



# Informativo Centro de Citricultura

Cordeirópolis, Fevereiro de 2013 • Número 213

## 3ª Conferência Internacional sobre Pesquisa em HLB

A 3ª Conferência Internacional sobre Pesquisa em *Huanglongbing* (HLB) ocorreu entre os dias 4 e 8 de fevereiro de 2013, em Orlando, Flórida, e superou as expectativas, com a participação de 486 pessoas, representando 21 países. Cerca de 50 eram brasileiros, tanto de institutos de pesquisa estaduais e federais, universidades, Fundecitrus, grupos de consultores de citros, bem como de diversas empresas privadas envolvidas com o setor e citricultores.

Do Centro de Citricultura, participaram os Pesquisadores Dirceu de Mattos Junior, Juliana Freitas-Astúa (Embrapa), Valéria Mafra (Pós doutoranda do INCT Citros) e a doutoranda Rosângela Inui-Kishi, os quais apresentaram três trabalhos e foram co-autores de outros dois.

A conferência foi organizada em dez sessões, cada qual representando uma temática diferente dentro da matéria principal: HLB. Os temas variaram desde informações recentes sobre epidemiologia da doença, manejo, políticas públicas e

diagnóstico, até interação patógeno-hospedeiro, biologia do vetor e do patógeno.

Esse Informativo sintetiza alguns dos principais estudos dessa Conferência nas diferentes áreas.

### Regulamentação de transgênicos

Desde a descoberta do HLB na Flórida em 2005, vários estudos têm sido conduzidos com o objetivo de identificar variedades de citros que demonstrem resistência ou tolerância ao HLB, e que possam ser usadas como fonte de material genético para o melhoramento.

Embora algumas variedades apresentem diferentes graus de tolerância, é consenso entre os pesquisadores que a resistência nas variedades comerciais de citros dificilmente será obtida por meio do melhoramento tradicional. Neste contexto, o uso de ferramentas biotecnológicas, em especial a transformação genética, tem se

mostrado uma alternativa promissora a médio prazo para o desenvolvimento de variedades comerciais com resistência ou tolerância ao HLB.

No primeiro dia do evento, Michael Irey (Southern Gardens Citrus) discutiu sobre os desafios nos processos regulatórios e legais relacionados com a liberação de citros transgênicos para resistência ao HLB. Compartilhando a própria experiência do grupo, Irey afirmou que os maiores desafios não dizem respeito apenas aos aspectos científicos ou metodológicos, mas também ao estabelecimento de métodos mais eficientes para testá-los em casa de vegetação e em campo, bem como às inúmeras exigências das agências reguladoras.

Usando como exemplo as plantas de citros transgênicas contendo um gene de defesa do espinafre, ele fez levantamento das demandas exigidas por cada agência reguladora dos EUA para liberação e regulamentação dos testes em campo e dos custos (em torno de US\$ 10,5 milhões) durante este primeiro período de triagem. No



Delegação brasileira na IRCHLB 2013, Orlando, Flórida, EUA. (Foto: Décio Joaquim, Gtacc)

## Editorial

### Avanços possíveis

*Após a 3ª Conferência sobre Pesquisa em HLB, realizada em Orlando, fica mais uma vez evidente que nos últimos dez anos houve expressivo avanço no conhecimento sobre a doença. Porém, fica cada vez mais comprovado que ainda falta um longo caminho para a solução desse complexo patossistema. Em que pese o grande volume de recursos colocados pela citricultura na Flórida para apoiar várias linhas de pesquisa, e o envolvimento de muitos grupos, ainda não existe uma explicação clara das interações das bactérias causadoras do HLB com seus hospedeiros, seja a planta, seja o inseto. O desenvolvimento de tecnologias de manejo do vetor em grandes áreas, associado à manutenção de baixíssimas taxas de plantas sintomáticas, demonstram que ainda é possível produzir citros, mesmo em áreas de ocorrência da doença. A questão a ser respondida é por quanto tempo o atual modelo se sustenta.*

