



Informativo Centro de Citricultura

Cordeirópolis, Janeiro de 2011 • Número 188

Evento internacional sobre HLB aponta avanços e perspectivas



The 2nd International Research Conference on Huanglongbing 2011

A 2ª Conferência Internacional sobre Pesquisa com *Huanglongbing* (HLB) reuniu de 10 a 14 de janeiro, em Orlando, Flórida, Estados Unidos, cerca de 400 pessoas, de 21 países, entre eles os EUA (268 representantes), Brasil (45), México (21), além de vários outros países da América Central (Costa Rica) e do Sul (Argentina, Guiana), Caribe (Cuba, República Dominicana, Jamaica), África (Zimbábue, Camarões, África do Sul, Nigéria), Europa (Inglaterra, França), Ásia (China, Japão, Coréia, Índia, Vietnã) e Oriente Médio (Israel). O Centro de Citricultura apresentou trabalhos na conferência, tendo sido representado pelos pesquisadores Helvécio Della Coletta Filho, Juliana Freitas-Astúa (Embrapa Mandioca e Fruticultura) e Marcos A. Machado.

A dimensão do evento tem explicação na rápida expansão da doença nos EUA, onde, estima-se que, 18% das plantas estejam contaminadas. Sua organização ficou sob responsabilidade da Universidade da Flórida/IFAS, do USDA/ARS e da Division of Plant Industry of Florida Department of Agriculture and Consumer Service, sob administração da Florida Citrus Mutual.

Assim como ocorreu na primeira conferência, realizada em 2008, o objetivo principal foi reunir toda a comunidade internacional envolvida com pesquisa e manejo de HLB, atualizar resultados de pesquisa e fomentar interações entre grupos e setores. Foram apresentados 171 trabalhos, sendo 75 orais e 96 na forma de pôsteres. A programação completa pode ser consultada, em inglês, em <http://www.irchlb.org/hlb.aspx>.

Esta edição do Informativo Centro de Citricultura traz uma síntese dos resultados de maior destaque que foram apresentados na Conferência. Confira a seguir:

Sobre a bactéria

A sessão abordou vários aspectos básicos e aplicados de *Candidatus Liberibacter* spp, com destaque para *Ca. L. asiaticus*, que tem sido a espécie mais estudada entre as três associadas ao HLB. Estudos sobre o genoma da bactéria demonstram a ocorrência de fagos (vírus que infectam bactérias) que podem estar associados à adaptação e que poderiam ser utilizados como alvos para controle desse patógeno.

Embora apresente genoma muito reduzido em tamanho, a bactéria ainda mantém conjuntos de genes semelhantes ao de outras bactérias intracelulares de mamíferos, ou bactérias dos grupos *Sinorhizobium* e *Agrobacterium*, dos quais é associada filogeneticamente. Interessantemente foram encontrados operons (= conjunto de genes com regulação única) para absorção de zinco, indicando que esse pode ser um dos mecanismos de patogenicidade da bactéria. Destaque-se que os sintomas de HLB muitas vezes se assemelham aos de deficiência de Zn. Esses genes poderiam também ser nocauteados dentro de uma estratégia de controle da bactéria dentro da planta.

O genoma de *Ca. L. americanus*, em fase final de conclusão, revela semelhanças com *Ca. L. asiaticus*, porém com suficiente diferença para caracterizar outra espécie. É possível que da comparação entre ambos os genomas sairá a resposta do porquê da queda na população de *Ca. L. americanus* e aumento da de *Ca. L. asiaticus* no Brasil. Isso

poderia estar associado a profagos observados na forma asiática da bactéria.

A partir de marcadores moleculares tem sido possível monitorar as populações da bactéria e sua origem, assim como comprovar a existência de diferentes genótipos da bactéria dentro da planta. Pelos menos seis genótipos já foram observados, com predominância do genótipo G na Flórida.

