



INCIDÊNCIA DE *Candidatus Liberibacter asiaticus* NA REGIÃO NOROESTE DO PARANÁ

Jéssica Laguilio Rodrigues¹, Aline Vanessa Sauer², Inaiara Souza³, William Mario de Carvalho Nunes⁴

RESUMO: A citricultura brasileira apresenta alto custo de produção, sendo os maiores investimentos empregados no controle de pragas e doenças. Dentre essas doenças encontra-se huanglongbing (HLB). O agente causal dessa doença severa é uma bactéria com crescimento limitado ao floema, denominada *Candidatus Liberibacter* spp, que causa prejuízos severos à citricultura. As plantas cítricas se tornam improdutivas poucos anos após a infecção pela bactéria. Desse modo, estudar qual a flutuação populacional da bactéria dentro da planta é importante para se entender esse patossistema e medidas de controle possam tornar-se mais eficientes no Paraná. O objetivo do presente estudo consistiu-se em avaliar as amostras de plantas sintomáticas de HLB, através do teste de PCR. Foi obtido um total de 68,4% de plantas positivas para o patógeno asiático, em contraposição 13,3% apenas para o patógeno americano, concluindo desde modo que o patógeno asiático é comumente incidente nas condições paranaense em relação ao patógeno americano.

PALAVRAS-CHAVE: Ciências agrárias, citricultura, huanglongbing.

1 INTRODUÇÃO

A citricultura brasileira representa um importante segmento da economia nacional, tanto em valor da produção, como na geração de empregos diretos e indiretos. O Brasil é um dos países líderes na produção mundial de laranja. O Estado do Paraná é responsável por 2,8% da produção de laranja do país (IBGE 2009), destacando-se a região Noroeste do Paraná representando 60% da área cultivada e 68% da produção paranaense.

O Huanglongbing (HLB) é considerado mundialmente uma das mais severas doença dos citros, pela sua alta capacidade de destruição e dificuldade de controle. O primeiro relato da doença no país foi em junho de 2004, nas proximidades do município de Araraquara em São Paulo (COLETTA FILHO, 2007). No Paraná o primeiro relato foi feito em maio de 2007 em pomar comercial do município de Altônia, pelo Núcleo de

¹ Graduanda bolsista PIBID/CAPES e não bolsista PIC do curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá (UEM) – PR, jessica.laguilio@gmail.com.

² Doutoranda bolsista/CAPES pelo programa de pós graduação em agronomia (PGA) da UEM

³ Graduanda bolsista PIBIC/CNPq do curso de Ciências Biológicas da UEM

⁴ Prof. Dr. do PGA/UEM

Pesquisa em Biotecnologia Aplicada da Universidade Estadual de Maringá (NUNES et al., 2007).

O agente causal do HLB é uma bactéria de crescimento limitado ao floema, sendo por este motivo denominada de *Candidatus Liberibacter* sp. O termo “Candidatus” refere-se às bactérias que não são cultivadas em meio artificial, dificultando assim, os estudos para sua prevenção e controle (COLETTA FILHO, 2007). Esta bactéria é originária do continente asiático (BOVÉ, 2006) e possui três espécies associadas à doença HLB, sendo elas *Ca. Liberibacter asiaticus*, *Ca. Liberibacter africanus*, e a mais recente variante asiática denominada *Ca. Liberibacter americanus*. No Brasil é possível observar apenas duas das três espécies de *Candidatus Liberibacter*, a *Ca. L. americanus* e *Ca. L. asiaticus* (COLETTA FILHO, 2007). A transmissão da bactéria pode ser realizada por psíldeos e por materiais contaminados (material de enxertia contaminado, ferramentas, utilitários, etc.). Os psíldeos responsáveis pela transmissão de *Ca. Liberibacter* são a *Diaphorina citri* e a *Trioza erytreae*, sendo a *D. citri* a encontra-se presente no Brasil e responsável por transmitir a *Ca. Liberibacter asiaticus* e *Ca. Liberibacter americanus* (COLLETA FILHO, 2007).

Os sintomas iniciais são observados na forma de clorose ao longo das nervuras das folhas, progredindo para amarelecimento e surgimento de ramos com folhas amarelas, contrastando com o verde restante da copa (TATINENI et al., 2008).

Técnicas moleculares como PCR (Polymerase Chain Reaction) convencional, são comumente utilizadas em pesquisas para a diagnose da doença em plantas sintomáticas em pomares comerciais ou experimentais. O PCR convencional consiste no anelamento e extensão da região flanqueada pelos iniciadores sintéticos na fita dupla de DNA. A reação sintetizará várias cópias desta região em específico, pois os iniciadores são oligonucleotídeos sintetizados em laboratório para que estes sejam complementares a região específica flanqueada no DNA (FERREIRA et al., 1998). A reação é dividida em ciclos, e cada ciclo possui três etapas; 1) elevação da temperatura para a desnaturação da fita dupla de DNA; 2) redução da temperatura para a hibridização DNA-DNA de cada iniciador para que ocorra o anelamento destes na região flanqueada; 3) extensão, qual envolve a adição de nucleotídeos utilizando como molde a sequência alvo, de maneira que uma cópia desta sequência seja feita no processo, deste modo tem se uma progressão geométrica a cada ciclo que se completa (FERREIRA et al., 1998).

