



XXII Congresso Brasileiro de

Fruticultura

Bento Gonçalves - RS
22 a 26 de outubro de 2012

USO DE FERRAMENTAS BIOTECNOLÓGICAS PARA O MANEJO DO HLB DOS CITROS

JULIANA FREITAS-ASTUA¹, POLYANA KELLY MARTINS², VALÉRIA SIQUEIRA
MAFRA³, JULIANA BALBINOTTE⁴, JOÃO ROBERTO SPOTTI LOPES⁵, ROSE
MONNERAT⁶, MARCOS ANTONIO MACHADO⁷

INTRODUÇÃO

O *huanglongbing* (HLB ou greening) dos citros é uma doença devastadora, conhecida há cerca de 100 anos em países da Ásia e da África. Relatada no Estado de São Paulo em 2004 (COLETTA-FILHO et al., 2004), a doença tem se disseminado rapidamente para novas áreas das Américas juntamente com seu vetor, o psíldeo *Diaphorina citri*. O controle do HLB apregoado até o momento baseia-se no tripé: uso de mudas saudáveis, erradicação de plantas sintomáticas e controle químico do vetor (GOTTWALD, 2010). No entanto, há grande demanda para o desenvolvimento e a implementação de estratégias alternativas para o manejo da doença que sejam menos dispendiosas e menos nocivas ao ambiente. Em função disso, diversos grupos de pesquisadores em todo o mundo têm buscado outras opções que auxiliem no manejo integrado do HLB, sejam elas hortícolas, fitossanitárias, epidemiológicas ou biotecnológicas (ALBRECHT; BOWMAN, 2011).

Nossos esforços têm sido feitos com o intuito de aumentar a resistência de cultivares comerciais à doença através de transgenia e reduzir a densidade populacional do psíldeo, através de uma nova abordagem de controle biológico do vetor, usando estirpes de *Bacillus thuringiensis* (Bt). Vários genes foram identificados como envolvidos na resposta de citros à infecção por *Candidatus Liberibacter* spp., bactérias causadoras do HLB, sendo que alguns deles são considerados candidatos potenciais a conferirem resistência à doença e, em função disso, estão sendo

¹ Pesquisadora, Embrapa Mandioca e Fruticultura e Centro de Citricultura Sylvio Moreira/IAC, e-mail: juliana@cnpmf.embrapa.br

² Pós doc Capes, Centro de Citricultura Sylvio Moreira/IAC, e-mail: polyana@centrodecitricultura.br

³ Doutoranda, Centro de Citricultura Sylvio Moreira/IAC, e-mail: valeriamafra@centrodecitricultura.br

⁴ Bióloga, mestre em Entomologia, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/USP, e-mail: julibalbinotte@usp.br

⁵ Professor associado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/USP, e-mail: jrslopes@usp.br

⁶ Pesquisadora, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, e-mail: rose@cenargen.embrapa.br

⁷ Pesquisador, Centro de Citricultura Sylvio Moreira/IAC, e-mail: marcos@centrodecitricultura.br



XXII Congresso Brasileiro de

Fruticultura

Bento Gonçalves - RS
22 a 26 de outubro de 2012

caracterizados e usados para a transformação de genótipos de citros. Com relação ao manejo do vetor, nosso grupo desenvolveu metodologias para o *screening* de estirpes de Bt patogênicas a *D. citri*, tendo sido encontradas pelo menos duas delas que apresentam potencial para serem usadas como agentes de controle biológico do vetor do HLB.

MATERIAL E MÉTODOS

A identificação e a clonagem de genes de interesse usados na produção de citros transgênicos foi feita a partir da análise do transcriptoma de laranja doce (*Citrus sinensis*) Pêra em resposta à infecção por *Candidatus Liberibacter americanus* (CaLam) obtido através do uso de um chip de DNA contendo as informações do genoma de laranja (32.000 unigenes). Adicionalmente, foram feitas buscas na literatura por genes envolvidos na defesa de plantas a patógenos (ALBRECHT; BOWMAN, 2008; 2012; FAN et al., 2011). Os genes selecionados foram clonados em vetores da série pCambia e alguns deles já foram inseridos em diferentes genótipos de citros via transformação por *Agrobacterium tumefaciens*.

