



Informativo Centro de Citricultura

Cordeirópolis, Fevereiro de 2015 • Número 237

4ª Conferência sobre Pesquisa com HLB: avanços científicos

IRCHLB IV

International Research Conference
on Huanglongbing

Caribe Royale
Orlando, Florida, USA

February 9 -13, 2015

A seguir estão relacionados temas importantes apresentados durante a conferência. Vários podem ter ficado fora desse levantamento, sendo que os resumos completos podem ser encontrados em <http://irchlb.org/hlb/Abstracts.aspx>.

Controle cultural e epidemiologia

- Pomares mais jovens que seis anos têm maior expectativa de produção quando a infecção estiver na fase inicial e forem feitos controle adequado do vetor e erradicação de plantas doentes. Pomares mais velhos podem ter boa produtividade controlando o vetor e não permitindo infecção secundária.
- A presença de plantas de murta ou de citros em pomares não comerciais ou residenciais sem controle de vetor é fonte constante de infecção. Ações externas ao pomar, como remoção de plantas infectadas e controle do vetor na vizinhança é essencial para redução na taxa de progresso em pomares comerciais.
- O manejo nutricional com boro, nitrato de potássio, sulfato de zinco, sulfato de manganês, fosfito e ácido salicílico, de quatro a cinco vezes por anos nos períodos de brotação e durante três anos, não mostrou nenhum efeito positivo no controle da doença no Brasil.
- A infecção primária dentro do pomar é extremamente difícil de ser controlada. No entanto, a infecção secundária (de fora para dentro do pomar) é extremamente eficiente para a manutenção e dispersão da doença.
- Tem sido demonstrada a ocorrência de porta-enxertos com maior tolerância ao HLB, principalmente híbridos com trifoliata. Pode ser uma estratégia

complementar interessante para redução da incidência de HLB em pomares novos. Cultivares mais tolerantes, como limão Rugoso, estão também sendo explorados para melhor entender a relação entre a bactéria e seus hospedeiros. Resistência ou alta tolerância ao

Mais uma vez a comunidade internacional se reuniu em Orlando para debates sobre pesquisa com *huanglongbing* (HLB). Depois da primeira conferência organizada no Brasil em 2006 essa é a quarta vez que esse evento ocorre na Flórida. Concentrada unicamente em HLB, a conferência é rara oportunidade de reunir os principais grupos de pesquisa com citros e debater os últimos avanços em vários aspectos desse patossistema.

Este Informativo do Centro de Citricultura traz uma síntese dos principais destaques dessa conferência.

Participantes

A 4ª Conferência sobre Pesquisa com HLB, realizada no Hotel Caribbean Royale, em Orlando, Flórida, EUA, no período de 9 a 13 de fevereiro teve participação majoritária de norte americanos, com mais de 70% dos inscritos. A segunda maior delegação foi a de brasileiros, com 54 inscritos. A maioria da delegação brasileira era constituída de assessores de empresas citrícolas e funcionários de empresas de defensivos. Pelo Centro de Citricultura participaram os Pesquisadores Marcos Antonio Machado e Dirceu de Mattos Jr e também o Pós Doutorando Leonardo Pires Boava e os doutorandos Diogo Manzano Galdeano e Laís Moreira Granato.

País	Nº de Participantes
EUA	345
Brasil	54
México	18
Argentina	8
China	7
Rep. Dominicana	6
Belize	5
Costa Rica	4
Inglaterra	4
Jamaica	4
Alemanha	3
Espanha	2
Filipinas	2
Israel	2
Japão	2
Vietnã	2
Colômbia	1
França	1
Paquistão	1
Paraguai	1
Total	472

Temática

A conferência foi dividida em quatro grandes temas, desenvolvidos com apresentações orais e pôsteres.

