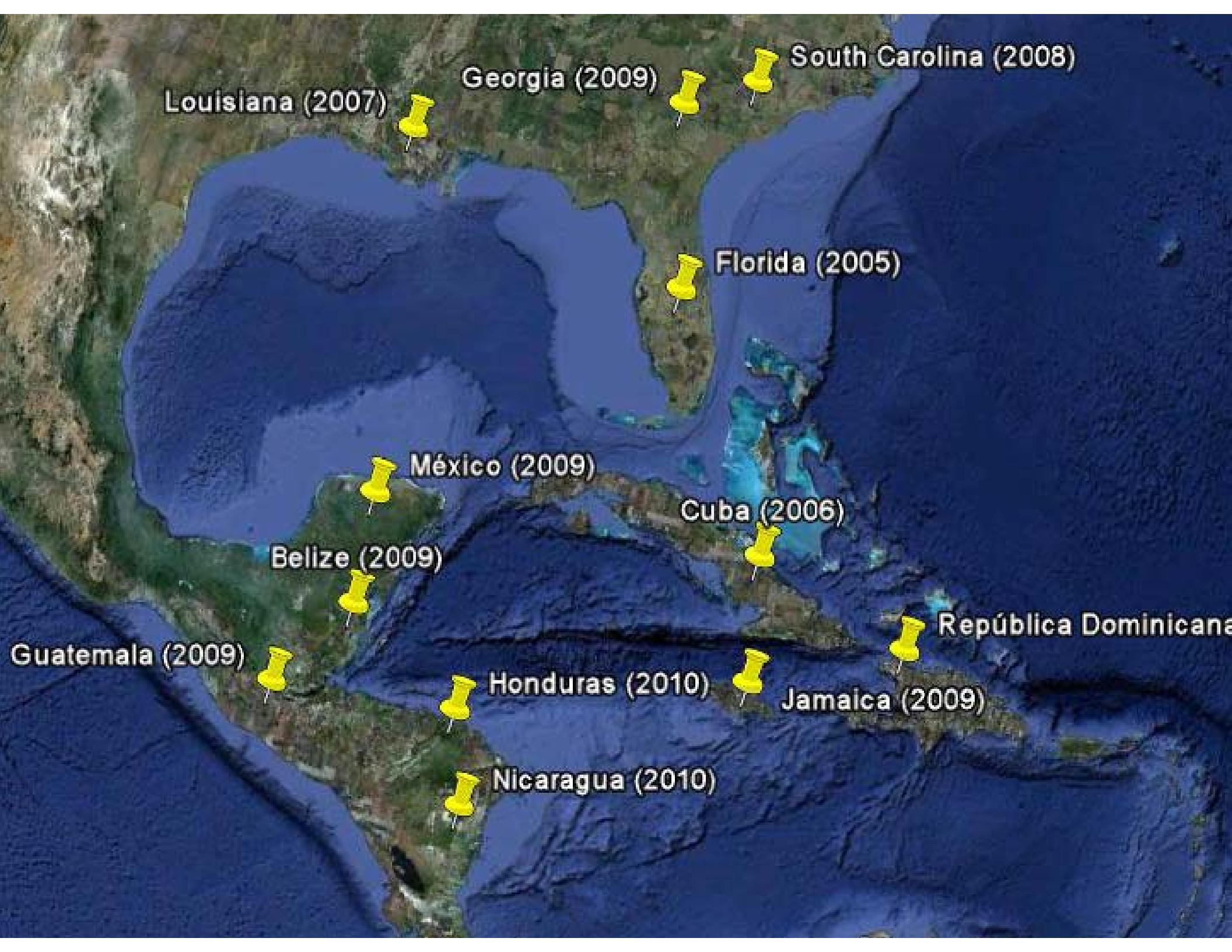
- Reducción del potencial de inóculo debe ser inmediata y constante

La seguridad de que su manejo debe ser cooperativo

- Su vecino es su parcerero

La inseguridad acerca del material propagativo

- Inspecciones son esenciales



Louisiana (2007)

Georgia (2009)

South Carolina (2008)

Florida (2005)

México (2009)

Cuba (2006)

Belize (2009)

República Dominicana

Guatemala (2009)

Honduras (2010)

Jamaica (2009)

Nicaragua (2010)



?Lo que el HLB trajo a la citricultura?

