



# *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

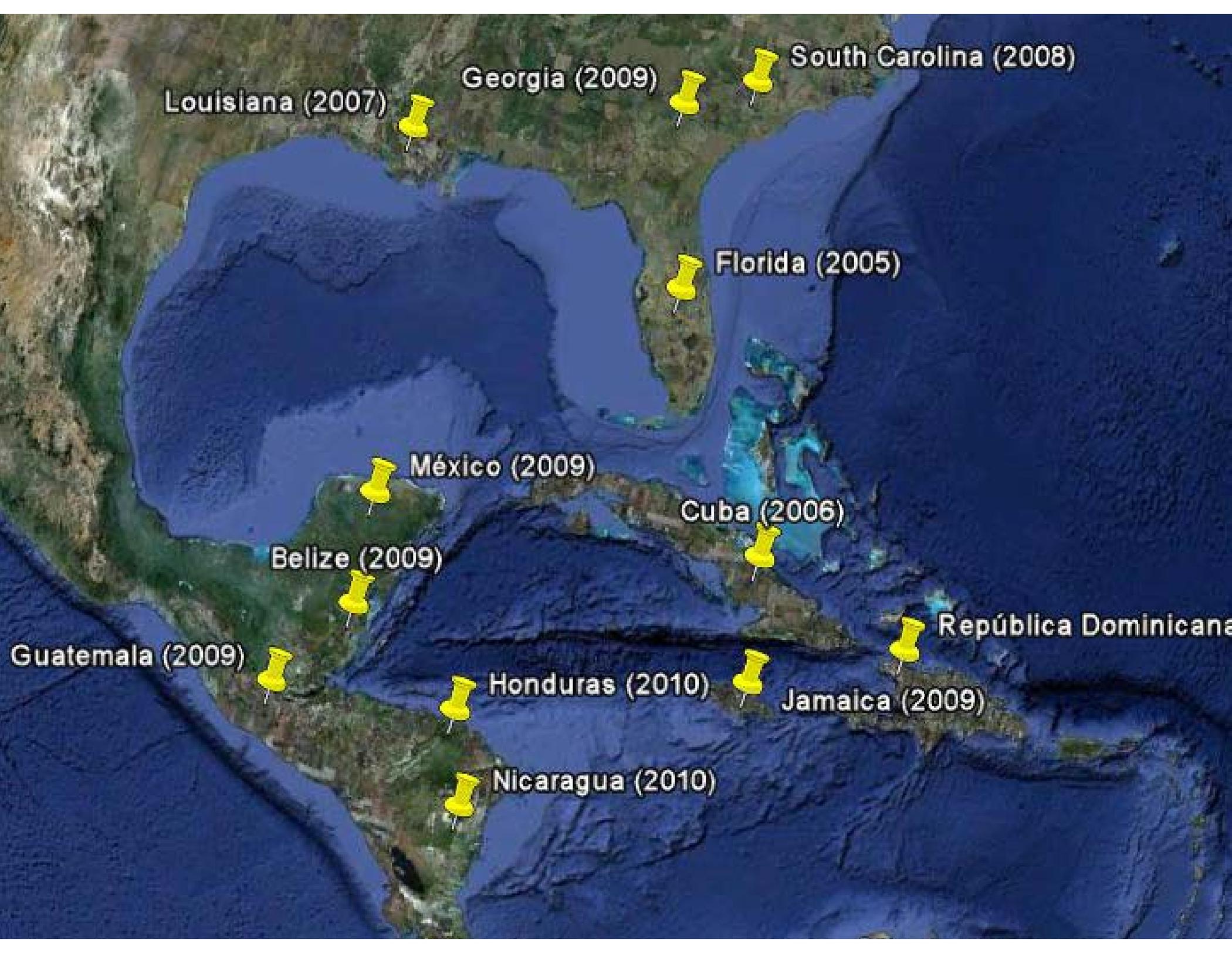
La seguridad de que su manejo debe ser cooperativo

- 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 (2009)

