

ESTRATÉGIAS BIOTECNOLÓGICAS NO CONTROLE DO HUANGLONGBING (HLB)

Michael Willian Rocha de Souza

Piracicaba
2019



INTRODUÇÃO

- A citricultura é amplamente praticada no mundo,
- Grande relevância dentro do agronegócio brasileiro pela movimentação anual de mais de US\$ 6,5 bilhões (Neves & Trombin, 2017),



Sendo o Brasil considerado o maior produtor mundial de laranja (FAO, 2019).



- A cultura dos citros tem sido alvo constante de inúmeras pragas e doenças que têm prejudicado a produtividade e a qualidade das frutas (Dadras Javan et al., 2019; Munir et al., 2019).



INTRODUÇÃO

- A doença Huanglongbing (HLB) é considerada a principal ameaça (da Graça et al., 2016; Pérez-Rodríguez et al., 2019),
- Devido aos sérios danos causados e ao alto custo financeiro e ambiental,
- No Brasil, desde o primeiro relato da doença em 2004, já foram erradicadas 46 milhões de plantas, o que corresponde a 100 mil ha (FUNDECITRUS, 2017).



INTRODUÇÃO

- O HLB é causado por bactérias Gram-negativas, restritas ao floema, pertencentes ao gênero *Candidatus Liberibacter*,

Candidatus Liberibacter asiaticus (CLas),

Candidatus Liberibacter africanus (CLaf),

Candidatus Liberibacter americanus (CLam).



<https://www.phytoma.com/>



INTRODUÇÃO

- Em folhas com sintomas do HLB são encontrados excesso de amido, quando comparado a folhas de plantas não sintomáticas:



patogeno que afeta o metabolismo de carboidratos primarios promovendo o acúmulo de amido (Ezquer et al., 2010).

INTRODUÇÃO

- Alguns pesquisadores têm buscado alternativas para o controle da bactéria através do uso de antibióticos (Zhang et al., 2014) e termoterapia (Doud et al., 2015),
- Alguns grupos utilizam ferramentas biotecnológicas para o desenvolvimento de plantas que aumentem a resposta de defesa contra *C. Liberibacter* spp. (Rocha Tavano et al., 2015; Yu et al., 2018; Zhang et al., 2018),
- Assim, essa monografia apresenta as principais estratégias biotecnológicas no manejo do HLB.

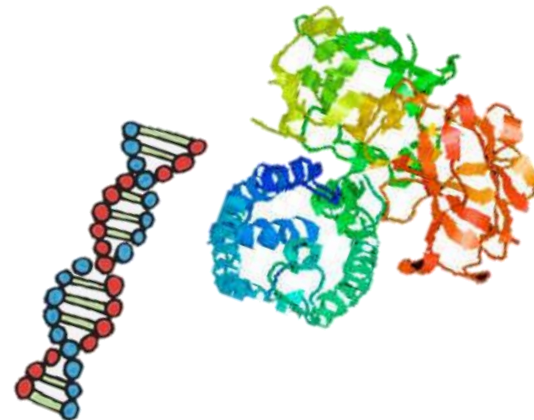


Bacillus thuringiensis (Bt)

- Tendo em vista os problemas no melhoramento genético de citros pelo método convencional, a transformação possibilita a introdução de genes sem alterar as características das cultivares,
- As primeiras gerações de plantas geneticamente modificadas (GMs) resistentes a insetos, foram desenvolvidas com genes codificadores de proteínas inseticidas (Bt) (FISCHHOFF et al., 1987).