La seguridad de que realmente es una enfermedad destructiva

- Sin perspectiva de ‘convivencia pacífica’
- El negocio citrícola sob riesgo

La seguridad de que se trata de una enfermedad de rápida diseminación

- Reducción del potencial de inóculo debe ser inmediata y constante

La seguridad de que su manejo debe ser cooperativo

- Su vecino es su parcerero

La inseguridad acerca del material propagativo

- Inspecciones son esenciales

Efecto vecino



?Lo que el HLB trajo a la citricultura?

La seguridad de que realmente es una enfermedad destructiva

- Sin perspectiva de ‘convivencia pacífica’
- El negocio citrícola sob riesgo

La seguridad de que se trata de una enfermedad de rápida diseminación

- Reducción del potencial de inóculo debe ser inmediata y constante

La seguridad de que su manejo debe ser cooperativo

- Su vecino es su parcerero

La inseguridad acerca del material propagativo

- Inspecciones son esenciales









?Lo que es necesario para que la actividad citrícola sobreviva al HLB?

▶▶ Acciones rápidas de supresión de la enfermedad (urgencia de muy corto plazo)

▶▶ Eficiente paquete tecnológico de manejo (corto a medio plazo)

▶▶ Variedades tolerantes o resistentes (largo plazo)

El tetraedro de la enfermedad

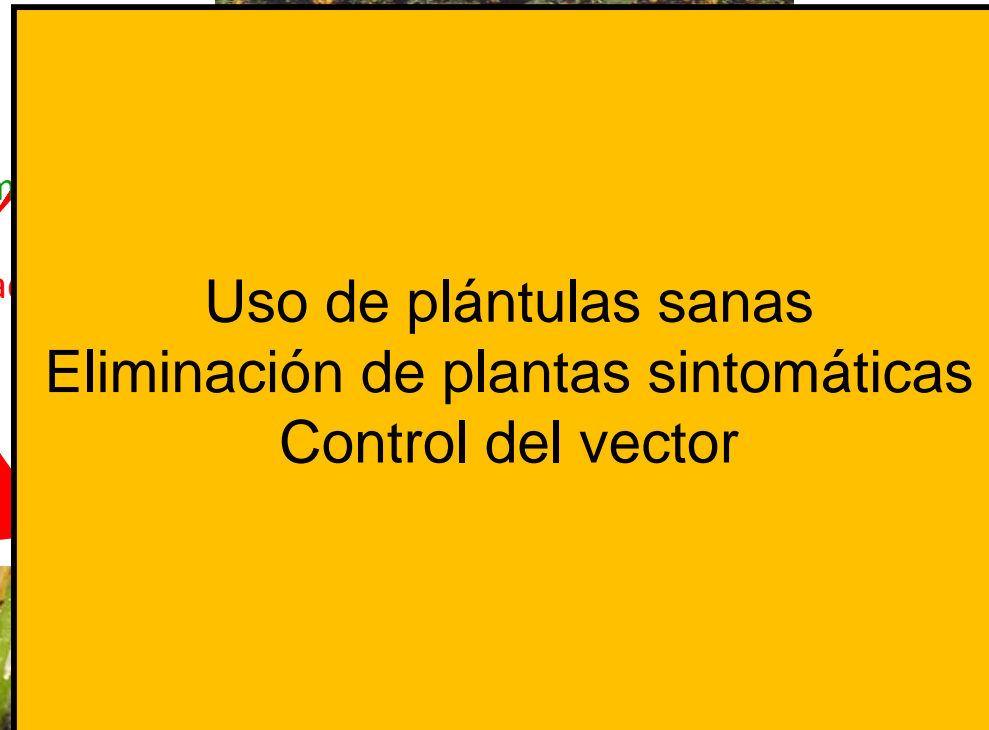


Plantas resistentes

- Selección masal
- Mejoramiento
- Transgenia

Alteración del ambiente

- Nutrición
- Plantíos adensados
- Irrigación
- Patrón



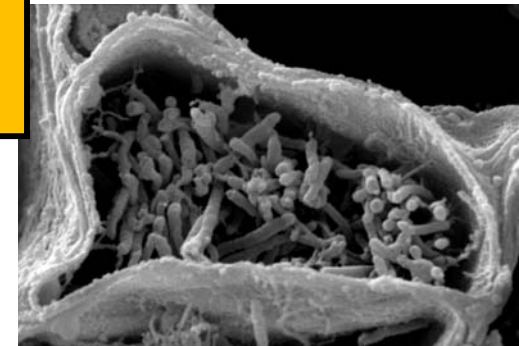
Control de la bacteria

- Antibióticos
- Reducción del inóculo



Control del vector

- Biológico
- Químico





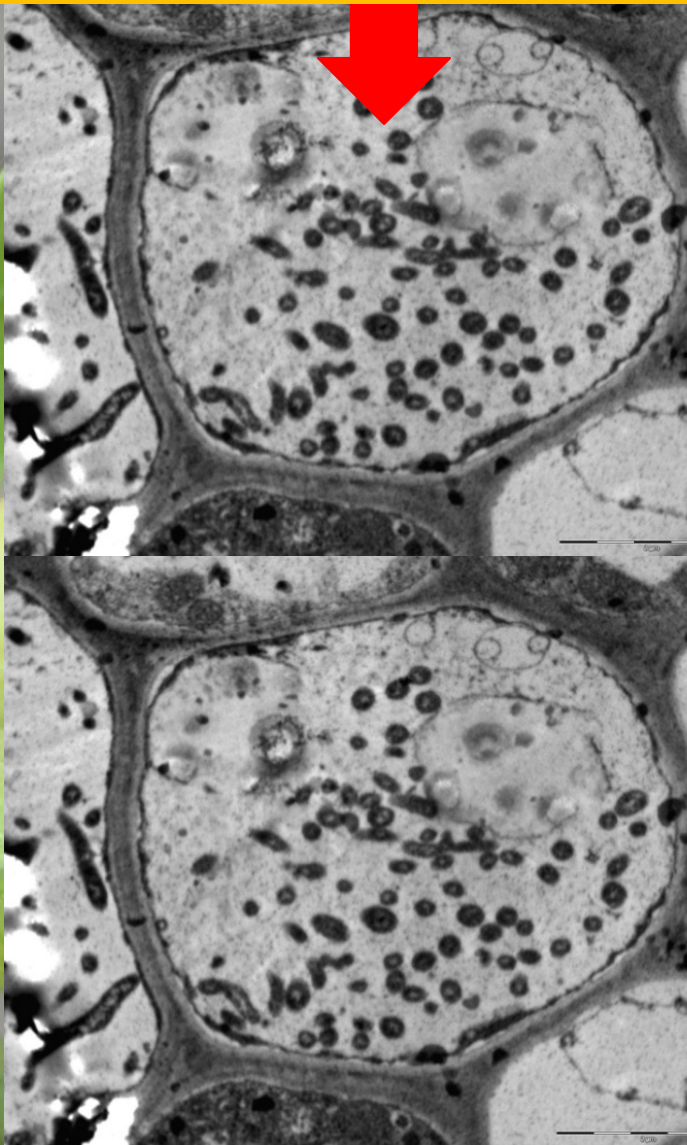
?Y la investigación?



!Conocer para manejar!

Objetivo

Desarrollar estrategias alternativas de manejo más eficientes, menos onerosas y menos perjudiciales al ambiente





HLB de los cítricos: etiología

- 3 especies:
 - *Candidatus Liberibacter africanus*
 - *Ca. L. americanus*
 - *Ca. L. asiaticus*

Interacciones complejas,
posibles nuevos vectores
etc.: desafío más grande

* 2008, en China - fitoplasma grupo I
(50%), Lam (1%)