Tema	Oral	Poster	Total
Controle cultural e epidemiologia	30	29	59
Interação Planta-Patógeno-Hospedeiro	26	51	77
Consequências da infecção	17	6	23
Vetor	20	31	51
Total	93	117	210

Editorial

Avanços sem avanços

Embora possa parecer paradoxal, o título “avanços sem avanços” reflete o sentimento geral sobre os resultados apresentados pela comunidade científica internacional na 4ª Conferência Internacional sobre Pesquisa com HLB, ocorrida recentemente em Orlando, Florida. Particularmente relevante tem sido a contribuição da comunidade científica dos Estados Unidos, principalmente em função do grande volume de recursos que foram aplicados pelo setor privado no setor de pesquisa. Todas as frentes científicas sobre o tema HLB têm sido abordadas, como na construção de um grande quebra-cabeça. Sem precedentes na história recente da pesquisa em patologia de plantas foi o acúmulo de conhecimento ocorrido nesses dez anos de HLB no Brasil e nos Estados Unidos. De modo direto tudo isso está registrado em um sem número de publicações em revistas referenciadas.

Houve avanços consideráveis sobre biologia das bactérias (genomas, presença de fagos ativos e efetores possivelmente envolvidos em patogenicidade) e do vetor (genomas, potencial controle com RNA interferente e efeito de temperatura), tolerância diferencial entre genótipos de citros e gêneros afins, possível efeito do porta-enxerto sobre o desenvolvimento da doença, comprovação que bom manejo nutricional pode retardar o surgimento de sintomas, modelos epidemiológicos avançados que explicam o padrão de distribuição da doença e produção de plantas geneticamente modificadas buscando tolerância à bactéria ou ao vetor. No entanto, ainda não se encontrou estratégia de sustentabilidade para pomares infectados, ou para evitar a expansão em pomares sadios, ou mesmo para uma solução definitiva.

O fato é que a complexidade do patossistema HLB não permite visualizar uma “bala de prata” que venha resolver seus desafios. Assim como em outros patossistemas de citros, precisamos de estratégias de manejo que permitam sustentabilidade da produção. Embora o Brasil também não tenha a solução, as estratégias de manejo (mudas sadias, controle intensivo do vetor e monitoramento da vizinhança) estabelecidas até o momento são as únicas possibilidades que permitem vislumbrar expectativa de manutenção produtiva do pomar.

Muito provavelmente o intenso combate ao HLB nos primeiros anos após sua confirmação no Brasil, através de ações conjuntas da Coordenadoria de Defesa Agropecuária (CDA), Fundecitrus e Centro de Citricultura, tenha permitido uma adequada aprendizagem sobre o patossistema.

Evidentemente que os avanços científicos obtidos nos últimos anos são essenciais na consolidação do conhecimento e, a partir daí, na busca de uma solução definitiva. No entanto, o rápido progresso do HLB na Flórida e a expansão recente no Estado de São Paulo não deixam dúvidas. Ele está sendo muito mais rápido que todos.

Matéria de Capa

HLB foram observadas em *Microcitrus* e *Eremocitrus*.

- Termoterapia de plantas no pomar (40 a 48 °C por 3 a 7 dias) reduz os sintomas de HLB e o título da bactéria, permitindo maior crescimento da planta por dois ou mais anos. A questão principal é como levar e operacionalizar esse conceito ao pomar.

- Controle químico (antibióticos, peptídeos ou outras moléculas) da bactéria foi tema de algumas apresentações, mas sem discussão sobre eventual impacto ambiental e operacional.

- O uso de cães treinados para detecção de plantas com HLB e cancro cítrico foi uma novidade operacional para levantamento dessas doenças no pomar.

- O pH e o teor de bicarbonato na água de irrigação, bem como salinidade, teor de cátions e ânions, com acidificação da rizosfera, aumentam a taxa de liberação de Ca, Mg, Mn, Zn e Fe. Nessas condições, há redução de sintomas de HLB e de queda de frutas.

- O uso de antibióticos, especialmente penicilina-G e estreptomicina, por injeção ou por aspersão foi apresentado. Penicilina injetada foi o tratamento mais efetivo na redução de sintomas.