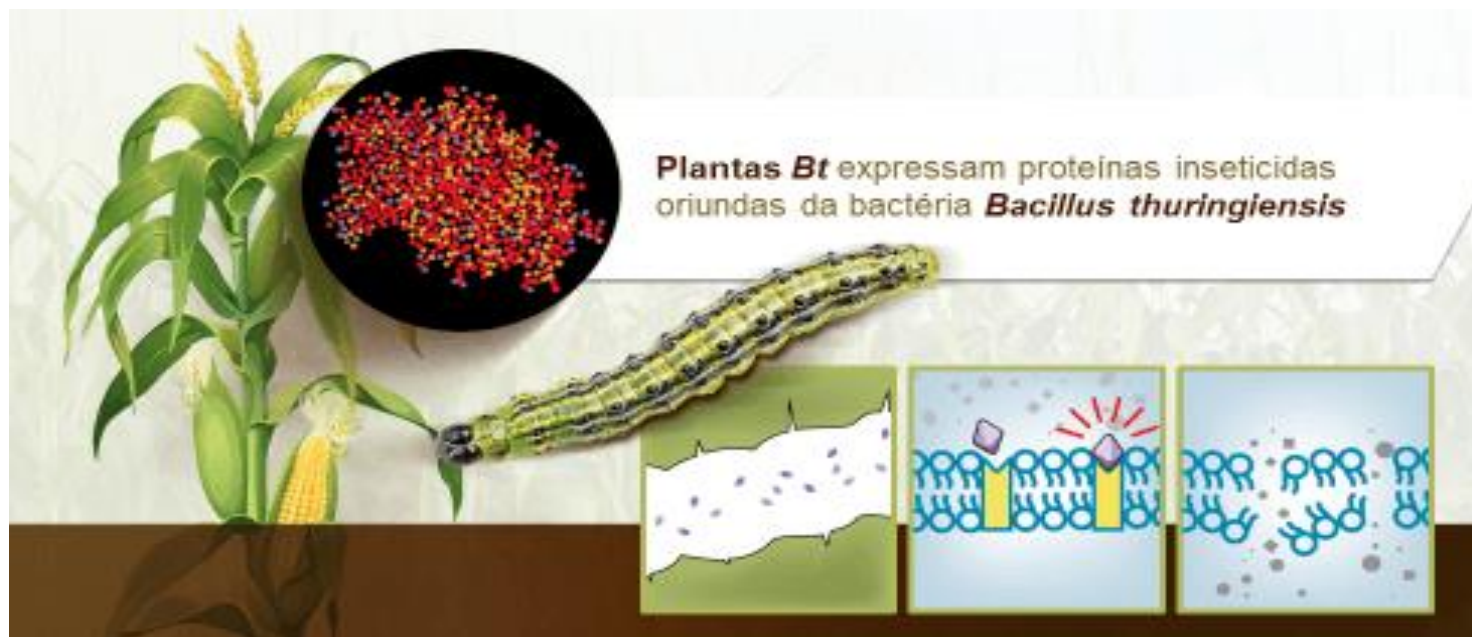
B. thuringiensis



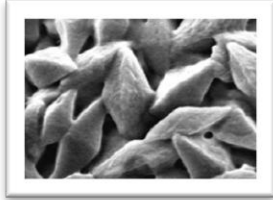
Genet Bt

Bacillus thuringiensis (Bt)

- Toxinas ativas se ligam a receptores no intestino dos insetos e após a ligação, as toxinas se inserem na membrana formando poros e desestabilizando o gradiente osmótico (ARONSON & SHAI, 2001; BRAVO *et al.*, 2007; OESTERGAARD *et al.*, 2007).



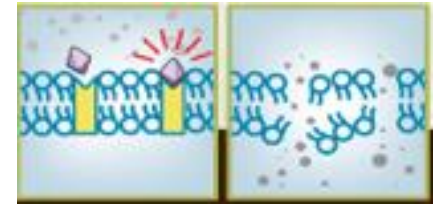
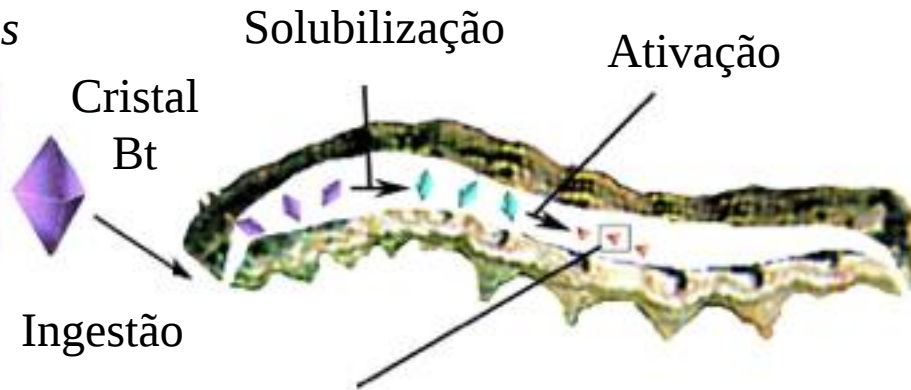
B. thuringiensis



Milho BT

Ligação ao receptor

Células do intestino
de insetos



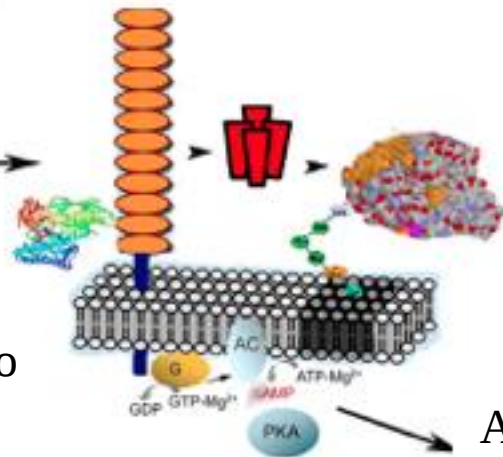
Caderina

Inserção na
membrana

Septicemia e morte

Morte Celular

Ativação da
via de morte
celular



Bacillus thuringiensis (Bt)

- Balbinotte, (2011), inoculou isolados de *Bt*, marcados com GFP (Green Fluorescent Protein) e confirmou a capacidade da bactéria colonizar plantas de citros endofiticamente,
- Quatro isolados apresentaram como promissores para o controle desse inseto sugador. Mortalidade (%) de ninfas de 3º instar de *D. citri*:
 - S1989 (24,4%) no bioensaio II,
 - S601 (34,9%) no bioensaio III e
 - S1302 (36,6%) e S1450 (46,6%) no bioensaio IV.



Bacillus thuringiensis (Bt)

- Dorta, (2014) avaliou plantas transgênicas de laranja ‘Hamlin’ e ‘Valência’ expressando proteínas Cry11, dirigida por um promotor constitutivo (CaMV 35S) e outro específico de floema (AtSUC2),
- Os níveis de expressão do transgene foram maiores para os eventos dirigidos pelo promotor AtSUC2,
- Possuem pequeno efeito deletério sobre o desenvolvimento de ninfas de *D. citri*. A mortalidade média nos dois ensaios foi entre 10 a 34%.



