

## DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE HUANGLONGBING DOS CITROS, VIA qPCR, EM MUDAS DE VALÊNCIA SOBRE SWINGLE

Patrícia Herrmann Corrêa<sup>1</sup>, Polyana K. Martins<sup>2</sup>, Gabriella D. Arena<sup>3</sup>, Mariana C. Miguel<sup>3</sup>, Hêmily S. Mutti<sup>3</sup>, Marcos A. Machado<sup>4</sup>, Juliana Freitas-Astúa<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Graduanda, Curso Ciências Biológicas UFSCar-Araras, patriciaherrmann@hotmail.com;

<sup>2</sup>Pós Doutora Centro APTA Citros Sylvio Moreira, Cordeirópolis-SP; <sup>3</sup>Graduanda, curso Biotecnologia UFSCar-Araras; <sup>4</sup>Pesquisador Dr. Centro APTA Citros Sylvio Moreira, Cordeirópolis-SP; <sup>5</sup>Pesquisadora Dra. Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas-BA, juliana@cnpmf.embrapa.br

### INTRODUÇÃO

O HLB é, sem dúvidas, a grande ameaça da citricultura no país, por ser uma doença severa e destrutiva, com prejuízos no desenvolvimento da planta e na produção de frutos. Os agentes causais da doença são espécies da bactéria *Candidatus Liberibacter* spp., que se alojam em vasos do floema. Três espécies de *Liberibacter* estão associadas ao HLB dos citros: *Ca. Liberibacter africanus*, *Ca. L. asiaticus* e *Ca. L. americanus*, sendo as duas últimas de ocorrência no Brasil. A doença pode se propagar através de seu vetor, o psílideo *Diaphorina citri*, e/ou por enxertia de tecidos infectados (Bové, 2006).

O HLB não provoca a morte das plantas, mas, com o passar dos anos, elas se tornam debilitadas e improdutivas. Pomares inteiros podem ficar inviáveis economicamente dentro de sete a dez anos após o aparecimento da primeira planta sintomática se as medidas de controle não forem tomadas (Gottwald et al., 2007).

O período de incubação do HLB depende de vários fatores, variando geralmente de seis a doze meses (Bové, 2006). Diante disso, a inspeção visual do pomar não representa o controle da doença, visto que plantas assintomáticas, porém infectadas, podem permanecer como fontes de inóculo para plantas ainda sadias. Como discutido por Bové (2006) e Gottwald et al. (2007), o conhecimento da proporção de plantas sintomáticas e assintomáticas é importante e deve ser utilizado na decisão da eliminação de pomares inteiros altamente infestados. Assim, a detecção de *Ca. Liberibacter* sp. precocemente é de extrema importância, pois minimiza, dentro do possível, o impacto financeiro aos citricultores com a erradicação das plantas.

Hoje o método mais confiável para o diagnóstico do HLB é o PCR quantitativo em tempo real (qPCR), que amplifica e detecta o DNA bacteriano presente no tecido. O método

visual é também utilizado, porém o diagnóstico é impreciso e pode levar a falsos negativos (plantas infectadas e ainda assintomáticas) ou falsos positivos, uma vez que os sintomas da doença podem ser facilmente confundidos com deficiência nutricional.

## MATERIAL E MÉTODOS

### **Preparação das mudas:**

O experimento consistiu em um conjunto de duzentas mudas de laranjeira Valência [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] enxertadas sobre citrumeleiros Swingle [*Citrus paradisi* Macf. x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.]. A estufa que abrigou as mudas utilizadas neste trabalho situa-se no Centro APTA Citros Sylvio Moreira-IAC, localizado no município de Cordeirópolis-SP.

Do conjunto total de mudas, cem foram conservadas sadias, enquanto que nas outras cem mudas, foram feita a inoculação da bactéria *Ca. L. asiaticus* pelo processo de enxertia de borbulhas. Também foi efetuada uma poda pré-inoculação, visando à estimulação de fluxo vegetativo com novas brotações, favorecendo, assim, a manifestação dos sintomas.

Todas as plantas receberam o mesmo manejo durante o experimento (temperatura, irrigação, adubação, podas e outros procedimentos) na casa de vegetação, onde foram mantidas. A permanência na casa de vegetação garantiu a integridade das plantas sadias, visto que, deste modo, não tiveram contato com o psilídeo *D. citri*.

As mudas inoculadas com a bactéria foram enumeradas de 1 a 100 e as sadias (não inoculadas) de 101 a 200. Sessenta mudas inoculadas e quatro sadias foram selecionadas para as análises, sendo esta seleção baseada no desenvolvimento das mesmas. Uma vez escolhida a muda, a coleta foi repetida mensalmente para comparação.

