



Informativo Centro de Citricultura

Cordeirópolis, Janeiro de 2010 • Número 176

Projeto Temático amplia informações sobre o *huanglongbing*

Tão logo foi comprovada a ocorrência de *huanglongbing* (HLB) no Estado de São Paulo em 2004, vários grupos de pesquisadores se mobilizaram no sentido de fortalecer as colaborações e acelerar a obtenção de resultados sobre o novo patossistema. Em 2005, foram aprovados pela Fapesp dois Projetos Temáticos, sendo um deles (Estudo da bactéria *Candidatus Liberibacter* spp: diagnóstico, biologia e manejo) coordenado pelo Centro de Citricultura Sylvio Moreira/IAC, com participação de pesquisadores de outras instituições. A equipe principal desse projeto é composta por Helvécio Della Coletta Filho, Marco A. Takita, Marcos A. Machado, Mariângela Cristofani-Yaly e Raquel L. Boscariol-Camargo (Centro de Citricultura), Pedro T. Yamamoto, Renato B. Bassanezi e Silvio A. Lopes (Fundecitrus), Elliot Kitagima e João Roberto S. Lopes (Esalq) e Alexandre M. Amaral (Embrapa/Centro de Citricultura).

Nesta edição, o Informativo Centro de Citricultura traz uma síntese dos principais resultados obtidos por esse Projeto, que “contribuiu de modo significativo para o aumento do conhecimento sobre a doença em São Paulo”, de acordo com o pesquisador Marcos A. Machado, diretor da instituição.

Resistência varietal

Foi feita uma avaliação da ocorrência de resistência à doença em diferentes espécies de citros e gêneros próximos. As tangerinas são as espécies que melhor multiplicam a bactéria do HLB, com destaque para a mexerica do Rio, que apresenta concentrações três vezes maiores às encontradas em tangerina Ponkan e Cravo. Em todas as espécies há desenvolvimento de sintomas típicos da doença. Em lima ácida Galego ocorre também o desenvolvimento de sintomas diferenciados, como engrossamento e acentuação da clorose de nervuras.

O monitoramento da população da bactéria em tangerina Sunki e *Poncirus trifoliata* por um período de dois anos revelou que, nesta última, a taxa de multiplicação da bactéria foi muito mais lenta e tardia, indicando tolerância. A comparação entre as duas espécies possibilitou a construção de mapa genético delas.

Alguns gêneros próximos de citros, como *Atalantia* e *Eremolemon* apresentam-se mais tolerantes, ocorrendo também grande variação da população bacteriana ao longo do ano. Em outros gêneros, como *Micromellum* e *Severinia*, sintomas visuais não são observados, mas sinais semelhantes a deficiência nutricional são comuns em *Microcitrus* e *Fortunella*. Em todos esses gêneros, ocorre multiplicação da bactéria.

Não parece haver, no entanto, resistência genética à infecção de *Ca. Liberibacter* spp dentro do grupo citros e gêneros afins. “O que se observa, de modo geral, é uma alta suscetibilidade, com todos as variedades sendo capazes de multiplicar a bactéria a altas taxas e com desenvolvimento de sintomas típicos da doença”, explica Machado, completando que os dados obtidos referem-se à avaliação após enxertia com borbulhas infetadas, o que não corresponde ao patossistema em condições naturais, onde a transmissão pelo vetor é a forma predominante de transmissão. “Eventual tolerância ou resistência em condições de campo poderiam ser atribuídas a menores taxas de transmissão da bactéria pelo vetor”, diz.

Enriquecimento e genoma da bactéria

Um dos principais objetivos do Projeto Temático foi estabelecer um sistema de enriquecimento da bactéria que pudesse, de alguma forma, substituir as dificuldades de seu cultivo. Afinal, para se conhecer um

determinado organismo é necessário acessar informações de sua biologia. Uma das primeiras abordagens para obter material genético de qualidade foi tentar extrair DNA bacteriano de plantas doentes. Tanto a baixa eficiência do procedimento, quanto a qualidade do DNA desencorajaram a continuidade dessa abordagem.