- Alguns estudos sobre transmissão de HLB por enxertia natural de raízes estão sendo conduzidos. Ao se confirmar a transmissão, será mais um complicador na epidemiologia da doença, principalmente quando a tecnologia de adensamento de plantio é uma opção para melhorar produtividade.

- Poda associada ao manejo nutricional tem sido tentada para reduzir os efeitos do HLB. Poda severa rejuvenesce a planta e afeta a produtividade, principalmente no primeiro ano. No terceiro ano o custo da poda já seria pago.

Interação Planta-Patógeno-Hospedeiro

- Padrões de expressão gênica entre plantas suscetíveis enxertadas em porta-enxertos com maior tolerância ao HLB estão sendo estudados.

- A bactéria cultivável *Liberibacter crescens* tem sido utilizada, através de comparação de vias metabólicas presentes no genoma, para entender as dificuldades no cultivo de *Liberibacter asiaticus* (Las).

- Novos métodos de detecção de HLB estão sendo desenvolvidos, entre eles o uso de proteoma e técnicas de espectrometria. No entanto, todos esses métodos são de alta sensibilidade e baixo rendimento.

- Novos estudos sobre efetores da bactéria do HLB demonstram que existe interação ativa dela com o hospedeiro, o que abre

possibilidades de novos alvos a serem atacados. Do mesmo modo, novos genes de resistência de hospedeiros alternativos passam a ser alvos para transformação genética.

- O sequenciamento do genoma de 26 isolados da bactéria Las demonstra a ocorrência de dois grupos principais com mistura de isolados. Aparentemente os fagos e profagos nos genomas da bactéria parecem desempenhar um importante papel na transmissão pelo vetor. Alguns desses profagos parecem ter atividade de peroxidase, o que permite focalizar em um alvo da bactéria a ser avaliado para alterações. Esses fagos só se expressam quando a bactéria está na planta hospedeira e não quando está no vetor.

- A ocorrência de Las não patogênicas, principalmente associadas à ausência de fagos, abre uma boa perspectiva de aprofundar os estudos sobre seus mecanismos de patogenicidade.

- A estratégia de produção de plantas de citros geneticamente modificadas com genes do próprio grupo deverá reduzir a rejeição pelo público quando essas plantas se tornarem comerciais. Fatores que causam o enfraquecimento do sistema radicular, como podridão radicular causada por *Phytophthora* ou outros fatores bióticos e abióticos, agravam os sintomas e consequências do HLB. Fica evidente que o HLB reduz consideravelmente o vigor do sistema radicular, antes mesmo do desenvolvimento de sintomas foliares. Uma das consequência é a redução da efetividade de fungicidas no controle à *Phytophthora*.

- O conhecimento dos efetores produzidos pela bactéria poderá auxiliar no entendimento dos mecanismos de sua patogenicidade e assim buscar estratégias para bloquear esses efetores. Alguns efetores que interagem com os cloroplastos já foram identificados.

- Peptídeos antimicrobianos tem potencial de ação direta sobre bactérias e podem ser usados para produção de plantas geneticamente modificadas. Tais plantas, transformadas com os peptídeos thionina e D4E1, já se encontram em avaliação experimental no campo.

- Buscando entender a biologia da bactéria no floema está sendo estudada a composição da seiva do floema. Além de micronutrientes foram constatadas altas concentrações de nucleotídeos, aminoácidos, ácidos orgânicos e açúcares.

- Uma nova espécie, *Candidatus Liberibacter caribbeanus*, foi encontrada em citros na Colômbia, mas ainda faltam informações sobre patogenicidade e severidade do HLB provocado por ela.

- No México foram encontrados dois fitoplasmas (*Candidatus Phytoplasma asteris*, subgrupo B e subgrupo S) em plantas de citros com sintomas de HLB.

- Mecanismos de defesa associados à resposta via ácido salicílico são acionados tanto em laranja quanto em trifoliata. No entanto, tais mecanismos não se assemelham a resposta de SAR (*systemic acquired resistance*), ou estão restritos ao local da infecção só desencadeando respostas de hipersensibilidade (HR).
- Em pomares mais adensados a população de psilídeos tende a ser maior que em pomares mais espaçados. Por outro lado, a presença de quebra-ventos reduz o número de psilídeos.
- Foi apresentada uma nova estratégia de transformação de citros utilizando vetores de *zinc finger nucleases*, que permitem edição do genoma.