*Considerado o mais desafiante patossistema dos citros, o HLB tem confirmado suas mais pessimistas perspectivas. Provavelmente por ter tentado conter a expansão da doença na sua fase inicial, a citricultura paulista parece estar em melhores condições fitossanitárias que a citricultura da Flórida. Foi um importante momento para estabelecer estratégias de manejo que permitiu a contenção da doença no Estado. No entanto, fica patente que a busca de uma solução definitiva para o HLB constitui-se o principal desafio para o setor de ciência e tecnologia. Fica também cada vez mais evidente que o manejo nutricional, tão propalado na Flórida e em voga no Brasil, não é capaz de manter a produção. Embora bem nutrida, a planta não deixa de responder à infecção do patógeno, apresentando um dos seus aspectos mais drásticos, que é acentuada queda de frutos.*

*Os resultados de pesquisa com todos os grupos que trabalham com HLB, principalmente nos Estados Unidos, confirma o que sempre o setor de pesquisa e desenvolvimento afirmou e afirma: sem intensificação dos esforços, maior competência e capacitação multidisciplinar, o setor continuará na espera por soluções milagrosas. Afinal, para muitos importantes segmentos do setor, «Deus não só é brasileiro, como é citricultor também!»*

*Se os avanços da Conferência na Flórida frustram muitos por não trazerem soluções definitivas, eles representam avanços possíveis face aos desafios que o patossistema HLB impõe a todos.*

entanto, embora um longo caminho tenha que ser percorrido desde a pesquisa até o plantio comercial dos transgênicos, a mensagem de sua palestra foi positiva, com o argumento de que essa é uma estratégia válida e até necessária.

### Detecção e diagnóstico

O destaque nesta sessão foi a apresentação de Richard Fink, da empresa Applied Nanotech Inc., sobre o desenvolvimento de um dispositivo portátil capaz de detectar compostos orgânicos voláteis, o sensor VOC. Os compostos voláteis são substâncias naturalmente produzidas por todos os organismos vivos e são importantes meios de comunicação entre indivíduos. No caso das plantas, compostos voláteis específicos são liberados em resposta a diferentes estímulos como, por exemplo, a alimentação por herbívoros. Uma vez que vários estudos têm mostrado que plantas infectadas com HLB liberam substâncias voláteis em um padrão diferente de plantas sadias, o sensor VOC foi desenvolvido com o intuito de detectar diferentes perfis de voláteis e potencialmente identificar quais plantas estariam infectadas em um pomar de citros, mesmo antes das plantas apresentarem os sintomas visuais da doença.

Através de testes preliminares em campo, o sensor VOC foi capaz de identificar aproximadamente 90% das plantas positivas para HLB durante o verão e inverno e 80% nos demais períodos do ano. Em casa de vegetação, o sensor foi ainda mais eficiente para detectar plantas assintomáticas, antes mesmo do diagnóstico positivo por PCR. O dispositivo tem sido também adaptado para detecção precoce de plantas de citros assintomáticas infectadas com patógenos causadores de outras doenças como a CVC e a tristeza.

Yong Ping Duan, do USDA/Fort Pierce, apresentou um protótipo de um dispositivo eletrônico denominado “MTI-Dx”, que promete realizar o diagnóstico molecular com tempo e custo menores do que os métodos de detecção por PCR rotineiramente utilizados. O MTI-Dx possui sensibilidade e especificidade para detecção semelhante a uma reação

de PCR, e o resultado positivo ou negativo, que é de fácil visualização, aparece em aproximadamente 25 minutos. O kit de detecção contendo o tampão de amostra, o cartucho descartável para aplicação da amostra e a base contendo a bateria ainda estão em fase de aperfeiçoamento, mas tem o potencial de auxiliar no diagnóstico molecular de forma simples, rápida e de baixo custo.

### Inspeção e manejo da doença

As palestras abordaram o estado da arte da epidemiologia da doença e a eficácia do programa de manejo que tem sido usado na Flórida e no Brasil, bem como as estratégias que estão sendo usadas para evitar a disseminação da doença em áreas livres. Foram apresentados diversos estudos usando modelos epidemiológicos para predição de áreas de risco, tanto em pomares quanto em áreas residenciais. A Embrapa apresentou uma proposta de rede de monitoramento do HLB chamada  $\beta$ ioMath, uma parceria com diversos centros de pesquisa estaduais e universidades que trabalham com HLB no Brasil. O intuito da rede é monitorar o vetor e a doença em alguns Estados produtores e repassar as informações às agências de defesa fitossanitária, que irão definir as melhores ações com o foco na prevenção de áreas não afetadas pelo HLB.

