

***Candidatus* Liberibacter spp., agentes do huanglongbing dos citros**

Marcos A. Machado^{1*}, Eliane Cristina Locali-Fabris¹ & Helvécio Della Coletta-Filho¹

RESUMO

As bactérias *Candidatus* Liberibacter spp. estão associadas ao *huanglongbing* (HLB, ou *ex-greening*) dos citros, desafiando as principais citriculturas da atualidade. Dentro de cada uma das três espécies de bactérias associadas à doença, *Ca. Liberibacter asiaticus* (Las), *Ca. Liberibacter africanus* (Laf) e *Ca. Liberibacter americanus* (Lam), há baixa diversidade genética, porém são bastantes distintas umas das outras, possibilitando classificá-las como espécies distintas. Ainda se conhece pouco sobre sua biologia em função da incapacidade de cultivá-las rotineiramente. Em decorrência disso, hospedeiros alternativos vêm sendo utilizados para enriquecimento da população bacteriana. Os cultivos relatados para as três espécies ainda não são consistentes e necessitam de reprodutibilidade. Apesar disso, abordagem de metagenoma tanto a partir de DNA total do vetor (*Diaphorina citri*) como de plantas de laranja doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] permitiram o sequenciamento do genoma que apresentou cerca de 1,227 milhões de pares de bases, maior que endossimbiontes obrigatórios, porém menor que outras bactérias fastidiosas vasculares conhecidas. Essa revisão traz informações sobre as bactérias consistentemente associadas ao HLB, particularmente os trabalhos mais recentes sobre a biologia, diversidade, cultivo e genoma.

Termos de indexação: citricultura, doenças de citros, genômica, bactérias, *greening*.

SUMMARY

***Candidatus* Liberibacter spp., citrus huanglongbing agents**

The bacteria *Candidatus* Liberibacter spp. are associated with huanglongbing (HLB or *greening*), challenging the main citrus growing regions today. Within each of the three species of bacteria associated with the disease, *Ca. Liberibacter asiaticus* (Las), *Ca. Liberibacter africanus* (Laf) and *Ca. Liberibacter americanus* (Lam), the genetic diversity is low. However, they are quite distinct from each other, enabling their classification as distinct species. Little is known about their biology because of the inability to cultivate them in vitro routinely. The cultivation reported for the three species are still inconsistent and need reproducibility. Due to this fact, alternative hosts have been used to enrich the bacterial population. Nevertheless, metagenomic approach from both total DNA vector (*Diaphorina citri*) and sweet orange (*Citrus sinensis*) allowed the sequencing of the genome with about 1.227 million base pairs, greater than endosymbionts, but

¹ Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC, Rodovia Anhanguera, km 158, Caixa Postal 4, 13490-970 Corderirópolis-SP

* Autor para correspondência - E-mail: marcos@centrodecitricultura.br

smaller other fastidious vascular bacteria known. This review provides information about the bacteria consistently associated with HLB, especially the most recent studies on their biology, diversity, in vitro cultivation and genome.

Index terms: citriculture, citrus disease, genome, bacteria, greening.

INTRODUÇÃO

No patossistema do *huanglongbing* (HLB ou *ex-greening*) as bactérias *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Ca. L. americanus* e *Ca. L. africanus* têm se tornado consistentemente envolvidas como agentes causais. Essas bactérias, do mesmo grupo de outras bactérias da Ordem Rhizobiales, são capazes de habitar o interior dos vasos de floema, portanto são intracelulares, e causam expressivos distúrbios no metabolismo de seus hospedeiros levando ao quadro de sintomatologia conhecido como HLB, uma das mais destrutivas doenças de citros. Pouco se conhece sobre sua biologia, uma vez que seu cultivo ainda não é feito de modo rotineiro e sistemático. De modo geral, estas bactérias apresentam-se distribuídas de modo errático e em baixas concentrações dentro dos vasos do floema. Assim, hospedeiros alternativos têm sido uma boa estratégia para enriquecimento de população bacteriana e para ampliação dos conhecimentos sobre sua biologia. Vetores também têm sido boa fonte de material para estudos de biologia molecular da bactéria, inclusive para o sequenciamento de seu genoma.

CLASSIFICAÇÃO E DIVERSIDADE

As bactérias causadoras do HLB dos citros são classificadas como α -Proteobacteria, da ordem Rhizobiales e família *Rhizobiaceae*, dentro da qual estão também incluídas bactérias dos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Agrobacterium* e *Sinorhizobium*, muitas delas envolvidas em processos de interação simbiótica com plantas. Inicialmente proposta como *Liberobacter* (Jagoueix et al., 1994), por ser restrita aos vasos do floema, também conhecidos como vasos liberianos, a bactéria teve o nome alterado para *Liberibacter*, para ajuste no nome latino correto.

Por não ser rotineiramente cultivada, recebe a denominação *Candidatus*, como que na condição

de candidato a ter aquela classificação tão logo mais conhecimentos sobre sua biologia sejam acumulados. Nesses casos, o termo *Candidatus* deve ser destacado em itálico, enquanto o nome do gênero e espécie devem ser anotados sem destaque.

Desde os primeiros relatos da associação de organismos procarióticos com plantas com sintomas de HLB nos anos 1970 (Lafleche & Bové, 1970), quando se suponha serem organismos semelhantes à *Rickettsia* (bactérias Gram-negativas intracelulares) e micoplasmas (bactérias sem parede celular e intracelulares), ficou comprovado, através da observação da estrutura da parede celular que esses organismos eram de fato bactérias Gram-negativas (Garnier et al., 1984), de ocorrência restrita aos vasos crivados do floema (Figura 1).

