Curso para Habilitação de Responsáveis Técnicos para Emissão de CFO/CFOC

2023

ADAPAR
Agência de Defesa Agropecuária do Paraná

AGRONOMIA
Universidade Estadual de Maringá

William Mário de Carvalho Nunes

Engenheiro Agrônomo - UEM - 1984
Mestre *em Fitopatologia - ESALQ/USP - 1994*
Doutor *em Proteção de Plantas* - UNESP - 1999
Professor *de Fitopatologia do curso de graduação em Agronomia*
Professor *do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PGA)*
Professor *do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento (PGM)*
Chefe *do Departamento de Agronomia (DAG)*

UEM 45 anos Agronomia Maringá

Departamento de Agronomia
Universidade Estadual de Maringá

PGM Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento
Portugês English Español
Conceito 5 Avaliação CAPES

Programa de Pós-graduação em Agronomia
PGA/UEM
Conceito 6 Programa de Excelência CAPES

Parte 3

DATA: 25/05/23 (quinta-feira).

10:15 – 11:00 h - Praga Quarentenária Presente – **Greening/HLB** *(Candidatus Liberibacter spp.)*

HUANGLONGBING (HLB) OU GREENING

INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 38, DE 1º DE OUTUBRO DE 2018

Órgão: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/Secretaria de Defesa Agropecuária

Pragas Quarentenárias Presentes (PQP)

PROCARIONTES		
Candidatus liberibacter americanus e Candidatus liberibacter asiaticus	Citros (Citrusspp.) Fortunella spp. Murta (Murraya paniculata) Poncirus spp.	Minas Gerais, Paraná e São Paulo

Fatores limitantes à produtividade

Doenças

Fúngicas e Bacterianas

I – Afetam os orgãos de reserva – 9

II – Danos em tecidos jovens – 3

III – Podridão de colos e raízes – 2

IV – Doenças vasculares – 4

V – Afetam a fotossíntese – 5

VI – Afetam o uso dos fotossintatos – 3

26

Vírus e Viróides

Vírus - 6

Viróides - 2

8

Fatores limitantes à produtividade

<u>Doenças</u>

Bacterianas

I – Afetam os orgãos de reserva

II – Danos em tecidos jovens

III – Podridão de colos e raízes

IV – Doenças vasculares – 1: **CVC***

V – Afetam a fotossíntese – 1: **Cancro cítrico**

VI – Afetam o uso dos fotossintatos – 3: **HLB***, **Stubborn***, **Galha lenhosa***

5

***agentes causais alojam-se nos vasos condutores das plantas**

Doença bacteriana relacionadas aos vasos condutores*

Grande desafio:

“Nós ainda só podemos prevenir”

Ainda não se desenvolveram produtos comerciais *EFICIENTES* e de caráter curativo

O Tetraedro de doenças transmitidas por insetos

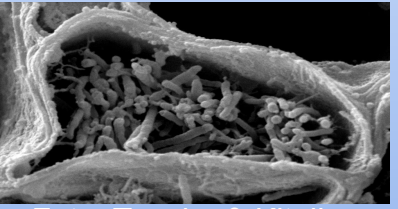


Foto: Tanaka & Kitajima

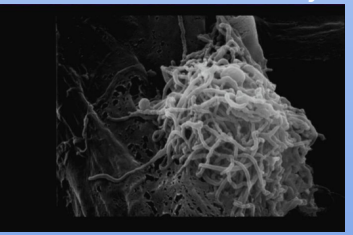


Foto: M. Davis

Bactéria

vetor

Hospedeiro

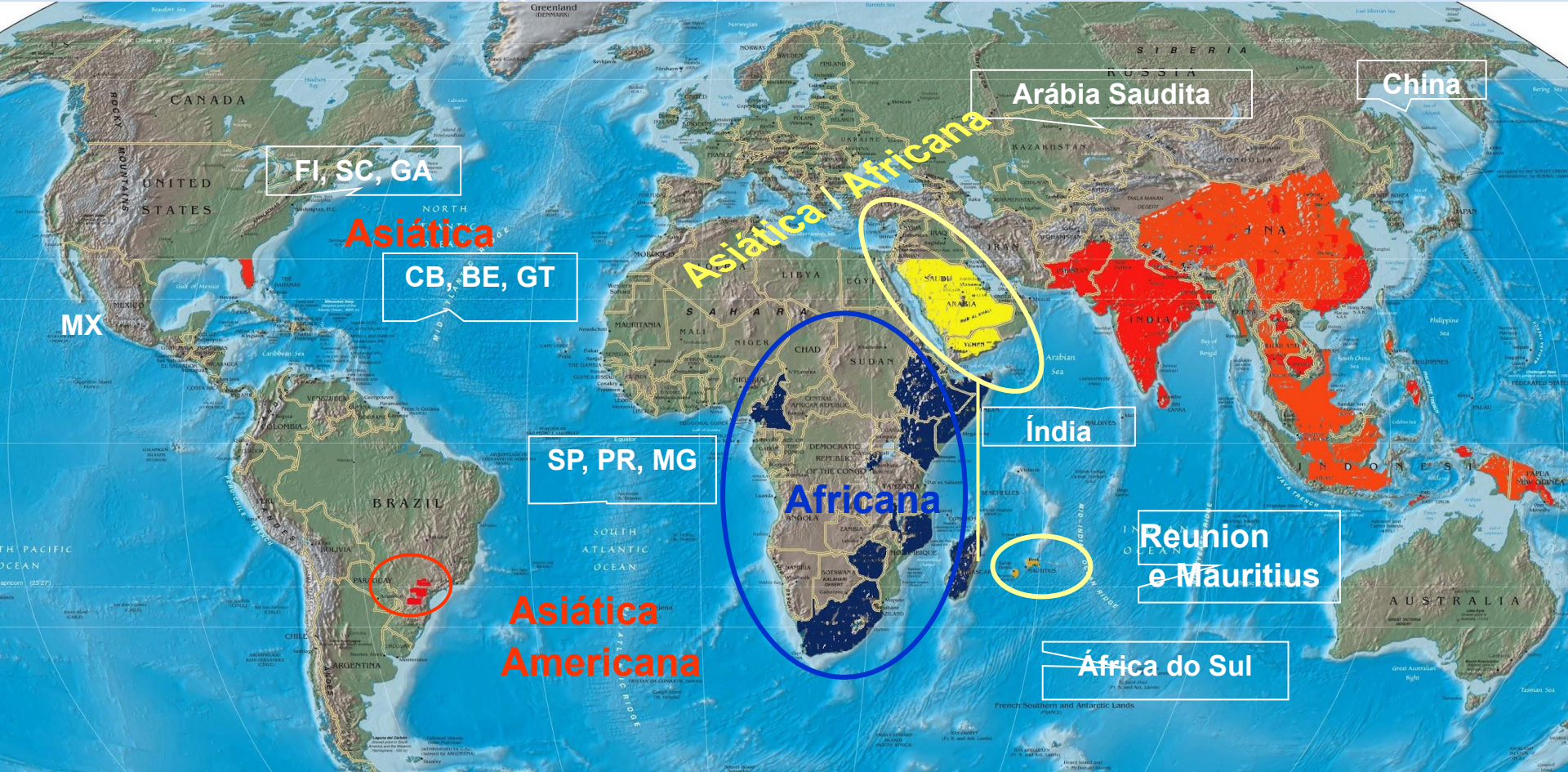
Greening / huanglongbing (HLB)

- China: “yellow shoot disease”, 1890
- Filipinas: “leaf mottle”, 1921
- India: “dieback”, 1929
- África do Sul: “**greening**”, 1937
- Taiwan: “likubin (decline)”, 1940
- Indonésia: “vein phloem degeneration”, 1940
- IOCV – 1995 : “huang long bing” – HLB “**黄龙病**”

↓

“yellow disease”

Ocorrência do HLB no mundo



HLB: Agente causal

Bactéria

- Gran negativa (ME - Garnier et al., 1984)
- Vasos de floema
- Não cultivada em meio de cultura

Microscopia transmissão floema – laranja doce (Kitajima & Tanaka)

***Candidatus* Liberibacter spp..**

***Ca*. Liberibacter asiaticus**

***Ca*. Liberibacter africanus**

***Ca*. Liberibacter americanus**

16Sr grupo IX (BR)

Fitoplasma

..... (China)

