



# Atualizações da pesquisa científica mundial para o controle efetivo do HLB

**Juliana Freitas-Astúa**  
Embrapa Mandioca e Fruticultura  
C.A.: Centro APTA Citros Sylvio Moreira



**Embrapa**

Ministério da  
Agricultura, Pecuária  
e Abastecimento

GOVERNO FEDERAL  
**BRASIL**  
PAÍS RICO É PAÍS SEM POBREZA






# Consenso

A doença mais devastadora dos  
citros em todo o mundo

# O que a citricultura necessita para sobreviver ao HLB?

 Ações rápidas de supressão da doença (curtíssimo prazo)

 Eficiente pacote tecnológico de manejo (curto a médio prazo)

 Alternativas eficazes, duradouras e sustentáveis para o controle do HLB (longo prazo)



**Embrapa**

Ministério da  
Agricultura, Pecuária  
e Abastecimento

GOVERNO FEDERAL  
**BRASIL**  
PAÍS RICO É PAÍS SEM POBREZA



# Pacote tecnológico de manejo

Baseado em observações de campo, experiência de outros países com a doença e dados de pesquisa



Manejo cultural



Controle químico do vetor



Epidemiologia da doença


Abordados por especialistas nesse evento



Ministério da  
Agricultura, Pecuária  
e Abastecimento



# Foco dessa apresentação

 Alternativas que possam ser usadas como **ferramentas** no manejo/ controle efetivo, duradouro e sustentável do HLB



Ministério da  
Agricultura, Pecuária  
e Abastecimento



**Importância da pesquisa científica:**



**Conhecer para manejar!**

# Histórico de pesquisa

**-1870-1920: Ásia e África: Descrição de sintomas**

1970-1980: Bactéria como o agente causal do HLB (Drs. Chen/  
Bové)

1980-1990: Identificação das espécies *Ca. Liberibacter asiaticus* (CLas) e *Ca. Liberibacter africanus* (CLaf)/ diferenças quanto à sensibilidade à temperatura, ao vetor, sequências genômicas...

**-2004: América**

>2000s: Grande salto em informações/ novas espécies (CLam), sequenciamento do genoma, diagnóstico, alvos alternativos para controle ...



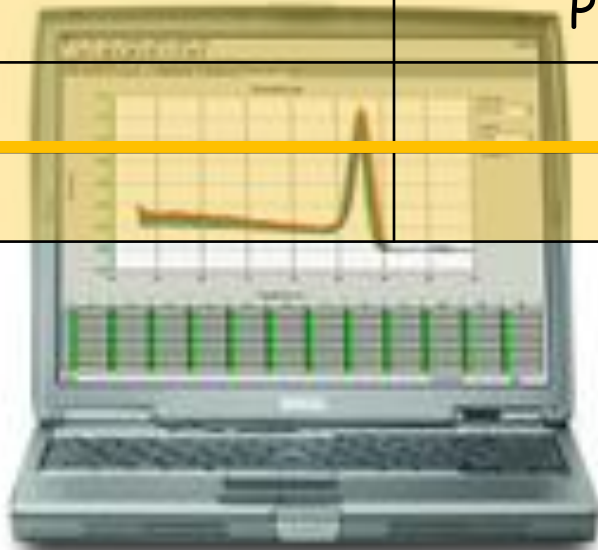
Ministério da  
Agricultura, Pecuária  
e Abastecimento





# Avanços no diagnóstico

<2004	>2004	Perspectivas
Visual	Visual (treinamento/ inspeções)	Visual (treinamento/ inspeções)
Teste de iodo	-	-
Microscopia	-	-
PCR	PCR/ qPCR	Novos primers
		Biofotônica
		Sorologia



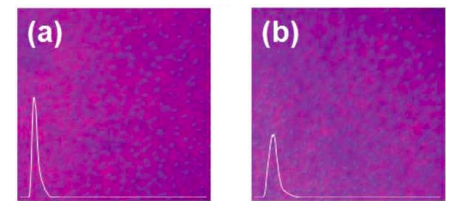


# Avanços no diagnóstico

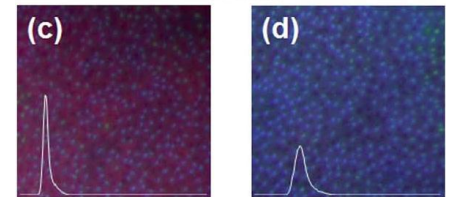
## Análise de fluorescência

- Cada vez mais precoce e confiável
  - qPCR (vários grupos)
    - EUA: concordância de 93% das amostras de 13 laboratórios (qPCR)
  - Biofotônica (Embrapa CNPDIA, grupos na FL)
    - Concordância > 85% com qPCR