Embora nas plantas de citros a presença de *Ca. Liberibacter* spp. resulte em sintomas bastante evidentes, dados de literatura têm mostrado que a bactéria apresenta distribuição bastante irregular e pode estar presente em baixas concentrações no floema (Hung et al., 1999). Apesar disso, os efeitos de sua patogenicidade são sistêmicos.

Embora as bactérias associadas ao HLB ainda não sejam rotineiramente cultivadas, o que dificulta sobremaneira o estudo de sua biologia, existem várias informações sobre a diversidade desse grupo. Atualmente está claro que o *huanglongbing* é uma síndrome provocada por diferentes espécies de *Ca. Liberibacter* (Bové, 2006), sendo também algumas espécies de fitoplasmas associadas a esta síndrome (Teixeira et al., 2008; Chen et al., 2009). Portanto, é extremamente importante que a diversidade da bactéria seja conhecida, sendo útil não só para o entendimento de sua taxonomia, como da dinâmica da estrutura da população dentro e entre plantas em diferentes ambientes, o que amplia as possibilidades de melhor manejo da doença. Numa revisão abordando diferentes patossistemas, McDonald & Linde (2002) mostraram que o conhecimento da diversidade e da estrutura

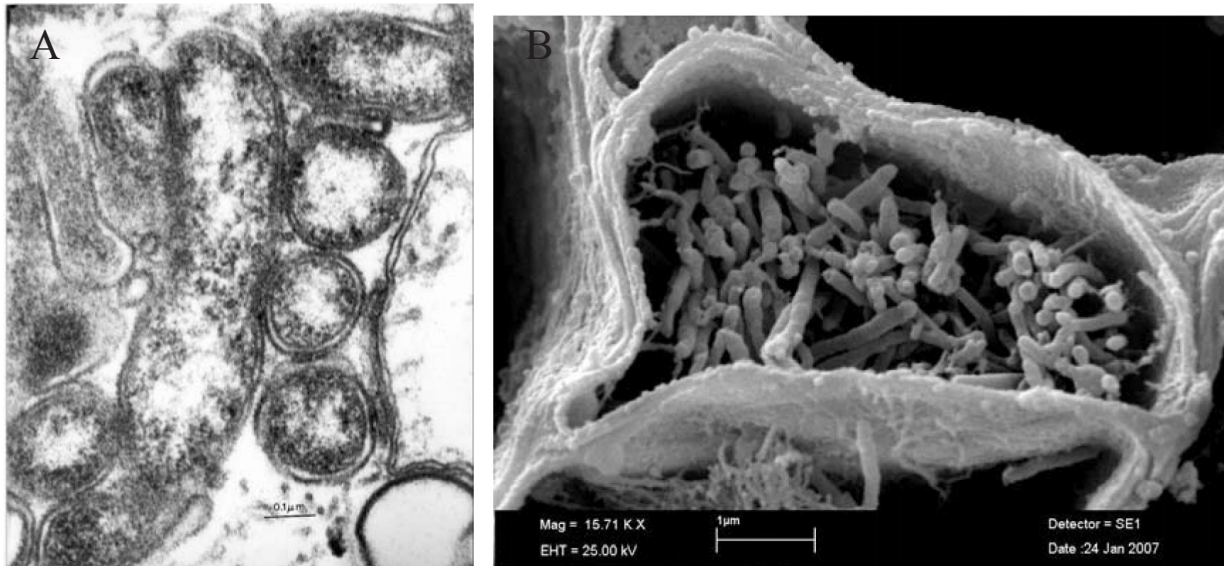


Figura 1: *Candidatus Liberibacter* em microscopia de transmissão em células do floema de laranja (A) e em microscopia de varredura no floema de vinca (B). (Fotos: E.W. Kitajima e F. Tanaka).

genética de populações de fitopatógenos pode ser usado para: *i.*) inferir sobre a ecologia e os processos evolucionários que possam estar moldando a população do patógeno no agroecossistema; *ii.*) fornecer subsídios sobre o potencial evolucionário do patógeno os quais poderão ser usados no melhoramento genético para resistência do hospedeiro.

O estudo de diversidade, além de avaliação do fenótipo da bactéria em diferentes hospedeiros, busca também avaliar as diferenças entre genomas de diferentes isolados. Para tanto, algumas regiões do genoma têm sido particularmente úteis, como o gene da proteína ribossomal 16S, os espaçadores da região entre os genes ribossomais 16S e 23S (Jagoueix et al., 1994, 1997; Subandiyah et al., 2000; Coletta-Filho et al., 2005; Okuda et al., 2005). Além da região ribossomal, a diversidade da bactéria do *huanglongbing* tem sido também investigada a partir de outras sequências do seu genoma, como o gene *omp* que codifica a proteína de membrana *Omp* (outer membrane protein) (Bastianel et al., 2005), o cluster gênico *nusG-rpIKAJL-rpoB* (Villeanoux et al., 1993; Okuda et al., 2005; Lin et al., 2008), e uma região do gene da DNA polimerase de bacteriófago (Tomimura et al., 2009). Porém, com a publicação das sequências genômicas de Las, outros genes alvos poderão ser utilizados para estudos de diversidade, assim como marcadores evolutivamente

mais dinâmicos como os baseados em Sequências Repetitivas Simples (SSR).

A região intergênica 16S/23S tem sequência altamente conservada, de modo que, quando diferenças são observadas entre dois ou mais organismos do mesmo grupo, é possível classificá-los como espécies diferentes, a exemplo da classificação de duas novas espécies da bactéria no Brasil (Coletta-Filho, 2005; Teixeira et al., 2005). Desse modo, tanto as sequências do gene 16S da região intergênica e a do gene 23S prestam-se muito bem para identificar diferenças entre espécies, mas pouco ou nada se aplicam a estudos de diversidade dentro da espécie. Isolados asiáticos e brasileiros de *Ca. L. asiaticus* são idênticos quando comparadas suas sequências de DNA. No entanto, há considerável divergência entre estes e *Ca. L. americanus* (Doddapaneni et al. 2008; Tomimura et al., 2009).