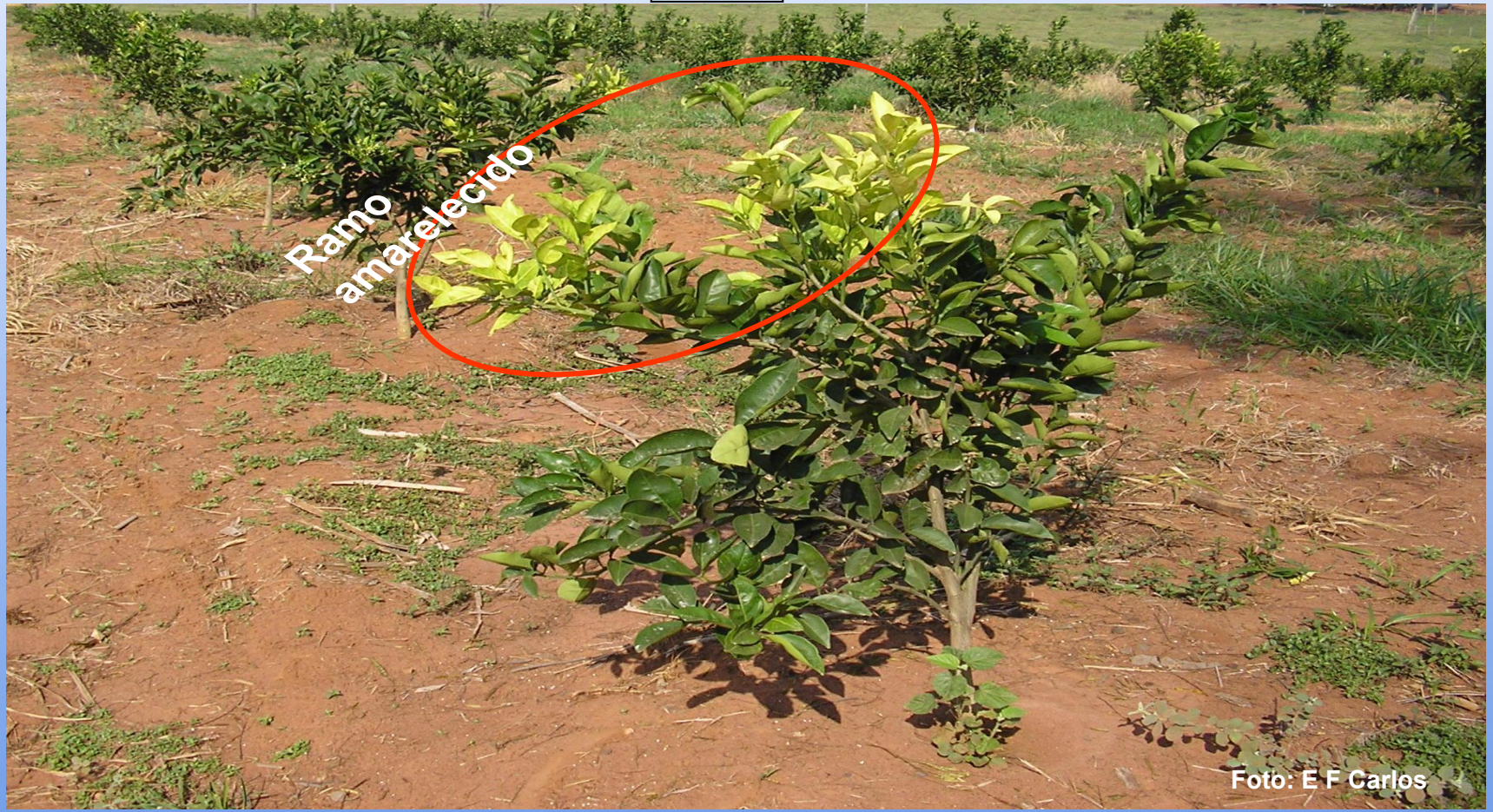
SINTOMAS

Laranjas doce

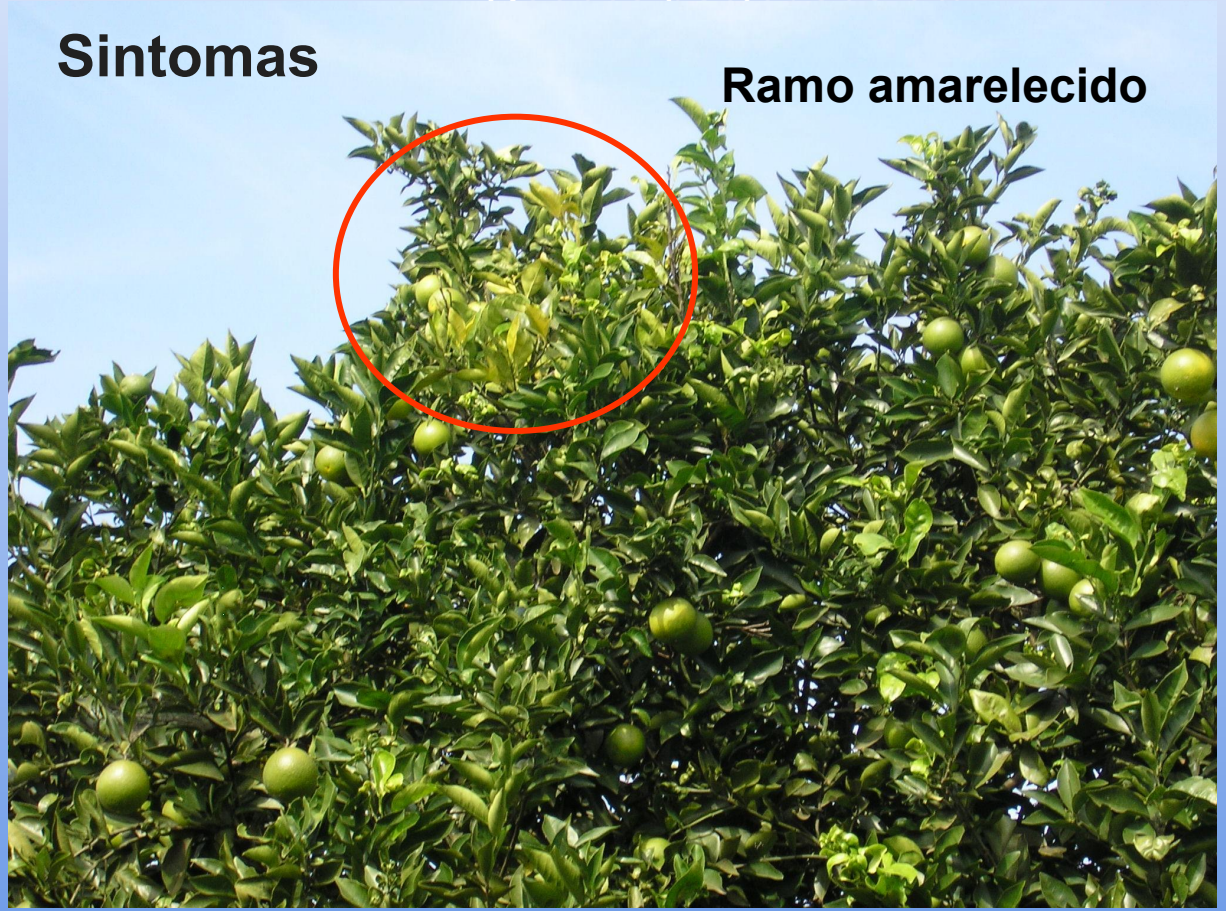
Foto: E F Carlos

Sintomas

HLB



HLB



HLB

Sintomas

HLB

Sintomas

HLB

Sintomas

Outros

Associados a folhas novas e temperaturas amenas

HLB

Sintomas

Sintomas que podem causar duvidas

Gomose

Foto: FUNDECITRUS

HLB

Sintomas

Sintomas não associados e que podem causar dúvidas

. Danos no tecido do floema

Rubelose

Sintomas

Sintomas não associados e que podem causar duvidas

Deficiência mineral: Zn

Sintomas

Sintomas não associados e que podem causar duvidas

Deficiência mineral: Zn

Foto: E F Carlos

HLB

Sintomas

Passos para identificação

~~Gomose~~

~~Def. mineral~~

~~Atrofia de vasos do floema:~~

. Rubelose

. Insetos

. Danos mecânicos

HLB

Sintomas

Passos para identificação

laranja doce

Sintomas em outras espécies

Tangerinas e Hibridos

Sintomas em outras espécies

Limas acidas

Sintomas não específicos

Problema Quebra-galho

viroides

DIAGOSTICO DO AGENTE CAUSAL

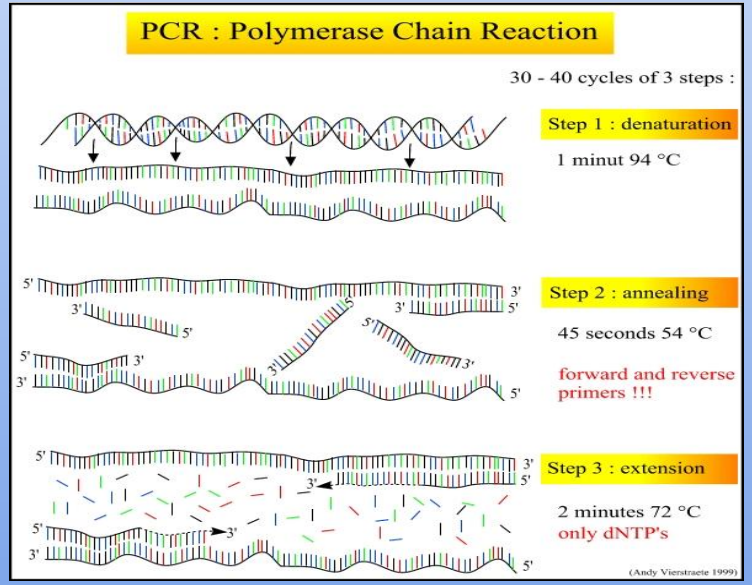
HLB

Diagnóstico

1. *Ca*. Liberibacter – não cultivada em meio de cultura !
2. *Ca*. Liberibacter – baixo título
3. *Ca*. Liberibacter – floema

PCR

Metodologia **específica para cada espécie de Liberibacter.**

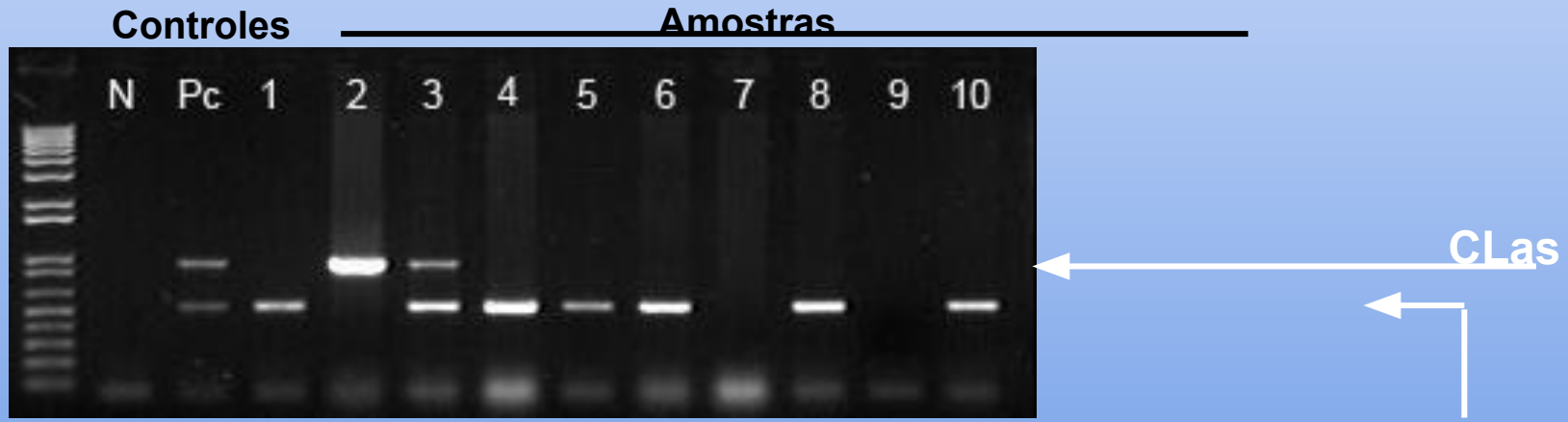


Diagnóstico

***Ca*. L. asiaticus e *Ca*. L. americanus**

Exemplificando ….

PCR



Plantas e Psilideos

Diagnóstico

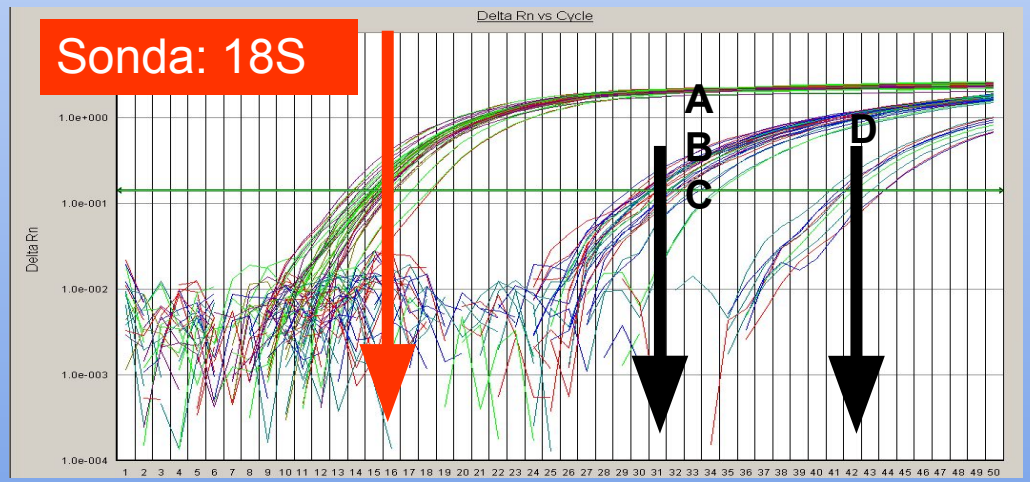
PCR quantitativo em tempo real

Dragão amarelo

Clorose assimétrica

Sem sintoma

Exemplificando ….



Detecção em folhas sem sintomas

Desvantagem: $ 5+ → PCR conv.

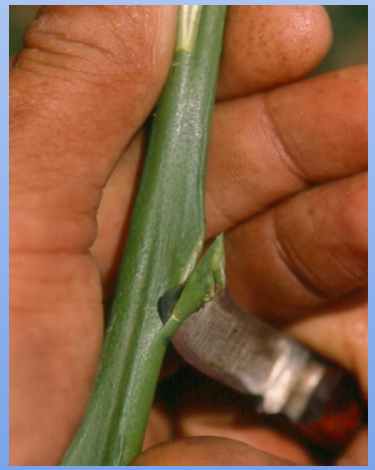
$\Delta Ct = Ct_D - Ct_{ABC} = 42 - 31 = 11$ ciclos: ABC > D $2^{*11} = 2048$ x

Fonte: EF Carlos

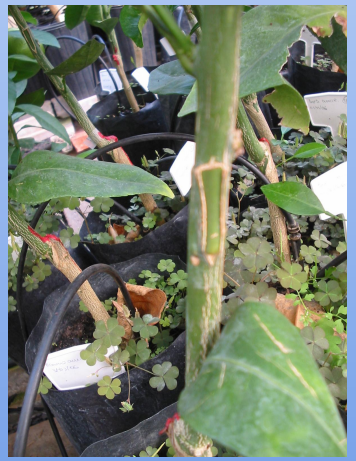
Transmissão

1. Borbulhas

A perpetuação / transmissão de Liberibacter através de borbulha de ramos sintomáticos já é conhecida de longa data.



perpetuação



transmissão

Transmissão

1. Borbulhas

- A frequência de plantas doentes varia de acordo com a espécie de Liberibacter, planta e época do ano!

Grafting season	No. plants diseased/ No. plants grafted	Percentage
Test 1		
1976 – Nov.	21/30	70.0
1977 – Jan.	6/14	42.9
Mar.	6/8	75.0
May	1/21	4.8
Jul.	0/22	0.0
Sep.	2/15	13.3
Test 2		
1979 – Feb.	29/30	96.7
Apr.	14/20	70.0
Jun.	1/9	11.1
Aug.	6/9	66.7
Oct.	18/19	94.7
Dec.	18/22	81.8
1980 – Feb.	24625	96.0
Jun.	4/27	14.8

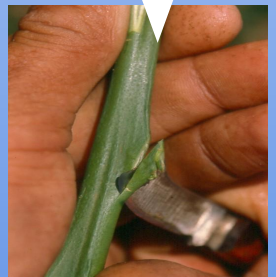
CLas >>> CLaf

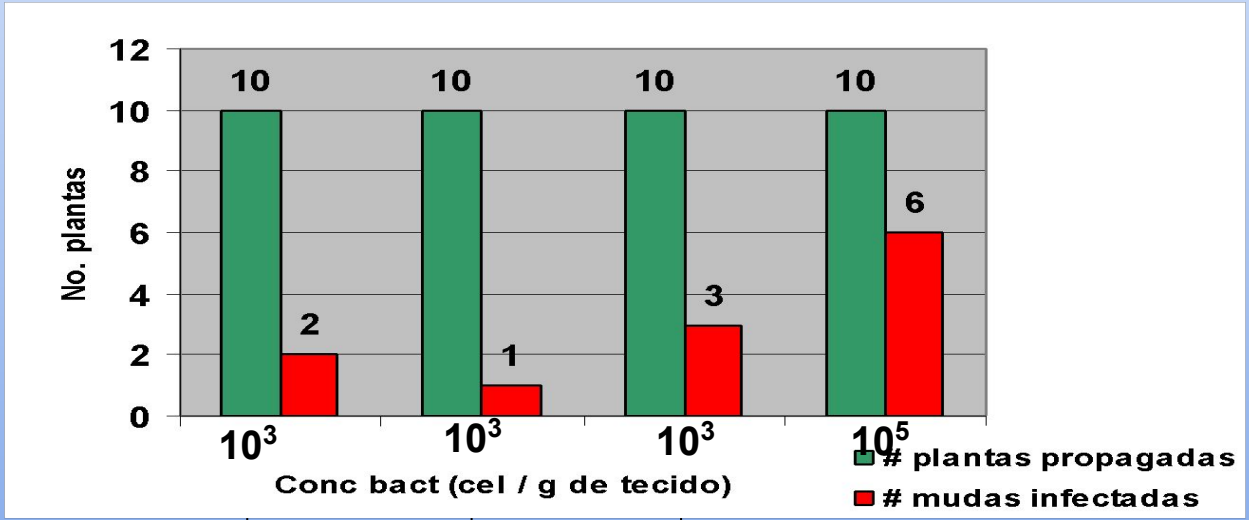
CLas >>> CLam

Transmissão

1. Borbulhas

- Liberibacter pode ser propagada por borbulhas de plantas infectadas, porém **sem** sintomas!





Coletta-Filho et al., 2010

30 60 90 120 dias de infec.

Transmissão

1. Borbulha

Termoterapia ?

Transmissão

1. Borbulhas !

Termoterapia ?

RESULTADOS

Porta-enxerto	Fonte borbulha	No. plantas enxertadas	No. plantas avaliadas*	No. plantas PCR positiva
Cravo	ET	3	3	3
Cravo	EN	9	7	7
Cravo	EN sem trat	10	5	5
Cleópatra	ET	3	1	1
Cleópatra	EN	9	1	1
Swingle	ET	3	1	0
Swingle	EN	9	1	1

ET - enxertia de tecido (sem lenho)
EN - enxertia normal, com lenho
EN sem trat - enxertia normal, com lenho porém sem tratamento de termoterapia

*As plantas avaliadas foram aquelas que apresentaram folhas suficientes para a coleta

Transmissão

2. Vetor

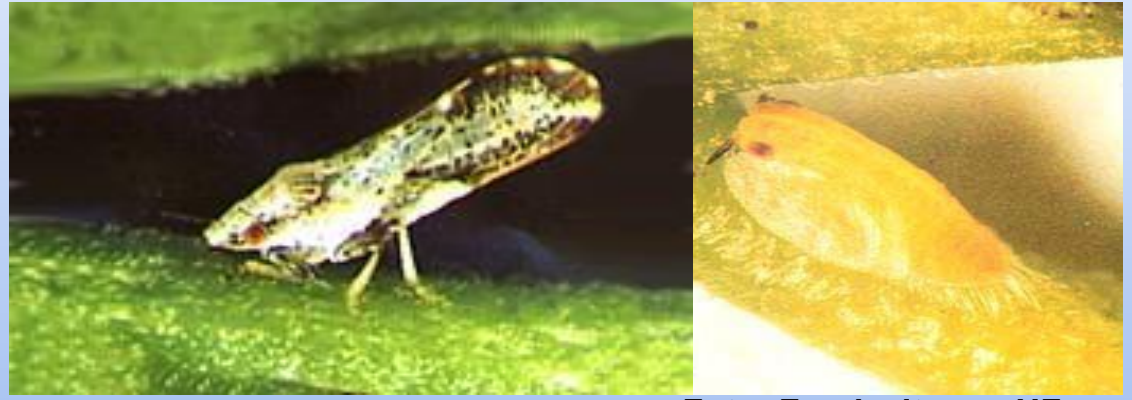


Foto: Fundecitrus e UF

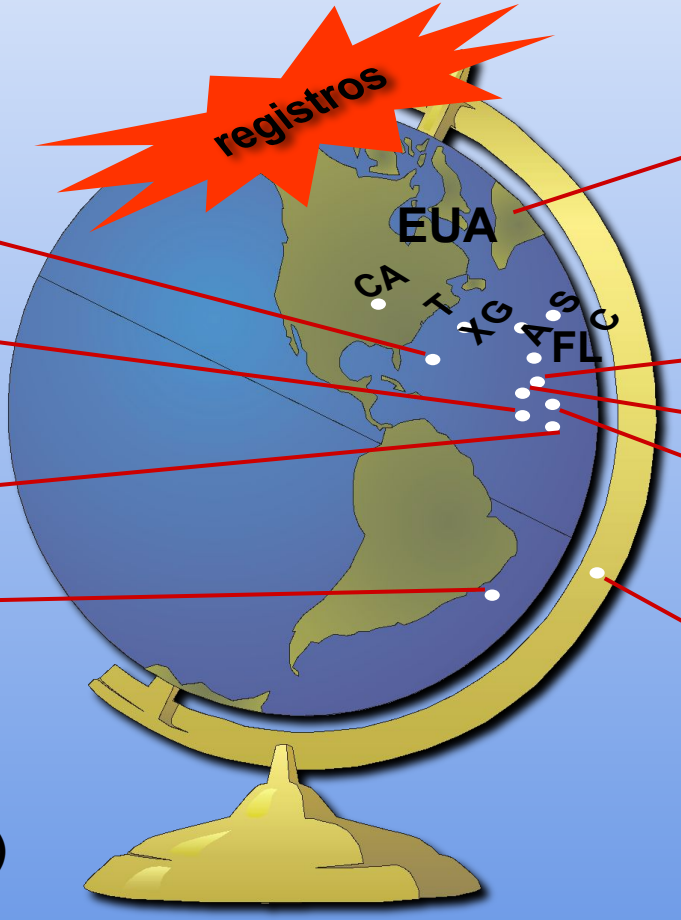
Diaphorina citri

***Ca*. Liberibacter asiaticus**

***Ca*. Liberibacter americanus**

Teixeira et al. 2005
P T Yamamoto

Diaphorina citri nas Américas



1998

México (2002)