Um dos sistemas de enriquecimento da bactéria estabelecidos no Projeto foi sua transmissão através de cuscuta e multiplicação em hospedeiros alternativos, como vinca e tabaco, espécies que multiplicam muito bem a bactéria, alcançando mais de dez vezes a concentração usualmente encontrada em citros. Há uma nítida e direta associação entre concentração da bactéria nos tecidos e a severidade de sintomas. Mesmo alcançando altos títulos nesses hospedeiros, o rendimento total de DNA da bactéria não ultrapassa a 3%, o que não permitiu um bom sistema de clonagem para sequenciamento.

O uso de hospedeiros alternativos de ciclo curto nos quais a bactéria se multiplique a altos títulos presta-se muito bem a estudos de interação planta-patógeno, particularmente para o entendimento de mecanismos de patogenicidade da bactéria e para os mecanismos gerais de resposta da planta.

(*Continua na página 2*)



Vinca infectada com *Ca. Liberibacter* spp., mostrando sintomas semelhantes a HLB (Foto: Helvécio Della Coletta Filho).

Editorial

Expressivo retrocesso

Embora sem surpresas, a mudança do modo de atuação do Fundecitrus, anunciada oficialmente neste mês de janeiro, não permite bons prognósticos para o setor citrícola no curto e médio prazos. Como exemplo de participação do setor de produção no controle de sua própria cadeia, o Fundecitrus representou um diferencial no agronegócio brasileiro e é responsável direto pelo sucesso no controle do cancro cítrico no Estado de São Paulo. Atuando em defesa, extensão e pesquisa, o Fundecitrus deverá se concentrar a partir de agora em extensão e pesquisa.

Ao propor este novo papel, o setor citrícola mostra estar em sintonia com vários movimentos de retrocesso que têm ocorrido no mundo e no Brasil, ou seja, decidiu voltar no tempo e tentar outro modelo de citricultura. Ignorou conquistas expressivas, não soube impor sua importância econômica, política e social, comprovou seu caráter extrativista e mostrou-se absolutamente incapaz de enfrentar desafios maiores do que uma safra ou de uma oscilação na bolsa de commodities. Ao assumir o atual modelo da Flórida no (des) controle de doenças, o setor mostrou o que realmente pensa de si mesmo e de todos aqueles que, de forma direta ou indireta, participam da atividade. Mostrou ser pequeno em um negócio grande e não grande como muitos admitem.

A decisão de mudança de rumo deverá trazer consequências extremamente graves para o controle de doenças como o cancro cítrico e o huanglongbing. Mais do que ninguém, o setor sabe que o controle dessas doenças deve ser feito de modo integrado e intensivo. Embora o HLB seja a preocupação imediata, a expansão do cancro cítrico deverá provocar prejuízos consideráveis quando ele ultrapassar as atuais taxas.

Nem é preciso lembrar que extensão, defesa e pesquisa são integrantes essenciais na sustentabilidade de qualquer cadeia de agronegócio. Ao assumir somente parte dessas atividades, o setor transfere para o Governo essa responsabilidade, mesmo sabendo das suas limitações orçamentárias e de outras prioridades que o setor público está sujeito.

A citricultura perde. O Estado de São Paulo perde. O Brasil perde.

A extensão do retrocesso deverá ser avaliada em breve, pela crescente perda de competitividade daquela que ainda é a maior citricultura do mundo.

Matéria de Capa

(Continuação)

Alternativas para enriquecimento da bactéria foram estabelecidas, sendo que a imunocaptura e a amplificação de fragmentos longos a partir de uma solução bacteriana após alimentação do vetor mostraram-se promissoras. Ambas as metodologias permitem 'isolar' a bactéria e, a partir daí, amplificar fragmentos do genoma que podem ser sequenciados. "Essa é ainda uma metodologia com caráter analítico, faltando-lhe o aspecto quantitativo, isto é, obter maior quantidade de DNA para o sequenciamento", afirma Machado. Por outro lado, a imunocaptura com anticorpos policlonais será sempre um método que favorecerá todas as bactérias gram-negativas no inseto, inclusive Wolbachia, de modo que na montagem do genoma possam ser 'retiradas'. "É a estratégia que funciona para o sequenciamento de *Ca. L. asiaticus*".