A comparação de outras sequências de DNA de *Ca. L. asiaticus* também tem revelado alta similaridade entre grupos de isolados da Ásia, mas significativa divergência com *Ca. L. africanus* (Jagoueix et al., 1997; Bastianel et al., 2005; Doddapaneni et al. 2008; Tomimura et al., 2009).

As informações sobre diversidade dentro e entre espécies de *Ca. Liberibacter* associadas ao HLB demonstram que efetivamente mais de uma espécie causam a mesma doença, e que essas espécies

devem ter origem comum na Ásia. Mesmo assim, a espécie *Ca. Liberibacter asiaticus* apresenta alta homogeneidade genética, provavelmente associada à reduzida interação com outras comunidades bacterianas (limitação espacial) decorrente de sua localização intracelular ou da sua interação com vetores não polífago, como o psílido *Diaphorina citri*.

Embora consistentemente associada a plantas com sintomas de HLB, ainda persistem dúvidas sobre a participação única de *Ca. Liberibacter* spp. como agentes causais da doença. O co-cultivo de uma actinobactéria junto com *Ca. Liberibacter asiaticus* (Davis et al., 2009), assim como a diversidade de bactérias endofíticas associadas a plantas infectadas e sadias (Sagaran et al., 2009), sugere o envolvimento de comunidades bacterianas no desenvolvimento da doença. Se confirmada essa informação, poderia ser explicado o padrão diferencial de sintomas da doença em plantas clones de mesma idade e condições ambientais, isto é, diferentes populações interagiriam com a população dominante de *Ca. Liberibacter* spp. acentuando ou atenuando os sintomas da doença. Por outro lado, bactérias endofíticas benéficas poderiam ser utilizadas no controle biológico.

Considerando a especificidade que usualmente ocorre entre patógeno e hospedeiro, é interessante destacar que a existência de outras *Liberibacter* causadoras da síndrome HLB em outras regiões do mundo deixa margens para hipóteses sobre suas origens. Se a interação entre a planta e a bactéria é altamente compatível, isto é, leva ao desenvolvimento da doença, é provável que todas as bactérias causadoras de HLB tenham uma origem comum, que deve ser a mesma dos citros. Se a interação apresentar inespecificidade, isto é, a bactéria é capaz de colonizar vários hospedeiros, isso pode ser um indicativo de que as novas espécies eram restritas às novas áreas e que passaram a infectar citros por terem um vetor comum. Ambas as hipóteses são prováveis e ambas se ajustam à baixa competitividade de *Ca. L. americanus*, representada pelo baixo percentual de plantas infectadas com essa espécie em relação a *Ca. L. asiaticus* em seis anos de comprovação da doença no Brasil (Lopes et al., 2009).

BIOLOGIA E HOSPEDEIROS

A incapacidade de cultivo rotineiro de todas as espécies de *Ca. Liberibacter* associadas ao HLB dificulta sobremaneira o melhor conhecimento de sua biologia. Exigências nutricionais, efeito de fatores abióticos sobre a taxa de crescimento, interação com outros microrganismos, hospedeiros e vetor, diversidade, filogenia e genoma são difíceis de serem avaliados sem um adequado sistema de cultivo. No entanto, muitas informações têm sido obtidas em experimentos com transmissão através de tecidos infectados, vetor ou com plantas parasitas do gênero *Cuscuta*.

A partir da transmissão por enxertia com borbulhas infectadas é possível monitorar através de PCR quantitativo, não só a população da bactéria ao longo do tempo, como sua distribuição dentro da planta. Estas informações são importantes na avaliação do período de incubação da doença (da transmissão ao desenvolvimento de sintomas) e na relação entre o título (concentração) da bactéria, o desenvolvimento de sintomas e a disponibilidade da bactéria para ser transmitida pelo vetor. Neste sentido, Coletta-Filho et al. (2010) observaram aumento da concentração da bactéria da ordem de dez mil vezes maior, 210 dias após enxertia, coincidente com o desenvolvimento de sintomas da doença. Portanto, nesse período, mesmo sem sintomas, a planta poderá estar apta a servir de reservatório para transmissão da bactéria pelo vetor. Experimentos colaborativos entre pesquisadores do Centro de Citricultura “Sylvio Moreira”- IAC e a Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba-SP (USP-ESALQ) estão em andamento para se confirmar esta hipótese.

A distribuição da bactéria nos tecidos apresenta-se altamente irregular, o que muitas vezes pode comprometer a amostragem para diagnóstico. Para comprovar isso, a população bacteriana tem sido monitorada por PCR quantitativo em diferentes órgãos e tecidos de plantas. Observa-se variação na concentração da bactéria da ordem de 10^7 a 10^{11} g⁻¹ de tecido, podendo ser detectada em raízes, lâmina foliar, pecíolo e frutos, particularmente no eixo da columela, onde se concentram os feixes vasculares (Tatineni et al., 2008). Em sementes, a bactéria pode ser detectada no tegumento, mas não pode ser comprovada no embrião e

nos cotilédones. A distribuição sistêmica da bactéria na planta, inclusive no sistema radicular, explica porque a poda para eliminação de tecido infectado não funciona no manejo da doença (Lopes & Frare, 2008). Deve ser destacado que o tamanho médio da bactéria está em torno de 0,1 a 2 mm, enquanto os poros da placa crivada dos elementos de vasos do floema têm em média 14 mm (Tatineni et al., 2008; Lin et al., 2010).