As tentativas de cultivo da bactéria avançam, porém sem um protocolo inteiramente estabelecido. O co-cultivo com células de *Diaphorina citri*, do mosquito *Aedes albopictus* e da mosca *Drosophila melanogaster* parece manter o crescimento da bactéria por mais de 18 repicagens.

Sobre diagnóstico e levantamento da bactéria

A técnica de PCR ainda é o melhor método de detecção da bactéria, mas variações dela tem sido desenvolvidas, garantindo mais eficiência e sensibilidade. Muitos dos novos alvos para PCR estão sendo obtidos a partir de informações sobre seu genoma. A detecção da bactéria no vetor tem sido uma estratégia para monitorar áreas livres, mas a metodologia deve ser ajustada, principalmente porque psílides coletados no campo tem título muito irregular da bactéria.

Análises espectroscópicas tem se mostrado promissoras, mas ainda necessitam validação e integração com diferentes técnicas. Por outro lado, o uso de anticorpos policlonais específicos contra a bactéria parece ser a melhor promessa para o desenvolvimento de um sistema simples, rápido e barato de diagnóstico em condições de campo. Tal metodologia encontra-se em desenvolvimento no Centro de Citricultura. (Continua nas páginas 2 e 3)

Editorial

Avanços possíveis

A 2ª Conferência Internacional sobre Pesquisa com Huanglongbing, realizada na Flórida em janeiro, reuniu os principais grupos de pesquisa do mundo envolvidos no entendimento desse patossistema. Foi uma valiosa oportunidade de atualização de conhecimento e integração, tendo ficado claro que a construção do conhecimento sobre HLB é como montar um quebra-cabeças, cujo número de peças ainda é completamente desconhecido.

Em que pese a existência de recursos aplicados, principalmente pela Citrus Research and Development Foundation (ex-FCPRAC), o avanço no conhecimento ainda não atingiu níveis aplicáveis ao produtor. Grande parte do atual modelo de manejo da doença origina-se de trabalho executado pelas empresas no Brasil, resultado da necessidade urgente de se manter competitivo, mesmo com a ocorrência de HLB no pomar.

É claro que esse conhecimento aplicado somente se sustenta se for validado no tempo e no espaço a partir de experimentos controlados. De todo modo, o volume acumulado de conhecimento sobre HLB, desde que ele foi comprovado no Brasil em 2004, atingiu níveis muito superiores àqueles acumulados em quase cem anos da descrição da doença.

Nota-se a evidente impaciência com que parte do setor citrícola acompanha o desenvolvimento das pesquisas sobre o HLB. Parece haver a certeza que a solução surgirá a qualquer momento, como resultado de um lance de sorte, ou - quem sabe - de uma genialidade oculta. Com certeza reside aí a elevada importância que dão a "pesquisa de curto prazo", como aquela que deveria trazer respostas e soluções rápidas.

A natureza complexa do HLB, assim como de outros problemas que afetam a citricultura, mais uma vez alerta para a necessidade de continuidade e competência. Curiosamente, continuidade é garantida com o apoio de projetos de fomento de agências públicas (Fapesp e CNPq, especialmente). Competência deveria ser mantida pela valorização das equipes, o que absolutamente não é feito pelos responsáveis pela pesquisa no Estado, muito menos por parte do setor privado.

Portanto, os avanços obtidos no conhecimento do HLB são aqueles possíveis face às circunstâncias.

Urge ampliar e capacitar as equipes. Sem o fator humano não tem sentido o financeiro.

Matéria de Capa

Avaliando-se a incidência temporal de sintomas, confirmados por PCR quantitativo (qPCR), observa-se que, nas condições da Flórida, a melhor época para coleta de material para análise é de agosto a janeiro (equivalente a fevereiro-julho no Brasil), com maior percentagem de plantas positivas também nesse período. Em épocas menos favoráveis à doença, somente folhas com sintomas de mosqueado indicam a presença da bactéria. Em épocas favoráveis à doença, vários outros tipos de sintomas foliares são também positivos por qPCR.