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

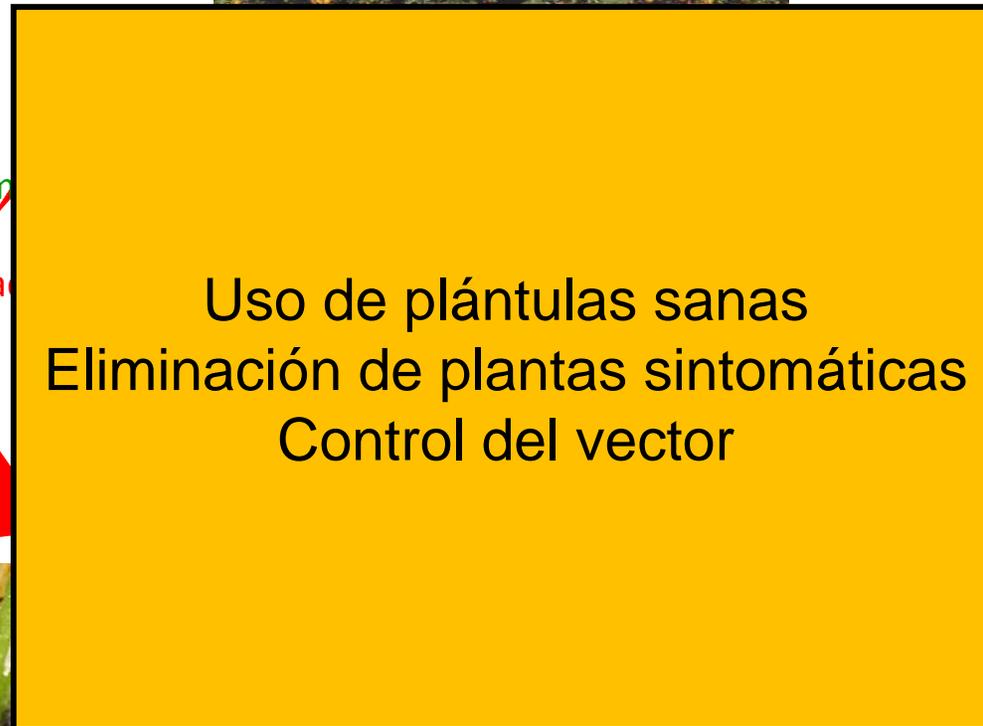


## Plantas resistentes

- Selección masal
- Mejoramiento
- **Transgenia**

## Alteración del ambiente

- **Nutrición**
- **Plantíos adensados**
- **Irrigación**
- **Patrón**



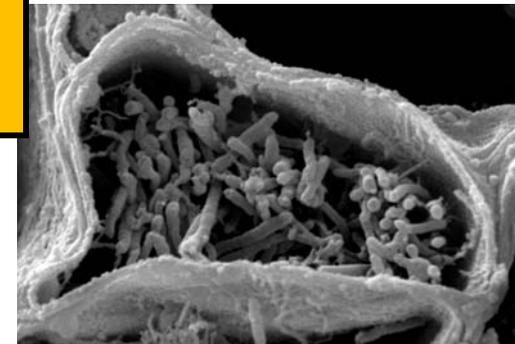