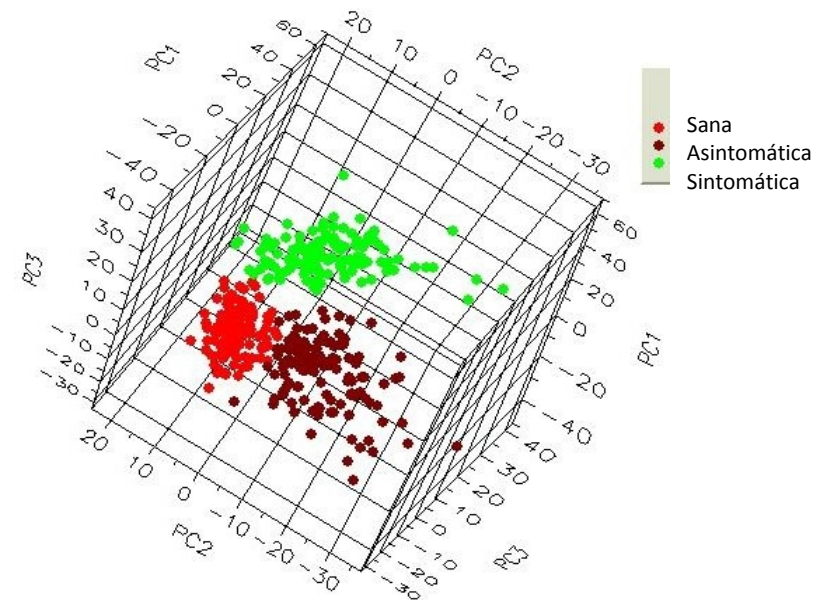
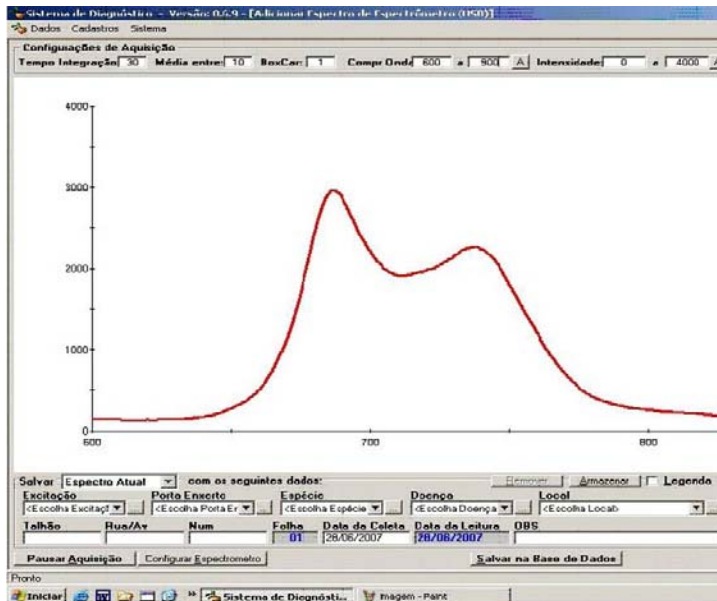
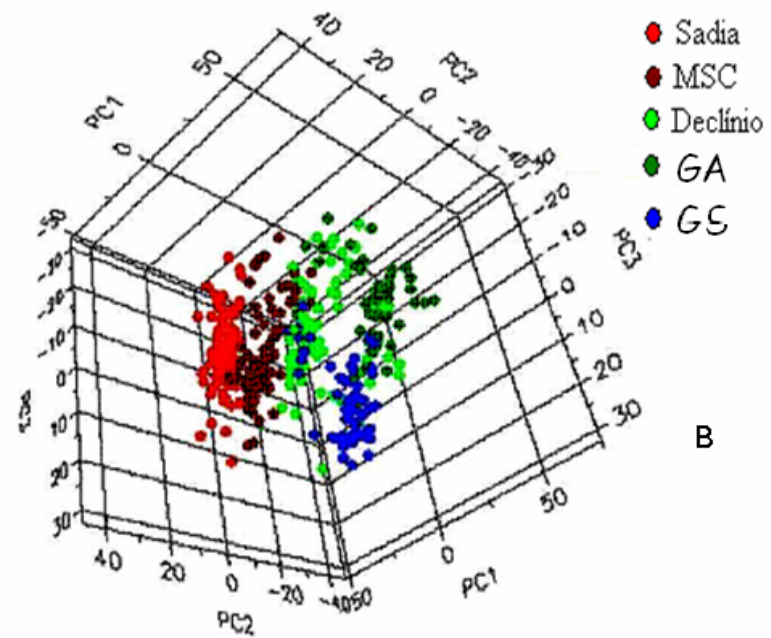
Diagnóstico precoz del HLB

- Espectroscopía óptica como fluorescencia inducida por laser (LIFS)
- Espectroscopía de emisión óptica inducida por laser (LIBS)
- Espectroscopía Raman
- Infrarrojo
- Imágenes de fluorescencia y multispectrales

X

RT-qPCR

Diagnóstico por biofotónica



Milori et al. (Embrapa-CNPDIA)