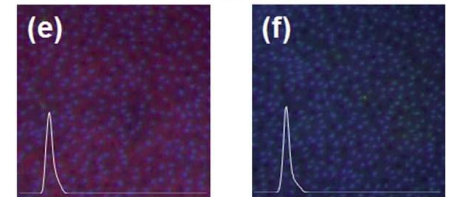
Sadio                      Infectado



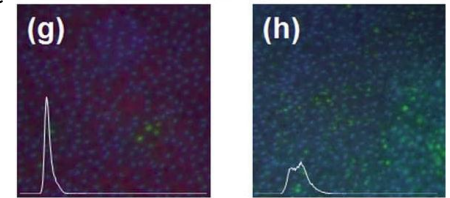
3<sup>rd</sup> month



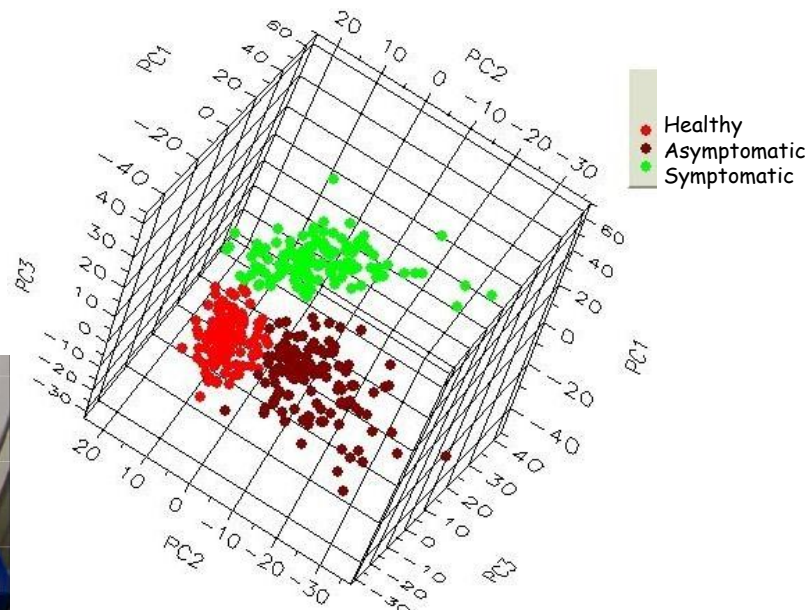
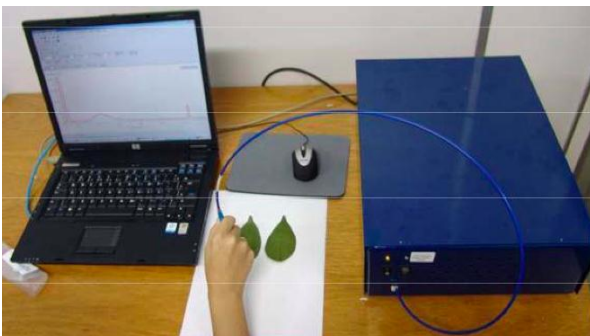
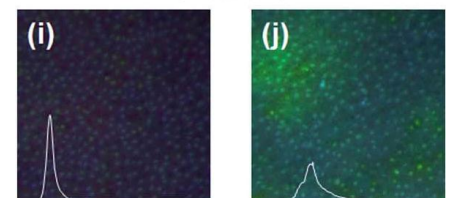
5<sup>th</sup> month