### Transmissão da bactéria pelo psílideo

Alguns estudos demonstram que a aquisição da bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las) é mais eficiente entre ninfas que em adultos. Outros sugerem que Las se replica no psílideo após a aquisição e pode ser transmitida das fêmeas infectadas para a progênie. O grupo liderado por Lukasz Stelinski, da Universidade da Flórida, apresentou dados consistentes mostrando que, além disso, Las pode ser transmitida dos machos para fêmeas em uma taxa média de 4% durante o acasalamento (transmissão sexual), sendo que 0,8% das ninfas emergem já infectadas. Esse parece ser mais um mecanismo alternativo de transmissão de Las entre populações de psílideos infectivos para não-infectivos na ausência de plantas de

citros infectadas. Outro parâmetro avaliado neste estudo foi o efeito da infecção por Las nas fêmeas durante a reprodução. Os resultados encontrados sugerem que a produção de ovos pelas fêmeas infectadas por Las é maior quando comparada com fêmeas não infectadas. Desse modo, o aumento na fecundidade de fêmeas infectadas por Las pode favorecer a disseminação da doença.

### **Ecologia, transmissão e manejo do psilídeo**

Dentre as apresentações desse tópico, destaca-se o estudo recente sobre a preferência do psilídeo na presença de plantas de citros infectadas e não infectadas e como a bactéria Las pode interferir neste comportamento. De acordo com os resultados do trabalho coordenado por Stelinski, foi proposto um modelo no qual a infecção por Las altera o metabolismo das plantas infectadas, induzindo a liberação de um composto volátil, o metil salicilato (MeSA), o qual é responsável por atrair os psilídeos para estas plantas. Uma vez que a infecção por Las também altera o balanço nutricional das plantas, os psilídeos se alimentam por um período curto nestas plantas e em seguida se dispersam para outras, preferencialmente não infectadas. O período de alimentação inicial em plantas infectadas seria suficiente para a aquisição da bactéria por alguns psilídeos e, portanto, a dispersão destes psilídeos preferencialmente para outras plantas não infectadas é um mecanismo que favorece a disseminação da bactéria no pomar.

Uma das principais estratégias de manejo do HLB é o controle da população de psilídeos. Usando ferramentas biotecnológicas, vários grupos têm investido no uso da técnica de RNA interferente (RNAi) para silenciar genes essenciais para o metabolismo e desenvolvimento dos psilídeos, resultando na sua morte em estágio de ninfas ou adultos. Alguns trabalhos foram apresentados nesta conferência e, embora esta estratégia seja promissora, os resultados apresentados foram abaixo do esperado, com uma mortalidade máxima de apenas 37% dos psilídeos após a alimentação com dieta artificial.

Diversos grupos apresentaram resultados relacionados com o controle de *Diaphorina*, seja ele químico com pesticidas de contato ou sistêmicos, ou ainda alternativo através de fungos entomopatogênicos ou parasitoides. Como em versões anteriores desse evento, o chamado manejo nutricional foi objeto de estudo de alguns trabalhos apresentados e, novamente, as opiniões e os resultados foram divergentes.

### **Ferramentas moleculares para estudo e controle do patógeno**

Desde o sequenciamento do genoma de Las em 2009, vários estudos têm sido conduzidos com o intuito de determinar a função dos genes dessa bactéria e identificar quais deles são importantes para a sobrevivência e colonização no vetor e patogenicidade em citros. Nesta conferência foram apresentados vários trabalhos recentes sobre o estudo da função de genes de Las envolvidos com transporte de substâncias do meio extracelular, formação de biofilme durante a colonização no psilídeo e potenciais fatores de virulência responsáveis pela supressão da resposta de defesa de citros à infecção.