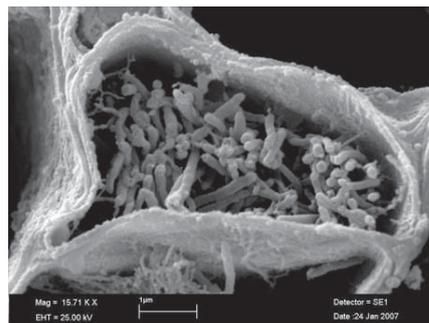
Tanto a partir de DNA total isolado de plantas de vinca infectadas, quanto de imunocaptura, foi tentado o sequenciamento do genoma da bactéria com tecnologia de pirosequenciamento. Em função da qualidade do DNA, o rendimento tem sido inadequado, mas já revela um genoma pequeno (1,3 a 1,5 milhões de pares de bases) e significativas diferenças entre *Ca. L. americanus* e *Ca. L. asiaticus*, o que nos leva a concluir que pode se tratar de uma mesma doença com vários agentes diferentes.

Diversidade e diagnóstico da bactéria

Entre as várias opções para diagnóstico da bactéria, a que melhor se ajusta a questões de sensibilidade, custo e operacionalidade é a amplificação por PCR (reação de polimerase em cadeia) de regiões genômicas.



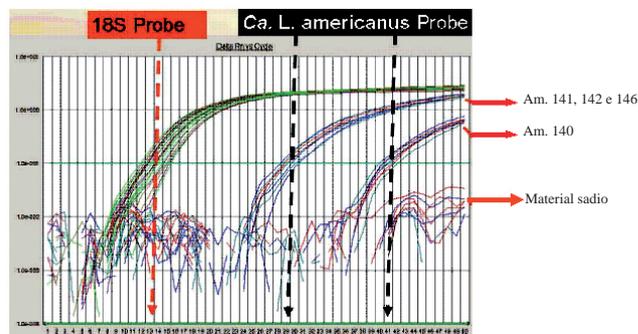
Padrão PCR com amplificação de (A) *Ca. Liberibacter americanus* e (B) *Ca. Liberibacter asiaticus*



Microscopia eletrônica de varredura de floema de vinca enriquecidos com *Liberibacter* (Foto: F.A. Tanaka & E.W. Kitajima)

Hibridação com sondas marcadas, por exemplo, é altamente inespecífica. Cromatografia de camada fina para produção da planta em resposta à infecção tem baixa sensibilidade e inespecificidade. E microscopia eletrônica não tem operacionalidade para grande número de amostras.

A amplificação por PCR, tanto de *Ca. Liberibacter asiaticus* quanto de *Ca. L. americanus*, mostra-se eficiente na confirmação do diagnóstico da doença. Não apresenta suficiente sensibilidade para detecção das bactérias em plantas assintomáticas. Para superar essa limitação foi desenvolvida a PCR em tempo real, com sensibilidade cerca de 100 vezes maior que a PCR comum.



Padrão de PCR em tempo real para amplificação de *Ca. L. americanus* (amostras 140, 141, 142 e 146) (Foto: Eduardo F. Carlos)

Ambos os protocolos têm sido utilizados rotineiramente na Clínica Fitopatológica do Centro de Citricultura.

O principal problema da PCR em tempo real é o custo e a altíssima sensibilidade do método, o que aumenta os riscos de contaminação de falsos positivos. Assim, como alternativa, foi desenvolvido

o nested-PCR, com especificidade e sensibilidade tão alta quanto a PCR em tempo real e que funciona bem para detecção da bactéria no vetor.

Bactéria no vetor e hospedeiros alternativos

Com grande capacidade atrativa do vetor, a murta, muito utilizada como planta ornamental em áreas urbanas, é o principal hospedeiro alternativo da bactéria. Os principais dados sobre murta originam-se de coletas em ambiente natural.



Murta *enxertada sadia e infectada com Ca. Liberibacter americanus* (Foto: Silvio A. Lopes)

Após os primeiros resultados sobre aquisição da bactéria pelo psílideo, ficou demonstrado que larvas e ninfas são mais eficientes na aquisição que indivíduos adultos. Por outro lado, a bactéria se multiplica no vetor, podendo alcançar um título mais de 60 vezes maior em poucas semanas. São informações importantes no estabelecimento de um sistema eficiente de manejo, priorizando tanto inseticidas de contato quanto sistêmicos, de modo a atuarem sobre todos os estágios do vetor.