Bacillus thuringiensis (Bt)

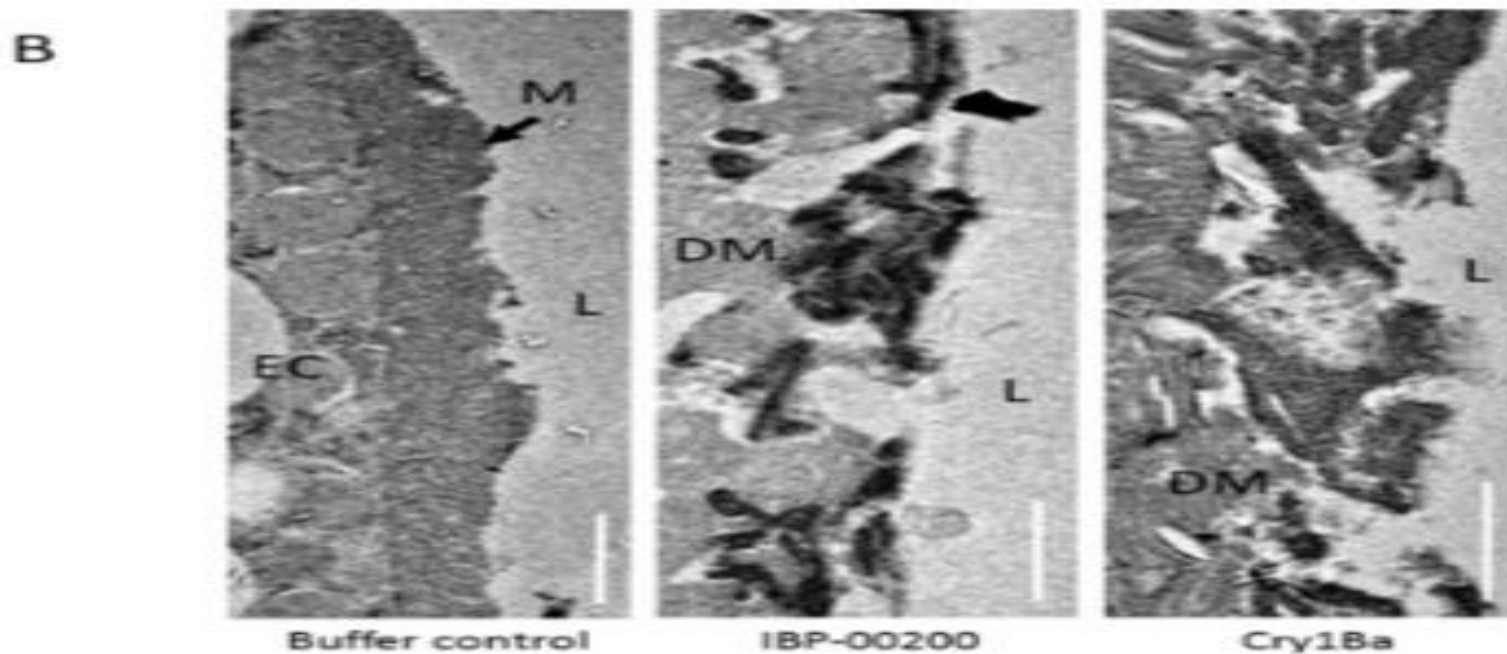
- Fernandez-Luna et al. (2019), analisaram dezoito isolados de *Bt* e a expressão de proteínas Cry tóxicas a adultos de *D. citri*,
- Seis isolados apresentaram taxa de mortalidade variando de 30% a 70%, em sete dias de alimentação, com uma dose de toxina de 500 µg/mL,
- As excreções produzidas pelos psilídeos foram monitoradas como um efeito de intoxicação das toxinas Cry resultante da paralisia intestinal (Schnepf et al., 1998),

Bacillus thuringiensis (Bt)

- Adultos de *D. citri* alimentados com toxinas derivadas das cepas IBL -00068, -00200 e -00829 produziram significativamente menos excreções após sete dias de exposição,
- Diferentes toxinas Cry podem interagir no intestino do inseto, resultando em sinergismo, efeitos aditivos e/ou antagonistas na mortalidade (Fernandez-Luna et al., 2010),
- Embora os bioensaios tenham sido realizados com insetos adultos, espera-se que as ninfas sejam consideravelmente mais suscetíveis.

Bacillus thuringiensis (Bt)

- Apesar dos resultados apresentados nessa monografia não serem muito promissores, ou melhor,

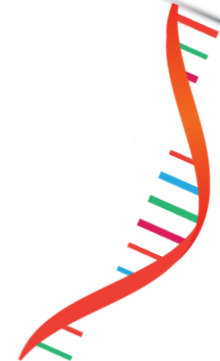


RNAi (RNA interferente)

- Em função do uso intensivo de agrotóxicos pesquisadores têm buscado alternativas mais sustentáveis para o controle de insetos vetores do HLB,