Com relação aos psilídeos, a maior fração de insetos positivos para a bactéria é encontrada nos meses de outubro a maio (equivalentes a abril-novembro no Brasil). No entanto, a maior incidência do vetor é constatada entre abril e novembro. Portanto, a melhor época de ocorrência do vetor nem sempre é a melhor época para se encontrar vetores infectados.

O fato comum é que a bactéria tem distribuição muito irregular na planta, comprometendo a amostragem e o diagnóstico. Para efeito de manejo, o HLB deve ser considerado uma doença de populações de plantas (talhões, pomares), ou seja, mais do que uma doença de plantas individuais.

Sobre o vetor

Estudos de população de *Diaphorina citri* identificam pelo menos duas entradas independentes nos Estados Unidos. Por outro lado, a avaliação de populações de endosimbiontes revela que a maior diversidade de bactérias ocorre na fase de ovo. Quando eles estão infectados com *Ca. L. asiaticus*, outra espécie de bactéria, ainda não identificada, ocorre simultaneamente. Se essa interação for comprovada, essa bactéria seria potencial alvo para reduzir a infectividade do vetor.

Trabalhos com RNA interferente (iRNA) tem se tornado cada vez mais frequentes como estratégia de controle de insetos. Utilizando dsRNA de genes alvo do psilídeo, tem sido possível reduzir experimentalmente a população do vetor. É uma estratégia promissora e poderá substituir, em muito, o uso de inseticidas no futuro próximo. Se a técnica será efetiva em reduzir a capacidade de transmissão, ainda é uma questão aberta. Nesse sentido, as informações sobre o genoma de *Diaphorina citri*, prestes a serem publicadas, serão de grande valia na obtenção de novos alvos potenciais. Alguns produtos encontram-se em fase de licenciamento.

Por meio de estudos com sinais químicos captados pela antena do psilídeo, alguns compostos voláteis com forte efeito atrativo

estão sendo identificados. Tais compostos deverão contribuir no manejo integrado do inseto.

Considerando-se ainda a biologia do inseto, observa-se que a ninfa é a fase mais eficiente na aquisição da bactéria, assim como a ótima temperatura para aquisição está ao redor de 25°C. Outro fato é que o título da bactéria no inseto decresce com a sua idade, isto é, aparentemente, insetos mais velhos seriam menos eficientes na transmissão que insetos jovens. Por outro lado, insetos contaminados tem menor tempo de vida, maior postura e desenvolvimento mais rápido.

Curiosamente, os insetos são mais atraídos por plantas doentes, porém escolhem plantas sadias para continuar sua geração. O fato deve estar associado à rápida disseminação da doença em áreas endêmicas. Foi ainda demonstrado que a bactéria do HLB pode ser transmitida durante o acasalamento.

Estudos com monitoramento de prova estiletar esclarecem sobre o comportamento alimentar do psilídeo em plantas tratadas com inseticidas sistêmicos ou de contato. Chlorpyrifos, fenpropathrin e spinotoram (não sistêmicos) alteram o comportamento alimentar do vetor e seriam recomendados para prevenir aquisição e inoculação. Por outro lado, aldicarb e spirotetramat (sistêmicos) não alteram o comportamento do inseto, o que deve possibilitar inoculação do patógeno antes de morrer. Imidacloprid e thiamethoxan (sistêmicos) foram os inseticidas mais efetivos em redução da picada de prova e morte do inseto, com efeito por até 95 dias. Outros inseticidas como dimethoato e lambdacyhalothrin previnem alimentação em folhas adultas, porém com menor proteção em brotações. Óleo mineral, por sua vez, tem moderado efeito de poucas horas na alimentação.

Em condições de campo, a escolha do inseticida e da forma de aplicação deverá levar em consideração a idade da plantas, condições climáticas e condições do solo. Destaque-se que o uso intensivo de muitos desses inseticidas tem favorecido a seleção de populações resistentes, principalmente a chlorpyrifos, imidacloprid, thimeathoxan e fenpropathrin. Ou seja, a rotação de produtos não pode ser negligenciada.