Consequências da infecção

- Alta queda de frutos em plantas infectadas não é aliviada com a aplicação de auxinas, nem com irrigação.
- HLB altera o padrão de voláteis da casca de laranja Valencia. Há acumulação de terpenos, o que sugere aumento das vias de síntese desses compostos. Por outro lado, há redução de aldeído, o que impacta negativamente a qualidade do óleo essencial.
- HLB altera o padrão do suco pela redução em açúcares e aumento de ácidos orgânicos e limoneno (responsável pelo sabor amargo do suco). Foi desenvolvida metodologia para correlacionar por PCR a presença do patógeno no suco e a qualidade no sabor do mesmo.
- Mais uma vez compostos orgânicos voláteis são distinguíveis entre plantas doentes e plantas saudáveis. Esse padrão de volátil também é distinto entre plantas com CTV e cancro cítrico.
- Aparentemente o declínio de plantas com HLB poderia ser, em parte, associado ao acúmulo de elementos essenciais e não essenciais, com efeito tóxico para a planta.
- HLB reduz primeiramente o desenvolvimento de raízes, antes mesmo do aparecimento de sintomas foliares. Essa redução ocorre em duas fases, e é mais severa quando há obstrução do floema. Essa redução de desenvolvimento é acompanhada de estímulo para crescimento de novas raízes, mas que não suportam as necessidades da planta.

Vetor

- Foi avaliado o padrão espectral de luz para detectar onde o vetor teria maior sensibilidade. O uso de cobertura morta que reflete UV reduziria a infestação do vetor.
- Confirmada a replicação da bactéria no vetor, principalmente em ninfas, que adquirem a bactéria mais rapidamente que as formas adultas.

- A resistência de alguns híbridos de citros para *Diaphorina citri* parece estar associada ao espessamento dos feixes do floema que dificultam a penetração do estilete.

- Embora *D. citri* seja atraída por luz não há alterações significativas de sua movimentação dentro do pomar em função das alterações da luz ao longo do dia.

- A tecnologia de RNA interferente (RNAi) tem sido aprimorada para o controle do vetor. É possível reduzir sua população fornecendo solução de dsRNA pelas raízes. O modelo ainda é experimental e usa estacas mantidas na solução. O tratamento com dsRNA também não aumenta a repelência do psilídeo à planta tratada. Por outro lado, o dsRNA é rapidamente degradado dentro da planta e no solo, reduzindo problemas associados à persistência no ambiente e em frutos.

- De modo geral, psilídeos expostos à bactérias Gram-negativas tem menor taxa de sobrevivência que aqueles expostos à bactérias Gram-positivas, revelando reduzido sistema imune inato do vetor.

- O uso de plantas armadilhas para atrair o vetor pode ser uma estratégia complementar para o manejo do inseto. Nesse sentido foi observado que fêmeas de *D. citri* são mais atraídas para plantas de *Murraya* do que para plantas de citros.

- A colonização de *D. citri* por *Liberibacter asiaticus* apresenta padrão de infecção por bactérias patogênicas. As vias metabólicas envolvidas nessas respostas são alvos promissores para intervir na transmissão da bactéria.

- Foram identificados viroses (*Iflavirus*) em *D. citri* que tem potencial para serem utilizados no controle do vetor. Por outro lado, a técnica de RNAi demonstra que funciona muito bem para reduzir o ciclo de vida do inseto, mesmo quando fornecido de forma oral em dieta artificial.

- *D. citri* tem limitada percepção de compostos voláteis naturais de citros. No entanto, quando há degradação desses compostos em suas formas ácidas ou acetatos, ocorrem altos níveis de resposta em estudos de eletrofisiologia da antena.