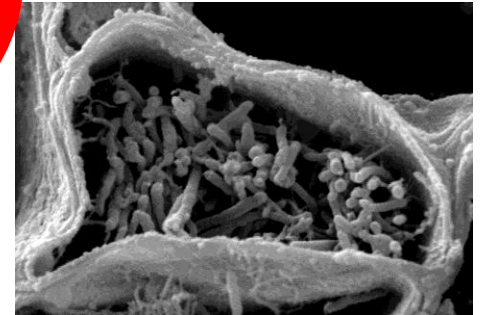
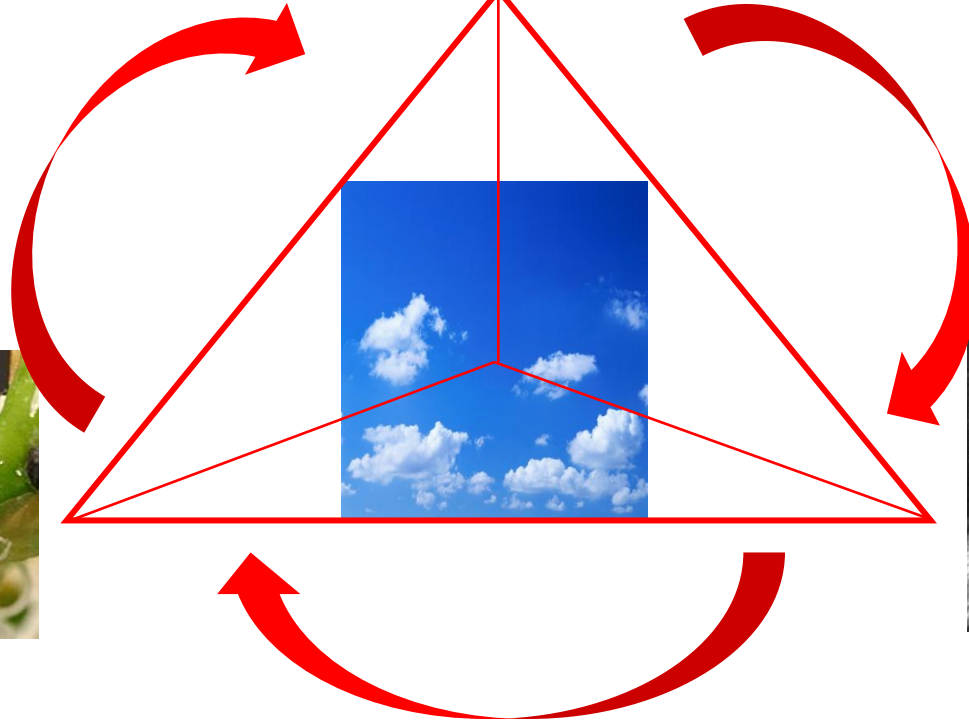
7<sup>th</sup> month



8<sup>th</sup> month



# Tetraedro da doença





# Informações sobre o patógeno

<2004	>2004	Perspectivas
Restrito ao floema	Não transmitido por sementes	
Baixa concentração em citros	Genoma CLas (2009)	Alvos para controle
		Controle do patógeno (PAM, fagos etc.)
<i>Candidatus</i> Liberibacter asiaticus e CLaf	CLam, fitoplasma grupo IX	Genomas, vetores etc. dos outros patógenos
Não cultivável <i>in vitro</i>	Tentativas de cultivo	Cultivo
Variabilidade (sintomas)	Variabilidade (genética)	Variabilidade (implicações epidemiológicas, quarentenárias)



# Resistência à bactéria

- Genoma: alvos para transgenia e desenvolvimento de produtos para o controle do HLB
- Peptídeos anti-microbianos

**PAMs**



- Controle de insetos e nematóides;
- Controle de problemas de pós-colheita;
- Desenvolvimento de novos antibióticos;
- Aplicação em produção animal;
- Indústria alimentícia;

**Controle de doenças de plantas**

# Prospecção de peptídeos anti-microbianos

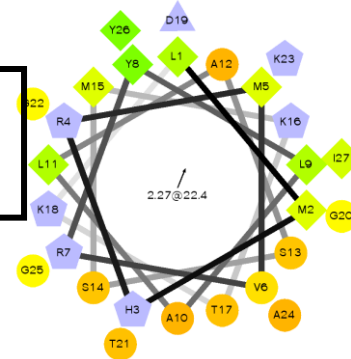
Prospecção de peptídeos que possuem atividade contra bactérias gram-negativas nos bancos de dados PhytAmp (AMP de planta) e APD (AMP)



Comparação dos AMPs com as sequências do CitEst (13)

AntiMIC Predictor - EMBRAPA  
(Dr. Carlos Bloch/ Cenargen)

Helical Wheel Projection  
(Dr. Eduardo Cilli/ Unesp)



um + dois

dois + sete



Ministério da  
Agricultura, Pecuária  
e Abastecimento



# Resultados de MIC e MBC

Microrganismo	Peptídeo	MIC	MBC
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. citri	CJ0714	4 µg/mL	4 µg/mL
	EC0604	8 µg/mL	8 µg/mL
	Hya	16 µg/mL	8 µg/mL
	SC0902	16 µg/mL	16 µg/mL
	AR0610	32 µg/mL	32 µg/mL
	pep1105	64 µg/mL	64 µg/mL
	imipinem	128 µg/mL	2 µg/mL
	ceftazidima	128 µg/mL	16 µg/mL
	CJ0715	128 µg/mL	128 µg/mL
	amoxicilina	Cresceu em todas as concentrações*	
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	AR0610	4 µg/mL	32 µg/mL
	Hya	8 µg/mL	16 µg/mL
	EC0604	8 µg/mL	32 µg/mL
	CJ0714	8 µg/mL	128 µg/mL
	SC0902	16 µg/mL	16 µg/mL
	pep1105	64 µg/mL	128 µg/mL
	pep1106	128 µg/mL	128 µg/mL
	imipinem	2 µg/mL	16 µg/mL
	amoxicilina	2 µg/mL	32 µg/mL
	ceftazidima	128 µg/mL	*