Guadalupe (1998)

Venezuela (1999)

Argentina (1997)

Porto Rico (2002)

Cuba (2001)

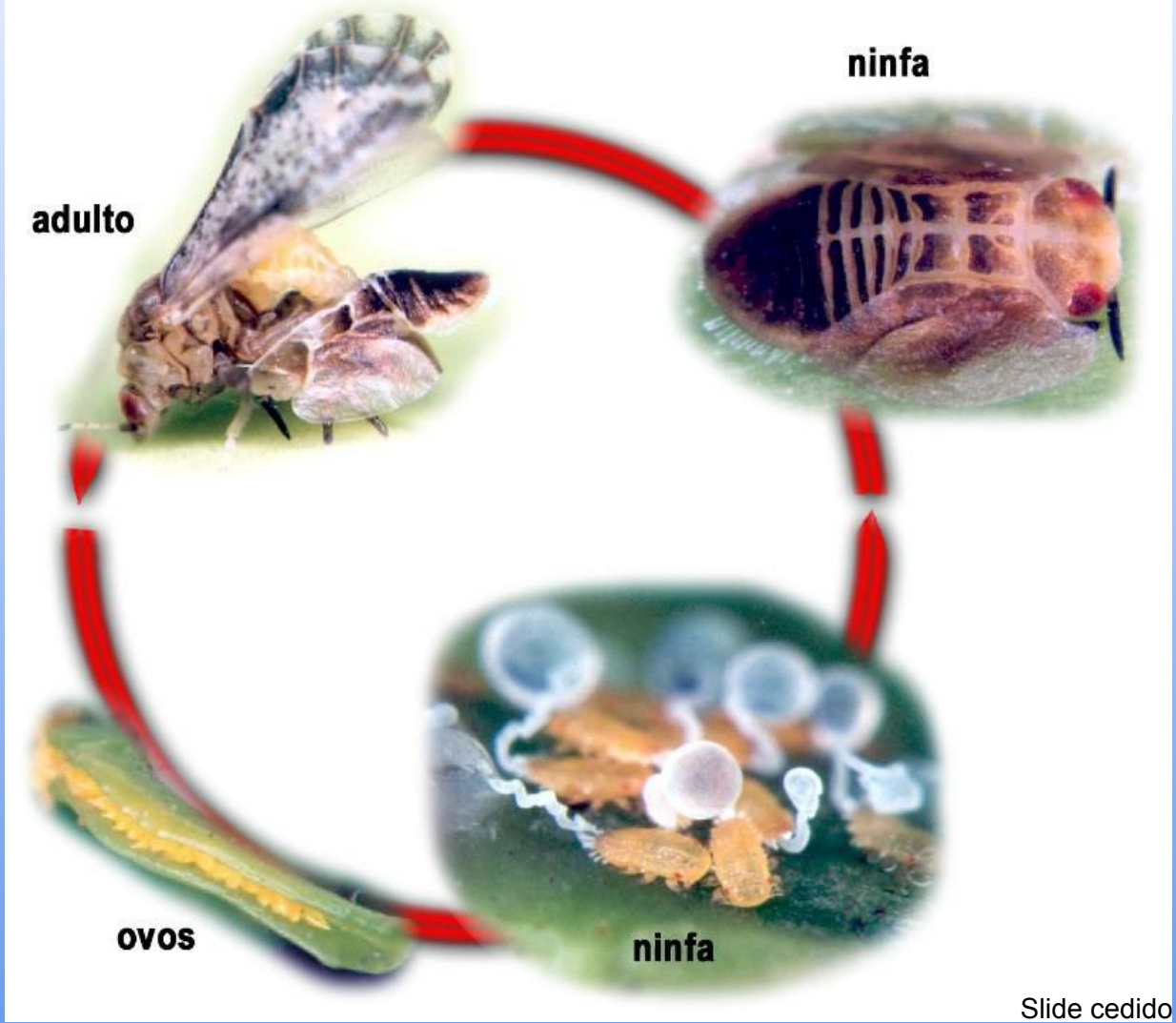
Rep. Dominicana (2001)

Brasil (1942)

(COSTA LIMA, 1942)
(SILVA et al., 1968)

Halbert & Nuñez (2004)

Slide cedido – Prof. JS Lopes/Esalq



Slide cedido – Prof. JS Lopes/Esalq

Influência do Ambiente no desenvolvimento

Duração média das fases de ovo e ninfa e do ciclo biológico (ovo-adulto) de *D. citri* criado em limão 'Cravo'. UR: 70% e fotofase de 14 h.

Temperatura (ºC)	Ovo	Ninfa	Ciclo biológico
	dias		
18	7,7 a	35,8 a	43,5 a
20	6,4 b	24,5 b	30,9 b
22	5,9 b	23,8 b	29,6 b
25	**4,5 c**	**12,6 c**	**17,1 c**
28	3,2 d	12,2 c	15,4 cd
30	2,9 d	9,4 c	12,4 d
32	2,6 d	9,4 c	12,1 d

Nava et al. 2008

Slide cedido – Prof. JS Lopes/Esalq

Transmissão por formas imaturas e adultos de *Diaphorina citri*

- *Ca.* L. asiaticus é detectado por PCR em ninfas de 2º. e 3º. ínstares (Hung et al. 2004).

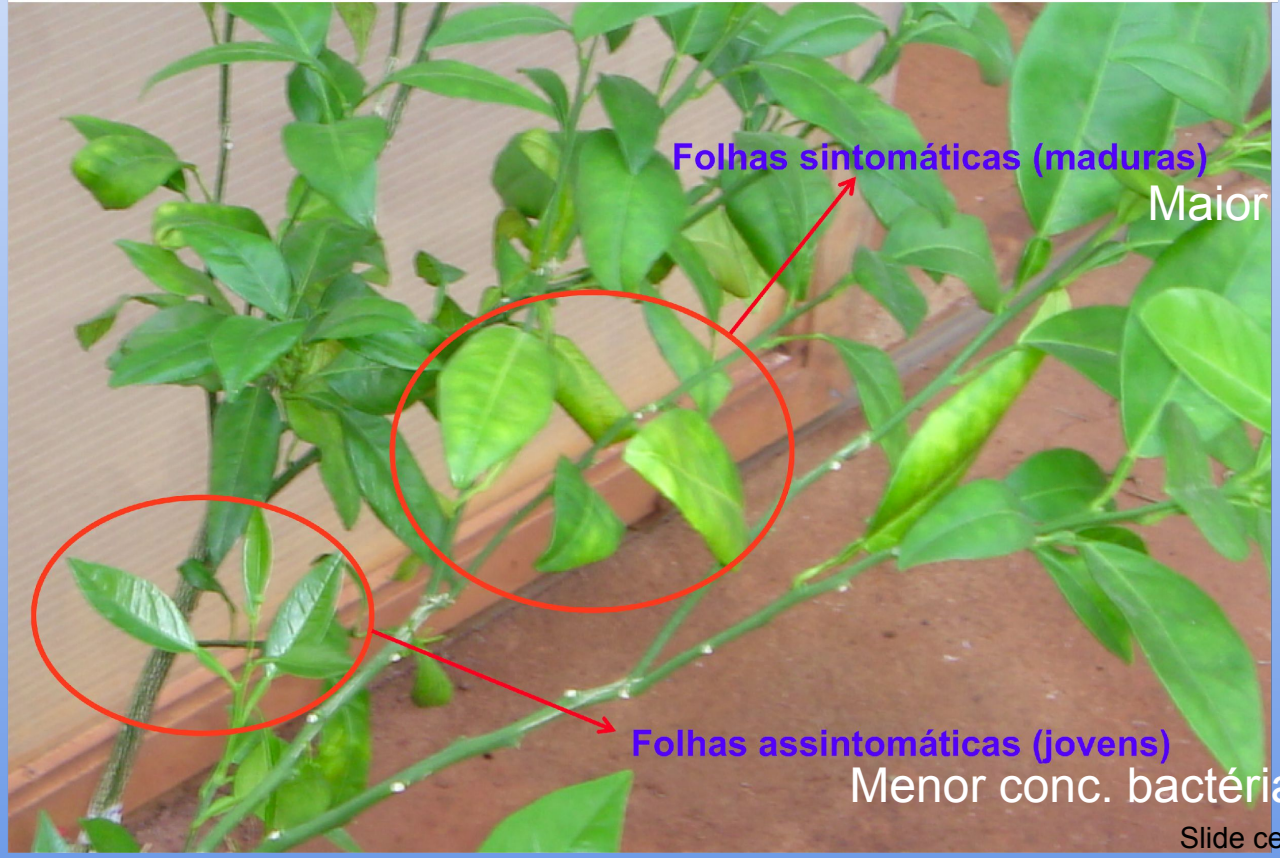
- Ninfas de últimos ínstares (4º. e 5º.) podem transmitir o patógeno (Capoor et al. 1974)

- Adultos podem transmitir patógeno adquirido na fase ninfal (**transmissão após edcise**) (Xu et al. 1988).

*****No campo, adultos são mais importantes que ninfas na disseminação (maior mobilidade e longevidade).**

Slide cedido – Prof. JS Lopes/Esalq

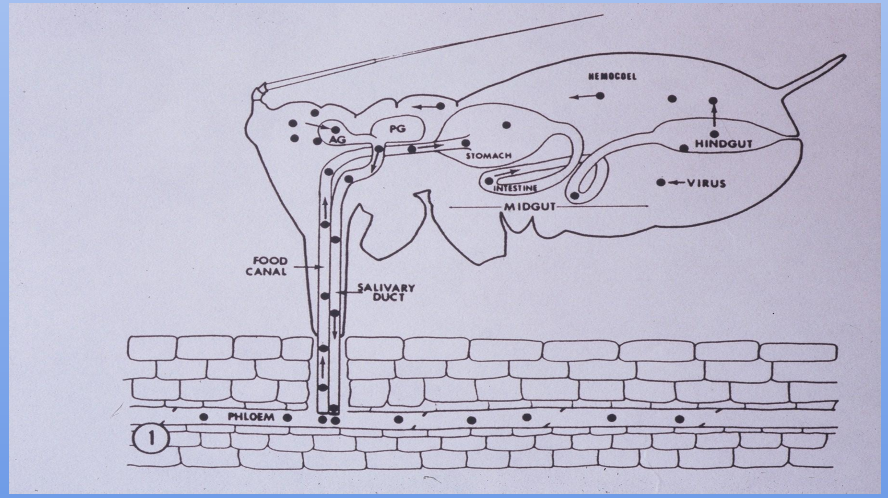
Idade das folhas em plantas infectadas com Ca. L. asiaticus



Slide cedido – Prof. JS Lopes/Esalq

Presença de brotações em plantas doentes aumenta probabilidade de aquisição de Liberibacter asiaticus

- Aquisição do patógeno é mais eficiente em folhas novas (teste com adultos de *D. citri*; PAA: 96 h)
- Psilídeo demora para localizar floema em folhas maduras (estudos de EPG)



Idade da folha x eficiência de aquisição

Idade da folha na planta-fonte	Proporção de psilídeos infectivos*
Nova	31/57 (54,4%)
Madura	4/40 (10%)

•Proporção de amostras positivas por PCR; 3 psilídeos/amostra
J.P. Bonani (2009)

Slide cedido – Prof. JS Lopes/Esalq

Relação circulativa

Evidências indiretas:

- Existência de periodo latente.
- Retenção após ecdise (ninfa adulto)
- Aumento na eficiência de transmissão com o tempo após o término da aquisição (van Vuuren & van den Merwe 1992).
- Longa persistência (3 meses) de *Ca.* L. asiaticus em *Diaphorina citri* (Hung et al. 2004).

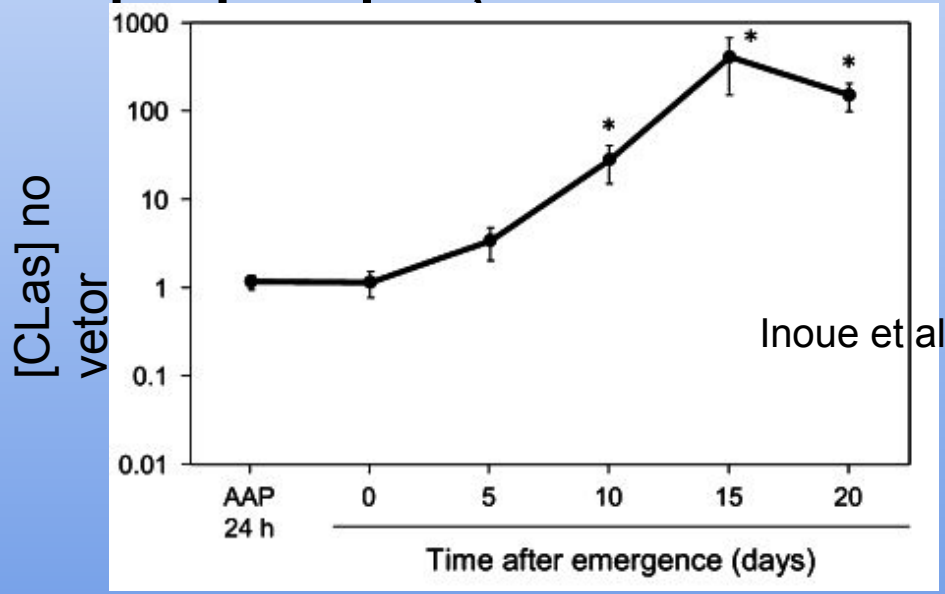
Slide cedido – Prof. JS Lopes/Esalq

Relação Propagativa

Evidência direta:

aumento na concentração de Ca. L. asiaticus no vetor (ninfas) com tempo após aquisição

.