## Control de la bacteria

- **Antibióticos**
- **Reducción del inóculo**



## Control del vector

- **Biológico**
- **Químico**





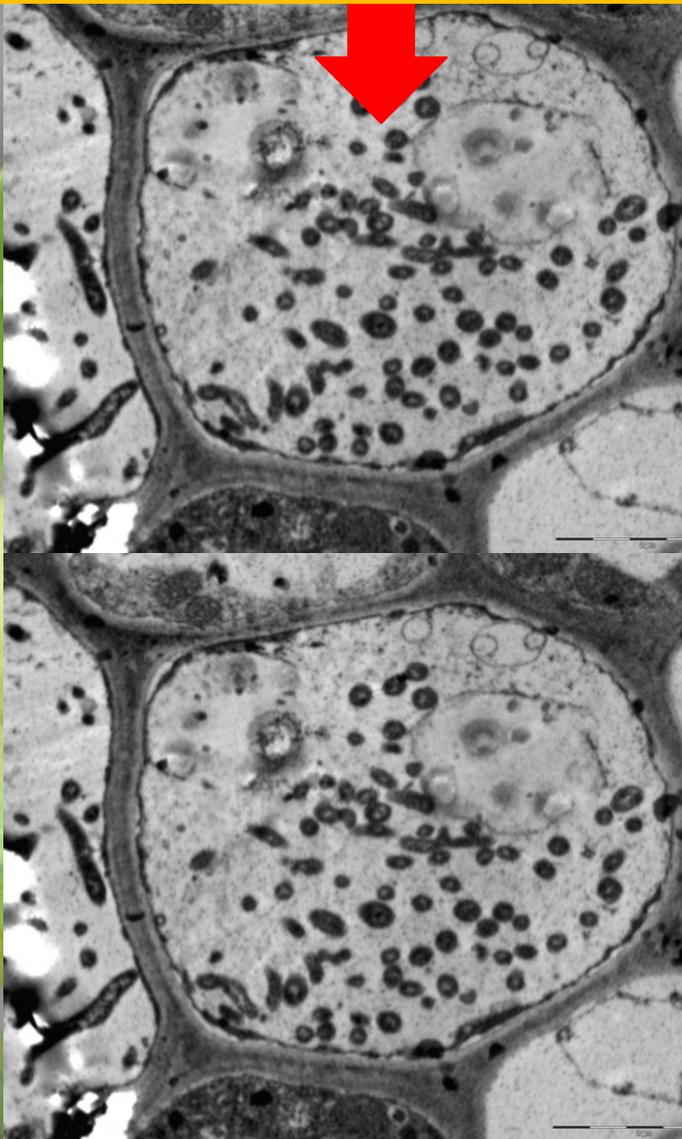
**?Y la investigación?**

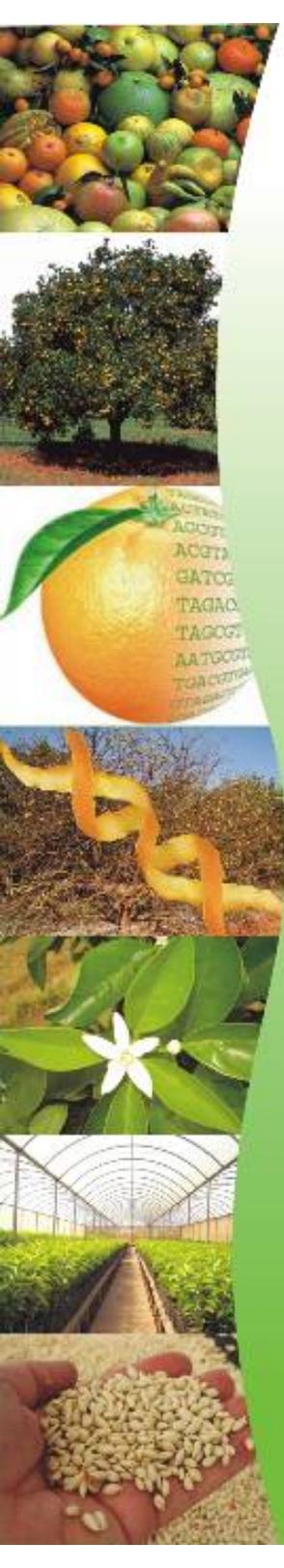