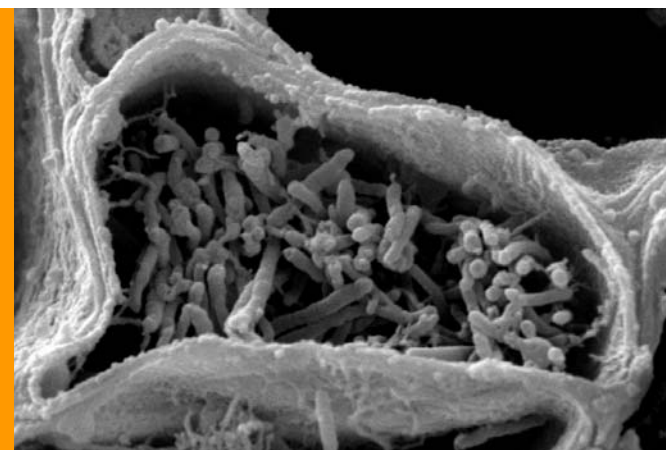
Control de la bacteria - transgenia

- Genes de resistencia
 - Genes conocidos de otros organismos
 - Ex.: Xa21 de arroz
 - Gene de resistencia de arroz selvagem (*O. longistaminata*) a *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*
 - Puede inhibir el crecimiento de bacterias Gram negativas
 - Evidencias:
 - 75-90% menos lesiones causadas por *X. oryzae* en arroz
 - Reducción del número de lesiones de *X. axonopodis* pv. *citri* en naranja (Mendes et al., 2010)



Para HLB:

- Valencia GM
- 10 eventos distintos + control
- 66 plantas
- Todas + bacteria y sintomáticas



Resistencia a la bacteria

- Péptidos antimicrobianos**

- Conocidos

- Ex.: Atacina, cecropina de insectos (*Hyalophora cecropia*, *Trichoplusia ni*, *Drosophila melanogaster*)
- Pueden inhibir el crecimiento de bacterias Gram negativas
 - Evidencias:
 - Aumento en la resistencia a *Erwinia amylovora* en manzanas GM (Ko et al., 2002)
 - **Reducción en el número de lesiones de canchrosis en naranja GM (Boscariol et al., 2006)**



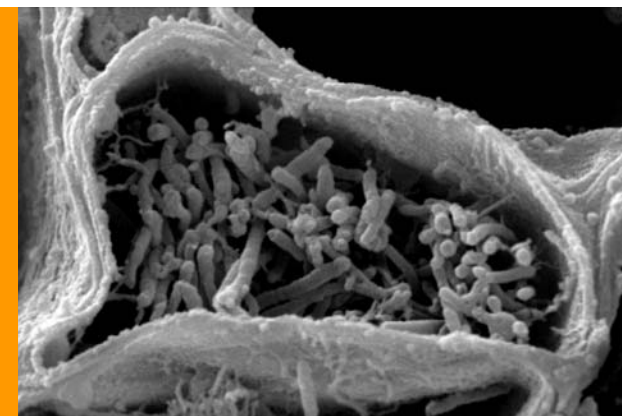
Para HLB (Atacina A):