Inoue et al. (2009)

Tempo após emergência (dias)

Slide cedido – Prof. JS Lopes/Esalq

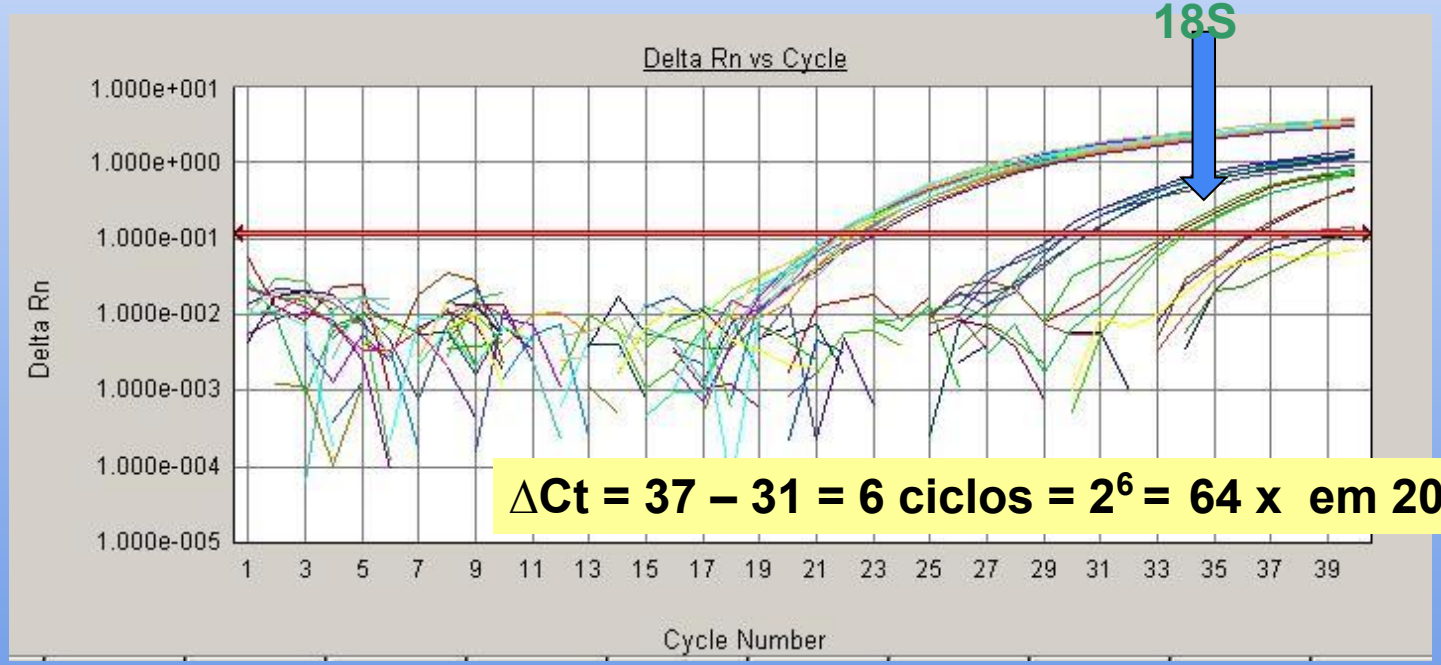
Transmissão

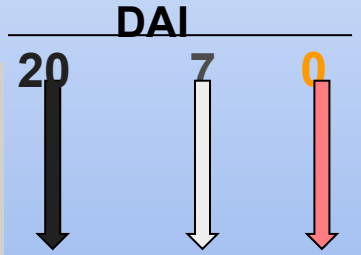
2. Vetor

Multiplicação persistente no vetor

Evidência direta

aumento na concentração de Ca. L. asiaticus no vetor (adulto) com tempo após aquisição

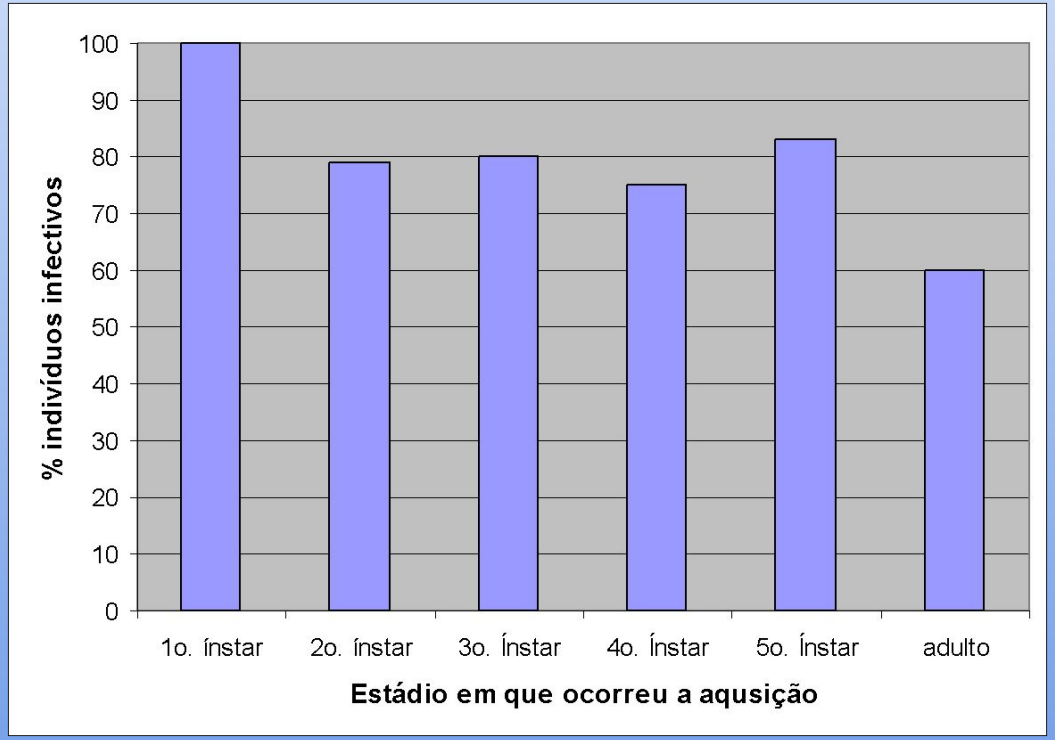




$\Delta Ct = 37 - 31 = 6$ ciclos $= 2^6 = 64$ x em 20 dias

Pslideos adultos: 96 hr de PAA em plantas com CLas

Eficiência de aquisição de *Ca*. L. asiaticus em 48 h por diferentes estádios ninfais e adultos de *D. citri*



PAA: 48 h

Slide cedido – Prof. JS Lopes/Esalq

Pesquisas do NBA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

Monitoramento de *Huanglongbing* (HLB) em pomares comerciais do noroeste paranaense

Dra.Bruna Rafaela Barbieri Galbiate
Orientador: Prof. Dr. William Mário de Carvalho Nunes

Maringá, 2021

Objetivo geral

- Analisar dados dos relatórios de HLB;
- Realizar uma inspeção de pesquisa para verificar a incidência de HLB a campo;

A inspeção na propriedade é efetuada por equipe	Própria ☐	Terceirizada ☐
Presença de murta na propriedade (planta hospedeira de greening)?	Sim ☐	Não ☐
Houve eliminação de murta?	Sim ☐	Não ☐

Total de Plantas Inspecionadas	
1º TRIM	2º TRIM

Declaro com a finalidade de atender a Instrução Normativa- MAPA n° 53 de 16/10/2008 – art.7° caput e seu § 1º, que vistoriei todas as plantas cítricas e de murta desta propriedade e eliminei as sintomáticas de Huanglongbing-HLB-(Greening), conforme os dados aqui apresentados.

Local e data

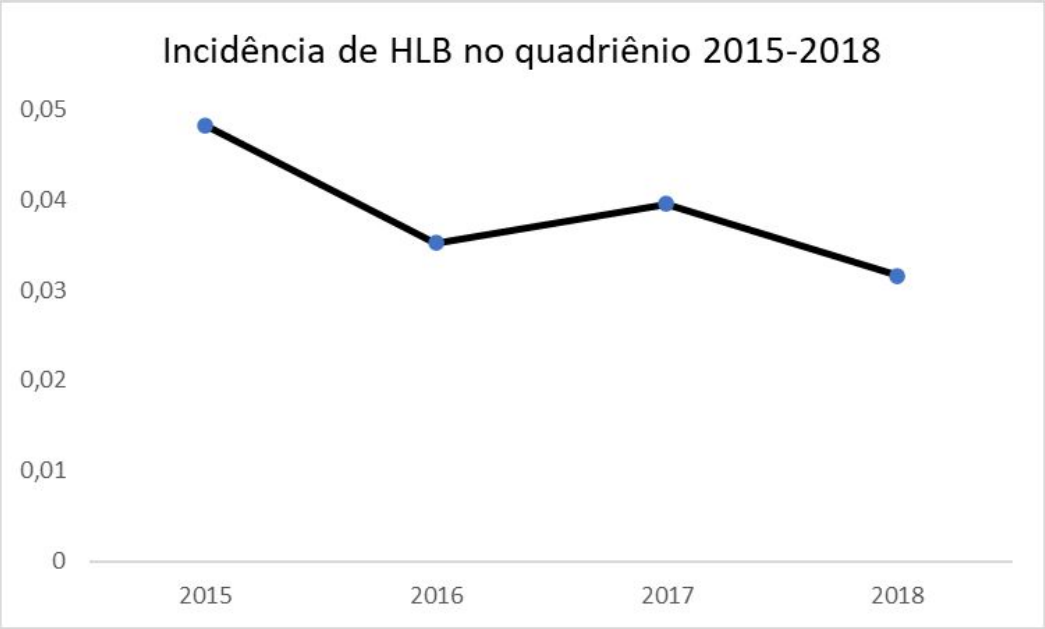
RG

☐ **Proprietário** ☐ **Arrendatário**

Assinatura

Observações:- (1) Se o declarante for arrendatário, deverá se identificar nesse campo e identificar o proprietário da terra.
Protocolar na Unidade Regional da Agência de Defesa Agropecuária do Paraná – ADAPAR, no qual está localizada a propriedade, sendo o do primeiro semestre até 15 de julho do ano em curso e o do segundo semestre até 15 de janeiro do ano seguinte.

Gráfico 1. Incidência de HLB nos pomares de Nova Esperança – Paraná no quadriênio 2015 a 2018.



Inspeção de pesquisa

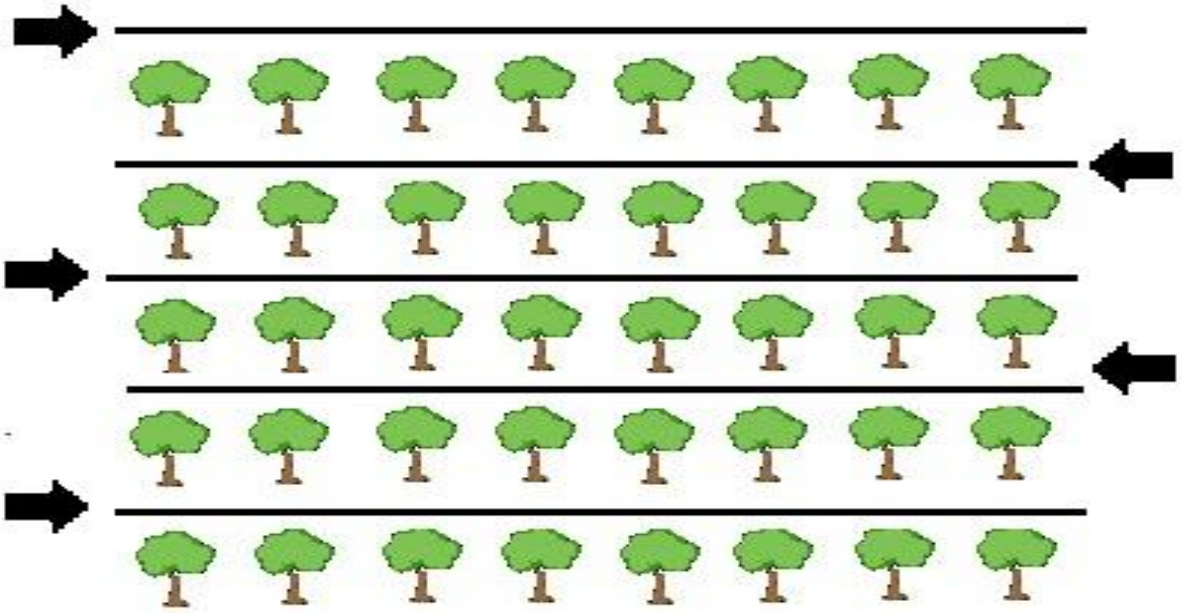


Figura 1. Exemplo de caminhamento realizado no pomar. Fonte: Acervo Pessoal

Tabela 1. Incidência de HLB de acordo com os relatórios entregues à ADAPAR (2015 a 2018) e incidência obtida através da inspeção realizada pessoalmente (INSPEÇÃO).

PROPRIEDADE	2015	2016	2017	2018	INSPEÇÃO
2	2.51 a	2.40 a	3.30 a	1.46 a	4,79
4	3.24 a	2.55 a	2.38 a	2.29 a	45,23
5	2.32 a	2.03 a	2.02 a	2.55 a	36,59
6	2.83 a	2.02 a	2.42 a	2.44 a	37,48
7	2.36 a	2.93 a	2.71 a	3.36 a	55,08
8	5.64 a	4.05 a	4.35 a	4.62 a	31,24
11	3.55 a	2.93 a	2.88 a	1.68 a	19,64

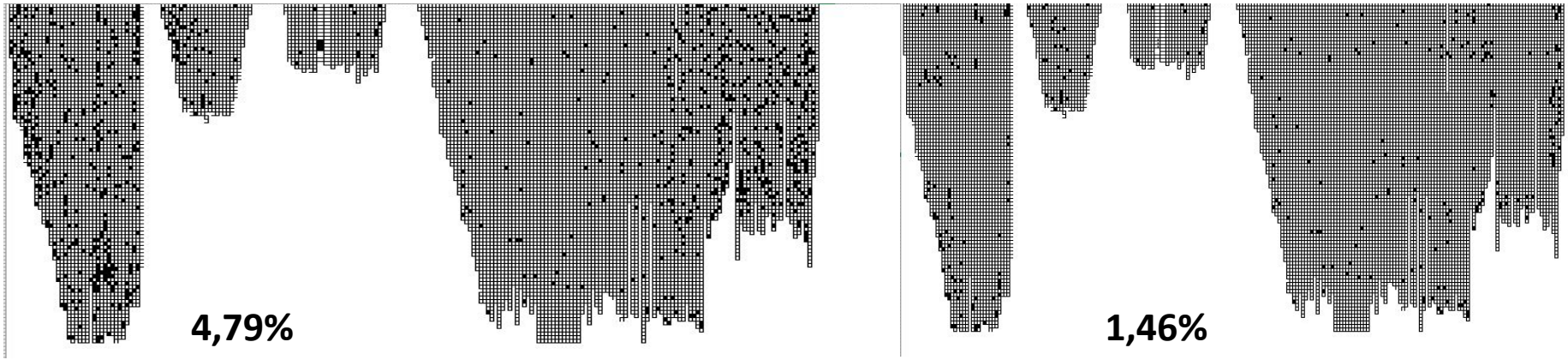


Figura 2. Mapa de incidência da propriedade 2.

Fonte: Acervo Pessoal

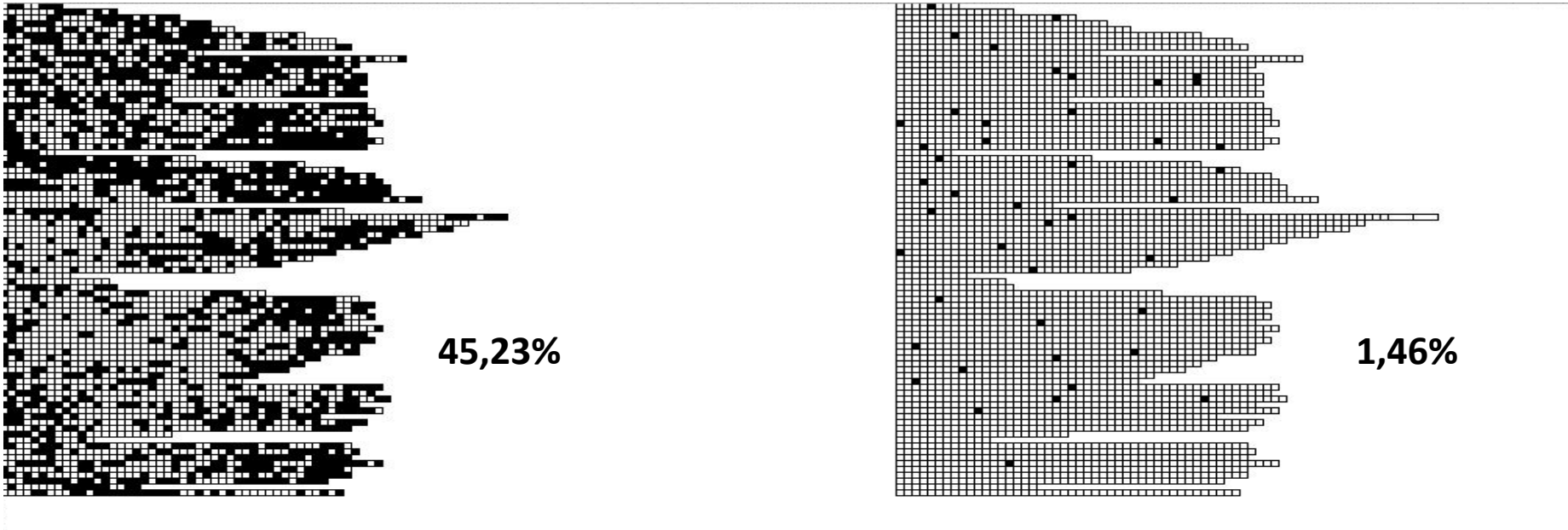


Figura 3. Mapa de incidência da propriedade 4.