**!Conocer para manejar!**

# 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%)

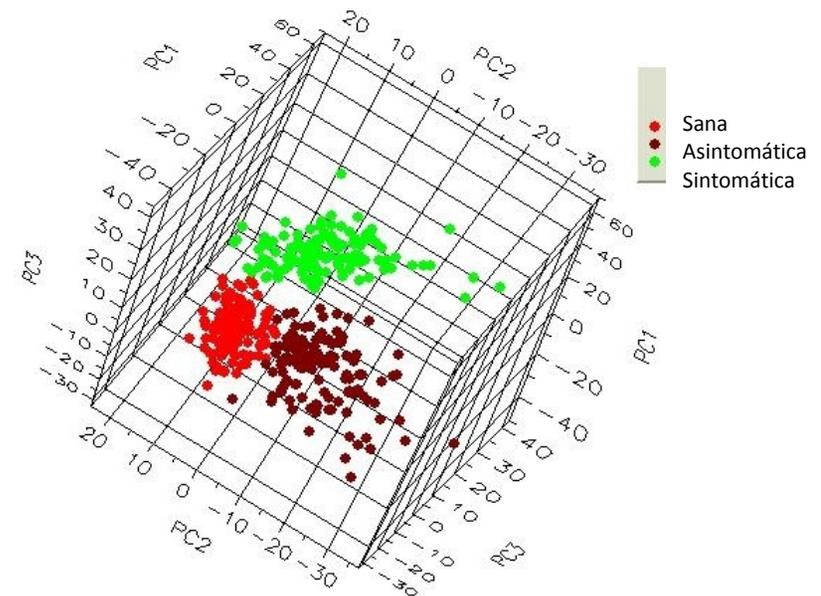
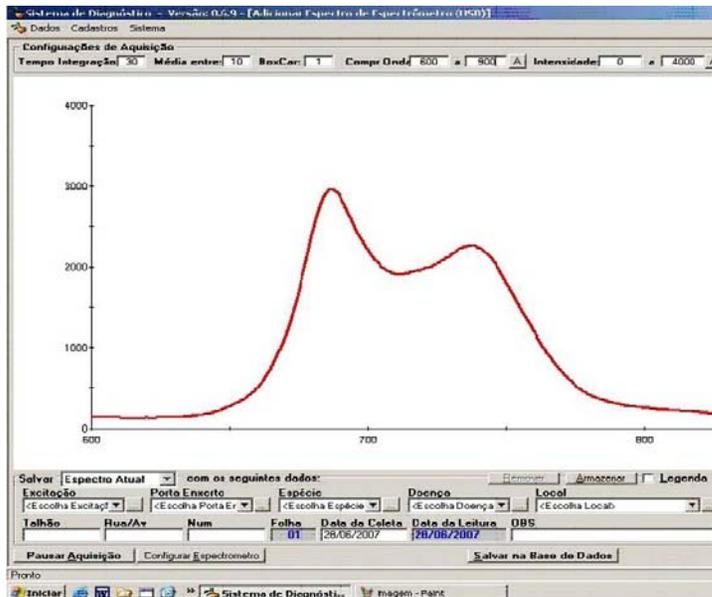
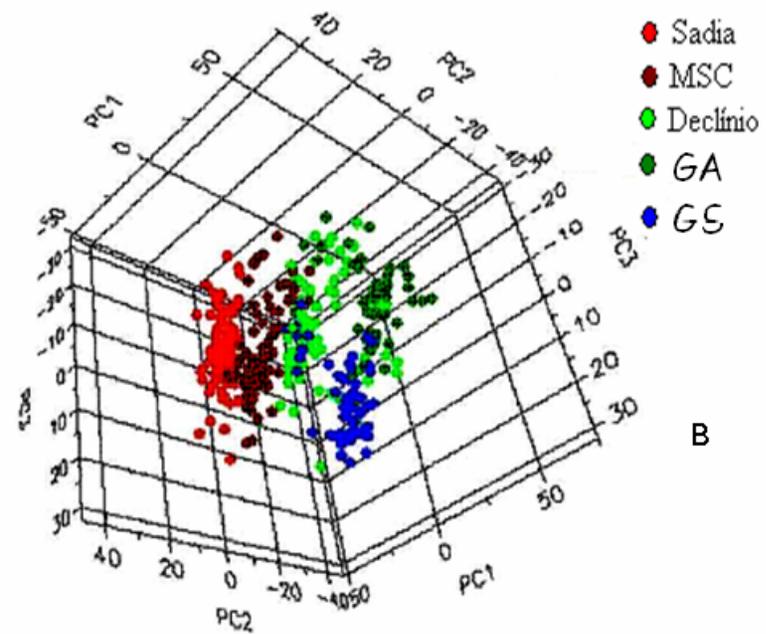
# Diagnóstico precoz del HLB

- 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 biofotônica



Milori et al. (Embrapa-CNPDI)