Para o caso do controle do psilídeo, inicialmente foram desenvolvidas metodologias para a alimentação *in vitro* de *D. citri*, inoculação de isolados de *Bacillus thuringiensis* em plântulas de laranja doce Pêra e posterior detecção da bactéria em ninfas de psilídeo que se alimentavam dessas plantas. Após a otimização das metodologias, foi feito o *screening* e a seleção de isolados de Bt potencialmente úteis para o controle biológico de *D. citri*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Seiscentos e trinta e três genes foram diferencialmente expressos em laranja doce em resposta a CaLam, sendo 418 deles induzidos e 215 reprimidos. Dezenove genes foram selecionados a partir desses resultados e também com base em seu envolvimento em respostas de defesa de plantas a patógenos já descritos na literatura. Todos eles foram clonados em vetores da série pCambia, sendo que seis genes já foram introduzidos em plantas de citros. Até o momento, apenas plantas transformadas com um único gene foram desafiadas com psilídeos infectados por *Ca. Liberibacter asiaticus* e estão sendo avaliadas quanto à resposta do HLB. No entanto, plantas dos outros eventos de transformação estão sendo multiplicadas e preparadas para o desafio.



XXII Congresso Brasileiro de

Fruticultura

Bento Gonçalves - RS
22 a 26 de outubro de 2012

Dos 20 isolados de Bt testados, dois apresentaram potencialidade para o uso como agentes de controle biológico de *D. citri*, causando mortalidades próximas a 75% das ninfas testadas.

CONCLUSÕES

Infelizmente, não existe uma estratégia única que seja simples, rápida, barata e eficiente para controlar o HLB dos citros. Pelo contrário, a experiência de todos os países onde a doença ocorre mostra que o manejo adequado é oneroso e complexo. No entanto, através de informações obtidas com o sequenciamento do genoma de citros, do transcriptoma de laranja doce em resposta ao HLB e da busca por alternativas para o controle do psílídeo, acreditamos ser possível encontrar opções viáveis que poderão ser úteis como ferramentas ao manejo integrado do HLB ao médio e longo prazo.

AGRADECIMENTOS

Ao convênio Embrapa-Monsanto (projeto 02.08.05.004.00.00) e ao INCT-Citros pelo auxílio financeiro.

REFERÊNCIAS

- FAN, J.; CHEN, C.; YU, Q.; BRLANSKY, R.; ZHENG-GUO, L.; GMITTER, F.G. Comparative iTRAQ proteome and transcriptome analyses of sweet orange infected by *Candidatus Liberibacter asiaticus*. **Physiologia Plantarum**, Lund, Sweden, v.143, n.3, p.235-245, 2011.
- ALBRECHT, U.; BOWMAN, K.D. Transcriptional response of susceptible and tolerant citrus to infection with *Candidatus Liberibacter asiaticus*. **Plant Science**, v.185-186, p.118-130, 2012.
- ALBRECHT, U.; BOWMAN, K.D. Tolerance of the trifoliolate citrus hybrid US-897 (*Citrus reticulata* Blanco *Poncirus trifoliata* L. raf.) to *Huanglongbing*. **HortScience**, Alexandria, v.46, n.1, p.16-22, 2011.
- COLETTA-FILHO, H.D.; TARGON, M.L.P.N.; TAKITA, M.A.; DE NEGRI, J.D.; POMPEU JR., J.; AMARAL, A.M.; MULLER, G.W.; MACHADO, M.A. First report of the causal agent of *huanglongbing* (“*Candidatus Liberibacter asiaticus*”) in Brazil. **Plant Disease**, St. Paul, v.88, p.1382, 2004.
- GOTTWALD, T.R. Current epidemiological understanding of citrus *huanglongbing*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.48, p.119-139, 2010.