Bowman et al. (2009)

Plant ID	Gene	Line #	qPCR	Visual Symptoms
566	LIMA	MP13	+	+
567	LIMA	MP5	+	+
568	LIMA	MP1	+	+
569	ATTE	MP11	+	-
570	LIMA	MP3-C7	+	+
571	LIMA	MP14	+	-
572	LIMA	MP18	+	+
<b>573</b>	<b>LIMA</b>	<b>MP16</b>	<b>UNDET</b>	<b>-</b>
<b>577</b>	<b>LIMA</b>		<b>UNDET</b>	<b>-</b>
<b>578</b>	<b>LIMA</b>	<b>MP4-C7</b>	<b>UNDET</b>	<b>-</b>
579	ATTE	MP2	+	+
580	LIMA	MP3-C6	+	+
585	ATTE	MP4	+	+
586	ATTE	MP29-C8	+	-
587	LIMA	MP7	+	+
588	ATTE	MP16	+	+
589	LIMA	MP21	+	+
590	ATTE	MP1	+	+
591	ATTE	MP8	+	+
<b>592</b>	<b>ATTE</b>	<b>MP14</b>	<b>UNDET</b>	<b>-</b>
<b>600</b>	<b>LIMA</b>	<b>MP2-C5</b>	<b>UNDET</b>	<b>-</b>
<b>601</b>	<b>LIMA</b>	<b>MP2-C6</b>	<b>UNDET</b>	<b>-</b>
<b>602</b>	<b>ATTE</b>	<b>MP19</b>	<b>UNDET</b>	<b>-</b>
<b>603</b>	<b>LIMA</b>	<b>MP5</b>	<b>UNDET</b>	<b>-</b>
604	LIMA	MP9	+	+
<b>605</b>	<b>LIMA</b>	<b>MP20</b>	<b>UNDET</b>	<b>+</b>
<b>606</b>	<b>ATTE</b>	<b>MP3</b>	<b>UNDET</b>	<b>-</b>
706	Control		+	-

2011: centenas de peptídeos testados... nenhum de citros!!

# Informações sobre o vetor

<2004	>2004	Perspectivas
Informações básicas sobre biologia de <i>D. citri</i> e interação patógeno-vetor	Monitoramento da aquisição e inoculação de CLas (EPG; qPCR), latência	Novas informações...
Controle químico (pouca)	Novos produtos e tecnologias de aplicação; monitoramento do efeito de inseticidas (EPG)	Novas informações...
Controle biológico com parasitóides (Ilhas Reunião)	Novos agentes para controle biológico	Uso de outros agentes
Controle cultural ("efeito goiabeira")	Caracterização de compostos voláteis da goiabeira, bem como de outros atraentes e repelentes	Desenvolvimento de produtos (feromônios, atraentes, repelentes etc.)
	Busca por controle alternativo	RNAi



Ministério da  
Agricultura, Pecuária  
e Abastecimento





# Semioquímicos

- Feromônios, atraentes, repelentes (ESALQ, Embrapa)
- Compostos voláteis repelentes da goiabeira
  - Grande interesse há alguns anos (Vietnã)
  - Testes de olfatômetro









**Caracterização e  
isolamento dos  
compostos de interesse**





# Informações sobre o vetor

<2004	>2004	Perspectivas
Informações básicas sobre biologia de <i>D. citri</i> e interação patógeno-vetor	Monitoramento da aquisição e inoculação de CLas (EPG; qPCR), latência	Novas informações...
Controle químico (pouca)	Novos produtos e tecnologias de aplicação; monitoramento do efeito de inseticidas (EPG)	Novas informações...
Controle biológico com parasitóides (Ilhas Reunião)	Novos agentes para controle biológico	Uso de outros agentes
Controle cultural ("efeito goiabeira")	Caracterização de compostos voláteis da goiabeira, bem como de outros atraentes e repelentes	Desenvolvimento de produtos (feromônios, atraentes, repelentes etc.)
	Busca por controle alternativo	RNAi
	Busca por alvos para resistência ao vetor	