Fonte: Acervo Pessoal

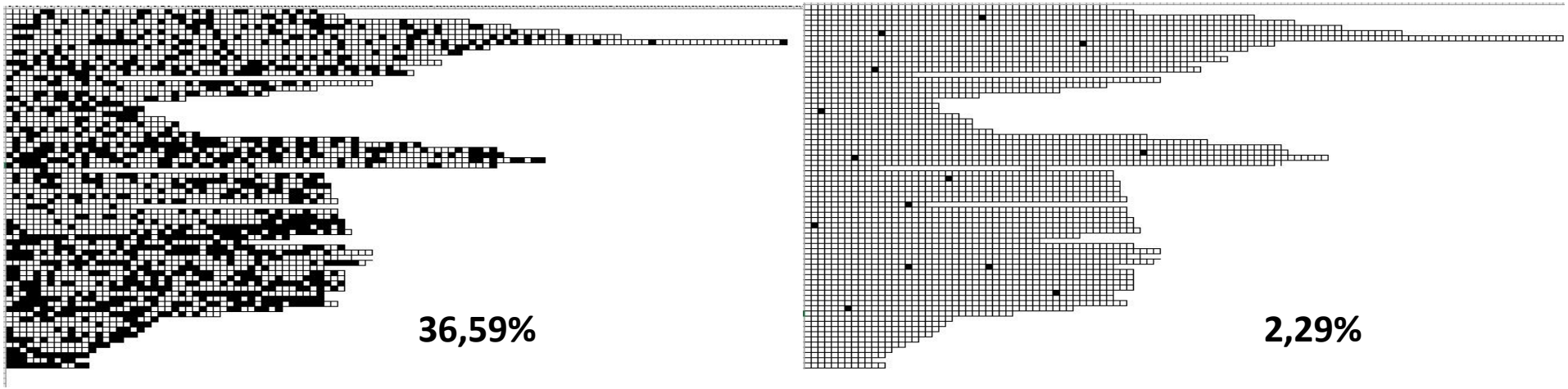


Figura 4. Mapa de incidência da propriedade 5.

Fonte: Acervo Pessoal

Importância do estudo...

- Situação alarmante sobre o HLB a campo!!!!
- Muitos pomares com incidência subestimada e consequentemente maior fonte de inóculo para a doença
- Pomares com incidência próximo de 100% devido ao período de latência da bactéria na planta

NBA
Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada
UEM Maringá-PR

Programa de Pós-graduação em Agronomia
PGA/UEM

Monitoramento do Psilídeo dos Citros (*Diaphorina citri)* no Estado do Paraná

Doutorando: Engenheiro Agrônomo Dr. Eduardo Lima Nunes
Orientador: Prof. Dr. Dauri José Tessmann
Mestranda: Engenheira Agrônoma Msc. Nayara Nascimento Souza
Orientador: Prof. Dr. William Mário de Carvalho Nunes

Departamento de Agronomia
Universidade Estadual de Maringá

UEM
Universidade Estadual de Maringá

PARANÁ
GOVERNO DO ESTADO
Secretaria da Agricultura
e Abastecimento

ADAPAR
Agência de Defesa Agropecuária do Paraná

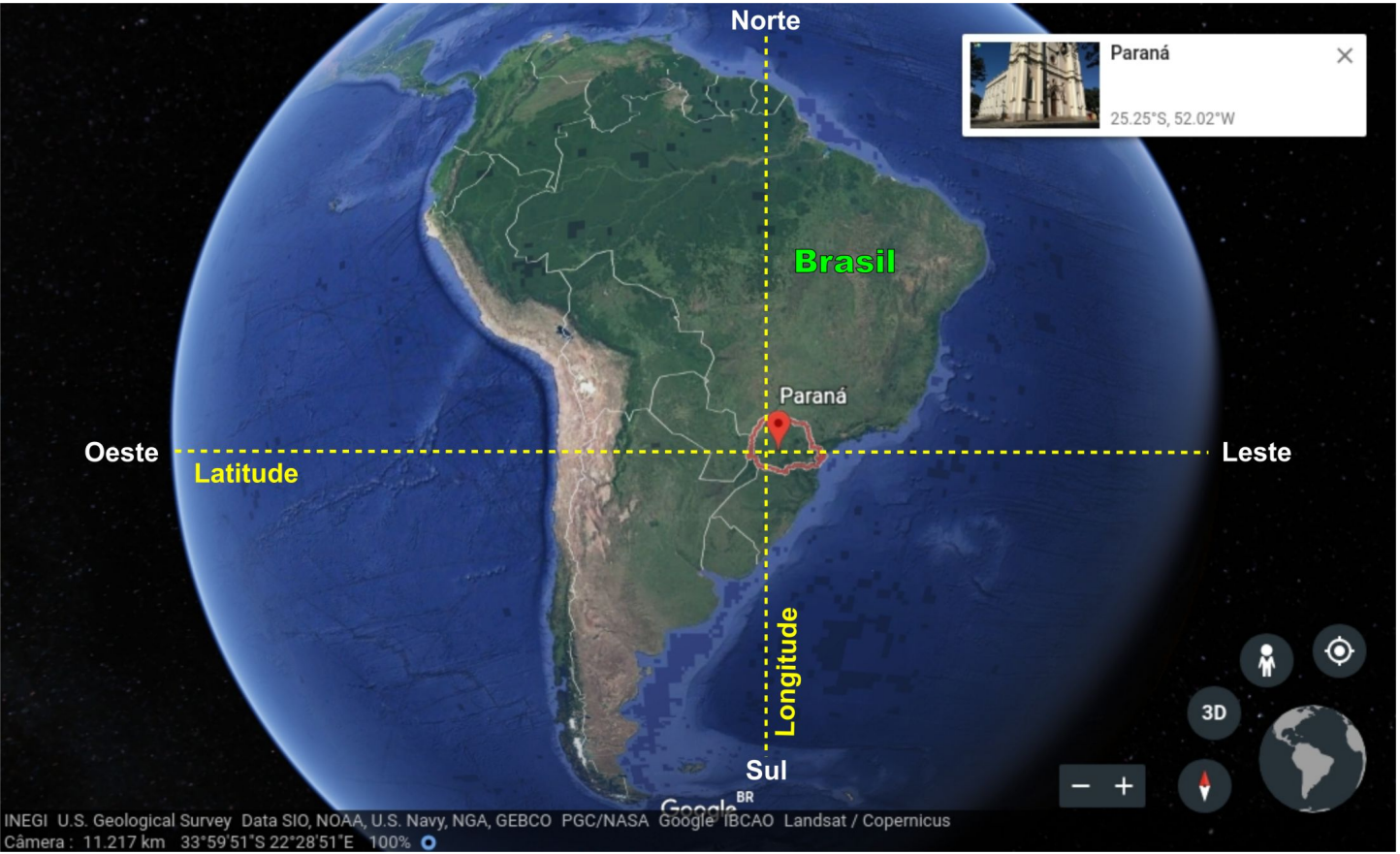
NBA
Núcleo de Pesquisa em
Biotecnologia Aplicada
UEM Maringá-PR

Programa de Pós-graduação em Agronomia
PGA/UEM

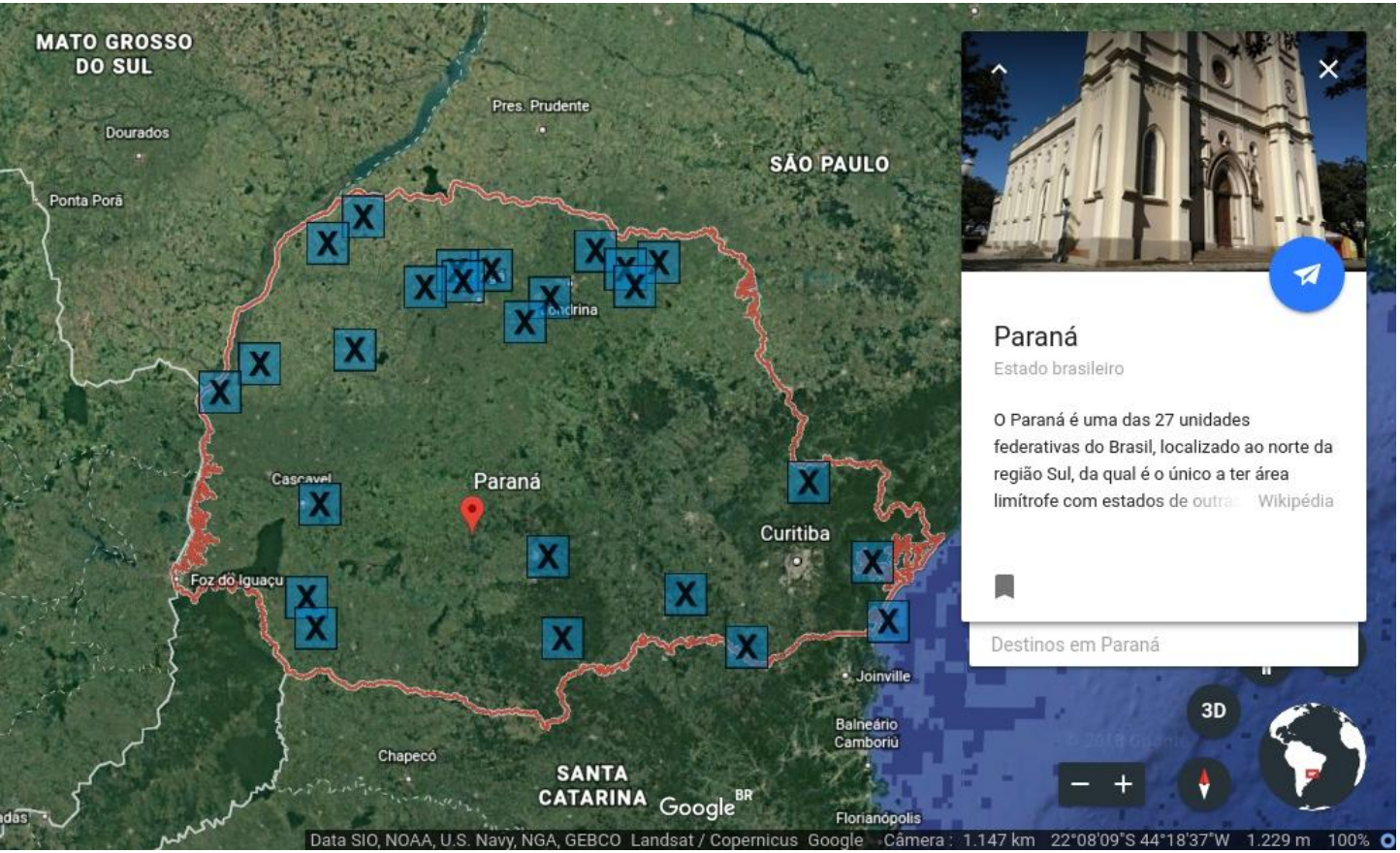
PROJETO
Anos: 2018/2019 (Eduardo)
Anos: 2020/2021(Nayara)