Hamlin, Pera, Valência y Natal + ck

24 eventos distintos

168 plantas avaliadas

Bacteria + > 6 meses; síntomas > 9 m

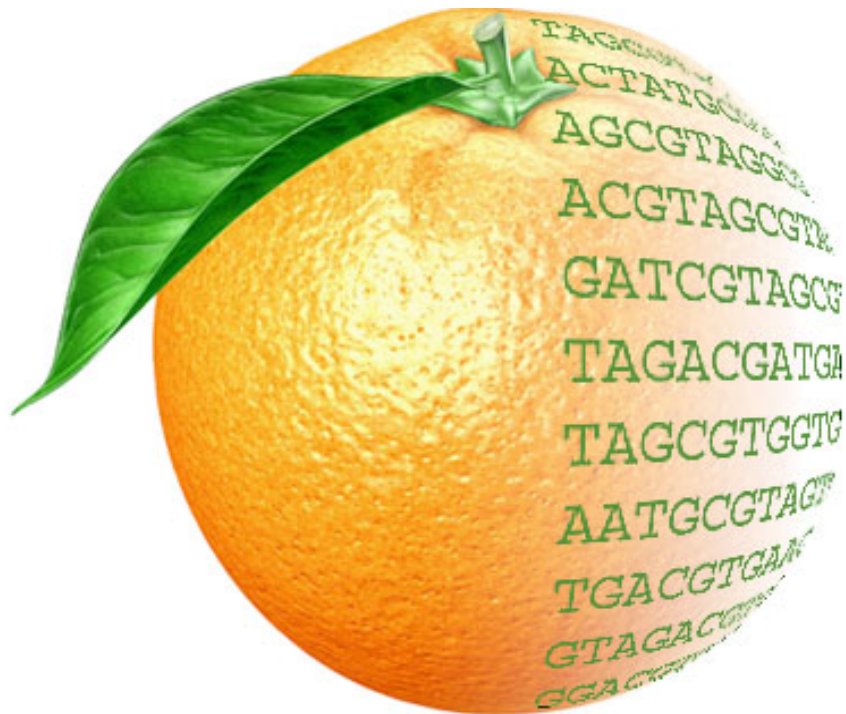


Control de la bacteria: estudio de las interacciones

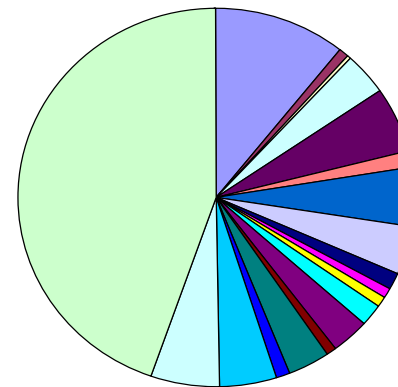
Transcriptoma de plantas de naranja dulce con síntomas de HLB - microarreglos

Establecimiento de plantas de cítricos – naranja dulce (Pêra) / Limón cravo en invernadero – 25 plantas

Infección de las plantas con *Ca. Liberibacter americanus*
→ injertía con yemas infectadas

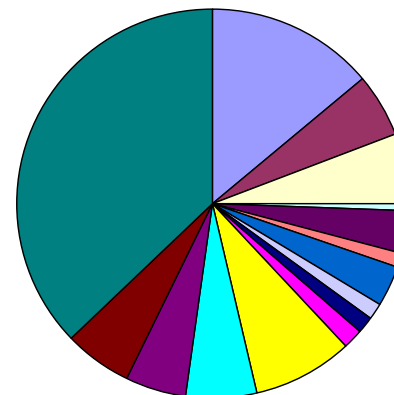


Induced Genes in *C. sinensis* CLam (+)



- 01 Metabolism
- 02 Energy
- 03 Cell cycle/DNA processing
- 04 Transcription
- 06 Protein Fate
- 08 Cellular Transport
- 10 Cellular Communication
- 11 Cell Rescue/Defense/Virulence
- 14 Cell Fate
- 20 Systemic Regulation
- 25 Development Systemic
- 30 Cellular Organization
- 40 Subcel. Localization
- 62 Protein Regulation
- 63 Protein Binding Function/Cofact
- 65 Storage Protein
- 67 Transport Facilitation
- 98 Classification Not Clear
- 99 Unclassified

Repressed Genes in *C. sinensis* CLam (+)



- 01 Metabolism
- 02 Energy
- 04 Transcription
- 05 Protein Synthesis
- 06 Protein Fate
- 08 Cellular Transport
- 10 Cellular communication
- 13 Regulation/Interaction Cellular
- 25 Development
- 30 Control/ Cellular Organization
- 40 Subcellular Localisation
- 63 Protein Binding Function/Cofactor Req.
- 67 Transport Facilitation
- 98 Classification Not Clear
- 99 Unclassified Proteins

Control de la bacteria: estudio de las interacciones

Establecimiento de plantas de cítricos – naranja dulce (Pêra) / Limón cravo em invernadero – 54 plantas (27CLam/27CLas)

Infección de las plantas con *Ca. Liberibacter* spp. → injertía con yemas infectadas

Cítricos especies	Coletas							
	CLam	CLas	Poda	Infección	48h	1 sem	1 mes	Síntomas
Hamlin	08	08	06/09	07/09	ok	ok	ok	
Ponkan	08	08	08/09	09/09	ok	ok	ok	
Trifoliata	08	08	08/09	09/09	ok	ok	ok	
Azeda	08	08	08/09	09/09	ok	ok	ok	
Tahiti	13	13	05/09	07/09	ok	ok	ok	
Galego	08	08	06/09	07/09	ok	ok	ok	
Cravo	13	13	05/09	07/09	ok	ok	ok	
Lima doce	09	10	06/09	07/09	ok	ok	ok	
Sunki	08	08	06/09	07/09	ok	ok	ok	