Ministério da  
Agricultura, Pecuária  
e Abastecimento





# Controle biológico do psilídeo

- Possível como **mais uma** ferramenta
  - Áreas livres da doença
  - Pomares abandonados, cidades...
- Clássico: parasitóide *Tamarixia radiata*
  - Exemplo de sucesso: Ilhas Reunião
- Agentes alternativos
  - outros parasitóides, fungos entomopatogênicos...
  - ***Bacillus thuringiensis* (Bt)**
    - Possibilidade para uso em controle biológico convencional e/ou transgenia



**Embrapa**

Ministério da  
Agricultura, Pecuária  
e Abastecimento

GOVERNO FEDERAL  
**BRASIL**  
PAÍS RICO É PAÍS SEM POBREZA

# Controle de *D. citri* com Bt

Screening de estirpes (bioensaio 48h, ninfas 3<sup>o</sup> instar)

Bt eficiente para  
fases imaturas



Principal aquisição da bactéria



20-30% dos psilídeos adultos e 100%  
das ninfas adquirem a bactéria



**Embrapa**

Ministério da  
Agricultura, Pecuária  
e Abastecimento

GOVERNO FEDERAL  
**BRASIL**  
PAÍS RICO É PAÍS SEM POBREZA

# Controle de *D. citri* com Bt

Uso promissor...

## Vantagens

- \* Para controle biológico convencional: menos dependente de condições ambientais, por ser **endofítico**
- \* Para transgenia: precedentes do uso de Bt em outras culturas



# Informações sobre o hospedeiro

<2004	>2004	Perspectivas
Manejo	Manejo	Manejo
Resposta diferencial de genótipos (sintomas)	Busca por genótipos interessantes (plantas elite, BAG, transgênicos)	Material superior (naturalmente R/T, melhoramento convencional, transgenia)
Indutores de SAR	Busca por outros alvos (a partir de informação de genoma, transcriptoma e proteoma)	Uso de alvos obtidos para produção de transgênicos





# Resposta diferencial de genótipos ao HLB





# Genes candidatos para transgenia

“Tradicionais” falharam!!  
Como encontrar alvos potenciais?






Ministério da  
Agricultura, Pecuária  
e Abastecimento





# Busca por genes candidatos para transgenia

-  Informação de genoma, transcriptoma, proteoma, metaboloma... (estudos em larga escala...)
-  Participação no sequenciamento e anotação do genoma completo de citros - Consórcio Internacional (Embrapa e CCSM)
-  Re-sequenciamento de outros genótipos de interesse (laranja doce, limão cravo, ponkan, *Poncirus trifoliata* etc.)



Ministério da  
Agricultura, Pecuária  
e Abastecimento



# Consolidação de banco de ESTs

	<b>Espécie</b>	<b>CitEST</b>	<b>Harvest</b>	<b>CitEST + Harvest</b>	<b>Novos unigenes montados</b>
<i>Citrus sinensis</i>	CS	112,420	89,182	201,602	np
<i>C. reticulata</i>	CR	48,627	87,016	135,643	np
<i>Poncirus trifoliata</i>	PT	34,920	20,981	5,5901	np
<i>C. aurantium</i>	CA	6,797	960	7,757	5,294
<i>C. aurantifolia</i>	CG	7,377	0	7,377	3,989
<i>C. latifolia</i>	LT	6,380	0	6,380	3,754
<i>C. limonia</i>	CL	6,666	0	6,666	1,407
<i>C. limettiodes</i>	CM	2,077	0	2,077	np
<i>C. sunki</i>	TS	2,320	0	2,320	1,378
Citrumelo Swingle	CW	6,908	8,758	15,666	6,799
<i>C. reshni</i>	TC	0	2,679	2,679	1,987
<i>Fortunella</i>	CF	0	1,728	1,728	1,153
<i>C. medica</i> Etrog	CD	0	468	468	327
<i>C. macrophylla</i>	CY	0	1,635	1,635	728
Citrange Carrizo	ST	0	817	817	703
<b>Total</b>		<b>234,492</b>	<b>214,224</b>	<b>448,716</b>	