Além dos estudos funcionais com o genoma de Las, dois trabalhos sobre genomas de outras espécies de *Liberibacter* foram apresentados. Nelson Wulff, do Fundecitrus, comentou os resultados sobre o sequenciamento de Lam, cujo genoma é menor que os de outras *Liberibacter* e se assemelha mais com o genoma de *Ca. Liberibacter solanacearum* (Lso) do que com o de Las. Várias comparações foram feitas entre os genes presentes em Lam, Las e Lso. Outro trabalho, coordenado por Eric Triplett, da Universidade da Flórida, mostrou os resultados do sequenciamento do genoma de *Liberibacter crescens*, uma bactéria cultivada e não-patogênica a citros. A comparação entre os genomas de *L. crescens* e CaLas quanto à capacidade metabólica e a presença de genes de virulência foi abordada nesta palestra e estes dados serão importantes para definir estratégias futuras para o cultivo das espécies patogênicas de *Liberibacter* e melhor compreensão da interação com o vetor e o hospedeiro.

Yong-Ping Duan apresentou dados sobre o *screening* de 27 compostos

## **Pesquisa**

### **Via de resposta ao ácido salicílico no HLB**

A resistência sistêmica adquirida (RSA ou SAR, em inglês) é uma resposta de defesa de plantas contra um largo espectro de patógenos. O ácido salicílico (AS) é o hormônio que desempenha um papel central na sinalização de vias de defesa basal e RSA. Pesquisas recentes com abordagens de transcriptoma, proteoma e metaboloma dos citros em respostas às bactérias *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CaLas) e *Ca. Liberibacter americanus* (CaLam) demonstram a ativação de processos de defesa, embora não suficientes para atingir o estado de tolerância ou resistência. A

Trabalho desenvolvido no Centro de Citricultura tem como objetivo avaliar a expressão de genes de metabolismo e respostas ao ácido salicílico, bem como outros genes de defesa envolvidos na interação de plantas com patógenos. A expressão do conjunto de genes foi avaliada tanto em laranja doce (suscetível) como em Poncirus (tolerante), desafiados independentemente com as bactérias do HLB. De modo geral, observa-se pouca diferença de expressão desses genes entre os dois genótipos estudados.

Genes envolvidos na sinalização da planta com o patógeno, e anteriores à via de síntese de AS, apresentaram maior expressão na fase de sintomas, isto é, vários meses após a enxertia com borbulhas infectadas. Esses genes atuam principalmente como intermediários entre aqueles que reconhecem moléculas efetoras do patógeno e aqueles que estão associados à biossíntese desse hormônio.

Genes relacionados ao metabolismo do aminoácido fenilalanina, a mais importante via de metabolismo de fenóis e derivados e que contribuem para síntese do AS, também foram menos expressos em estágios avançados da doença. Provavelmente isso representa uma queda na capacidade de resposta de defesa da planta ao longo da infecção.

Aparentemente, as bactérias do HLB dispõem de mecanismos eficientes para burlar as defesas da planta, causando gradativas alterações hormonais, com consequências sobre a fisiologia da planta, resultando nos sintomas da doença. É possível que o estágio fisiológico do desenvolvimento de cada setor da planta, afetado pelas bactérias, deve contribuir para sua reação à bactéria, resultando na irregularidade de sintomas e desenvolvimento da doença.

*Responsável:* Tiago Silva Oliveira, aluno de Mestrado da Unicamp.

*Orientador:* Marcos A. Machado

## Notas

### Participação em bancas

No dia 26 de fevereiro o Pesquisador Sérgio Alves de Carvalho participou da avaliação de tese de Denilson de Oliveira Guilherme, doutorando do Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), em Campos dos Goytacazes, RJ. Sob a orientação da Profa. Cláudia S. Marinho, a tese teve como título “Uso do porta-enxerto *Flying Dragon* na produção de mudas e no cultivo de citros no Norte Fluminense”.

O Pesquisador Helvécio Della Coletta Filho participou da comissão julgadora da defesa de tese de doutoramento da aluna Eveline Tavano, defendida no CENA, em Piracicaba, para obtenção do título de Doutora em Ciências, com área de concentração em Biologia na Agricultura e no Ambiente. A tese intitulada “Transformação genética de *Citrus sinensis* (L.) para resistência a *Candidatus Liberibacter spp*” vem somar esforços no controle do HLB em citros, através de plantas transgênicas expressando genes que codificam peptídeos antibacterianos (*attA*) dirigidos por promotores específicos de floema, local onde a bactéria do HLB se aloja.