 Especies infectadas

Resistencia a la bacteria

Transformación genética de los cítricos

- Promotores de floema (PP2, suc etc.)
 - Evaluación por medio de transformación de citrange Carrizo
- Genes de interés
 - factores de transcripción, proteínas PR...
(diferencialmente expresos via microarreglos)
- Péptidos antimicrobianos (AMP) de cítricos
- Similaridad com otros AMP



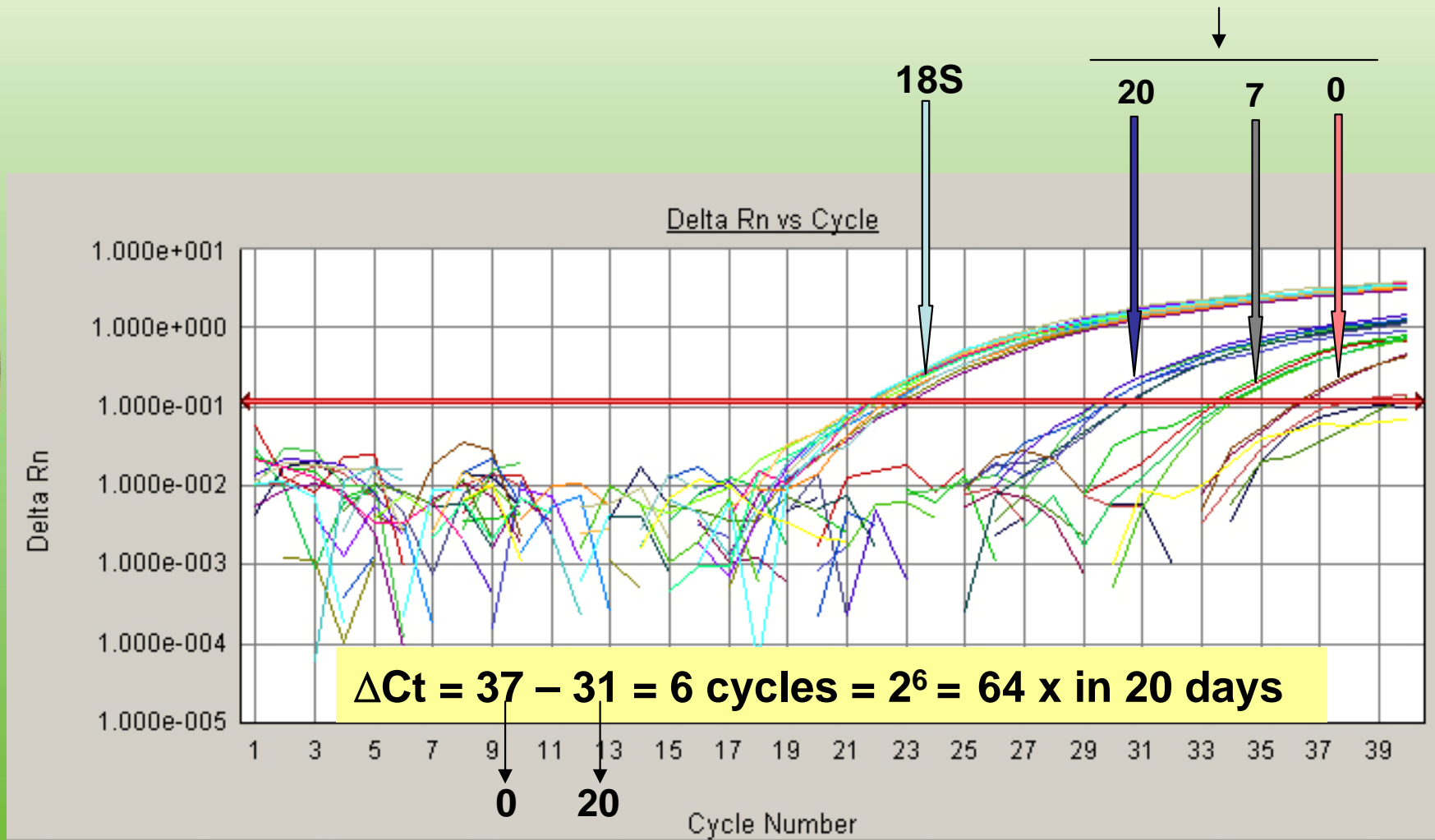


- 20-30% de los psílicos adultos y 100% de las **ninfas** adquieren la bacteria
- Adquisición eficiente en hojas jóvenes, aunque asintomáticas

Candidatus Liberibacter spp.