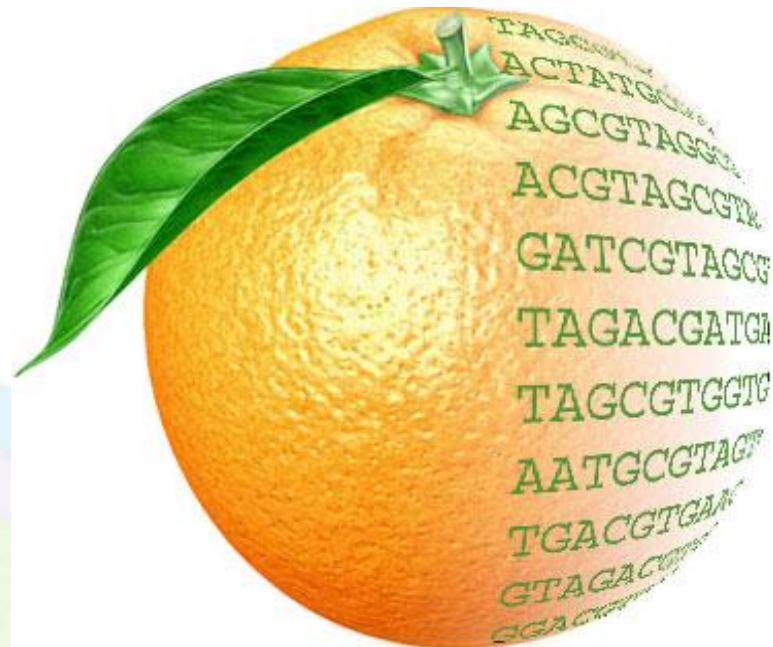
# Sequenciamento de Clementina haplóide pelo ICGG

Brasil (Embrapa e CCSM), EUA, França, Itália, Espanha

Sequenciamento Sanger: JGI, HudsonAlpha e Genoscope

Cobertura: 6.5; 296 Mb; ~ 36.000 transcritos

Montagem: Arachne; [www.phytozome.net](http://www.phytozome.net)



**Embrapa**

Ministério da  
Agricultura, Pecuária  
e Abastecimento

GOVERNO FEDERAL  
**BRASIL**  
PAÍS RICO É PAÍS SEM POBREZA



# Re-sequenciamento de outros genótipos

4  
5  
4

*Citrus limonia*  
*Citrus reticulata*  
*Citrus sinensis*  
*Poncirus trifoliata*

I  
l  
l  
u  
m  
i  
n  
a



51 bilhões  
de bases

Library	Total Bases	#Reads	Qual Avg.
CR05-C6-100	3,569,770,765	35,344,265	37.06
CR05-C6-101	3,769,960,239	37,326,339	36.22
CS02-C1-960	3,827,171,790	37,892,790	36.09
CS02-C1-961	3,783,640,285	37,461,785	36.00
CS02-C1-962	3,688,751,391	36,522,291	36.20
CS02-C1-963	3,678,745,725	36,423,225	36.26
CL06-C4-964	3,593,949,357	35,583,657	36.43
CS00-C1-250	3,550,119,498	35,149,698	35.59
CS00-B0-250	3,809,683,640	37,719,640	34.81
CS00-C1-251	3,907,031,985	38,683,485	34.18
CS00-B0-251	3,357,382,612	33,241,412	34.84
CS00-C1-252	3,653,150,204	36,169,804	34.41
CS00-B0-252	3,696,246,601	36,596,501	34.64
CL06-C4-965	3,581,020,953	35,455,653	34.72



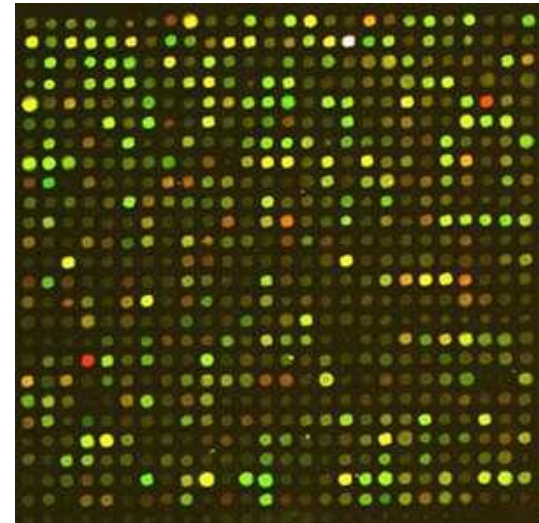
Ministério da  
Agricultura, Pecuária  
e Abastecimento



