



UNIDOS
contra o
GREENING

PERSPECTIVAS BIOTECNÓLOGICAS DO CONTROLE DO GREENING

Nelson A. Wulff
Pesquisador
Fundecitrus

Fundecitrus
CIÊNCIA E SUS
PARA A
CITRICULTURA

Estratégias biotecnológicas no controle de doenças e pragas



Planta repelente ao psilídeo
Murta Letal

Genes para o controle da bactéria

(Greening/HLB)



(Pinta)

Redução do
limoneno no
fruto



(Cancro)

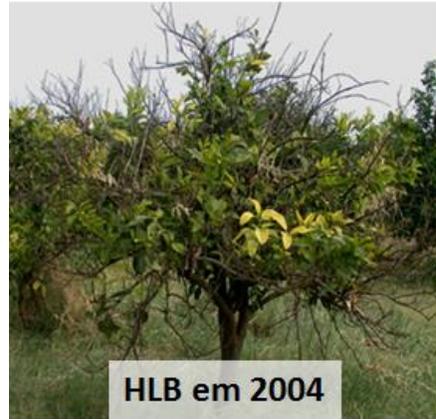


(Mosca)



Qualidades benéficas
do suco
(Saúde)

Perspectivas biotecnológicas no controle do greening (HLB)



Engenharia genética



- Manejo é oneroso ou impraticável em algumas situações;
- Ausência de resistência genética em citros contra o psíldeo e Liberibacterias;
- ✓ Resistência via transgenia: possibilidade de desenvolver resistência, menor custo, integração com manejo, menor impacto ambiental, sustentabilidade.