Visita e Treinamento na ESALQ – USP

Laboratório de Insetos Vetores de Fitopatógenos



NBA
Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada
UEM Maringá-PR

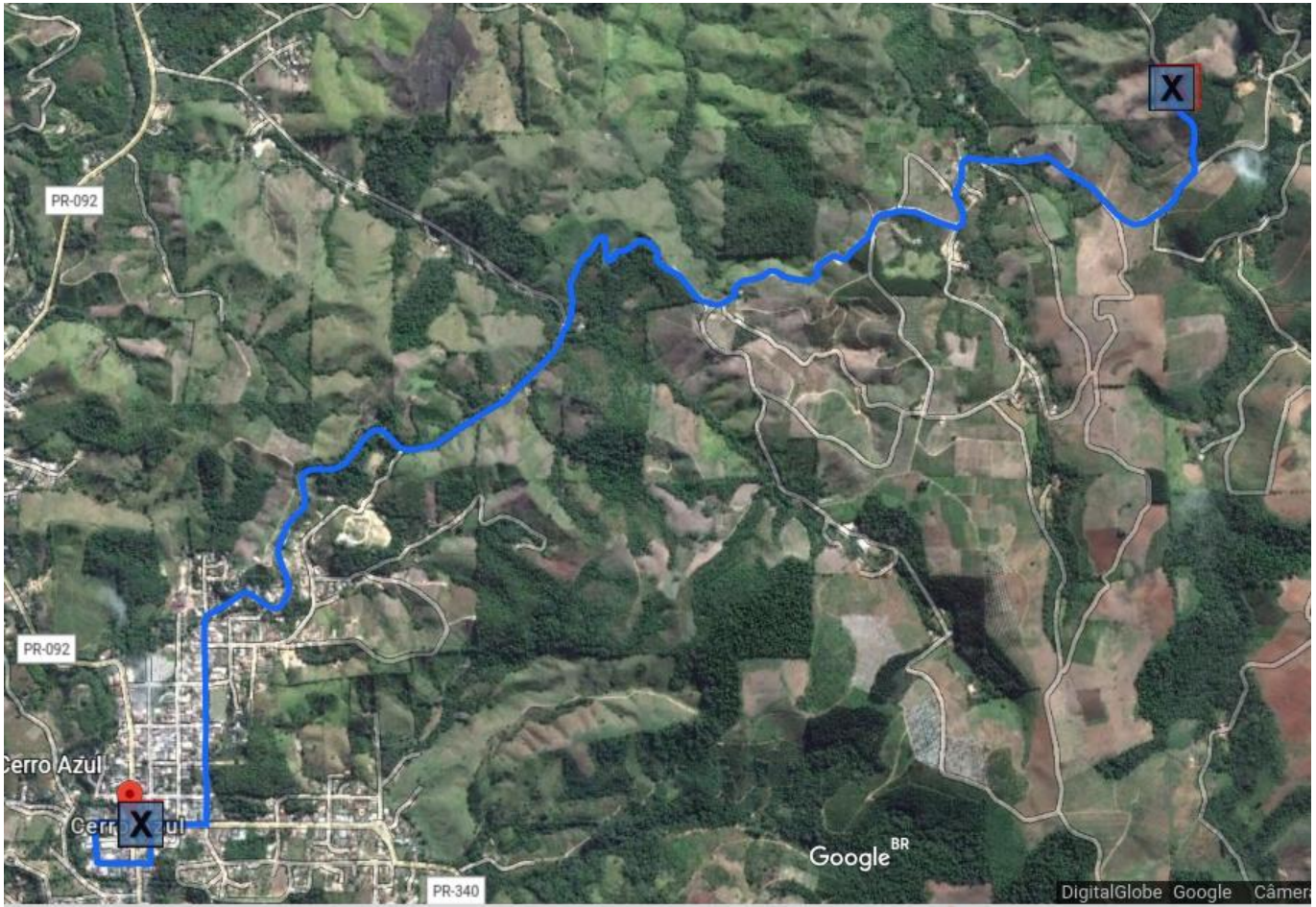


NBA
Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada
UEM Maringá-PR

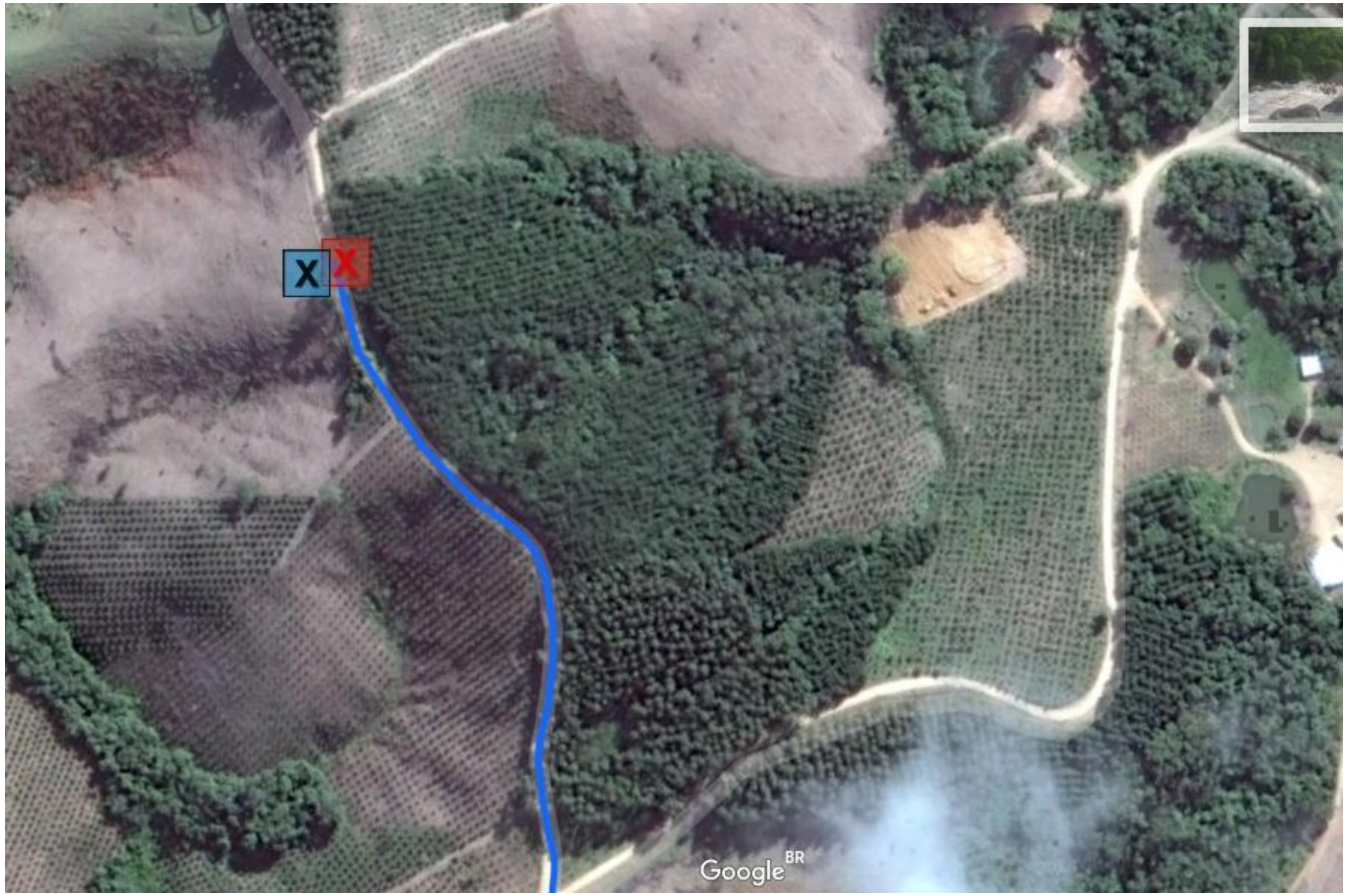
CERRO AZUL

NBA
Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada
UEM Maringá-PR

NBA
Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada
UEM Maringá-PR



NBA
Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada
UEM Maringá-PR



NBA
Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada
UEM Maringá-PR

NBA
Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada
UEM Maringá-PR

EXEMPLO DE ARMADILHA RETIRADA DE UM PONTO EM CERRO AZUL

NBA
Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada
UEM Maringá-PR

CERRO AZUL

armadilha/15 dias	A6.1	A6.2	A6.3
datas de retirada	05/04/2018	05/04/2018	05/04/2018
município	Cerro Azul S 24º 93' 34.7" W 49º 51'56"	Cerro Azul S 24º 56' 46" W 49º 18' 24"	Cerro Azul S 24º 48' 16" W 49º 13' 47"
Diaphorina citri MACHO	0	0	0
Diaphorina citri FÊMEA	0	0	0
Psylloidae	0	0	0
Outros hemipteras	18	4	4
Hymenópteras	8	54	6
Aleyrodidae (mosca-negra)	0	0	0
Tamarixia radiata	0	0	0
Tripes	1	7	0
Outros insetos	54	212	288
total	81	277	298

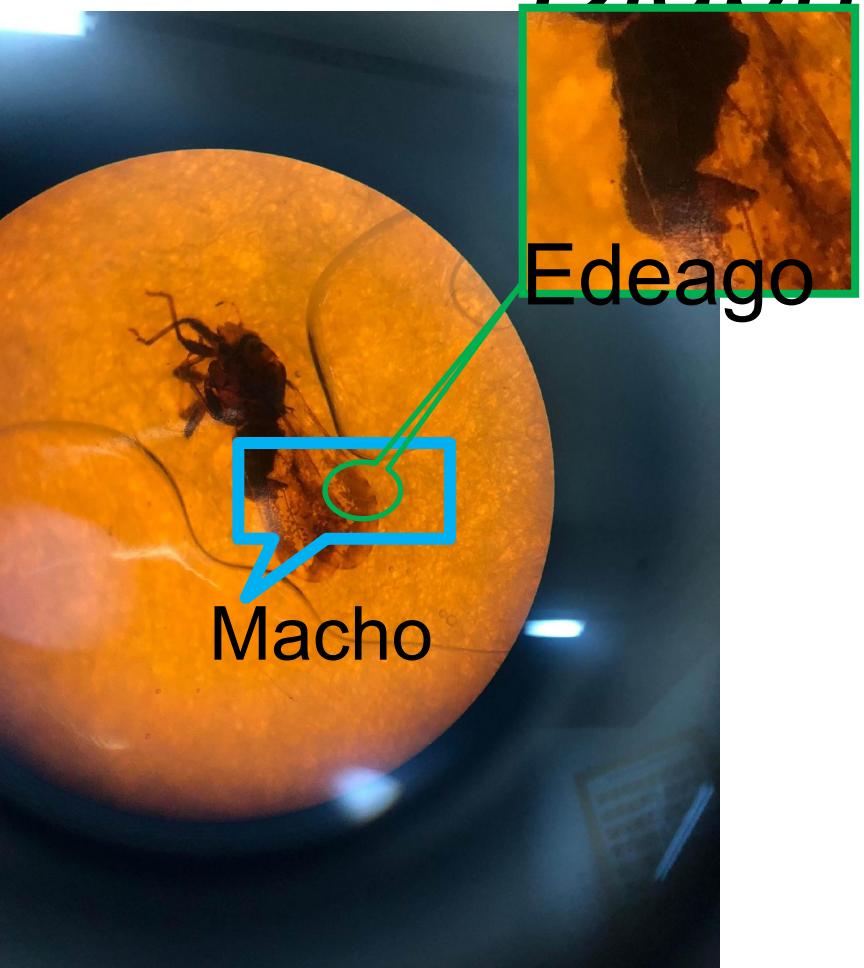
PSILÍDEO
Diaphorina citri

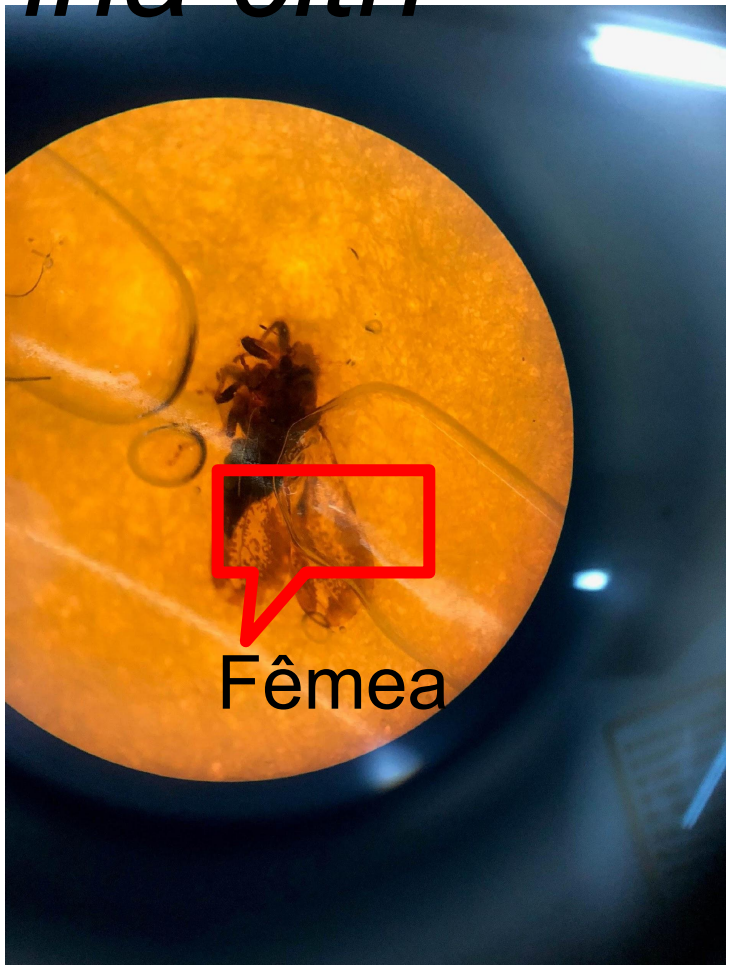
NBA
Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada
UEM Maringá-PR

Diaphorina citri
Psilídeo do citros

NBA
Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada
UEM Maringá-PR

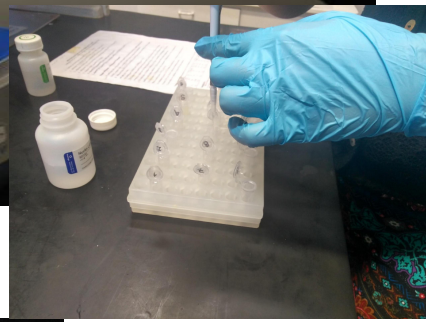
Diaphorina citri

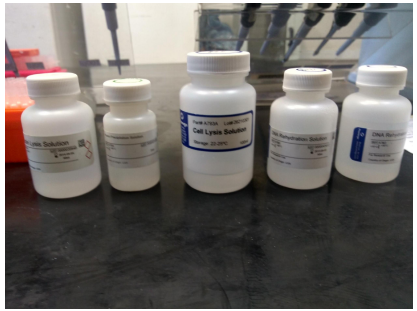




D. citri (NBA)

Extração de DNA





METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO DNA DE *D. CITRI*

(Método Deng et al., 2006 modificado por Heivesão Deliacoleta Filho)

1. Colocar os insetos em tubos de 1,5 ml (para 1 inseto);
2. Adicionar 30µl de STE (10mM Tris HCl, 1mM EDTA, 25mM NaCl);
3. Macerar o inseto com o auxílio de uma ponteira ou pistilo;
4. Adicionar 10µl de Proteinase K na concentração de 200 µg/ mL, vortex por 10"
5. Manter a 50°C durante 30 minutos;
6. Centrifugar brevemente (rpm)-3000 rpm por 1minuto;
7. Retirar fase superior (35µl) e transferir para um novo tubo de 1,5 ml

Etapa adicional – Kit Wizard Promega:

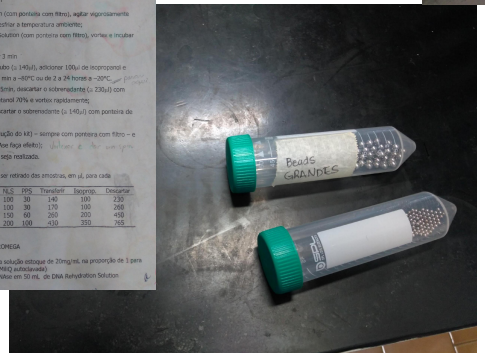
8. Adicionar 100 µl de Nucle Lysis Solution (com ponteira com filtro), agitar vigorosamente (vortex), manter a 80°C durante 5 min e resfriar a temperatura ambiente;
9. Adicionar 30µl de Protein Precipitation Solution (com ponteira com filtro), vortex e incubar em gelo por 5 min;
10. Centrifugar a 10000 rpm (13000bg) por 3 min
11. Transferir fase superior para um novo tubo (± 145µl), adicionar 100µl de isopropanol e inverter os tubos com as mãos. Colocar 10 min a –80°C ou de 2 a 24 horas a –20°C;
12. Centrifugar a 11700rpm (14000bg) por 5min, descartar o sobrenadante (± 230µl) com auxílio de uma pipeta, adicionar 150µl de etanol 70% e vortex rapidamente;
13. Centrifugar a 11700rpm por 5 min; descartar o sobrenadante (± 140µl) com ponteira de filtro e secar o tubo a 50 °C (± 20 min);
14. Adicionar 50µl de 1/10 TE + RNAse (solução do kit) – sempre com ponteira com filtro – e incubar a 37°C por 30 min (para que a RNAse faça efeito);
15. Armazenar em geladeira até que a PCR seja realizada.