Adquisición y multiplicación de la bacteria en el vector

Días de alimentación



Control del Vector

- **Toxinas**

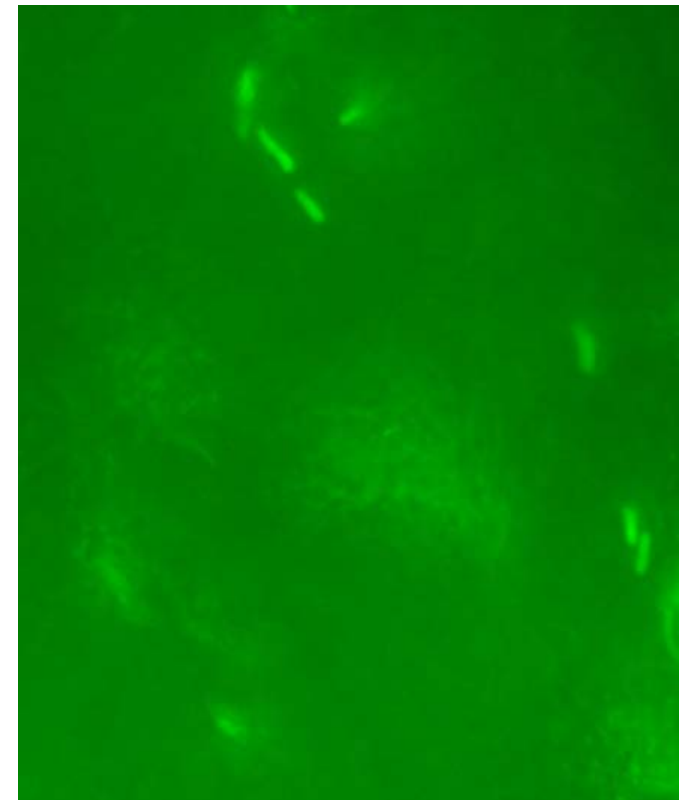
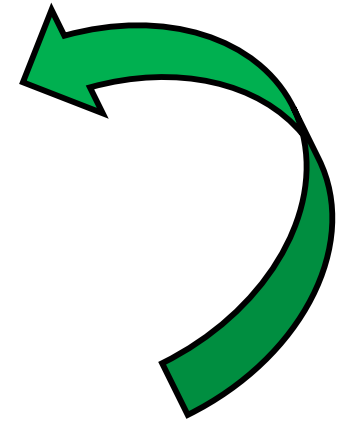
- Ex.: Uso de Bt para el control del psílido
- Etapa 1: Selección de estirpes patogénicas (invernadero)
- Etapa 2: Clonagem del gene codificador de la toxina
- Etapa 3: Transformación de cítricos
- Etapa 4: Evaluación



**Proyecto en fase inicial...
Todavía sin evidencia de que
va a funcionar!!!**



Inoculación por la raíz



Microscopía de fluorescencia: Bt- GFP
aislado de hojas de ramos inoculados

Incremento de la resistencia del hospedante

- Incremento en la resistencia sistémica adquirida (SAR)
 - Inductores de SAR (Actigard, ácido salicílico, ácido isonicotínico, imidacloprid) cuando aplicados en las plantas: sin efecto
- Aumento en la resistencia sistémica adquirida (SAR)
 - Ex.: NPR1 (regulador de SAR en *Arabidopsis*) – CCSM; UF; USDA
 - Evidencias:
 - NPR1 en manzana GM aumentó la resistencia a una bacteria y dos hongos patogénicos (Malnoy et al., 2007)
 - AtNPR1 en arroz confere resistencia a Xoo (Chern et al., 2001)
 - **AtNPR1 en naranja aumenta la tolerancia a Xac (Simões et al., submetido)**



Resultado promisor... tolerancia?

Em HLB:

Natal y Hamlin

12 plantas + ck

Natal: bac+/ sint+

Hamlin bac+/ sint-





Resultados previstos

Por lo menos un aislado de Bt deberá ser eficiente para el control del psílido y podrá ser usada en el manejo del HLB;

Estudio de las interacciones planta/patógeno/vector y informaciones del genoma expreso y completo de cítricos deberán ampliar el conocimiento sobre el patossistema y sugerir nuevas abordajes de control, incluso transformación genética.



Gracias!

eliane@centrodecitricultura.br