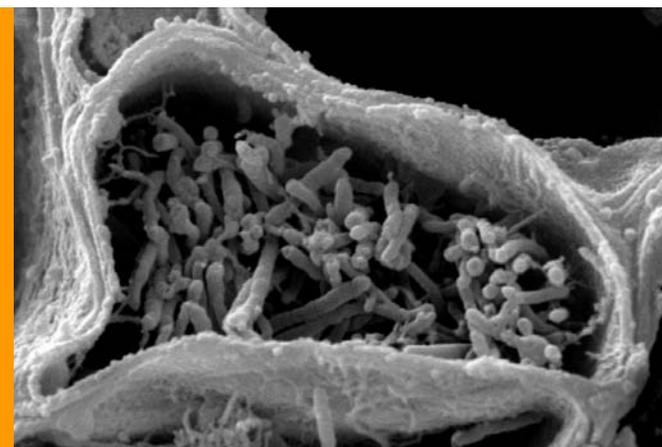
# Control de la bacteria - transgenia

- 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)**



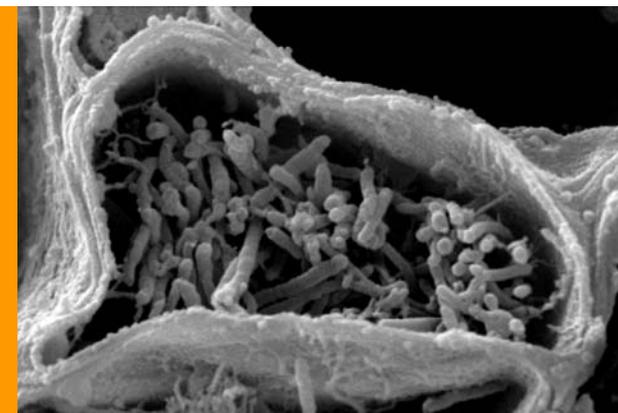
Para HLB (Atacina A):

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

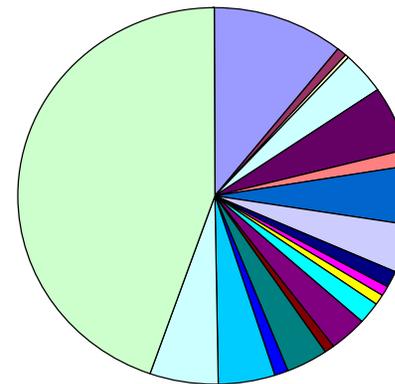
## Transcriptoma de plantas de naranja dulce con síntomas de HLB - microarreglos

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

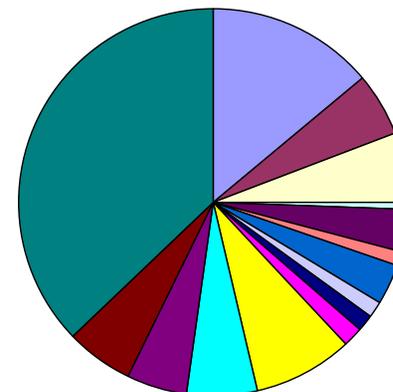


Induced Genes in *C. sinensis* CLam (+)