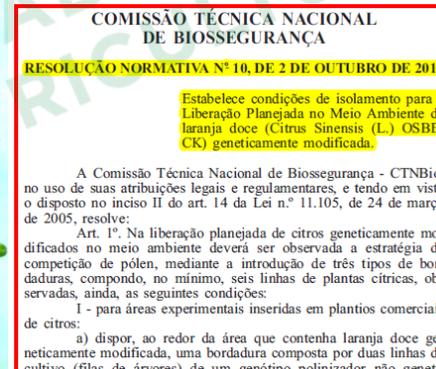
Jul/2009



2010_2011



Mai/2012

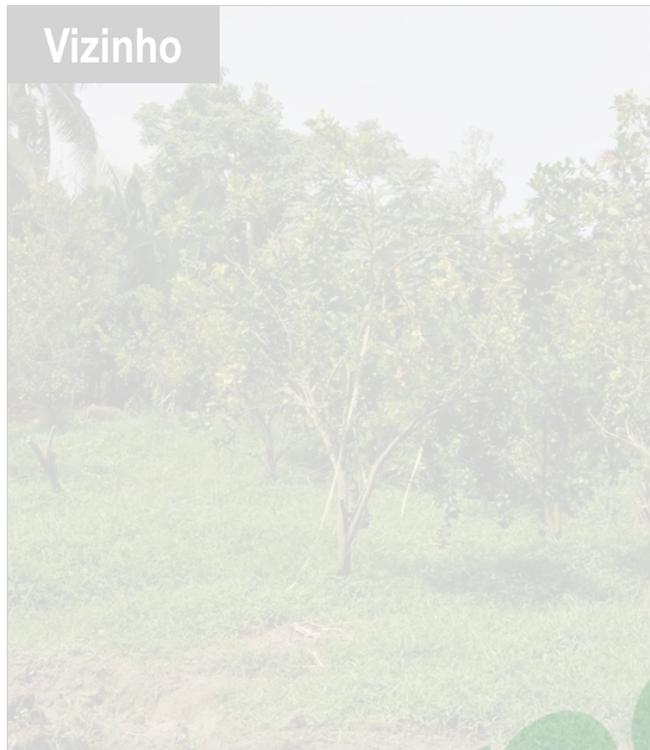


Out/2013

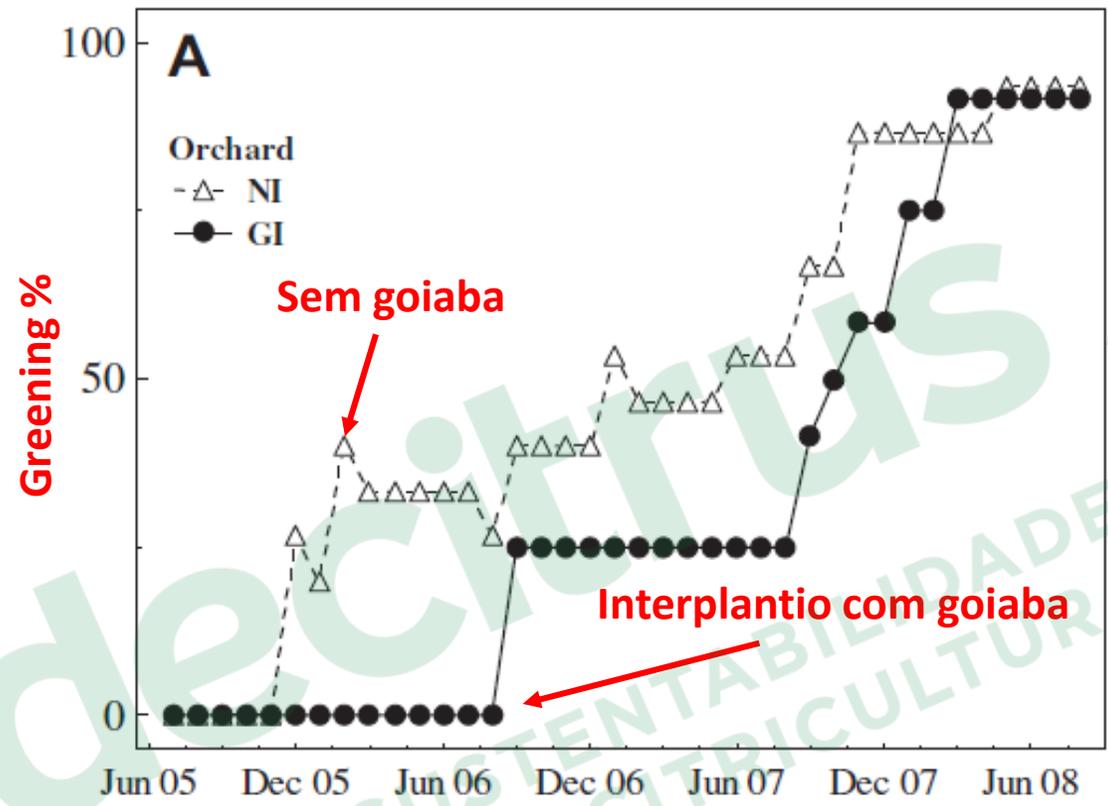


Jan/2016

Repelência ao psíldeo em goiabeiras



Citros Citros



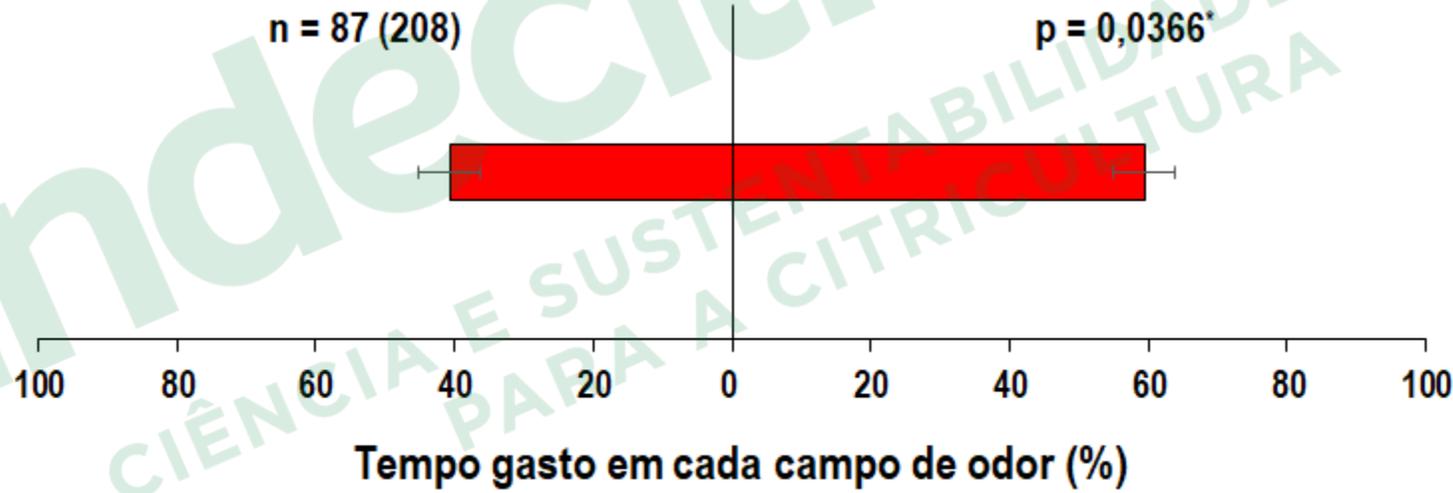
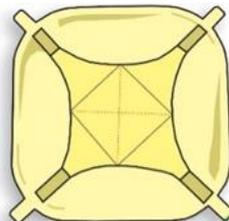
Citros Goiaba