Tabela: Volume de cada reagente e volume a ser retirado das amostras, em µl, para cada quantidade de insetos

Nº Insetos	STE	PK	Transferir	NLS	PPS	Transferir	Isopropo.	Descartar
1	30	10	35	100	30	140	100	230
3	50	10	55	100	30	170	100	260
6	100	15	80	150	60	260	200	450
10	150	30	160	200	100	430	350	765

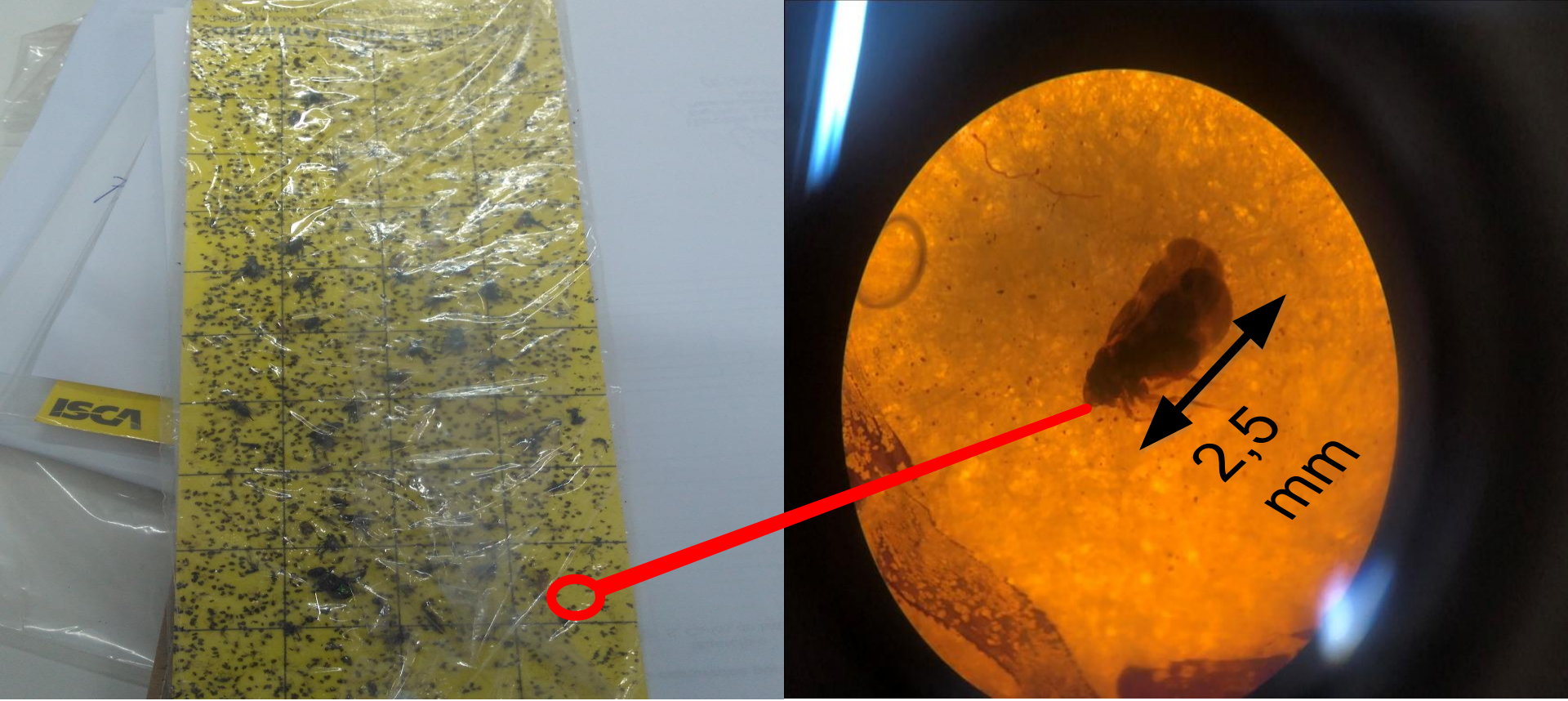
Observações:

- DNA Purification Kit Wizard Genomic PROMEGA
  Cat # A1125
- Proteinase K (200 µg/ mL) - Diluir nossa solução estoque de 20mg/mL na proporção de 1 para 100 (µl de solução em 19ml de água MilQ autoclavada)
- TE + RNAse -> acrescentar 100µl de RNAse em 50 mL de DNA Rehydration Solution



Diversidade

Mosca negra do citros
Aleurocanthus woglum



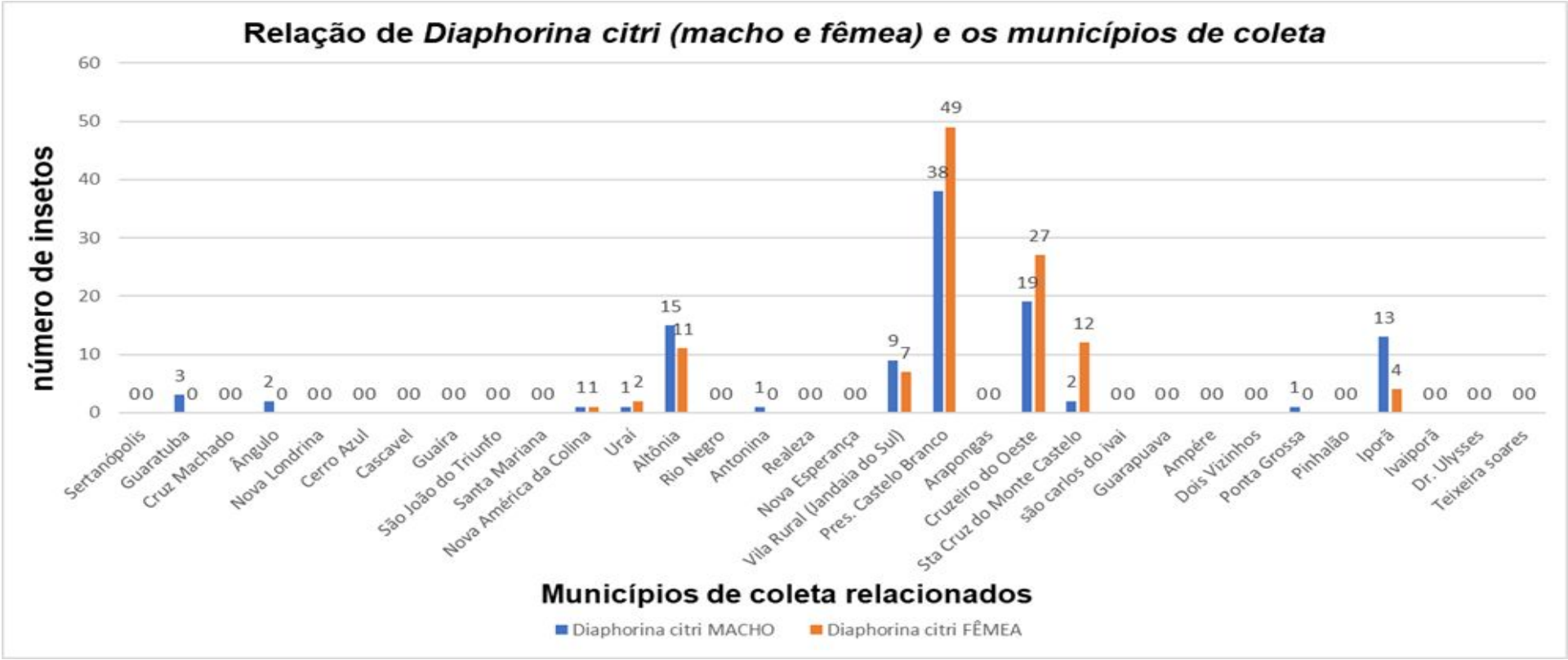
Mosca negra do citros (*Aleurocanthus woglum*)

NBA
Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada
UEM Maringá-PR

Tamarixia radiata

- *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae)
- Ectoparasitóide idiobionte (impedem que seu hospedeiro tenha qualquer desenvolvimento depois de parasitado)
- É nativo da Índia e são específicos IN de *D. citri*
- São pequenos himenópteros de coloraão escura
- Medem de 0,92 a 1,04 mm
- (Chien 1995 e Onagbola et al, 2009)

Tamarixia radiata


Relação de *Diaphorina citri (macho e fêmea) e os municípios de coleta*
número de insetos
60
50
40
30
20
10
0
Municípios de coleta relacionados
Sertanópolis
Guaratuba
Cruz Machado
Ângulo
Nova Londrina
Cerro Azul
Cascavel
Guaíra
São João do Triunfo
Santa Mariana
Nova América da Colina
Uraí
Altônia
Rio Negro
Antonina
Realeza
Nova Esperança
Vila Rural (Jandaia do Sul)
Pres. Castelo Branco
Arapongas
Cruzeiro do Oeste
Sta Cruz do Monte Castelo
são carlos do ivai
Guarapuava
Ampére
Dois Vizinhos
Ponta Grossa
Pinhalão
Iporã
Ivaiporã
Dr. Ulysses
Teixeira soares
Diaphorina citri MACHO
Diaphorina citri FÊMEA

Relatório de Armadilhas ADAPAR/UEM/NBA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada – NBA

Agência de Defesa Agropecuária do Paraná - ADAPAR

Relatório do Monitoramento de *Diaphorina citri* com Armadilhas Adesivas Amarelas no Estado do Paraná

Maringá

Fevereiro/2019

Relatório das armadilhas

Foram colocadas armadilhas em 32 municípios para o monitoramento do psilídeo asiático dos citros, *Diaphorina citri*, vetor de um importante fitopatógeno de uma doença de grande expressividade em pomares de citros no Brasil e nos principais estados produtores, dentre eles o Paraná. A Agência de Defesa Agropecuária do estado do Paraná, ADAPAR juntamente com o IAPAR e a UEM/NBA estão juntos desenvolvendo o monitoramento do inseto vetor a *D. citri*, de regiões próximas a produções de citros e ou regiões estratégicas como Ponta Grossa que reserva um banco de germoplasma e viveiro de mudas comerciais de citros.

Contudo, foram georreferenciados pontos aleatoriamente em várias cidades do estado do Paraná, dentre elas estes 32 municípios onde foram instaladas “armadilhas adesivas amarelas” e até a presente data avaliadas e ou transportadas até ao especialista em entomologia agrícola da UEM/NBA. E durante esta avaliação destas armadilhas amarelas, estamos identificando além do inseto alvo a *Diaphorina citri,* as categorias de Psylloidae que são outros psilídeos da mesma superfamília da *D. citri,* outros hemíptera, hymenopteras, moscas negras, importante praga de citros, *Tamarixia radiata,* parasitoide específico de *D. citri,* tripés, devido a abundância de aparições neste monitoramento e outros insetos que englobam todos os outros insetos de outras ordens.

O município onde se avaliou maior número de armadilhas foi Cerro Azul, com 18 armadilhas avaliadas, e contados 6.858 insetos e nenhuma *Diaphorina citri* foi detectada, importante região produtora de citros (Poncan). No município de Presidente Castelo

NBA

Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada

UEM Maringá-PR

Fotos e identificação: Engenheiro Agrônomo, MSc. Eduardo Lima Nunes

Wérica Valim, Geógrafa e Mestranda no PGA/UEM

Ana Flávia Pedrão Graduanda em Agronomia, Bolsista do PIBIC

Bruno Cesar Almeida Graduando em Agronomia, Bolsista do PIBIC

Maria Andressa Galvão Graduanda em Agronomia

Vitor Henrique Gonçalves Lopes Graduando em Agronomia

Imagens mapas: Prof. Dr. Hudson Sérgio de Souza

Orientador: Prof. Dr. William Mário de Carvalho Nunes

Literatura

Tropical Plant Pathology
https://doi.org/10.1007/s40858-020-00348-7

ORIGINAL ARTICLE

Revisiting seed transmission of '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' in different citrus species and hybrids

Thiago Z. Bagio[1] · Marcelo G. Canteri[2] · Rui P. Leite Júnior[1]

Received: 11 November 2019 / Accepted: 6 April 2020
© Sociedade Brasileira de Fitopatologia 2020

Abstract

Huanglongbing (HLB) caused by '*Candidatus* Liberibacter spp.' is the most destructive disease for citrus production. These bacteria are disseminated naturally by insect vectors, such as the psyllid *Diaphorina citri*. However, the transmission of the bacteria vertically from seeds to seedlings has been controversial. Therefore, the objective of this study was to re-investigate the vertical transmission of the bacterium '*Ca.* Liberibacter asiaticus' (CLas) from seeds to seedlings. Seeds of 'Rangpur' lime, 'Swingle' citrumelo, 'Ponkan' mandarin and the sweet oranges 'Folha Murcha', 'IAPAR-73', 'Pera Rio', 'Shamouti' and 'Valencia' were included in the study. Besides the seeds, 3493 citrus seedlings were also examined for the presence of the bacterium and for the development of HLB symptoms. The presence of the bacterium in different parts of the seeds and in citrus seedlings was examined by standard PCR. CLas was detected in all parts of the seeds, including seed coat or testa, tegmen, and endosperm plus embryos of all citrus cultivars, except for 'Shamouti' sweet orange. Although transient, the presence of the HLB bacterium was also detected in seedlings of 'Ponkan' mandarin and 'Folha Murcha' sweet orange obtained from seeds of HLB-infected trees up to 18 months after seedlings transplanting. However, no typical symptoms of HLB were observed in the citrus seedlings. Although CLas may infect the citrus seeds, the results of this study do not support the vertical transmission of viable cells of CLas from seeds to seedlings.

Keywords Bacteria · *Citrus* spp. · Huanglongbing · Vertical transmission

Introduction

Huanglongbing (HLB) is the most destructive disease for citrus production in the major citrus producing areas around the world (Bové 2006). The disease is associated with the fastidious, Gram negative and phloem-inhabiting bacteria '*Candidatus* Liberibacter asiaticus', '*Ca.* Liberibacter africanus' and '*Ca.* Liberibacter americanus' (Bové 2006; Coletta-Filho et al. 2004; Teixeira et al. 2005). In Brazil, HLB was first reported in citrus growing areas in the state of São Paulo in 2004 (Coletta-Filho et al. 2004; Teixeira et al. 2005). Further, the species '*Ca. L. asiaticus*' and '*Ca. L. americanus*' have been reported in Brazil (Coletta-Filho et al. 2004; Teixeira et al. 2005). Currently, the disease is also present in the Brazilian states of Mato Grosso do Sul, Minas Gerais and Paraná (Belasque Júnior et al. 2009; Agência Estadual de Defesa Sanitária Animal e Vegeta 2020).

The HLB bacteria are transmitted by contaminated propagative material and by insect vectors, such as the Asian citrus psyllid *Diaphorina citri*, Kuwayama (Bové 2006). Vertical transmission of '*Ca.* Liberibacter spp.' through seeds and the consequent development of HLB symptoms in the citrus trees has been controversial. Citrus seedlings obtained from seeds of fruits from diseased trees may develop symptoms similar to HLB, supporting the possible transmission of '*Ca. L. asiaticus*' through seeds, but with no detection of bacteria, probably due to the absence of sensible enough diagnosis tools (Tirtawidjaja 1981). Graham et al. (2008) also reported the potential presence of '*Ca. L. asiaticus*' in citrus seedlings produced from seeds obtained from HLB symptomatic trees, but the results were inconclusive. Although the HLB bacteria have been detected in seedlings obtained from seeds extracted

✉ Rui P. Leite Júnior
ruileite@iapar.br

[1] Área de Proteção de Plantas, Instituto Agronômico do Paraná – IAPAR, Londrina, PR 86047-902, Brazil

[2] Departamento de Agronomia, Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina, PR 86057-970, Brazil

Published online: 14 May 2020

[Revisiting_seed_transmission_Candidatus_Liberibacter_asiaticus_different_citrus_species.pdf]

Gasparotoetal2021FirstLook-Repositrio(1).pdf

Phytopathology® · 2022 · 112:180-188 · https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-21-0239-FI

Ecology and Epidemiology

e-Xtra*

Prevalent Transmission of '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' over '*Ca.* Liberibacter americanus' in a Long-Term Controlled Environment

Maria Cândida de Godoy Gasparoto,[1,2] Isabela Vescove Primiano,[3] Renato B. Bassanezi,[3] Silvia Afonseca Lourenço,[1] Luiz H. Montesino,[3] Nelson Arno Wulff,[3] Elaine Cristina Martins,[3] Armando Bergamin Filho,[1] and Lilian Amorim[1,†]

[1] University of São Paulo, Luiz de Queiroz College of Agriculture, Piracicaba, SP, Brazil
[2] São Paulo State University, Campus of Registro, SP, Brazil
[3] Fund for Citrus Protection, Fundecitrus, Department of Research and Development, 14.807-040, Araraquara, São Paulo, Brazil
Accepted for publication 13 August 2021.

ABSTRACT

In Brazil, citrus huanglongbing (HLB) is associated with '*Candidatus* Liberibacter americanus' (CLam) and '*Ca.* Liberibacter asiaticus' (CLas). However, there are few studies about HLB epidemiology when both Liberibacter spp. and its insect vector, the Asian citrus psyllid (ACP, *Diaphorina citri*), are present. The objective of this work was to compare the transmission of HLB by ACP when both CLam and CLas are present as primary inoculum. Two experiments were performed under screenhouse conditions from April 2008 to January 2012 (experiment 1) and from February 2011 to December 2015 (experiment 2). The experiments were carried out with sweet orange plants infected with CLam or CLas as inoculum source surrounded by sweet orange healthy plants. One hundred Liberibacter-free adult psyllids were monthly confined to the source of inoculum plants for 7 days with subsequent free movement inside the screenhouse. Fortnightly, nymphs and adults of psyllids were monitored. Psyllid and leaf samples were collected periodically for Liberibacter detection by PCR or quantitative PCR. CLas was detected more frequently than CLam in both psyllid and leaf samples. No mixed infections were detected in the psyllids. A clear prevalence of CLas over CLam was observed in both experiments. The final HLB incidences were 16.7 and 14.5% of Liberibacter-positive test plants, and CLas was detected in 92.3 and 93.1% of these infected plants. Mixed infection was observed only in 3.8% of infected test plants in experiment 1. These results endorse the shift in the prevalence of CLam to CLas observed in citrus orchards of São Paulo, Brazil.