- 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



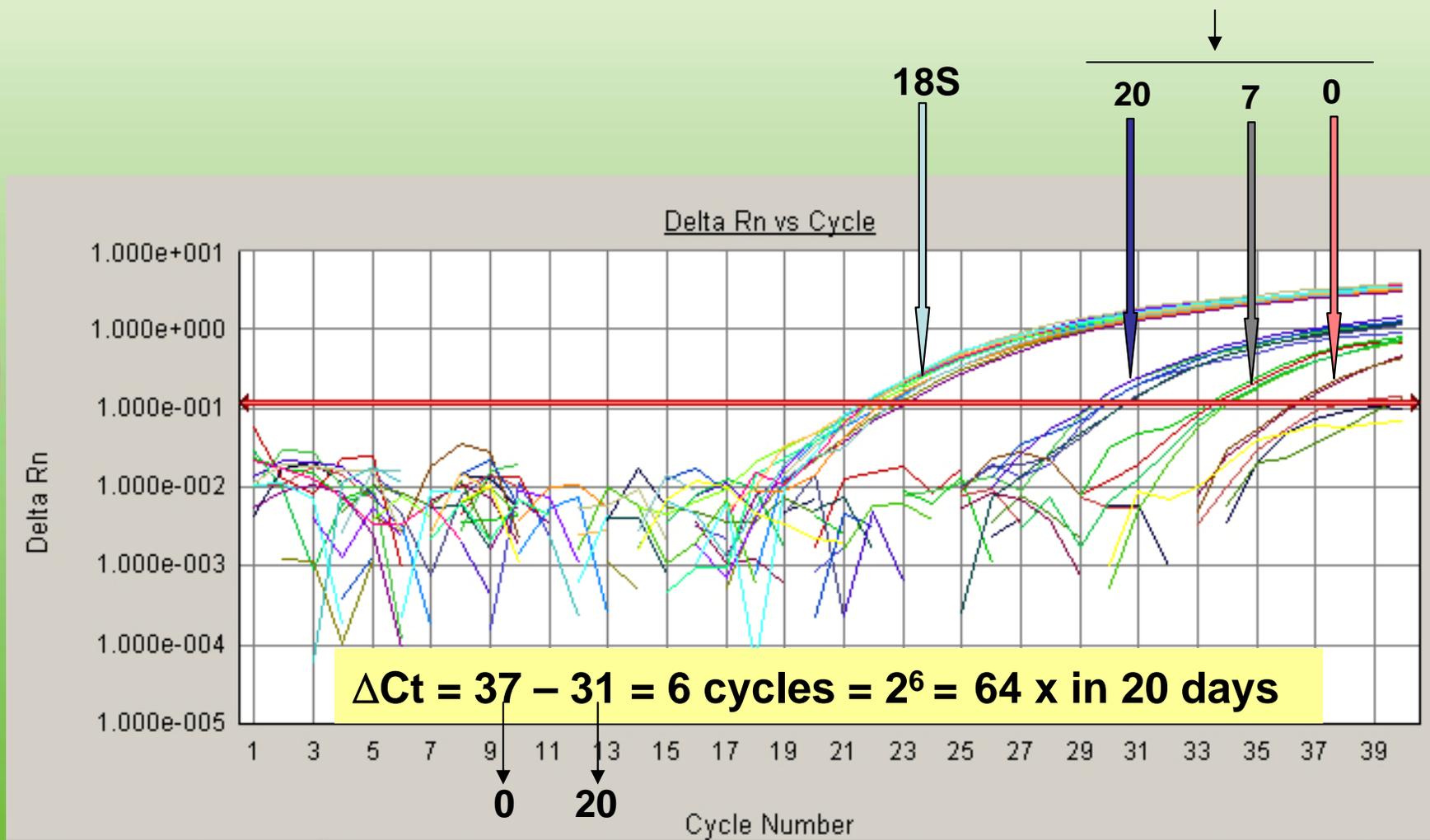


- 20-30% de los psílidos adultos y 100% de las **ninfas** adquieren la bacteria
- Adquisición eficiente en hojas jóvenes, aunque asintomáticas

# *Candidatus Liberibacter* spp.

Adquisición y multiplicación de la bacteria en el vector

Días de alimentación



# Control del Vector

- **Toxinas**

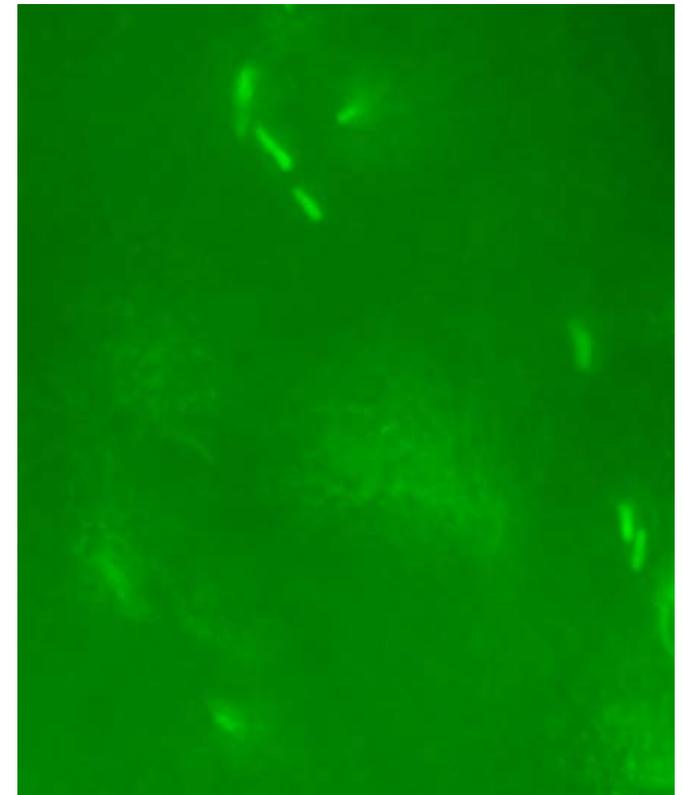
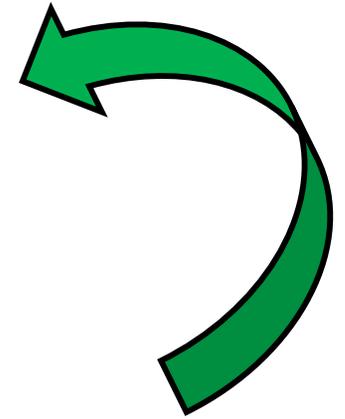
- Ex.: Uso de Bt para el control del psílido
- Etapa 1: Selección de estirpes patogénicas (invernadero)
- Etapa 2: Clonagem del gene codificador de la toxina
- Etapa 3: Transformación de cítricos
- Etapa 4: Evaluación