- Foi avaliado o efeito do espectro luminoso do dia na capacidade de voar de *D. citri*. Psilídeos infectados respondem mais prontamente ao voo sob luz verde e azul. O conhecimento dos hábitos do vetor será seguramente uma estratégia para melhorar seu controle.

- Alguns trabalhos estão sendo conduzidos no sentido de usar *Wolbachia*, uma bactéria endossimbionte de *D. citri*, para controlar a transmissão da bactéria do HLB. Modelos semelhantes tem sido empregados no mosquito transmissor da dengue.

Bibliografia sobre HLB

Uma base de dados de publicações sobre HLB está disponível em www.imok.ufl.edu.

Pesquisa

Identificação, diversidade e interações de *Brevipalpus phoenicis*

Brevipalpus phoenicis se destaca entre as espécies do gênero *Brevipalpus* (Acari:Tenuipalpidae) com relevância principalmente na citricultura paulista, por ser considerada a espécie vetora do *Citrus leprosis virus C* (CiLV-C), causador da leprose dos citros. Os sintomas podem variar dependendo da espécie cítrica e, em geral, os sintomas são manchas anelares localizadas, cloróticas ou necróticas, em folhas, ramos e frutos. A doença tem grande impacto econômico, causa perdas significativas na produção dos pomares e tem grande implicação ambiental, devido ao constante uso de acaricidas para controle desse vetor. Muitos estudos concentram-se nas interações entre vetor, vírus e hospedeiro mas, no entanto, são escassas as informações sobre a base genética dessas interações.

Estudos realizados acerca da taxonomia de *B. phoenicis* demonstraram ocorrer divergência morfológica entre populações de ácaros, gerando questionamento sobre a existência de variações intraespecíficas ou a ocorrência de espécies crípticas, cujos indivíduos poderiam ocorrer simultaneamente em citros. Há relatos de eficiência de inoculação diferencial entre populações do vetor; porém, não há informações se isto está relacionado à estas morfoespécies. Sendo assim, estas variações devem ser melhor exploradas no quesito interação vírus-ácaro-planta.

Pesquisas no CCSM-IAC, com apoio da Fapesp e CNPq, têm sido conduzidas com o propósito de validar marcadores moleculares com potencial para auxiliar na rápida identificação destas morfoespécies e, conseqüentemente, obter informações sobre a real diversidade genética de *B. phoenicis*. Concomitantemente, há estudos avaliando a eficiência de inoculação do vírus da leprose (CiLV-C), por algumas dessas morfoespécies, em laranja Pera (*Citrus sinensis*), que é uma das principais variedades dos pomares paulistas. Espera-se a curto-médio prazo gerar informações que contribuam para os estudos epidemiológicos da leprose dos citros e para o manejo da doença nos pomares.

Valdenice Moreira Novelli

Pesquisa Aplicada

Especificidade de hospedeiros de *Xylella fastidiosa*: laranjeiras e cafeeiros

A bactéria *Xylella fastidiosa* é um dos patógenos que afetam um dos maiores números de espécies de plantas. Encontra-se presente em culturas agrícolas, ornamentais, assim como também pode infectar plantas nativas e daninhas presentes na flora. Em nossas condições tem sido responsável pela clorose variegada dos citros (CVC), requeima da folha do cafeeiro (RFC), também conhecida como atrofia do ramo do cafeeiro (ARC) e escaldadura da folha da ameixeira (EFA). Nas propriedades agrícolas, os cultivos de café e laranja doce muitas vezes dividem espaços comuns, sendo separados apenas por carreadores. Estes hospedeiros também são alvo da alimentação dos vetores deste patógeno, conhecidos popularmente como cigarrinhas (Hemiptera: *Cicadellidae*). Como estes insetos são polípagos, ou seja, alimentam-se de inúmeras plantas cultivadas ou da flora local, fazem com que aumentem as chances de infecções cruzadas ocorrerem entre estirpes de *X. fastidiosa* de diferentes hospedeiros.