A transmissão da bactéria por *Diaphorina citri* é do tipo persistente (provavelmente propagativa), com período de latência inferior a 21 dias. Os dados de aumento de população da bactéria em ninfas apóiam a hipótese de persistência propagativa. A sobrevivência de indivíduos de 46 até 100 dias após aquisição sugere que os vetores infectivos poderiam manter-se em transmissão ativa da bactéria por períodos de 1 a 3 meses.

Temperatura, bactéria e poda

Aqui o foco principal do trabalho foi entender como a temperatura poderia afetar o desenvolvimento da bactéria e da doença. Era uma informação relevante face à maior dispersão da doença no centro do Estado. Naquele momento, havia a hipótese que regiões mais quentes poderiam ser menos afetadas, assumindo-se que havia um equilíbrio nas populações de ambas as bactérias. Atualmente se sabe que *Ca. L. asiaticus* tem maior taxa de transmissão, multiplica-se mais no hospedeiro e não parece ser afetado por altas temperaturas,

comuns no norte do Estado. Passou, então, a ser a espécie dominante em São Paulo.

Ca. L. americanus, por sua vez, mostrou-se altamente suscetível a temperaturas mais elevadas, podendo ser aparentemente eliminada da planta nessas condições, ou mesmo não se multiplicar. Se esse efeito é persistente ainda não se sabe. O fato principal é que desde o início da detecção do HLB no Brasil, em junho de 2004, tem crescido de modo significativo a proporção de *Ca. L. asiaticus*, em relação à de *Ca. L. americanus*, sugerindo que a primeira espécie apresenta maior adaptação ao patossistema que a outra. As razões para isso são desconhecidas, mas poderiam estar associadas a temperatura do ambiente, eficiência de transmissão e adaptação ao vetor.

Outro resultado relevante obtido refere-se à constatação de que a poda não é uma prática viável para redução de inoculo na planta ou mesmo promover a cura da doença, o que já era conhecido, mas que foi taxativamente comprovado nesse Projeto. Considerando o fato de a bactéria colonizar o floema, não foram surpresa esses resultados. Portanto, práticas-tentativa de controle por poda, como é feito na África do Sul, devem estar fora de cogitação.

Epidemiologia, manejo e custos

Essa parte do Projeto foi sem dúvida alguma o maior e mais abrangente estudo sobre epidemiologia de HLB já realizado e trouxe inúmeras informações que auxiliarão no estabelecimento de estratégias de manejo da doença no Estado.

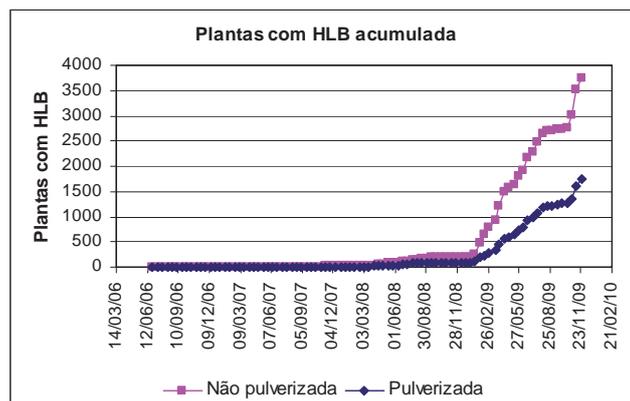
A epidemia do HLB é extremamente severa e rápida e seu controle somente poderá ser feito de modo integrado. Sem a redução ou eliminação de fontes externas para infecção primária, estratégias de erradicação de plantas infectadas ou controle químico do vetor podem ser inócuos. A significativa evolução (0 a 45 %) no número de plantas

doentes na área experimental após três anos é, no mínimo, assustador. Erradicação de plantas doentes e controle químico do vetor por si só não funcionam se forem executados em área restrita, sem a integração regional. Mesmo adotando-se um programa de controle químico do vetor, fontes externas para infecção primária são determinantes no progresso da doença. O controle químico apresenta-se mais efetivo na redução das infecções secundárias.

Outro fator determinante em qualquer estratégia de manejo relaciona-se com o longo período de incubação da doença antes que os primeiros sintomas possam ser observados. “Ao que tudo indica, levantamentos baseados em sintomas podem ser inócuos na medida em que há grande probabilidade de haver um grande número de plantas já infectadas servindo com fontes de bactéria para infecções secundárias e que ainda não foram observadas”, diz o pesquisador do Centro de Citricultura.