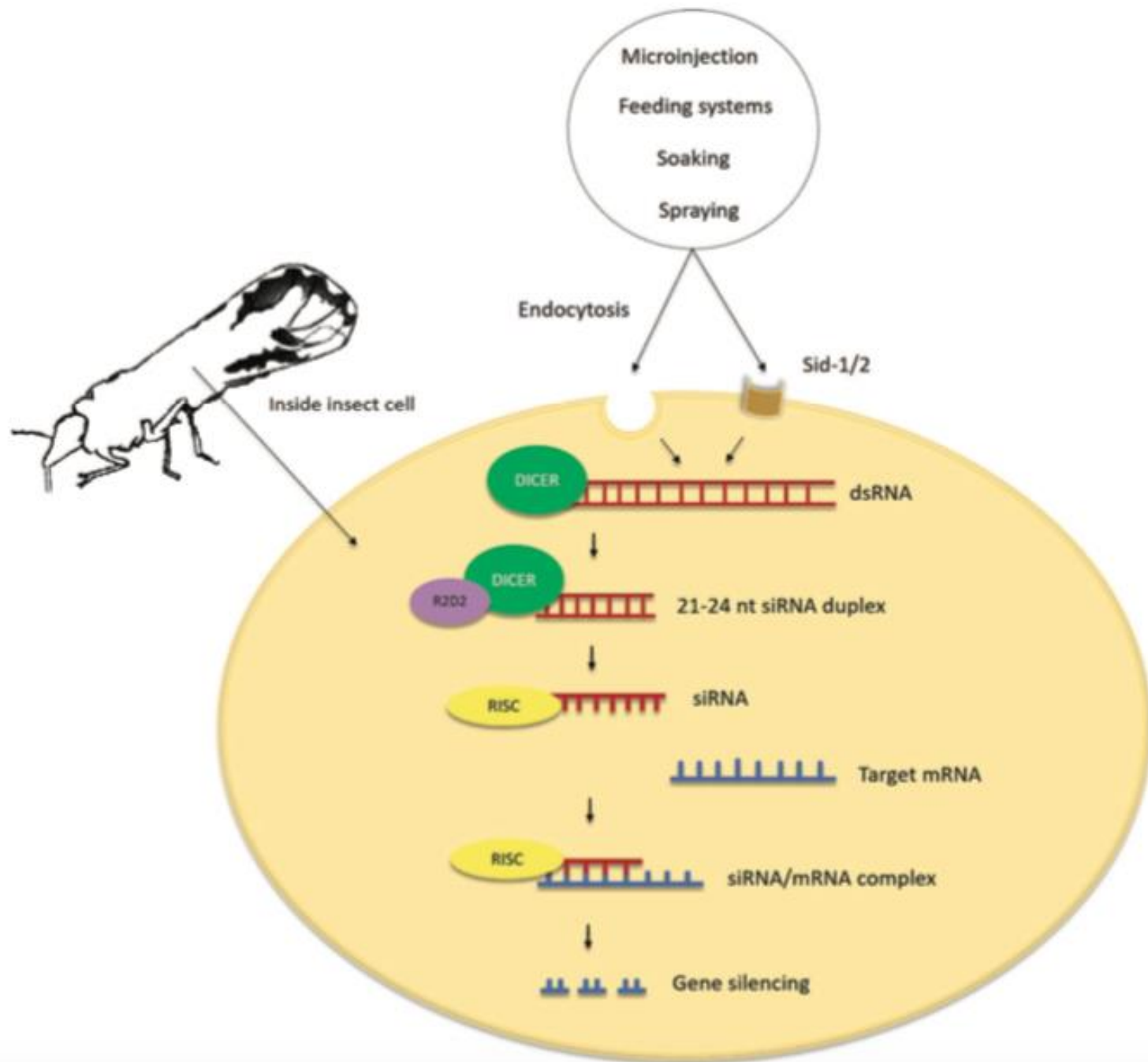
Silenciamento Gênico



- Proporcionar perda total ou parcial de função em atividades importantes para o inseto (Hajeri et al., 2014; Killiny & Kishk, 2017) ou pelo silenciamento de genes que levem diretamente à mortalidade (Yu & Killiny, 2018b).

RNAi

- Permite o silenciamento de partes bem distintas do gene, sendo possível silenciar um gene de uma determinada espécie,
- O silenciamento gênico por RNAi pode ser modulado em função da quantidade de dsRNA administrada,
- A eficácia depende do sistema de liberação de dsRNA (Zhang et al., 2010; Wang et al., 2011):
 - administrado por via tópica,
 - adição na água associada à nanopartículas para alimentação,
 - aplicação (spray) ou,
 - expressão pelas plantas de interesse agronômico.



RNAi

- O uso efetivo de RNAi como biopesticidas moleculares para o biocontrole de insetos como *D. citri* e *T. erytreae* requer a entrega *in vivo* de dsRNAs.
- Ghosh et al. (2018), demonstraram métodos para entrega de dsRNA para insetos:
 - através da imersão de *Phaseolus vulgaris* L., em solução com 300 µL de dsRNA,
 - por ingestão com administração oral (20 ng/µL),
 - sprays foliares (200 mL de solução com 0,5 mg/mL de dsRNA),
 - imersões radiculares (100 mL de solução com 1,33 mg/mL de dsRNA) e
 - injeções em grânulos de argila (20 mL de dsRNA).

RNAi

- dsRNA ingerido por via oral foi eficaz para induzir uma diminuição significativa na expressão de genes, como os hormônios juvenis ácido O-metiltransferase (JHAMT) e vitelogenina (Vg),
- A administração e ingestão de dsRNA (20 ng/ μ L) aumentaram a mortalidade de psilídeos em 30 - 45% (Ghosh et al., 2018).
- Hajeri et al. (2014), com *Citrus macrophylla*, *Citrus paradisi* e *Citrus aurantium* revelou que a técnica de RNAi também pode ser eficiente através do silenciamento gênico induzido por vírus (Waterhouse et al., 2001; Lu et al., 2003).