No dia 22 de fevereiro o Pesquisador Marco Aurélio Takita participou do Exame de Qualificação de Mestrado em Tecnologia da aluna Eloá Carolina Nava Cardoso Palma, sua co-orientada, na Faculdade de Tecnologia da Unicamp, campus de Limeira, que contou também com a participação da Pesquisadora Alessandra Alves de Souza, como membro da banca. A aluna fez a apresentação do trabalho que desenvolveu no mestrado, cujo título é “Biodunet: um sistema *Web*

*Open Source* com visualização 3D para manipulação de clonagem em plasmídeos», na linha de pesquisa em Bioinformática.

O Pesquisador Marco Aurélio Takita ainda participou, no dia 25 de fevereiro, do Exame de Qualificação de Fernanda Raquel Camilo dos Santos, aluna de doutorado do Curso de Pós-graduação em Agricultura Tropical e Subtropical do Instituto Agrônomo, orientada da Profa. Dra. Maria Imaculada Zucchi, na área de concentração Genética, Melhoramento Genético e Biotecnologia. Na ocasião a aluna apresentou um projeto intitulado «Expressão de proteínas heterólogas envolvidas na degradação de celulose proveniente do bagaço de cana-de-açúcar, visando maior eficiência da produção do etanol».

### Aula em Pós-graduação

No dia 27 de fevereiro, o PqC Marco Aurélio Takita ministrou aula no Curso de Pós-graduação em Tecnologia da Faculdade de Tecnologia da Unicamp, campus de Limeira, no curso “FT045 Tópicos em Tecnologia para Informação II: Introdução à Bioinformática”. O curso foca aspectos de biologia molecular básica bem como diferentes algoritmos utilizados em bioinformática, onde o aluno é capacitado a aplicar os conhecimentos adquiridos no desenvolvimento de ferramentas computacionais para o trabalho com a enorme quantidade de dados gerados pelas tecnologias mais atuais.

### XXXVI Congresso Paulista de Fitopatologia

Pesquisadores e alunos do Centro de Citricultura participaram do XXXVI Congresso Paulista de Fitopatologia, ocorrido no Instituto Biológico, em São Paulo, entre os

dias 19 a 21 de fevereiro, com apresentação de oito trabalhos. Estes abordaram temas variados relativos às doenças de ocorrência em citros de origem viral (leprose), bacteriana (CVC e HLB) e controle biológico de doenças micóticas (mancha preta, podridão floral e podridão dos frutos na pós-colheita).

### I Encontro Paulista de Ciência do Solo

Nos dias 26 e 27 de fevereiro ocorreu o I Encontro Paulista de Ciência do Solo, na Unesp - campus Jaboticabal, SP. O evento foi promovido pela Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Núcleo Estadual São Paulo, e teve como tema central: Multidisciplinaridade e Métricas da Produção Sustentável. O evento constituiu-se em um fórum multidisciplinar no qual se desenvolveram conferências, mesas redondas e palestras de especialistas sobre temas importantes, polêmicos e atuais, dando aos participantes a oportunidade para a efetiva troca de experiências entre os profissionais de diferentes áreas de atuação e conhecimento. O Centro de Citricultura foi representado pelo Pesquisador Fernando Alves de Azevedo.



### Expediente

Informativo Centro de Citricultura

### Conselho Editorial

Arthur A. Ghilardi  
José Dagoberto De Negri  
Marcos Antonio Machado  
Vivian Michelle dos Santos

### Colaboração

Fernando Alves de Azevedo  
Helvécio Della Coletta Filho  
Juliana Freitas-Astúa  
Marco Aurélio Takita  
Sérgio Alves de Carvalho  
Tiago Silva Oliveira  
Valéria Mafra

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

[www.centrodecitricultura.br](http://www.centrodecitricultura.br)  
[informativo@centrodecitricultura.br](mailto:informativo@centrodecitricultura.br)

Próximo evento...

**14º Dia do Limão Tahiti**  
11 de abril de 2013  
em Pindorama, SP

Inscrições e informações:  
[diadolimao@gmail.com](mailto:diadolimao@gmail.com)  
[eventos@centrodecitricultura.br](http://eventos@centrodecitricultura.br)



Secretaria de Agricultura  
e Abastecimento