Uma das principais alterações anatômicas observadas em tecidos com a bactéria do HLB é a formação e deposição de alta quantidade de calose aparentemente bloqueando os poros da placa crivada, acompanhado de acúmulo de sacarose, provavelmente resultado dos distúrbios de transporte nos vasos do floema. Não ocorre acúmulo considerável de bactéria dentro do vaso crivado, que implique no bloqueio da placa e, diferentemente de outras bactérias do sistema vascular, as bactérias do HLB não parecem formar agregados de biofilme. As alterações anatômicas e bioquímicas são positivamente correlacionadas com a expressão de genes ligados à síntese de amido e proteínas do sistema estrutural e funcional do floema (Kim et al., 2009). Portanto, assim como outras bactérias de floema, o mecanismo de patogenicidade das bactérias do HLB estaria associado à indução de distúrbios metabólicos no hospedeiro, provavelmente em resposta a produtos da bactéria, levando ao desequilíbrio no metabolismo de carboidratos. No entanto, essa hipótese ainda não está completamente comprovada.

As dificuldades no cultivo das bactérias do HLB, não têm impedido o estudo do efeito da temperatura sobre seu crescimento. Mesmo utilizando-se plantas infectadas com espécies diferentes, foi comprovado que temperaturas acima de 27°C afetam de modo significativo a taxa de multiplicação de *Ca. L. americanus*, sendo que acima de 32°C não é mais possível detectá-la. *Ca. L. asiaticus* por sua vez multiplica-se bem até 35°C (Lopes et al., 2009). Assim como foi demonstrado para *Ca. L. africanus* (Schwarz et al., 1972), confirma-se também o efeito da temperatura na biologia dessas bactérias, com implicações no manejo da doença.

Embora a diversidade genética das bactérias do HLB possa ser considerada baixa, elas induzem respostas diferentes em diferentes genótipos de citros e gêneros afins. Essa resposta diferencial tem permitido agrupar diferentes isolados de *Ca. L. asiaticus* em

função da severidade de sintomas que desenvolvem nos hospedeiros. Recentemente Folimonova et al. (2009) agruparam diferentes genótipos de citros em *sensíveis* (apresentam clorose severa nas folhas, redução de crescimento e, eventualmente, morte da planta), *moderadamente tolerantes* (alguns sintomas dispersos, pouca ou nenhuma redução de sintomas, sem indução de morte da planta), *tolerantes* (poucos sintomas), ou genótipos com reação variável (sintomas severos somente em setores da planta com redução de crescimento parcial). Dentre os sensíveis incluem-se as laranjas (*Citrus sinensis*), clementina (*C. clementina* Hort. ex. Tan.), pomelos (*C. paradisi* Macf.) e tangelos (*C. reticulata* Blanco x *C. paradisi*). Nos genótipos com resposta variável à infecção estão as toranjas (*C. grandis* Osbeck), tangerina Cleópatra (*C. reshni* Hort. ex. Tan.) e kumquat (*Fortunella* sp), laranja Azeda (*C. aurantium* L.), limão Volkameriano (*C. volkameriana* Pasq.), citrumelo Swingle (*Poncirus trifoliata* L. Raf. x *C. paradisi*), cidra (*C. medica* L.), limão Tahiti [*C. latifolia* (Yu. Tanaka) Tanaka] Christm.), limão Galego [*C. aurantifolia* (Christm.) Swingle] e tangerina Sue Chu Sha. Como genótipos tolerantes foram confirmados o limão Eureka [*C. limon* (L.) Burm. f.], lima da Pérsia (*C. limettoides* Tanaka), citrange Carrizo (*C. sinensis* x *P. trifoliata*) e *Severinia buxifolia*. Curiosamente *P. trifoliata* não apresenta resposta consistente, uma vez que pode apresentar baixos títulos da bactéria nos seus tecidos.

Monitorando a população bacteriana através de PCR quantitativo foi possível também observar resposta diferencial de genótipos de citros e gêneros afins (Boscariol-Camargo e Cristofani-Yaly, comunicação pessoal). As tangerinas parecem ser as espécies que melhor multiplicam a bactéria, com destaque para a mexerica-do-Rio (*Citrus deliciosa* Ten.) que pode apresentar concentrações da bactéria cerca de 3x maiores que as concentrações encontradas nas tangerinas Ponkan e Cravo (*C. reticulata* Blanco). Fica evidente também que os sintomas são os mesmos em diferentes genótipos. O acompanhamento e comparação entre plantas de tangerina Sunki (*C. sunki* hort. ex. Tan.) e *P. trifoliata* inoculadas com *Ca. Liberibacter asiaticus*, revelou que este último apresentou multiplicação mais tardia e menor concentração da bactéria em relação à tangerina Sunki, no período de um ano. Como em *P.*

trifoliata, a taxa de infecção foi menor, a multiplicação da bactéria foi mais lenta, apresentando menor título, sugere-se que essa espécie apresenta maior tolerância à bactéria do HLB.

Análises com os oito gêneros afins (*Severinia*, *Microcitrus*, *Atalantia*, *Poncirus*, *Eremolemon*, *Fortunella*, *Merope*, e *Micromellum*) confirmaram a presença da bactéria em todas as plantas, porém com variação na concentração do inóculo ao longo dos meses. De modo geral, houve aumento na concentração da bactéria no tecido da planta nos meses mais frios, entre julho e setembro, mas todas apresentaram uma redução no número inicial de cópias do 16S rDNA bacteriano detectado.