RNAi

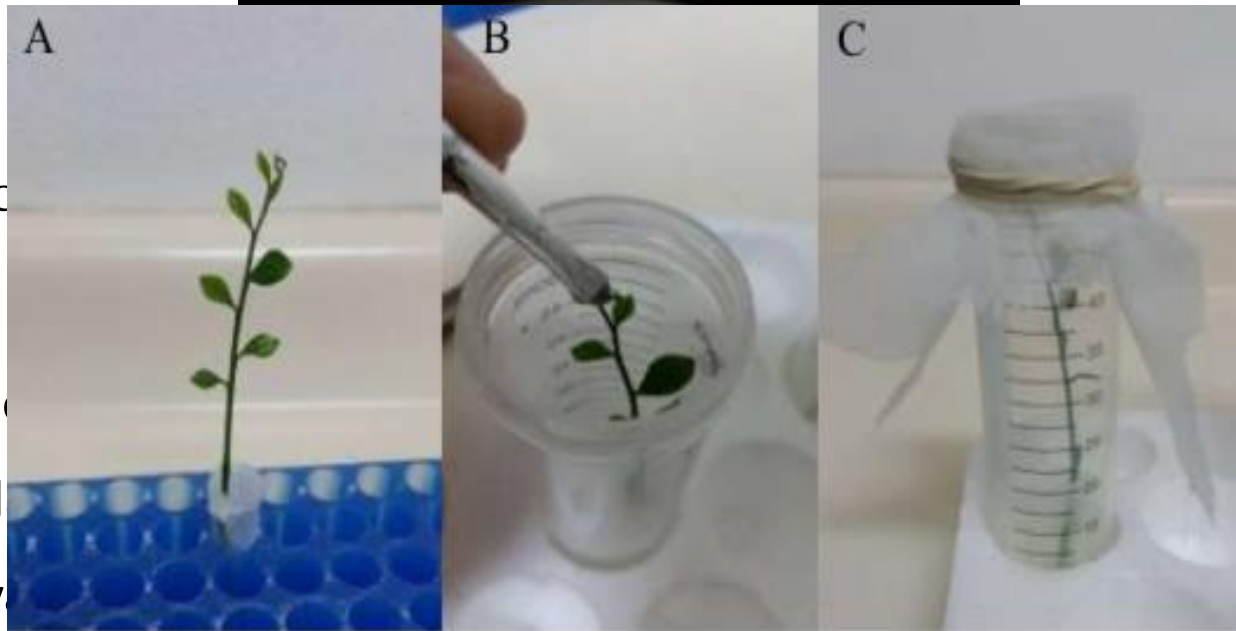
- O vírus da tristeza dos citros modificado com o gene *awd*, responsável pelo fenótipo da asa de *D. citri*, foi eficiente em promover alteração da expressão desse gene em insetos alimentados em plantas inoculadas com o vírus,
- Foi observado aumento na mortalidade e má formação na asa (15% das ninfas alimentadas se desenvolveram em adultos com severas deformações e outros 30% com graus variados de malformação das asas),
- Além disso, os autores constataram que a indução do silenciamento gênico induzido por vírus pode ser transmitida através da enxertia.

RNAi

- A mortalidade de adultos e ninfas de *D. citri* foi avaliada, pela inibição dos genes da síntese de quitina, catepsinas D e inibidores dos genes da apoptose, utilizando dietas artificiais com dsRNAs ou folhas de *Murraya paniculata* em imersão (Galdeano et al., 2017),

- Todos os
com conc

- A inibição
genes d
respectiv



comparação

inibidores dos
mortalidade

RNAi

Organism	Mode of delivery	Target gene	Effect of RNAi on target insect	Reference
<i>Diaphorina citri</i>	Topical application	<i>abnormal wing disc</i>	Survival reduction and malformed-wing	(El-Shesheny et al. 2013)
	Soaking	<i>muscle protein 20</i>	Mortality increase and reduced body weight	(Yu et al. 2017)
	CTV-RNAi vector	<i>abnormal wing disc</i>	Survival reduction and malformed-wing	(Hajeri et al. 2014)
	<i>In planta system</i>	<i>arginine kinase</i>	Mortality increase	(Andrade and Hunter 2017)
	Artificial diet and <i>in plant system</i>	<i>cathepsin-D, chitin synthase and inhibitor of apoptosis</i>	Mortality increase	(Galdeano et al. 2017)
	Topical feeding	<i>abnormal wing disc</i>	Reduction of survival and lifespan, malformed-wing	(Killiny and Kishk 2017)
	Artificial diet	<i>boule</i>	Mortality increase	(Yu and Killiny 2018a)
	Artificial diet	<i>transformer 2</i>	Females lay fewer eggs and reduction of hatching rate of laid eggs. Not produced male-biased progeny	(Yu and Killiny 2018b)
	Topical application	<i>cytochrome P450</i>	Increase of susceptibility to insecticide	(Killiny et al. 2014)
	Artificial diet	<i>glutathione-S-transferase</i>	Increase of susceptibility to insecticide	(Yu and Killiny 2018c)
	Topical feeding	<i>esterase and acetylcholinesterase</i>	Mortality increase	(Kishk et al. 2017)

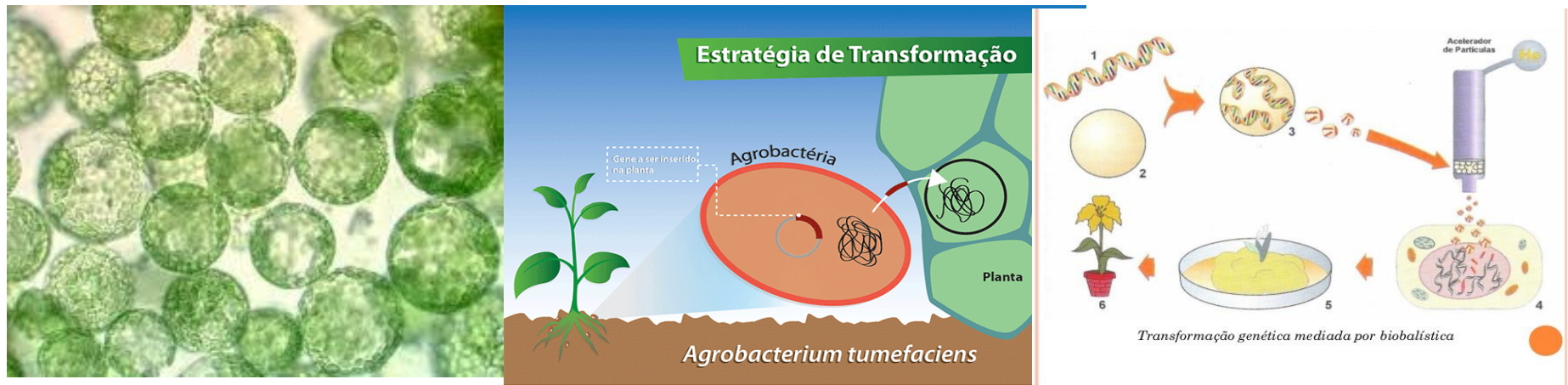
(Galdeano et al., 2018).