### **Coleta do material, extração do DNA e qPCR:**

As coletas foram feitas mensalmente. Assim, o término da primeira coleta designa-se “primeiro mês” e assim sucessivamente. De cada uma das plantas avaliadas, três folhas (A, B e C) foram coletadas e serviram como repetição biológica do experimento. Após a coleta, o DNA foi extraído do pecíolo e da nervura de cada folha pelo método CTAB (Murray e Thompson, 1980). O DNA foi ressuspenso em 80 µL de tampão TRIS-EDTA acrescido de 20 µg/µL de RNase. A concentração e qualidade do DNA foram analisadas em espectrofotômetro NanoDrop™ 8000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE) e por eletroforese em gel de agarose a 1%, respectivamente.

Os *primers* e sondas usados no ensaio foram desenhados por Carlos et al. (2006) usando o software Primer Express (versão 2.0 AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA) e sintetizados pela mesma empresa. O desenho foi feito com base na sequência do gene 16S

rDNA de *Ca. L. asiaticus* (GenBank AY919311). Para cada coleta foram montadas placas de qPCR compostas pelas amostras de DNA de uma muda sadia como controle negativo, das mudas infectadas pela bactéria e do controle de amplificação (reação sem DNA). As amostras foram avaliadas em duplicata, pipetadas automaticamente no aparelho epMotion 5070 Eppendorf. A amplificação, a aquisição dos dados e as análises foram feitas no equipamento ABI PRISM 7500 Fast Sequence Detection System (Applied Biosystems) com a versão 1.4 do software de análise SDS.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método de qPCR detectou a bactéria a partir do primeiro mês após a inoculação (Tabela 1).

Tabela 1: Resultado de mudas positivas para HLB por análise com qPCR

Nº de plantas positivas por qPCR (%)						
1º Mês	2º Mês	3º Mês	4º Mês	5º Mês	6º Mês	7º Mês
5	21	29	44	52	54	54
(8,33%)	(35,00%)	(48,33%)	(73,33%)	(86,67%)	(90,00%)	(90,00%)

Foi observado um aumento na detecção da bactéria com o passar dos meses, como esperado (Tabela 1). No entanto, nos primeiros três meses após a inoculação, a detecção não foi homogênea para a mesma planta, possivelmente em função da já comprovada distribuição irregular do patógeno no hospedeiro (Irey et al., 2006; Gottwald et al., 2007).

Os sintomas típicos do HLB só foram observados cerca de seis meses após a inoculação, resultado este em concordância com a literatura (Bové, 2006). No entanto, a partir do quarto mês, foram observados sintomas de deficiência nutricional associados exclusivamente às plantas inoculadas, induzindo a dúvidas quanto ao diagnóstico.

Outro dado observado foi que do total de sessenta plantas avaliadas, seis permaneceram negativas por qPCR ao longo dos meses. Provavelmente isso se deve à baixa concentração de bactérias na borbulha enxertada.

## CONCLUSÃO

Esse foi o primeiro estudo envolvendo a detecção temporal de *Ca. L. asiaticus* na combinação laranja Valência sobre citrumelo Swingle em condições controladas. Nossos dados corroboram aqueles publicados por outros autores de que a bactéria pode ser detectada por qPCR a partir do primeiro mês de inoculação, muito antes do aparecimento dos sintomas característicos.

## AGRADECIMENTO

Ao biólogo Luis Fernando Carvalho Silva, do Centro APTA Citros Sylvio Moreira-IAC, pela condução das plantas em casa de vegetação, ao CNPq pela cessão da bolsa de estudos da primeira autora e à FAPESP e Embrapa pelo suporte financeiro do projeto.

## REFERÊNCIA

- BOVÉ J.M. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. **Journal of Plant Pathology**, v.88, p.7-37, 2006.
- CARLOS, E.F.; COLETTA-FILHO, H.D.; TARGON, M. L. N.; MACHADO, M.A. Quantitative real-time PCR based on TAQMAN probes for the molecular detection of *Candidatus Liberibacter asiaticus* and *Ca. L. americanus*. In **Huanglongbing-Greening International Workshop** (p. 81), Ribeirão Preto, SP, Brazil, July 16–20, 2006 Proceedings.
- GOTTWALD, T.R.; da GRAÇA, J.V.; BASSANEZI, R.B. **Citrus huanglongbing: the pathogen and its impact**. Plant Health Progress 6 September 2007. Online (doi: 10.1094/PHP-2007-0906-01-RV).
- IREY, M.S.; GAST, T.; GOTTWALD, T.R. Comparison of visual assessment and polymerase chain reaction assay testing to estimate the incidence of the Huanglongbing pathogen in commercial Florida citrus. **Proceedings of Florida State Horticultural Society**, v.119, p.89-93. 2006.
- MURRAY, M.; THOMPSON, W.F. Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, v.8, p. 4321-4325, 1980.
- TEIXEIRA, D.C.; SAILLARD, C.; COUTURE, C.; MARTINS, E.C.; WULFF, N.A.; EVEILLARD-JAGOUÉIX, S.; YAMAMOTO, P.T.; AYRES, A.J.; BOVE, J.M. Distribution and quantification of "*Candidatus Liberibacter americanus*", agent of huanglongbing disease of citrus in São Paulo State, Brazil, in leaves of an affected sweet orange tree as determined by PCR. **Molecular and Cellular Probes**, v.22, p.139–150, 2008.