# Resposta de laranja Pêra a CLam -Genes diferencialmente expressos-



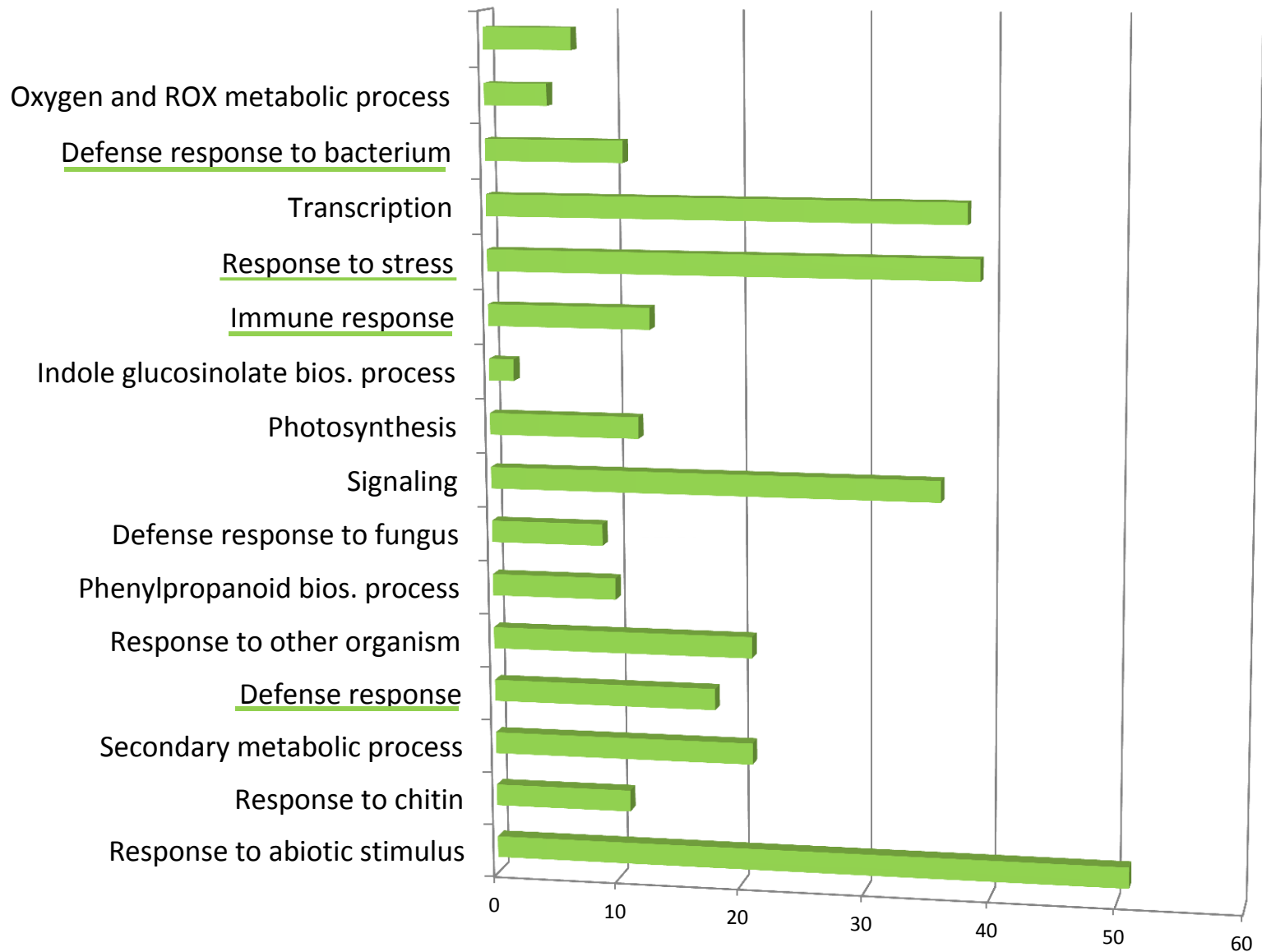
Chip customizado 385K (32,000 unigenes de *C. sinensis*)  
3 sondas 60 nt/ gene  
4 reps no chip



- **634** genes DE (P-value  $\leq 0.05$ , fold change  $|FC| \geq 2.0$  and odds probability  $\geq 0.95$ )
- **419** induzidos e **215** reprimidos