RNAi

- Os genomas de psilídeos, pulgões, moscas-brancas e gafanhotos foram sequenciados para ajudar a selecionar genes alvos,
- Até o momento, muitos métodos de entrega de dsRNAs foram aplicados em insetos em condições de laboratório. No entanto, variações na eficiência dos efeitos entre diferentes populações da mesma espécie devem ser investigadas,
- O suprimento contínuo e grandes quantidades de dsRNA são necessários para silenciar os genes alvos,
- Portanto, o futuro dessa tecnologia em escala comercial, no manejo do HLB, depende de como esses desafios serão resolvidos.

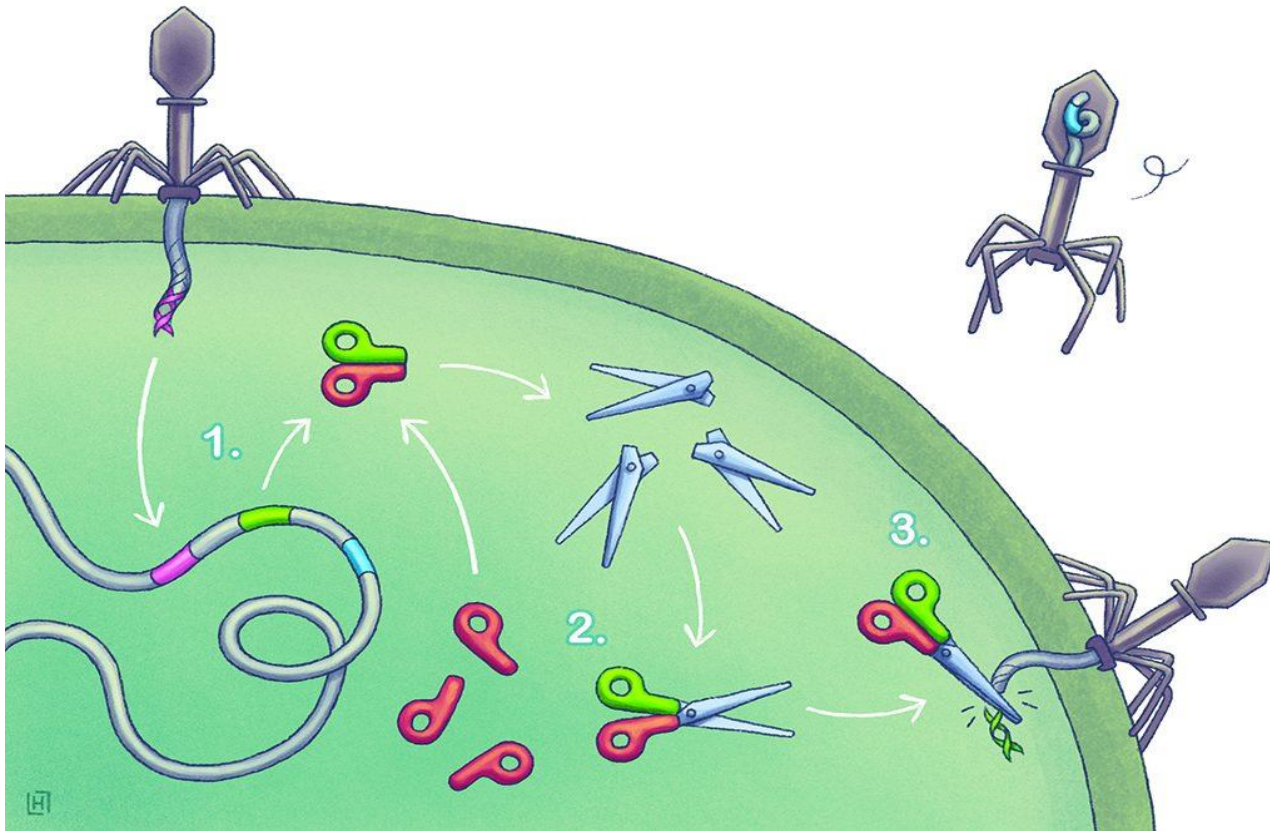
CRISPR

- Os programas de melhoramento genético convencionais via hibridação e seleção recorrente em citros, apresentam diversas dificuldades relacionadas à biologia reprodutiva,
- Vários métodos de transformação genética têm sido descritos para citros,



CRISPR

- O sistema CRISPR/Cas9 atua quando um bacteriófago invade, mas não destrói a célula bacteriana,