O presente estudo objetivou diagnosticar a doença HLB através de recursos específicos com o uso de técnicas moleculares - PCR (Polymerase Chain Reaction).

2 MATERIAL E MÉTODOS

O material utilizado para o estudo e análise molecular foram amostras de folhas com sintomas de HLB retiradas de plantas de laranja-doce de pomar experimental de citros localizado na Fazenda Experimental Iguatemi (FEI) da Universidade Estadual de Maringá (UEM) e pomares comerciais do Noroeste do Paraná. A coleta desse material ocorreu periodicamente durante o período vigente da pesquisa, fornecendo um lote de 98 amostras para a análise realizada no Laboratório de Biologia Molecular do Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada da UEM.

Após a coleta do material sintomático, foi realizada a extração do DNA total da planta pelo método CTAB, descrito em Coletta-Filho et al (2000). O DNA extraído foi submetido à reação da polimerase em cadeia (PCR) para o diagnóstico da doença HLB.

Para o teste de PCR foram utilizados *primers* sintéticos específicos, cujo para *Ca. Liberibacter asiaticus* foi utilizado os pares de iniciadores LasR1/LasF1, e LPAS/RPAS, e para *Ca. Liberibacter americanus* os *primers* LSg2r (5'-CAACTTAATGATGGCAAATA-3') e LSg2f (5'-TTAAGTTAGAGGTGAAATCC-3').

Após as reações foi feito eletroforese em gel de agarose com brometo de etídio, para a análise em luz UV da presença de fragmentos da sequência específica de interesse de DNA amplificados, qual foi possível observar a presença ou não de HLB. Os géis produzidos foram fotografados usando o sistema de fotodocumentação digital. As reações de PCR com DNA extraídos de plantas sintomáticas de HLB apresentaram um produto de 200 pb (pares de base) para *Ca. Liberibacter asiaticus* e aproximadamente 550 pb para *Ca. Liberibacter americanus*.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das amostras analisadas obteve-se 67 amostras positivas para o patógeno asiático (68,4%), 13 amostras positivas para o patógeno americano (13,3%) e 18 amostras não conclusivas com o teste realizado(18,3%) (Figura 1).

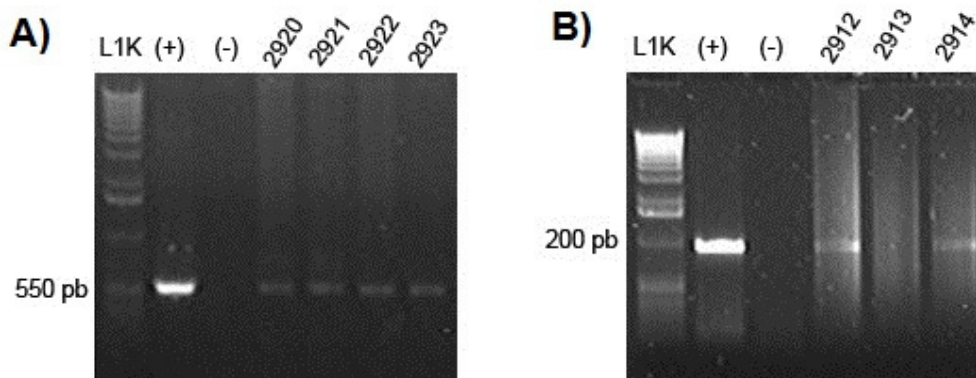


Figura 1. Eletroforese de PCR para *Ca. L. americanus* (A) e *Ca. L. asiaticus* (B). A presença de bandas indica a presença do patógeno. L1K: *Leader*; (+): controle positivo; (-): controle negativo; 2912 e 2914: amostras positivas para *Ca. L. asiaticus*; 2920, 2921, 2922, 2923: amostras positivas para *Ca. L. americanus*; 2913: amostra sem diagnóstico.

Os resultados obtidos revelam que o patógeno asiático é comumente incidente nos pomares comerciais e experimental da região noroeste citrícola do Estado do Paraná.