# Resposta de laranja Pêra a CLam

## -Processos biológicos mais representativos-





# Validação dos GDE

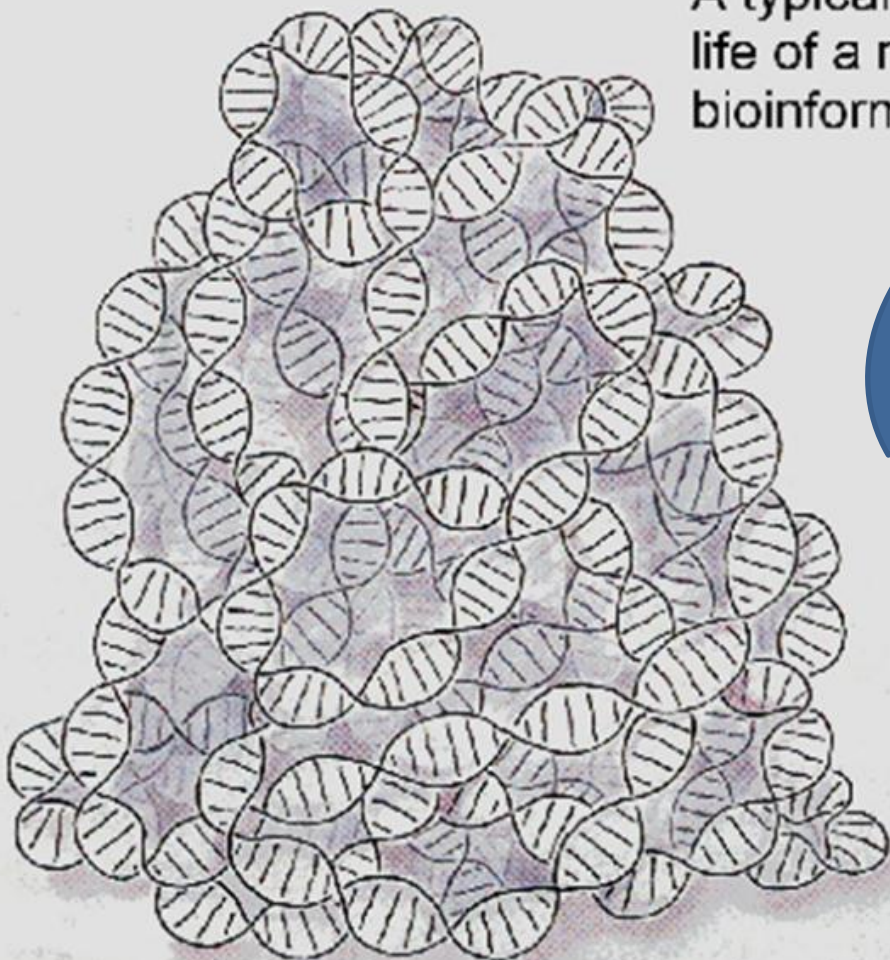
48 pares de primers  
RT-qPCR

Validação em nove  
genótipos x CLam x CLas  
(quatro tempos)



Alvos para transformação  
genética

A typical day in the  
life of a modern  
bioinformatician



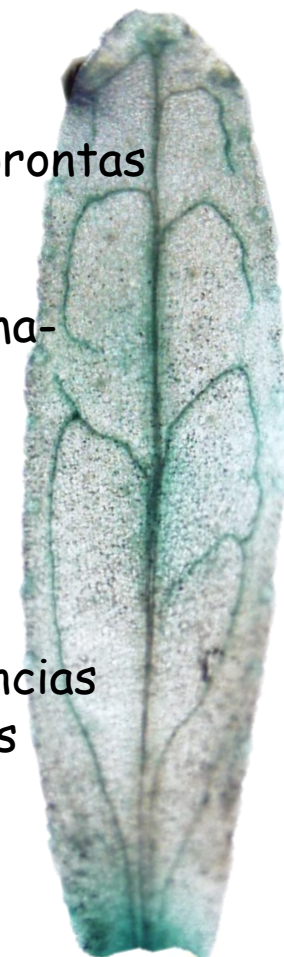
## Aplicação

10 construções prontas  
4 em andamento

1 promotor floema-  
específico  
3 potenciais



Todas as sequências  
são de citros



**Embrapa**

Ministério da  
Agricultura, Pecuária  
e Abastecimento

GOVERNO FEDERAL  
**BRASIL**  
PAÍS RICO É PAÍS SEM POBREZA



# Próximas etapas

🍊 Obter número adequado de plantas GM para cada construção

🍊 Testar!!



**Embrapa**

Ministério da  
Agricultura, Pecuária  
e Abastecimento

GOVERNO FEDERAL  
**BRASIL**  
PAÍS RICO É PAÍS SEM POBREZA

# Instituições participantes

## Bt

- Embrapa Mandioca e Fruticultura
- ESALQ/USP
- Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

## Genoma/ Transcriptoma

- Embrapa Mandioca e Fruticultura
- Centro de Citricultura Sylvio Moreira
- Fiocruz-RJ

## PAM/ transgênicos

- Embrapa Mandioca e Fruticultura
- Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
- Centro de Citricultura Sylvio Moreira
- Unesp/ Araraquara
- Unicamp
- Instituto Biológico-SP
- Univ. Florida

Fundo Embrapa-Monsanto  
INCT-Citros (CNPq/FAPESP)



**Embrapa**

Ministério da  
Agricultura, Pecuária  
e Abastecimento

GOVERNO FEDERAL  
**BRASIL**  
PAÍS RICO É PAÍS SEM POBREZA



Obrigada!



**Embrapa**

Ministério da  
Agricultura, Pecuária  
e Abastecimento

GOVERNO FEDERAL  
**BRASIL**  
PAÍS RICO É PAÍS SEM POBREZA