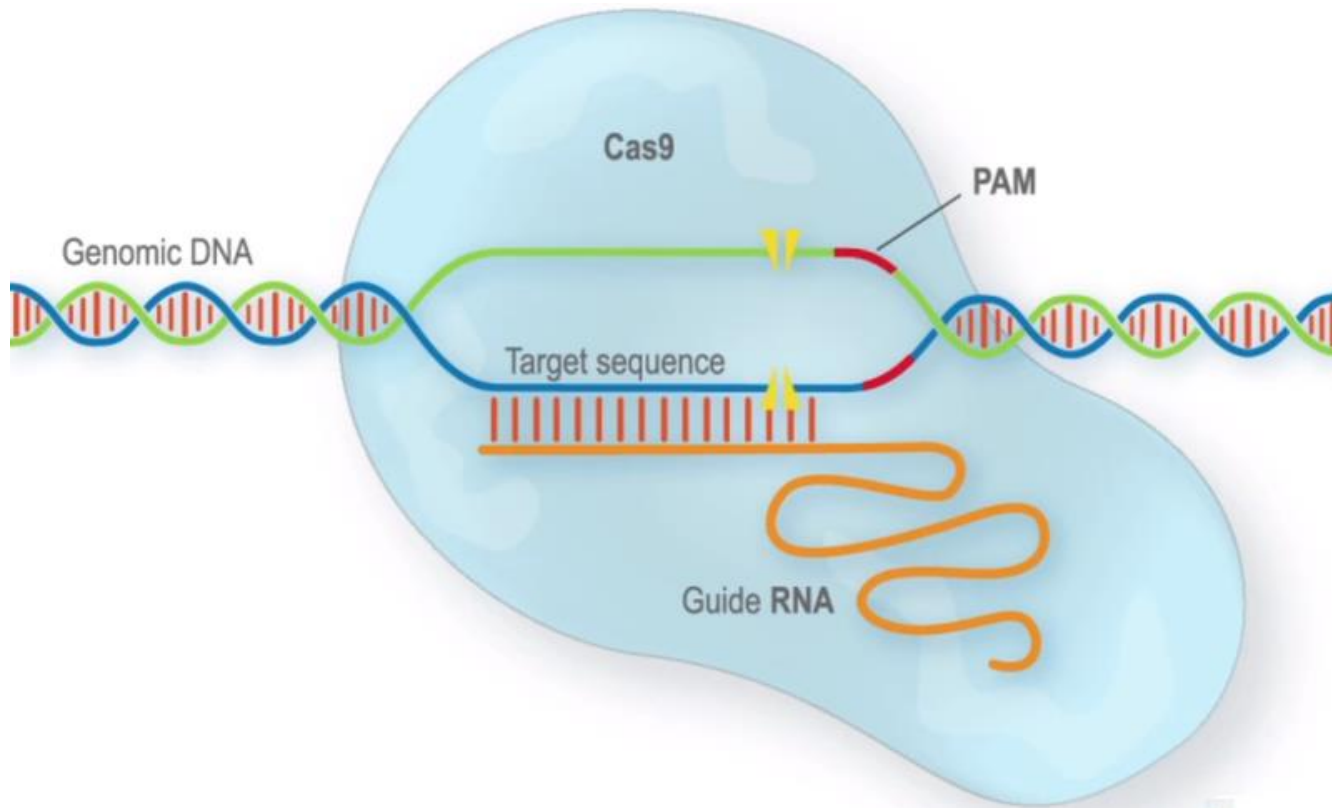


CRISPR

- A ação desse sistema exige a associação entre uma endonuclease Cas9, e uma estrutura guia formada de dois RNAs, sendo um tracrRNA (trans-activating CRISPR RNA), e um CRISPR RNA (crRNA),
- O complexo de tracrRNA e crRNA é responsável por direcionar a Cas9 até o DNA invasor,
- Ao se ligarem a sequência complementar presente no DNA viral e reconhecer o domínio PAM (Protospacer Adjacent Motif), a endonuclease Cas9, cliva a dupla fita e desta forma impossibilita a progressão da infecção.

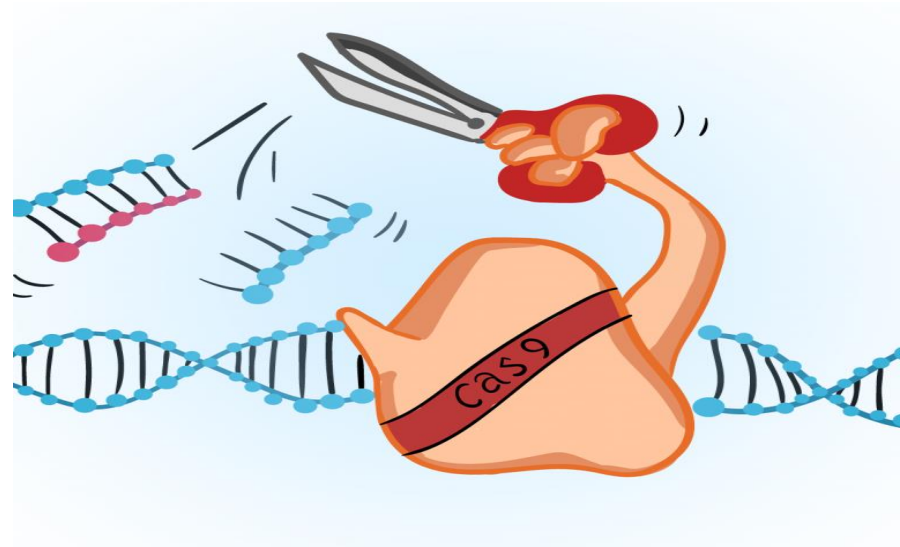
CRISPR

- A tecnologia CRISPR atualmente utiliza uma fusão crRNA-tracrRNA chamada de RNA guia único (sgRNA)