Keywords: Asian citrus psyllid, bacterial pathogens, *Citrus sinensis*, comparative epidemiology, epidemiology, greening

Citrus huanglongbing (HLB) is a serious disease that is responsible for tree decline, the decrease of citrus yield, and the increase of production costs in citrus-producing countries (Bassanezi et al. 2020; Graham et al. 2020). This disease is associated with species of phloem-limited α-proteobacteria in the genus '*Candidatus* Liberibacter' (Bové 2006; Teixeira et al. 2005). '*Ca.* L. americanus' (CLam) (Teixeira et al. 2005) and '*Ca.* L. asiaticus' (CLas) (Coletta-Filho et al. 2004) are both associated with HLB in Brazil. These bacterial species are naturally transmitted from diseased to healthy citrus plants by the Asian citrus psyllid (ACP, *Diaphorina citri*) (Capoor et al. 1967; Yamamoto et al. 2006). Although variables of CLas transmission by ACP are well documented, there is little information about CLam (Darolt 2021; Nascimento 2010). CLas acquisition and transmission occurs when psyllids feed on the infected host for ≥1 h, and the rates are positively correlated with confinement time on infected plants (Bonani et al. 2008; Capoor et al. 1974; Pelz-Stelinski et al. 2010). The rate of CLas acquisition by nymphs is higher than by adults (Ammar et al. 2020; Canale et al. 2017). In addition, the efficiency of transmission of CLas by adult *D. citri* is higher when the vector acquired the pathogen as nymph compared with adult (Ammar et al. 2020; Inoue et al. 2009; Pelz-Stelinski et al. 2010). After a latent period of 17 days, psyllids can transmit CLas to a new host for ≤35 days (Canale et al. 2017). Because citrus plants are the most abundant inoculum source of both Liberibacter spp. in orchards, studies focusing on the behavior of CLam and CLas and its interaction with *D. citri* and citrus plants are necessary.

In sweet orange plants (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck), early disease symptoms include the presence of one or more yellow shoots on infected plants. Leaves may become smaller, thicker, and leathery, with enlarged and corky midribs (Bové 2006) on some trees showing yellow shoots. The most characteristic symptom is asymmetrical yellow mottling of the leaves, called blotchy mottle (Bové 2006). Eventually, defoliation and dieback occur in advanced stages of bacterial infection. Fruit from symptomatic branches is small, lopsided, more acidic and bitter, and has a lower juice percentage and total soluble solid content than healthy fruit (Bassanezi et al. 2011). Usually, yield loss is proportionally larger than the symptomatic area in the tree canopy (Bassanezi et al. 2011). The higher the disease severity, the lower the plant yield, especially because of premature fruit drop on affected branches. Despite the similarity of symptoms induced by CLam and CLas, at the same optimal environmental conditions for symptoms expression (22 to 24°C), plants infected with CLam show more conspicuous symptoms than plants with CLas (Lopes et al. 2009a, b; Lopes and Frare 2008).

Initial HLB symptoms are observed 3 months after bacterial inoculation by ACP, although blotchy mottle symptom is usually found between 4 and 6 months, ≤1 year after inoculation (Canale et al. 2019; Lin et al. 2017; Yamamoto et al. 2006). The time interval between ACP inoculation and visual symptoms (i.e., the incubation period) can be related to several factors, such as canopy variety, plant age, and season (Bassanezi and Primiano 2021; Bassanezi et al. 2010; Gottwald 2010; Lin et al. 2017). Symptoms

†Corresponding author: L. Amorim; lilian.amorim@usp.br

Funding: This work was supported by Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus, project 043012), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, project 2007/55013-9), and Citrus Research Development Foundation (project NAS7). First author was granted a Ph.D. scholarship by FAPESP (project 2007/52040-5).

*The *e*-Xtra logo stands for "electronic extra" and indicates there are supplementary figures published online.

The author(s) declare no conflict of interest.

© 2022 The American Phytopathological Society

Pesquisa Agrotóxicos

Not Secure | celepar07web.pr.gov.br/agrotoxicos/pesquisar.asp

ADAPAR

Agrotóxicos no Paraná

legislação | faça sua pesquisa | lista | bulas | cadastro | fale conosco

faça sua pesquisa

Nome do Agrotóxico

Ingrediente Ativo

Registrante

Classificação Toxicologica

Praga: Candidatus liberibacter spp. - Candidatus liberibacter spp.

Situação: Liberado

Classe

Cultura Infestada

Expurgo: Sim Não

Aplicação Aérea: Sim Não

Trat. de Sementes: Sim Não

Pesquisar | Limpar

Alvo Biológico - Nome Científico

Alvo Biológico - Nome Comum

Não há resultados para essa pesquisa.

Informativo Centro de Citricultura

Cordeirópolis, Julho de 2004 • Edição Especial

Reconheça o *Greening* dos Citros

O *greening* é uma doença que afeta a citricultura de vários países da Ásia e da África. O nome da doença está associado ao fato dos frutos das plantas doentes apresentarem manchas de coloração verde, mesmo após o período de maturação. No entanto, seu nome oficial é huanglongbin (HLB), que significa "amarelecimento dos ramos", tendo sido dado por pesquisadores chineses que primeiro descreveram a doença.

No Brasil, o *greening* era considerado uma doença quarentenária A1, isto é, não havia relato da presença do agente causal. No entanto, a partir de informações de citricultores de várias regiões do Estado, o Centro APTA Citros Sylvio Moreira do IAC demonstrou que, em plantas com sintomas muito semelhantes ao *greening*, poderia ser detectada a presença da bactéria causadora da doença. Em função dos sintomas apresentados em ramos e folhas, a doença foi classificada inicialmente como "amarelão".

Sintomas

Como em muitas doenças de sistema vascular que afetam a copa, o *greening* desenvolve sintomas gerais de deficiência nutricional na folhas, ramos e frutos. Os principais são:

- clorose leve a severa (Foto A) com sintomas semelhantes a deficiência de N, Zn ou Fe (Foto F);
- amarelecimento ao longo dos vasos em folhas normais, com mosqueamento de manchas amarelas pontuadas com manchas verdes (Foto D);
- em ramos velhos mais afetados pode ocorrer redução do tamanho da folhas (Foto B);
- frutos de tamanho reduzido (Foto E), deformados (Foto C), com um lado maior que outro;
- frutos tendem a apresentarem manchas verdes e amarelas na casca;
- columela (parte branca no eixo do fruto) também deformada, com presença de vasos amarelados (Foto C);
- sementes abortadas e pequenas (Foto C);
- podem ocorrer manchas no albedo (parte branca da casca) do fruto;
- severa perda de folhas e frutos;
- os sintomas podem se agravar na presença de outras doenças.

Em uma primeira avaliação, os sintomas podem ser confundidos com gomose, severo ataque de rubelose, brocas, ou deficiência nutricional aguda. No entanto, os sintomas nos frutos não deixam muitas dúvidas. Na ausência de frutos, recomenda-se o parecer de um especialista na área.

12-06002-Reconheça o Greening dos Citros.pdf

www.nature.com/scientificreports

scientific reports

Check for updates

OPEN

A new and accurate qPCR protocol to detect plant pathogenic bacteria of the genus '*Candidatus* Liberibacter' in plants and insects

María Quintana-González de Chaves[1,4], Félix Morán[2,4], Silvia Barbé[2], Edson Bertolini[3], Felipe Siverio de la Rosa[1] & Ester Marco-Noales[2✉]

Four pathogenic bacterial species of the genus '*Candidatus* Liberibacter', transmitted by psyllid vectors, have been associated with serious diseases affecting economically important crops of Rutaceae, Apiaceae and Solanaceae families. The most severe disease of citrus plants, huanglongbing (HLB), is associated with '*Ca*. Liberibacter asiaticus' (CaLas), '*Ca*. Liberibacter americanus' (CaLam) and '*Ca*. Liberibacter africanus' (CaLaf), while '*Ca*. Liberibacter solanacearum' (CaLsol) is associated with zebra chip disease in potatoes and vegetative disorders in apiaceous plants. Since these bacteria remain non-culturable and their symptoms are non-specific, their detection and identification are done by molecular methods, mainly based on PCR protocols. In this study, a new quantitative real-time PCR protocol based on TaqMan probe, which can also be performed in a conventional PCR version, has been developed to detect the four known phytopathogenic species of the genus *Liberibacter*. The new protocol has been validated according to European Plant Protection Organization (EPPO) guidelines and is able to detect CaLas, CaLam, CaLaf and CaLsol in both plants and vectors, not only using purified DNA but also using crude extracts of potato and citrus or psyllids. A comparative analysis with other previously described qPCR protocols revealed that this new one developed in this study is more specific and equally or more sensitive. Thus, other genus-specific qPCR protocols have important drawbacks regarding the lack of specificity, while with the new protocol there was no cross-reactions in 250 samples from 24 different plant and insect species from eight different geographical origins. Therefore, it can be used as a rapid and time-saving screening test, as it allows simultaneous detection of all plant pathogenic species of '*Ca*. Liberibacter' in a one-step assay.

The genus *Liberibacter* comprises Gram-negative bacteria belonging to the Rhizobiaceae family (Class: Alphaproteobacteria, order: Rhizobiales)[1,2], whose niche is confined to the phloem of host plants and haemolymph and salivary glands of insect vectors that can transmit them. The main vectors of these bacteria are phloem sap-feeding psyllids species (Hemiptera: Psylloidea), in which they multiply in a persistent, circulative form[3–7]. Most of the species of this genus are associated with important plant diseases such as huanglongbing (HLB), the most devastating citrus disease worldwide, the zebra chip of Solanaceae and vegetative disorders of Apiaceae. A remarkable aspect about these bacteria is the fact that they have not been cultured on laboratory media so far[8,9]. Indeed, only one species in the genus, *Liberibacter crescens*, that is non-pathogenic, has been cultivated[10]. The species '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' (CaLas), '*Candidatus* Liberibacter africanus' (CaLaf)[1] and '*Candidatus* Liberibacter americanus' (CaLam)[11] are associated to HLB. Almost all commercial citrus species and cultivars, regardless of rootstocks, are susceptible to this disease[3,12].

Typical symptoms of HLB are rapid tree decline, including yellow shoots with blotchy mottled leaves, lopsided fruits with color inversion, aborted seeds, leaf and fruit drop and shoot dieback; the disease causes tree death within a few years[3,13], producing billions of dollars of economic losses worldwide annually[14].

[1]Unidad de Protección Vegetal, Instituto Canario de Investigaciones Agrarias (ICIA), 38270 Tenerife, Spain. [2]Unidad de Bacteriología, Centro de Protección Vegetal y Biotecnología. Instituto Vasleniano de Investigaciones Agrarias (IVIA), 46113 Valencia, Spain. [3]Department of Plant Health, Faculty of Agronomys, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre 91540-000, Brazil. [4]These authors contributed equally: María Quintana-González de Chaves and Félix Morán. ✉email: marco_est@gva.es

[A new and accurate qPCR protocol to detect plant pathogenic bacteria of the genus 'Candidatus Liberibacter' in plants and insects | Scientific Reports]

Available online at www.sciencedirect.com
ScienceDirect
Current Opinion in Insect Science

Variations on a theme: factors regulating interaction between *Diaphorina citri* and "*Candidatus* Liberibacter asiaticus" vector and pathogen of citrus huanglongbing

Saeed Hosseinzadeh[1] and Michelle Heck[1,2]

Diaphorina citri, the Asian citrus psyllid, is a vector of *Candidatus* Liberibacter asiaticus (CLas), the causal agent of huanglongbing (HLB), the world's most serious disease of citrus. Owing to the relevancy and urgency of HLB research, the study of transmission biology in the HLB pathosystem has been a significant area of research. The focus of this article is to summarize and synthesize recent advancements in transmission biology between *D. citri* and CLas to create an updated view of the research landscape and to identify avenues for future research. Variability appears to play an important role in the transmission of CLas by *D. citri*. We advocate that it is important to understand the genetic basis for and environmental factors contributing to CLas transmission and how that variation may be exploited to develop and improve HLB control tactics.

Addresses
[1] Plant Pathology and Plant Microbe Biology Section, School of Integrative Plant Science, Cornell University, Ithaca, NY 14853, USA
[2] Emerging Pests and Pathogens Research Unit, USDA Agricultural Research Service, Ithaca, NY 14853, USA

Corresponding author: Heck, Michelle (Michelle.Heck@USDA.gov)

Current Opinion in Insect Science 2023, **56**:101025

This review comes from a themed issue on **Pests and resistance**

Edited by **Anna Whitfield** and **Dorith Rotenberg**

For complete overview about the section, refer "Pests and resistance (June 2023)"

Available online 27 March 2023

https://doi.org/10.1016/j.cois.2023.101025

2214-5745/Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Background on *D. citri* and Liberibacters

D. citri transmits *Candidatus* Liberibacter asiaticus (*C*Las) in a persistent, propagative, and circulative manner. *D. citri* feeds on a wide range of citrus host plants and close relatives of citrus, and host plants impact oviposition and life-stage development [1••]. It reproduces sexually, and while it prefers warm weather, can overwinter [2], which explains its worldwide distribution. Biological variation in *D. citri* populations helps it to tackle ecological and immune hardships [3–5•] and extends to *C*Las transmission efficiency [6–8]. Temperature differences between California and Florida, two major citrus-producing regions in the United States, have been implicated in the stark differences in huanglongbing (HLB) spread within these regions. In California, temperatures may be too low for *D. citri* to complete its life cycle on citrus [which results in lower infection rates], whereas in Florida, temperatures remain permissive for continuous *D. citri* mating and development [9••]. Transmission of *C*Las is intimately linked to the insect's development (Figure 1), where acquisition must occur during the nymphal stage and can be measured quantitatively [10••]. *C*Las acquisition by nymphs is correlated to the amount of *C*Las available in the leaf vascular tissue.

The identification of psyllid genes involved in acquisition and transmission of *C*Las remains a major challenge for the field moving forward because *C*Las is uncultivable [11]. Four chromosomal-length *D. citri* reference genomes have been analyzed using PacBio HiFi and chromatin confirmation contact (Hi-C) sequencing showing 13 chromosomal-length assemblies [12••,13]. These genome assemblies pave the way for sequencing-based approaches such as genome-wide association studies, transcriptome, and proteome analyses to identify the *D. citri* genes that regulate vector competence. Transcriptome analysis across different *D. citri* tissues involved in acquisition and transmission shows that multiple genes change their expression in response to *C*Las infection at different tissue barriers in the psyllid and these vary according to the tissue type [14••]. Mass spectrometry-based proteomics of different psyllid tissues, including the gut and the hemolymph, have identified cytoskeletal, adenosine triphosphate (ATP) transport, reproductive, and immunity proteins differentially expressed in response to *C*Las infection, supporting the transcriptome analysis finding of the complexity of the gene networks involved in *C*Las infection of insect tissues [5,15–17•]. Importantly, psyllids have different color morphs, each with a distinct profile of immunity proteins that respond to *C*Las infection, suggesting that natural variation in the insect immune system plays an important role in determining vectoring ability [5]. Blue psyllids acquire less *C*Las and have a more dampened immune response to *C*Las infection, while nonblue morphs acquire more *C*Las

[Variations on a theme: factors regulating interaction between Diaphorina citri and "Candidatus Liberibacter asiaticus" vector and pathogen of citrus huanglongbing - ScienceDirect]

Departamento de Agronomia
Universidade Estadual de Maringá

Obrigado

Prof.Dr. William M. C. Nunes

Contatos:

wmcnunes@uem.br

fone: 44 - 3011 - 8916

44-99967-5641