**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:

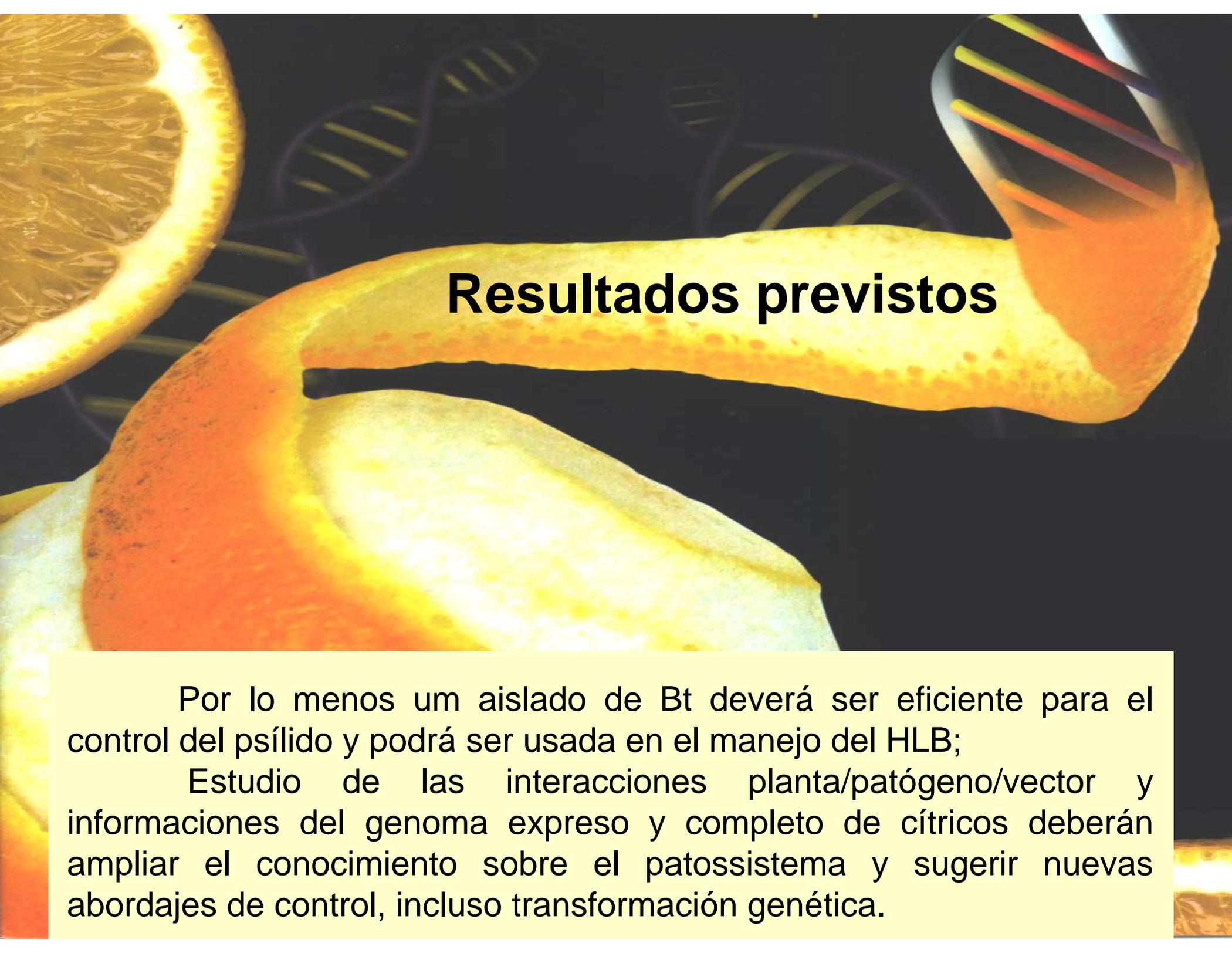
Natal y Hamlin

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](mailto:eliane@centrodecitricultura.br)