Sobre a interação planta-patógeno

Estudos em vários níveis de abordagens tem sido conduzidos na tentativa de ampliar o conhecimento sobre os processos que ocorrem quando a planta é infectada pela bactéria. A maior concentração da bactéria em tecidos mais jovens e menor em tecido mais velhos parece indicar que, após um tempo de infecção, ocorre uma resposta da planta no tecido infectado; porém, com a

distribuição da bactéria pela planta, essa resposta não é suficiente para reduzir o efeito final, que é a doença. Essa resposta ativa da planta pode ser demonstrada pela ativação de genes das vias de resistência, como a via do ácido salicílico (SA), do ácido jasmônico (JA) e a via de síntese de etileno. Às alterações iniciais das células do floema segue-se o acúmulo de amido, coincidindo com os primeiros sintomas que ocorrem entre 6 e 9 meses após inoculação da bactéria.

Como consequência desse processo de estresse, uma das respostas da planta é o acúmulo de calose nas placas crivadas do floema, com evidente obstrução ao transporte de fotoassimilados. Por outro lado, a bactéria tem enzimas que degradam SA, que poderia ser um de seus mecanismos de patogenicidade e explicaria porque, aparentemente, a aplicação exógena de SA tem efeito remediador temporário na doença.

Sobre transmissão por sementes

Ainda há controvérsia sobre a transmissão da bactéria por sementes. Ela pode ser encontrada no tegumento, mas no embrião ainda não foi detectada por PCR. Não fica claro se diagnóstico positivo em sementes implica presença de bactéria viva ou morta. Estudo que sugere transmissão por sementes foi capaz somente de comprovar a presença da bactéria na plântula, porém sem desenvolvimento de sintomas. De modo geral, o consenso é que não ocorre transmissão por sementes. Na dúvida, recomenda-se retirar o tegumento da semente antes da semeadura.

Sobre epidemiologia e manejo

O progresso do HLB na Flórida mostra-se preocupante. De 1,6 a 2,5% em 2008, e 6,4% em 2009, hoje estima-se que cerca de 18% das plantas já estejam infectadas. Sem legislação específica para controle, a decisão do produtor em remover plantas doentes leva em consideração a idade da planta, os níveis de infecção, a taxa de progresso da doença, as perspectivas de produção versus custos e preço da fruta, e os custos para manejo nutricional.

O efeito do HLB na qualidade de fruta parece depender da época de colheita. Há uma tendência de menor brix e maior acidez (menor *ratio*), acompanhado de altos níveis de limonin e nomilin, perceptíveis no suco.

Alternativas prolíficas foram apresentadas, entre elas o uso de injeção no tronco com solução de antibióticos (penicilina e estreptomicina) e cúpricos

(sulfato de cobre quelado), com boa resposta de recuperação. Os estudos ainda encontram-se em andamento.

Na apresentação de trabalhos realizados no Brasil, ficou evidente que o manejo regional é a melhor estratégia para controle da doença, reduzindo seu progresso em 75% e sua incidência em 90%. A base desse manejo está na redução das populações de psíldeo e menor frequência de insetos infectados.

A controvérsia sobre o manejo nutricional persiste e continua sem conclusão. Muitos resultados positivos com o uso de manejo nutricional não tem experimentação e controle adequados. Por outro lado, experimentos controlados demonstram que não existe nenhum efeito benéfico. O fato é que muitos pomares tem mostrado resposta favorável ao manejo nutricional.

De modo geral, observa-se que o manejo é tão ou mais bem sucedido em pomares mais velhos, que no caso da Flórida, apresentam idade acima de oito anos. No entanto, tais pomares apresentam-se quase completamente infectados, isto é, não há efeito profilático, e tem ocorrido morte de plantas, atribuída a declínio. O uso de manejo nutricional associado ao controle de vetor e erradicação de plantas tem mostrado ser a melhor estratégia para manter a produtividade.