A maior redução na concentração da bactéria foi observada nos gêneros *Atalantia*, *Poncirus*, *Eremolemon* e *Microcitrus*, chegando a diminuir de 10^5 para 10^1 16S ml^{-1} do DNA bacteriano em *Atalantia* e de 10^9 para 10^5 NC-16S ml^{-1} em *Microcitrus*. Estes resultados sugerem uma maior tolerância desses genótipos à presença da bactéria, podendo ser interessante aprofundar os estudos nestes gêneros para entender quais mecanismos de tolerância ao HLB estão sendo ativados.

Fica evidente, portanto, que as bactérias do HLB podem se multiplicar em todos os genótipos de citros e gêneros próximos, porém a resposta desses genótipos, representada pelos sintomas da doença, é extremamente variável. Fica claro também que não existe genótipo imune à bactéria dentro do grupo dos citros e afins. Dessa forma, a busca por resistência deverá focalizar outras abordagens.

Experimentalmente as bactérias do HLB podem ser também transmitidas a hospedeiros alternativos, como vinca (*Catharantus roseus*) e tabaco (*Nicotiana tabacum*) através da conexão vascular estabelecida por plantas parasitas do gênero *Cuscuta* spp., nas quais estas bactérias também induzem sintomas de clorose (Scheler et al. 2009), redução de crescimento e morte da planta (Figura 2). Além de se multiplicarem em taxas muito maiores que em citros (Locali-Fabris et al., 2008), o uso de hospedeiros alternativos tem sido uma opção para avaliação de respostas da bactéria a antibióticos (penicilina) e biocidas (DBNPA, 2,2-dibromo-3-nitropropionamida), sendo evidenciada a eliminação da bactéria e promoção de crescimento das plantas (Zhang et al., 2010).

CULTIVO E GENOMA

Embora tenha havido muitas tentativas de cultivo da bactéria sem sucesso, alguns relatos de cultivo são promissores, porém a maioria ainda é inconclusivo. Os primeiros relatos sobre cultivo de organismos associados ao HLB remontam da década de 1970 (Gosh et al., 1971) e 1980 (Garnett, 1985), quando ficou estabelecida a associação com bactérias. No entanto, esses trabalhos não se confirmaram e somente com a expansão da doença nos anos 2000 é que novos relatos foram publicados sobre seu cultivo.

Em 2008 Davis e colaboradores, utilizando meios de cultura complexos, obtiveram culturas de bactérias a partir de tecidos infectados com *Ca. L. asiaticus*, que

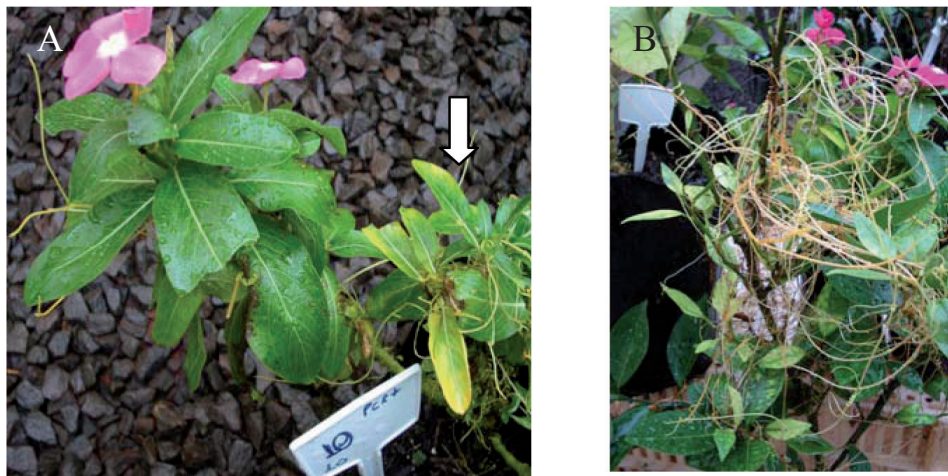


Figura 2: Aspecto geral de plantas (A) de vinca sadia e infectada (seta) e (B) e de laranja fonte de *Ca. Liberibacter* para transmissão por *Cuscuta*.

se mostraram positivas para a presença da bactéria, mas co-cultivada com outra bactéria, possivelmente uma Actinobacteria semelhante à *Propionibacterium acnes*, bactéria associada à acne humana. São informações que, se confirmadas, podem corroborar a hipótese que o HLB poderia estar associado a mais de uma bactéria agindo de modo sinérgico.

Scheler et al. (2009) estabeleceram um meio definido denominado Liber A, a partir de meios testados para outros organismos fastidiosos, com adição de fosfatos, NADP, cicloheximida e extrato de homogeneizado de pecíolo e nervura central de folha de laranja doce. De acordo com os autores, utilizando esse meio é possível isolar e cultivar as três espécies de *Ca. Liberibacter* associadas ao HLB. Infiltrando a bactéria em folhas, os autores teriam reproduzido os sintomas de HLB, embora não tenha sido possível observar sintomas em frutos em função da reduzida idade das plantas testadas. Embora o postulado de Koch não tenha sido completamente preenchido, os autores consideram que seus resultados confirmam a associação dessas bactérias com HLB em citros. Como em todo trabalho científico, a repetição desses resultados em outros grupos, tem sido a fase crítica para seu completo estabelecimento.