De acordo com os estudos de Nunes et al (2010) a primeira diagnose de HLB asiático foi realizada com ênfase em 2007 no município de Altônia – PR, e hoje a doença encontra-se em mais de 54 cidades infectadas pelo patógeno asiático. Lopes et al (2009) explica que devido à facilidade de *Candidatus L. asiaticus* ser transmitida via enxertia de tecidos infectados para plantas cítricas ser maior que *Candidatus L. americanus*, tem se a grande diferença no índice de plantas infectadas pelo HLB asiático, pois o patógeno suporta temperaturas acima de 32°C em contraposição a população de *Ca. L. americanus*, que pode até desaparecer em climas mais quentes. Isso explica a pouca ocorrência do HLB americano na região Norte, Noroeste do Paraná, que possui condições climáticas mais quentes em relação às demais regiões do Estado. Além disso, as duas espécies possuem capacidade de multiplicação distinta no tecido floemático das plantas cítricas. “*Ca. L. asiaticus* chega a atingir populações com título bacteriano em média 10 vezes maior que *Ca. L. americanus*” (Teixeira et al., 2010 p. 116).

O fato de ter ocorrido amostras sem diagnóstico para nenhum dos patógenos, pode ser em função de a planta estar infectada por fitoplasma, precisamente do grupo 16Sr IX, também patógeno dos citros, cujos sintomas são semelhantes aos do HLB (LEAL et al, 2010).

Além disso, outro fator que pode ter influenciado na não diagnose de HLB é a probabilidade do baixo nível de infecção na planta, com quantidades mínimas de DNA bacteriano cujo PCR convencional não teve ênfase na amplificação. Com o diagnóstico obtido gera grande preocupação, pois a incidência da doença no pomar comercial evidencia a importância de um controle e manejo de plantas sintomáticas, visando limitar a propagação da doença para pomares vizinhos, preservando a economia citrícola da região.

A ocorrência da doença no pomar experimental pode inviabilizar a implantação e execução de vários experimentos importantes para o desenvolvimento da citricultura na região norte do Paraná.

4 CONCLUSÃO

Tem-se a necessidade de novos estudos utilizando técnicas de diagnóstico mais precisas como, por exemplo, o teste de PCR quantitativo, que além do mecanismo semelhante ao PCR convencional, fornecendo diagnósticos precisos em função da quantificação da população bacteriana na planta.

Atualmente, em vista da importância da citricultura na economia do país, novos estudos para melhor entendimento deste patossistema faz-se necessário.

REFERÊNCIAS

BOVÉ J.M., Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. **Journal of Plant Pathology**, v. 88, p.7-37, 2006.

COLETTA FILHO, H.D.; BORGES K.M. & MACHADO, M.A. Ocorrência de *Xylella fastidiosa* em plantas candidatas a matrizes de laranja-doce, e transmissão por borbulhas contaminadas. **Laranja**, v. 21, p. 327-334, 2000.

COLLETA FILHO H.D., HLB (ex- greening) no Brasil: situação atual. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, 2007.

FERREIRA M.E., GRATTAPAGLIA D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. **Brasília: EMBRAPA-CENARGEN**, 3ª ed., p. 37-39, 1998.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA – IBGE. Levantamento sistemático da produção agrícola. Disponível em <http://www.sidra.ibge.gov.br> acesso em 21.05.2010.

LEAL, R. M., BARBOSA, J. C., COSTA, M. G., BELASQUE JUNIOR, J., YAMAMOTO, P. T., DRAGONE, J. Distribuição espacial de Huanglongbing (greening) em citros utilizando a geoestatística. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal - SP, v. 32, n. 3, p. 808-818, Setembro 2010.

LOPES, S. A., FRARE, G. F., BERTOLINI, E., CAMBRA, M., FERNANDES, N. G., MARIN, D. R., BOVÉ, J. M. Liberibacters associated with citrus huanglongbing in Brazil: “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” is heat tolerant, “*Ca. L. americanus*” is heat sensitive. **Plant Disease** n. 93, p. 257-262, 2009.

NUNES, W. M. C., SOUZA, E. B., LEITE JUNIOR, R. P., SALVADOR, C. A., RINALDI, D. A., CROCE FILHO, J., PAIVA, P. G. Plano de ação para o controle de huanglongbing no

estado do Paraná – Brasil. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v.31, n.2, p.169-177, 2010.

NUNES, W.M.C., ZANUTTO C.A., RINALDI D.A.M.F., CROCE FILHO J., AZEVEDO M.L., LEITE JÚNIOR R.P., COLETTA FILHO H.D., VICENTINI S., NUNES M.J.C. Primeira constatação de huanglongbing em pomar comercial de citros no Estado do Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 1094, p. 327, 2007.

TATINENI, S., SAGARAM, U.S., GOWDA, S., ROBERSTON, C.J., DAWSON, W.O., IWANAMI T., WANG N. In Planta Distribution of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' as Revealed by Polymerase Chain Reaction (PCR) and Real-Time PCR. **Phytopathology**, v. 98, n. 5, p. 592-599, 2008.

TEIXEIRA, D. C., WULFF, N. A., LOPES, S. A., YAMAMOTO, P. T., MIRANDA, M. P., SPÓSITO M. B., BELASQUE JUNIOR, J., BASSANEZI, R. B. Caracterização e etiologia das bactérias associadas ao huanglongbing. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v.31, n.2, p.115-128, 2010.