Sobre resistência e transgênicos

Existe suscetibilidade diferencial entre espécies e variedades de citros que precisa ser melhor explorada para melhoramento e cisgenia (transformação genética dentro do grupo dos citros). Aparentemente, alguns porta-enxertos, como os trifoliatas e seus híbridos, poderiam aumentar a tolerância ao HLB, porém mais estudos necessitam ser concluídos.

Vários eventos de transgenia estão sendo produzidos e testados em condições de campo. Alguns deles muito promissores, especialmente com o uso de peptídeos e fagos antimicrobianos.

Pesquisa do Centro

Anticorpos contra *Candidatus Liberibacter spp*

Com recursos obtidos junto ao Citrus Research and Development Foundation (Florida Citrus Mutual) pesquisadores do Centro de Citricultura desenvolveram anticorpos policlonais capazes de reconhecer a bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus*, agente associado ao *huanglongbing* (HLB ou *greening*) que afetam as plantas de citros. Testes preliminares através de ELISA e DOT-BLOT utilizando-se daqueles anticorpos apresentaram-se promissores no reconhecimento da bactéria em pecíolo de laranja doce sintomático (*foto*). Comparando-se os resultados obtidos através de PCR e de ELISA obteve-se boa correlação entre as duas metodologias de diagnóstico, o que mostra a potencialidade dos anticorpos como ferramenta de diagnóstico. Os pesquisadores responsáveis pelo projeto tem como objetivo agora desenvolver um sistema de diagnóstico, utilizando-se destes anticorpos, que possa ser utilizado pelo próprio citricultor em sua propriedade. Para isto testes estão sendo feitos junto à uma empresa privada americana especialista em desenvolvimento de ferramentas e soluções para a manejo de pragas e doenças agrícolas. Segundo o pesquisador Helvecio Della Coletta Filho, responsável pelo projeto, além do potencial destes anticorpos no diagnóstico via serologia, os mesmos poderão ser utilizados em imunomarcagem e visualização da colonização de *Liberibacter* nos seus hospedeiros, o psíldeo vetor e a própria planta cítrica, auxiliando o entendimento deste complexo patossistema.

Helvecio Della Coletta Filho

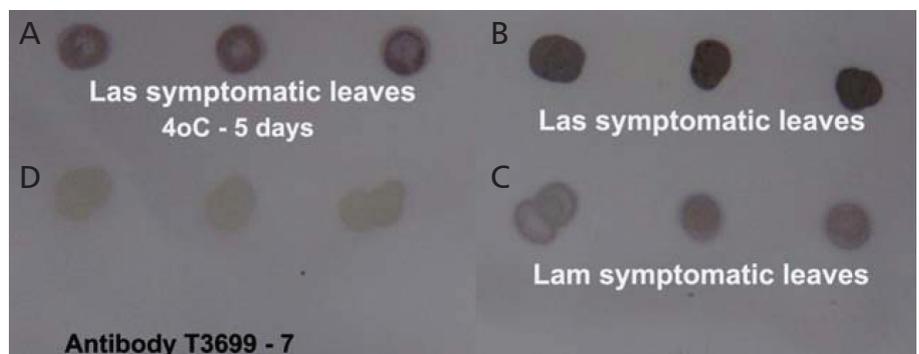


Figura ilustra os resultados preliminares obtidos através de DotBlot (DIBA) utilizando-se do anticorpo #7. Dots de coloração escura significam plantas positivas (A,B,C) e de coloração clara planta negativa (D)

Notas

Bancas de tese e dissertação

O pesquisador Jorgino Pompeu Junior participou da comissão julgadora da defesa de tese de doutorado de Carlos Vinicius Garcia Barreto intitulada "Uso da irrigação por capilaridade na produção de porta-enxertos de limão Cravo na fase de tubetes", realizada em 13 de janeiro na Faculdade de Engenharia Agrícola da Unicamp.