A principal dificuldade em concluir o sequenciamento completo do genoma das bactérias do HLB está no fato de elas não serem cultivadas rotineiramente. Desse modo, para a obtenção de DNA com qualidade mínima para sequenciamento deve-se proceder a abordagens alternativas, entre elas metagenoma, seja de DNA total de plantas infectadas (citros ou vinca) ou do vetor, que pode ser complementada com imunocaptura da população bacteriana no seu interior. O termo metagenômica significa a análise genômica de comunidades de microrganismos usualmente não cultivados (Schloss & Handelsman, 2003). A técnica consiste na análise biológica de comunidades de microrganismos presentes em nichos como solo, ambiente aquático, biofilmes, órgãos humanos, entre outros, através da montagem, sequenciamento e análise de bibliotecas metagenômicas de DNA total (Breitbart et al., 2002; Venter et al., 2004). Embora essa abordagem possibilite a obtenção de DNA de qualidade, sua concentração ainda é muito baixa, o que impede a construção de bibliotecas de fragmentos

menores de DNA para sequenciamento. No entanto, através de amplificação por PCR de fragmentos longos de DNA é possível obter fragmentos que podem ser clonados e sequenciados.

Duan et al. (2009) utilizando a estratégia de metagenoma de vetores infectados (na ordem de $1,29 \times 10^{10}$ cópias do genoma da bactéria/psilídeo), apresentaram a primeira versão do genoma completo de *Ca. L. asiaticus*. Com uma cobertura de 16 vezes, obtida através de pirosequenciamento, o genoma circular da bactéria foi estimado em 1.227.204 pares de bases (ou 1,227 Mb), contendo aproximadamente 1186 genes, sendo 74% homólogo ao de outras bactérias. *Candidatus Liberibacter solanacearum* é uma espécie bacteriana associada à doenças também transmitidas por psilídeos à solanáceas, como batata e tomate (Liefiting et al., 2009; Li et al., 2009) e até o momento considerada a primeira *Liberibacter* a infectar naturalmente hospedeiros fora da família *Rutaceae* (Liefiting et al., 2009). Antes da apresentação completa do genoma de *Ca. Liberibacter asiaticus*, comparações genômicas, utilizando resultados de sequenciamento quase total dos genomas de *Ca. Liberibacter solanacearum* (CLso) e *Ca. Liberibacter asiaticus* (CLas), evidenciaram tamanho e composição genômica muito similares entre estas espécies (Tabela 1).

De modo geral, o genoma de *Ca. L. asiaticus* apresenta similaridade com bactérias da família *Rhizobiaceae*, com limitada capacidade respiratório-aeróbica e aparente dependência do metabolismo de nitrogênio (aminoácidos) para obtenção de energia. Além do mais, a bactéria possui um complexo sistema de transportadores, que normalmente são limitados em bactérias intracelulares como *Ca. L. asiaticus*. Não foram encontrados genes típicos associados a patogenicidade, sugerindo que essa bactéria teria um estilo de vida parasitária, com reduzida interação ativa com seu hospedeiro. Os autores concluem que provavelmente a bactéria provoca a doença ao interferir com mecanismos de transporte no floema, seja por bloquear as placas crivadas, seja por desbalanço no metabolismo de açúcar. Por outro lado, a bactéria apresenta um genoma relativamente maior e atípico de bactérias intracelulares.

Os resultados de Duan et al. (2009) foram confirmados por Tyler et al. (2009) com abordagem metagenômica de tecidos de floema de plantas de laranja

Tabela 1. Análises comparativas entre genomas de espécies de *Ca. Liberibacter* (Duan et al., 2008)

Características genômicas	CLso	CLas
Tamanho do Genoma (nº de pares de bases)	1.247.299	1.226.704
GC %	35,1	36,5
CDS	1.126	1.124
rRNA Operons	3	3
tRNA	45	44
Proteínas hipotéticas	385	362
Pseudogenes	31	32
Tipos de proteínas de Transporte		
Classe I – Canais/Poros	12	09
Classe II – Potencial eletroquímico e transporte dirigido	20	24
Classe III – Transportadores primários ativos	101	92
Transportadores ABC	41	40
Sistema de secreção - Tipo I e Tipo II	07	09
Classe IV – Grupo de Translocadores	01	01
Classe IX – Sistema de Transporte não caracterizado completamente	11	11
Total de Proteínas de Transporte	142	137

doce com HLB. No entanto, a principal conclusão desse trabalho foi a confirmação da ocorrência de somente *Ca. L. asiaticus* associado a plantas doentes, ao contrário do que foi sugerido por Davis et al. (2009) e Sagaram et al. (2009).

Cada vez mais se consolida a associação das bactérias *Ca. Liberibacter* spp. com o *huanglongbing*. Se elas são bactérias originalmente endossimbiontes nos insetos e que podem também interagir com a planta, ainda é uma hipótese a ser provada. Seu genoma de cerca de 1,227 Mb é maior do que de bactérias endossimbiontes de insetos, que podem apresentar genoma menor (cerca de 0.6 Mb) e altíssima especialização nas interações endossimbióticas com seu hospedeiro. Por outro lado, seu genoma é menor que algumas bactérias fastidiosas, como *Xylella fastidiosa* (2,4 Mb), indicando menor especialização, porém dependência completa do hospedeiro para sobreviver.

CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Apesar do pouco tempo de constatação do HLB em São Paulo e na Flórida, já houve significativo avanço no conhecimento de agentes causais. No entanto, sem um eficiente sistema de cultivo, os avanços na fisiologia e genética ficam restritos e nem sempre são conclusivos. O tamanho do genoma da bactéria, leva à hipótese que possa ser um organismo com relativa autonomia metabólica em

relação aos seus hospedeiros, ampliando as perspectivas para cultivo e manutenção *in vitro*. O conhecimento de sua diversidade permitiu o desenvolvimento de um adequado sistema de diagnóstico baseado em amplificação de DNA, porém essa metodologia nem sempre tem a rapidez necessária para acompanhar o progresso da doença, principalmente em plantas assintomáticas. Cada vez mais fica claro que, monitorar a doença através de sintomatologia nem sempre permite uma precisa avaliação do período de incubação da bactéria.