Não é claro na literatura a ocorrência de infecções cruzadas entre *X. fastidiosa* de laranjeiras e cafeeiros, devido ao baixo número de isolados utilizados nos trabalhos realizados e às diferentes

condições metodológicas utilizadas. No intuito de tentarmos esclarecer esta questão, um total de 226 isolados de *X. fastidiosa* foram obtidos de laranjeiras (n = 127) e de cafeeiros (n = 99) cultivados proximamente. Estes isolados foram genotipados por meio de 14 marcadores genéticos diferentes.

Os resultados mostraram que mesmo dentro de uma mesma área geográfica e compartilhando dos mesmos insetos vetores, isolados de *X. fastidiosa* de laranjeiras e cafeeiros são biologicamente e geneticamente distintos, não sendo possível apontar nenhum evento de infecção cruzada. Em condições controladas, ensaios de inoculações cruzadas, utilizando estirpes representantes de 14 grupos genéticos distintos de *X. fastidiosa* de laranjeiras e 15 de cafeeiros, mostraram também ausência de infecções cruzadas entre estirpes de *X. fastidiosa* de laranjeiras em cafeeiro e vice-versa.

Embora não se tenha observado eventos de infecção cruzada ocorrendo nos patossistemas testados, não se pode esquecer da alta capacidade adaptativa dessas bactérias em outros hospedeiros. Exemplo disso são as infecções por *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* em oliveiras, que estão acontecendo na região de Puglia, na

Itália. No Brasil, plantas de oliveira também têm sido observadas como hospedeiras de *X. fastidiosa*, cuja origem aponta para isolados advindos de cafeeiros, dado a altíssima similaridade genética entre ambos.

Apesar dos inúmeros estudos sobre os patossistemas de *X. fastidiosa*, ainda são incertos os processos envolvidos na adaptação desta bactéria a novos hospedeiros, assim como a importância de reservatórios naturais de estirpes desta bactéria nestes processos. Porém sabe-se que recombinação é um processo presente em *X. fastidiosa*. Estes fatos reforçam ainda mais a necessidade e importância de estudo populacionais envolvendo diferentes hospedeiros e seus insetos vetores.

Carolina Sardinha Francisco,
aluna de Mestrado e
Helvécio D. Coletta Filho, Pesquisador



Expediente

Informativo Centro de Citricultura

Conselho Editorial

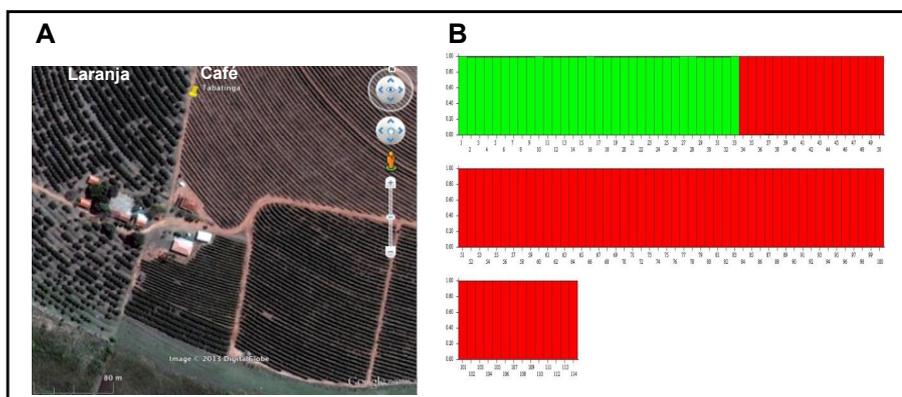
Arthur A. Ghilardi
José Dagoberto De Negri
Marcos Antonio Machado
Vivian Michelle dos Santos

Colaboração

Carolina Sardinha Francisco
Helvécio Della Coletta Filho
Valdenice Moreira Novelli

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

www.centrodecitricultura.br
informativo@centrodecitricultura.br



A) Foto aérea demonstrando a proximidade entre as culturas de laranja doce e café amostradas no trabalho. B) Análise estatística dos dados genéticos mostrando claramente a separação entre os isolados de *Xylella fastidiosa* de laranja doce (verde) e café (vermelho).