Nas condições deste experimento (região com alta pressão externa de inóculo, parcelas de 0,9 ha, com e sem controle do vetor), as elevadas perdas de plantas com sintomas da doença e o custo das estratégias de manejo da doença tornam insustentável economicamente o cultivo de citros.

Considerando a atual incidência de plantas com HLB no experimento (média para tratamentos com e sem controle do vetor, respectivamente, 28,9% e 61,7%) e as taxas de progresso da doença estimadas, estima-se que ao final de 54 meses após o plantio terão sido eliminadas nas parcelas, com e sem controle do vetor, respectivamente, 62,8% e 83,4% das plantas do plantio original. Mesmo que as plantas remanescentes apresentem no próximo ano uma produção acima da média para sua faixa etária (em torno de uma caixa por planta), a receita obtida não pagará o dispêndio realizado para o controle da doença e muito menos o investimento total realizado desde o plantio.



Número de plantas com sintomas de HLB nas parcelas pulverizadas e não pulverizadas com inseticidas

Fundecitrus muda estratégia de ação

O setor citrícola foi surpreendido, no final de 2009, com a notícia que o Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus) não deverá mais atuar na área de defesa da citricultura. Um novo convênio para sua atuação deverá ser feito com a Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo. A seguir, a transcrição da nota divulgada pela entidade em janeiro:

O Fundecitrus vai mudar seu foco de atuação no Estado de São Paulo. A nova postura foi aprovada pelo Conselho Deliberativo da entidade com o objetivo de aprimorar o manejo das doenças. O assunto esteve em pauta durante reunião realizada com o secretário de Agricultura e Abastecimento do Estado, João Sampaio, na tarde do dia 18 de janeiro, quando um novo convênio foi discutido.

As mudanças adotadas visam maior enfoque na conscientização e educação fitossanitária, prestação de serviços e capacitação de produtores. De acordo com o presidente do Fundecitrus, Lourival Carmo Monaco, a entidade enfatizará o conhecimento e a modernização tecnológica. "O foco será maior no produtor e na prevenção de pragas e doenças", afirma.

As novas diretrizes foram necessárias, pois, as ações de controle do greening foram insuficientes frente a dinâmica da doença. Em cinco anos, a incidência de talhões com a presença do greening passou de 3,4% para 24%. Dessa forma, o Fundecitrus vem buscando mecanismos que se mostrem mais efetivos no manejo da doença, embora entendendo que a redução do inóculo é o caminho que permite o controle.

Para Mônaco, as mudanças foram necessárias. "Vamos preparar os produtores para que eles façam o manejo adequado de seus pomares, focando na prevenção de pragas e doenças dos citros".

Na área de pesquisa, o Fundecitrus ampliará o desenvolvimento de conhecimento, a difusão e a incorporação às tecnologias. Na área técnica, as visitas, as palestras, os cursos e os treinamentos terão continuidade, sendo intensificados.

Engenheiros agrônomos levarão - aos citricultores - recomendações para a condução adequada dos pomares. "Todos os citricultores continuarão tendo o apoio do Fundecitrus", disse o presidente. Os produtores poderão contar ainda com o trabalho de diagnose por meio de análises laboratoriais.

Os levantamentos amostrais também serão feitos anualmente com as principais pragas e doenças.

A partir de agora, a inspeção e fiscalização de pomares ficam sob a responsabilidade da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, por meio da Coordenadoria de Defesa Agropecuária (CDA). Contudo, o produtor deve seguir as normas estabelecidas pelas legislações atuais para o controle das doenças cítricas.

Em 33 anos de existência, o Fundo de Defesa da Citricultura sempre foi considerado um exemplo de competência em suas ações na política de sanidade das doenças cítricas. Ações do Fundecitrus permitiram que 99% dos pomares não apresentassem sintomas de cancro cítrico durante dez anos.

Segundo o presidente Mônaco, estima-se que a política de combate ao cancro evitou que gastos equivalentes a R\$ 300 milhões fossem evitados caso a doença se expandisse. "No caso do greening, estabelecemos uma rede de pesquisa que permitiu entender o processo de disseminação e transmissão da doença".

EVENTOS EM MARÇO NO CENTRO DE CITRICULTURA



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 Antonio Ghilardi

José Orlando de Figueiredo

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