Hospedeiros alternativos para multiplicação da bactéria, como vinca, têm se prestado muito bem para o melhor entendimento da bactéria e o teste de produtos que eventualmente poderiam ser utilizados no seu controle. No entanto, o modelo de planta herbácea anual nem sempre se aplica à planta lenhosa perene.

O foco na biologia da bactéria deve ser mantido e ampliado, pois somente assim será possível avaliar melhor as interações com seus hospedeiros, seja a planta ou seja o vetor. Seguramente daí surgirão abordagens de controle mais seguras e fundamentadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bastianel C, Garnier-Semancik M, Renaudin J, Bove JM & Eveillard S (2005) Diversity of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*,” based on the *omp* gene sequence. Appl. Environ. Microbiol. 71: 6473-6478.

- Bové JM (2006) Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology* 88: 7-37.
- Breitbart M, Hewson I, Felts B, Mahaffy JM, Nulton J, Salamon P & Rohwer F (2003) Metagenomic Analyses of an Uncultured Viral Community from Human Feces. *J. Bacteriol.* 185(20): 6220–6223.
- Chen J, Pu X, Deng S, Liu L, Li H & Civerolo EE (2009) A phytoplasma related to ‘*Candidatus Phytoplasma asteris*’ detected in citrus howing huanglongbing (yellow shoot disease) symptoms in Guangdong, P. R. China. *Phytopathology* 99(3): 236-242.
- Coletta-Filho HD, Takita MA, Targon MLPN & Machado MA (2005) Analysis of 16S rDNA sequences from citrus huanglongbing bacteria reveal a different ‘*Ca. Liberibacter* strain associated with citrus disease in São Paulo. *Plant Disease* 89: 848-852.
- Coletta-Filho HD, Carlos EF, Alves KCS, Pereira MAR, Boscaroli-Camargo RL, Souza AA & Machado MA (2010) *In planta* multiplication and graft transmission of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ revealed by Real-Time PCR. *European Journal of Plant Pathology* 126(1): 53-60.
- Davis MJ, Mondal SN, Chen H, Rogers ME & Brlansky RH (2009) Co-cultivation of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ with Actinobacteria from citrus with huanglongbing. *Plant Disease* 92: 1547-1550.
- Doddapaneni H, Liao H, Lin H, Xianjin B, Xiaolong Z, Civerolo E, Irey M, Coletta-Filho HD & Gerhard P (2008) Comparative phylogenomics and multigene cluster analyses of the Citrus Huanglongbing (HLB)-associated bacterium *Candidatus Liberibacter*. *BMC Research Notes* 1: 72.
- Duan Y, Zhou L, Hall DG, Li W, Doddapaneni H, Lin H, Liu L, Vahling CM, Gabriel DW, Williams KP, Dickerman A, Sun Y & Gottwald T (2009) Complete genome sequence of citrus huanglongbing bacterium, ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ obtained through metagenomics. *Mol. Pl. Microb. Interaction* 22(8): 1011-1020.
- Duan YP, Zhou LJ, Hall D, Li WB, Liu L & Gottwald T (2008) Genome sequencing of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the causal agent of citrus Huanglongbing (greening) in Flórida. 11th International Citrus Congress, Wuhan, China, 52 p.
- Folimonova SY, Robertson CJ, Garnsey SM, Gowda S & Dawson WO (2009) Examination of the responses of different genotypes of citrus to *Huanglongbing* (citrus greening) under different conditions. *Phytopathology* 99:1346-1354.
- Garnett HM (1985) Isolation of the greening organism. *Citrus Subtrop. Fruit J.* 611: 4-6.
- Garnier M, Danel N & Bové JM (1984) The greening organism is a gram-negative bacterium, p. 115-124. *In.* Garnsey SM, Timmers LW & Dodds JA (eds.) *Proceedings of the 9th International Conference of Citrus Virologists.* University of California, Riverside.
- Ghosh SK, Raychaudhuri SP, Varma A & Nariami TK (1971) Isolation and culture of mycoplasma associated with greening disease. *Curr. Sci* 40: 299-300.
- Hung TH, Wu ML, Su HJ (1999) Development of a rapid method for the diagnosis of citrus greening disease using the Polymerase Chain Reaction *Journal of Phytopathology* 147: 599-604.
- Jagoueix ES, Bové JM & Garnier M (1994) The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the α -subdivision of the proteobacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 379-386.
- Jagoueix ES, Bové JM & Garnier M (1997) Comparison of the 16S/23S ribosomal intergenic region of *Candidatus Liberobacter asiaticum* and *Candidatus Liberobacter africanum*, the two species associated with citrus huanglongbing (greening) disease. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 224-227.
- Kim JS, Sagaram U, Burns JK, Li JL & Wang N (2009) Responses of sweet orange (*Citrus sinensis*) to ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ infection: microscopy and microarray analyses. *Phytopathology* 99 (1): 50-57.
- Lafleche D & Bové JM (1970) Structures de type mycoplasme dans les feuilles d’orangers atteints de la maladie du greening. *C. R. Acad. Sci. Ser. D* 270:1915-1917.
- Li W, Abad JA, Frenc-Monar RD, Rascoe J, Wen A, Gudmestad NC, Secor GA, Lee IM, Duan Y & Levy