No dia 21 de janeiro, a pesquisadora Raquel L. Boscaroli Camargo participou como membro de banca de defesa de mestrado de Pâmela Fávero, que obteve o título de Mestre em Ciências, área de concentração: Fitotecnia, na Esalq/USP. A dissertação teve como tema: "Transformação genética de três cultivares de laranja doce a partir de explantes de plantas adultas".

Pós-graduação da Unesp

De 25 a 27 de janeiro, o pesquisador Fernando Alves de Azevedo ministrou aulas sobre citricultura na Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita (UNESP), na disciplina de pós-graduação - Fruticultura I, coordenada pelo Prof. Dr. Luiz de Souza Corrêa. Como complemento às aulas, os pós-graduandos visitarão as instalações do Centro Citricultura no início de fevereiro próximo.

Aula em curso profissionalizante

O pesquisador Jorgino Pompeu Junior, proferiu aula em 28 de janeiro, sobre "Evolução do uso e características dos novos porta-enxertos" no II Curso de Mestrado Profissionalizante do Fundecitrus-CAPEES.

Conferência sobre Genoma de Plantas e Animais

No período de 15 a 19 de janeiro foi realizada a Plant and Animal Genome XIX Conference (19ª Conferência de Genoma de Plantas e Animais) em San Diego, na Califórnia. O evento, considerado um dos mais importantes na área de Genética e Genômica, teve neste ano, um número recorde de 2.275 participantes inscritos, originários de cerca de 60 países diferentes, e a presença de 145 empresas com estandes de exposição.

Foram registrados também recordes no número de pôsteres (total de 845) e de apresentações orais (611 comunicações, em cerca de 80 *workshops*), incluindo trabalhos para diversas culturas vegetais.

O Centro de Citricultura participou com a apresentação de uma comunicação oral e três pôsteres, relacionados ao mapeamento genético, sequenciamento do genoma de tangerina Ponkan e limão Cravo e análise de transcriptomas para resistência a CVC e desenvolvimento floral. Participaram do evento os pesquisadores Mariângela Cristofani-Yaly e Marcos A. Machado.

Eventos 2011

IV Dia do <i>Huanglongbing</i>	10 de março
12º Dia do Limão Tahiti	31 de março
VI Dia do Porta-Enxerto	28 de abril
VI Dia de Campo da Tangerina (Socorro)	24 de maio
33ª Semana da Citricultura	06 a 11 de junho
37ª Expocitros e 42º Dia do Citricultor	06 a 11 de junho
18º Curso de Citricultura	04 a 15 de julho
II Dia dos Citros de Mesa	15 de julho
III Encontro de Citricultura na Região Sudoeste do Estado de São Paulo (Capão Bonito)	28 de julho
17º Dia do Viveirista de Citros	11 de agosto
VII Curso de Doenças de Citros e seu Manejo	20 a 22 de setembro
11ª Dia da Laranja	25 de outubro



**10 de março
2011**

IV Dia do *Huanglongbing*



Expediente

Informativo Centro de Citricultura
Editora e jornalista responsável
Cristina Rappa (MTb 15.213)

Conselho Editorial
José Dagoberto De Negri
Marcos Antonio Machado
Vivian Michelle dos Santos

Colaboração
Arthur A. Ghilardi
Fernando Alves de Azevedo
Hélcio Della Coletta Filho
Jorgino Pompeu Jr.
Juliana Freitas-Astúa
Mariângela Cristofani-Yaly
Raquel Boscaroli Camargo

Rod. Anhanguera, km 158
Caixa Postal 04, CEP 13490-970,
Cordeirópolis, SP
Fone/fax: (19) 3546-1399
www.centrodecitricultura.br
informativo@centrodecitricultura.br



SECRETARIA DE
AGRICULTURA E ABASTECIMENTO