CRISPR

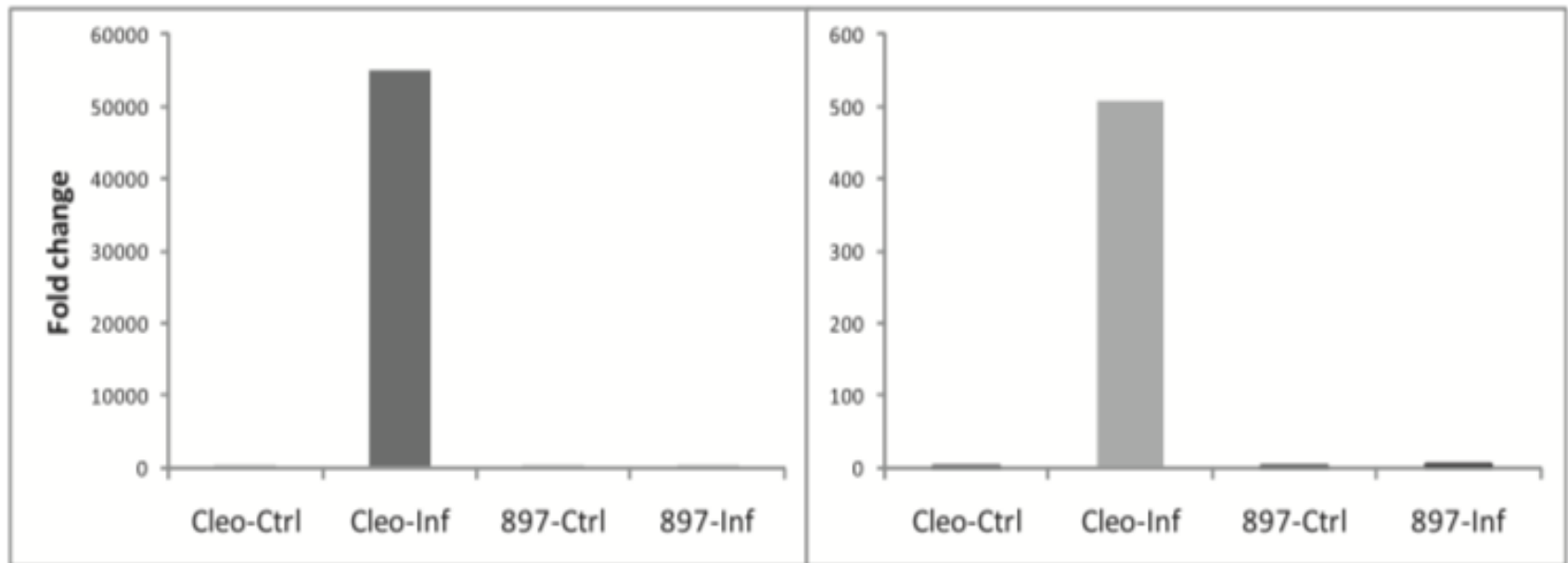
- Mesmo possuindo a forma duplex crRNA-tracrRNA o processo de clivagem pela Cas9 não é totalmente específico (Cong et al., 2013; Ramos, 2016),
- A edição do genoma se dá através do sistema natural de reparo na célula: ligação de extremidade não homóloga (NHEJ) e a recombinação homóloga (HR) (Chapman et al., 2012; Liu et al., 2014),
- Este mecanismo pode ser utilizado contra doenças como o HLB.



CRISPR

- Técnicas moleculares tem sido desenvolvidos para a comparação dos níveis de transcritos e de proteínas entre plantas infectadas ou não pelo HLB,

Phloem protein 2-B15 (Cit.35955.1.S1_at)



CRISPR

- Trabalhos envolvendo o uso do sistema CRISPR/Cas9 em plantas começaram em 2013,
- Aplicações incluem desde provas de conceito, utilizando genes alvos como GFP (Jacobs et al., 2015), GUS (Michno et al., 2015) até o silenciamento de genes de interesse como de susceptibilidade a doenças (Peng et al., 2017),
- Para estudos visando provas de conceito e eficiência de vetores CRISPR, comumente é adotada a estratégia do uso de transformação transiente.



CRISPR



- Para citros, existem trabalhos de edição de genoma de apenas dois grupos de pesquisa usando o sistema CRISPR (Jia et al., 2016; Jia & Wang, 2014; Peng et al., 2017),
- Transformação transiente em folhas de laranja doce utilizando-se como alvo o gene CsPDS (fitoenio desaturase), onde foi possível observar uma taxa de mutação de 3,2 a 3,9%, sem mutação *off-target* (Jia & Wang, 2014),
- O sistema Cas9/sgRNA parece ser uma ferramenta valiosa para a criação de novas cultivares de citros com características benéficas para produtores e consumidores.

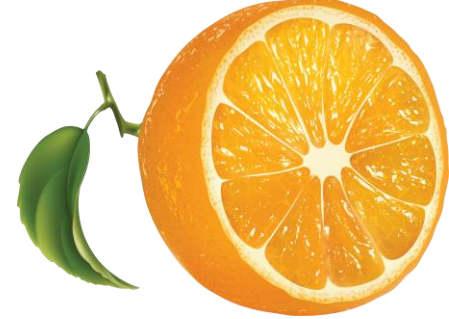
CRISPR



- Edição do gene CsLOB1 (Lateral Organ Boundaries 1) relacionado a susceptibilidade ao cancro cítrico, onde foi possível encontrar frequências de mutações próximas a 90%,
- Todas as plantas mutantes eram morfologicamente normais em comparação com o controle, indicando que a modificação do promotor CsLOB1 não interrompe o desenvolvimento da planta (Jia et al., 2016; Peng et al., 2017),

CRISPR

- Vantagem sobre todas as outras tecnologias pois a planta modificada pode não conter DNA exógeno,
- Porém, devido aos vagos mecanismos de infecção e desenvolvimento do HLB, o CRISPR não pode atingir o objetivo de conferir resistência a esta doença no momento,
- No entanto, é uma ferramenta poderosa com grande potencial após identificação de efetores do patógeno e um possível gene relacionado a suscetibilidade (Song et al., 2017).



CONSIDERAÇÕES FINAIS



- Esforços pela busca de medidas que possam conter o HLB têm se intensificado nos últimos,
- Não existe uma estratégia única que seja simples, rápida, barata e eficiente,
- Por outro lado, a ação conjunta das medidas de manejo atualmente utilizadas e as potenciais estratégias de controle citadas nesta revisão podem manter a doença em níveis baixos,
- Esperamos que no futuro possamos aplicar medidas de controle mais eficazes e com menor custo para o citricultor e o meio ambiente.

#UNIDOS
contra o
GREENING

OBRIGADO!

E-mail: michael.willian@usp.br