- L (2009) Multiplex real-time PCR for detection, identification and quantification of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' in potato plants with zebra chip. *J. Microbiol Methods* 78:59-65.
- Liefting LW, Sutherland PW, Ward LI, Paice KL, Weir BS & Clover GRG (2009) A new '*Candidatus Liberibacter*' species associated with diseases of solanaceous crops. *Plant Dis.* 93:208-214.
- Lin H, Doddapaneni H, Bai X, Yao J, Zhao X & Civerolo E (2008) Acquisition of uncharacterized sequences from '*Candidatus Liberibacter*', an unculturable bacterium, using an improved genomic walking method. *Mol. Cell. Probes* 22: 30-37.
- Lin H, Chen C, Doddapaneni H, Duan Y, Civerolo EL, Bai X & Zhao X (2010) A new diagnostic system for ultra-sensitive and specific detection and quantification of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the bacterium associated with citrus Huanglongbing. *Journal of Microbiological Methods* 81(1): 17-25.
- Locali-Fabris EC, Coletta-Filho HD, Francisco CS, Alves KCS, Pereira MAR, Carlos EF & Machado MA (2008) *Candidatus liberibacter americanus*: quantification in *Citrus sinensis* L. Osbeck and in *Catharantus roseus* plants In: 11. international Citrus Congress, p. 231.
- Lopes SA & Frare GF (2008) Graft transmission and cultivar reaction of citrus to '*Candidatus Liberibacter americanus*'. *Plant Disease* 92: 21-24.
- Lopes SA, Frare GF, Bertolini E, Cambra M, Fernandes NG, Ayres AJ, Marin DR & Bové JM (2009) *Liberibacter* associated with citrus *huanglongbing* in Brazil: *Candidatus Liberibacter asiaticus* in heat tolerant, *Ca. L. americanus* is heat sensitive. *Plant Disease* 93 (3): 257-263.
- McDonald BA & Linde C (2002) Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* 40: 349-379.
- Okuda M, Matsumoto M, Tanaka Y, Subandiyah S & Iwanami T (2005) Characterization of the *tufB-secE-nusG-rplKJL-rpoB* gene cluster of the citrus greening organism and detection by loop-mediated isothermal amplification. *Plant Dis.* 89: 705-711.
- Sagaram US, Kristen MA, Pankaj T, Andersen GL, Lu SE & Wang N (2009) Bacterial diversity analysis of *huanglongbing* pathogen-infected citrus, using PhyloChip arrays and 16S rRNA gene clone. *Applied Environ. Microbiology* 75(6): 1566-1574.
- Scheler A, Schuenzel EL, Cooke P, Donnua S, Thaveechai N, Postnikova E, Stone AL, Schneider WL, Damsteegt VD & Shaad NW (2009) Cultivation of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*', '*Ca. L. africanus*', and '*Ca. L. americanus*' associated with huanglongbing. *Phytopathology* 99 (5): 480-486.
- Schloss PD & Handelsman J (2003) Biotechnological prospects from metagenomics. *Current Opinion in Biotechnology* 14(3): 303-310.
- Schwarz RE & Green GC (1972) Heat requirements for symptoms suppression and inactivation of the greening pathogen, p. 44-51. In: Price WC (ed) *Proceedings of the 5th International Conference of the Citrus Virologists*, University of Florida, Gainesville, FL.
- Subandiyah S, Iwanami T, Tsuyumu S & Ieki H (2000) Comparison of 16S rDNA and 16S/23S intergenic region sequences among citrus greening organisms in Asia. *Plant Dis.* 84: 15-18.
- Tatineni S, Sagaram US, Gowda S, Robertson CJ, Dawson WO, Iwanami T & Wang N (2008) In planta distribution of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' as revealed by polymerase chain reaction (PCR) and real-time PCR. *Phytopathology* 98(5): 592-599.
- Teixeira DC, Saillard C, Eveillard S, Danet JL, Ayres AJ & Bové JM (2005) *Candidatus Liberibacter americanus* associated with citrus huanglongbing (greening disease) in São Paulo State, Brazil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55:1857-1862.
- Teixeira DC, Wulff NA, Martins EC, Kitajima EW, Bassanezi RB, Ayres AJ, Eveillard S, Saillard C & Bové JM (2008) A phytoplasma closely related to the pigeon pea witches-broom phytoplasma (16Sr IX) is associated with citrus huanglongbing symptoms in the State of São Paulo, Brazil. *Phytopathology* 98(9): 977-984.
- Tomimura K, Miyata S, Furuya N, Kubota K, Okuda M, Subandiyah S, Hung TH, Ji H & Iwanami T (2009) Evaluation of genetic diversity among '*Candidatus*

Liberibacter asiaticus' isolates collected in Southeast Asia. *Phytopathology* 99(9): 1062-1069.

Tyler HL, Roesch LFW, Gowda S, Dawson WO & Triplett EW (2009) Confirmation of the sequence of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' and assessment of microbiological diversity in huanglongbing-infected citrus phloem using a metagenomic approach. *Mol. Pl. Microb. Interaction* 22 (12): 1624-1634.

Venter JC, Remington K, Heidelberg JF, Halpern AL, Rusch D et al. (2004) Environmental genome shotgun sequencing of the sargasso sea. *Science* 304:66-74.

Villechanoux S, Garnier M, Laigret F, Renaudin J & Bové J (1993) The genome of the non-cultured, bacterial-like organism associated with citrus greening disease contains the *nusG-rplKAJL-rpoBC* gene-walking method. *Curr. Microbiol.* 26:161-166.

Zhang M, Duan Y, Zhou L, Tueckek WW, Stover E & Powell CA (2010) Screening molecules for control of citrus huanglongbing using an optimized regeneration system for '*Candidatus Liberibacter asiaticus*'-infected periwinkle (*Catharanthus roseus*) cuttings. *Phytopathology* 100(3): 239-245.