Vietnam

Pomar de citros em monocultura:
ALTA incidência de psíldeos e de HLB

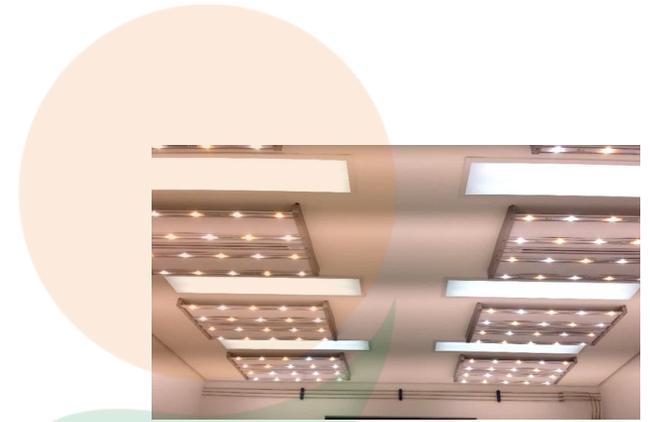
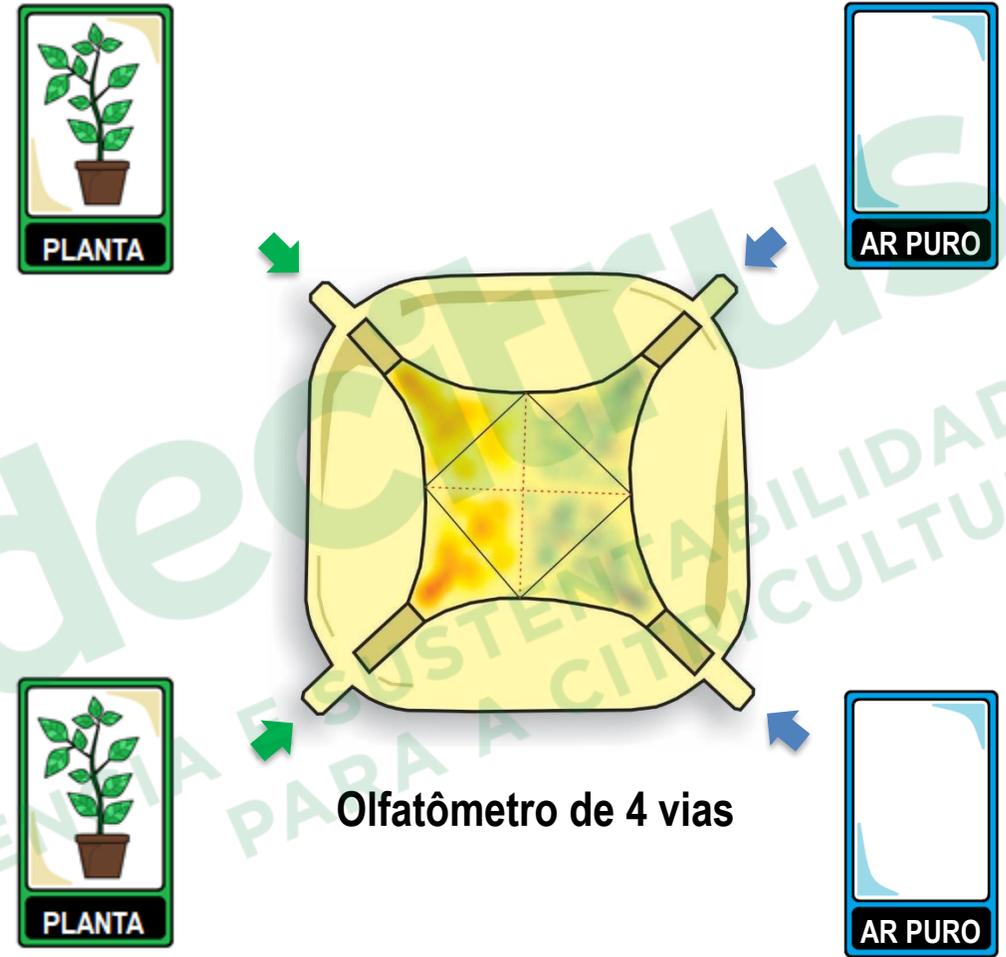
Pomar com interplântio de citros e goiaba:
MUITO BAIXA ocorrência de HLB e de psíldeos

▶ Repelência ao psilídeo em goiabeiras



▶ Repelência ao psilídeo em goiabeiras

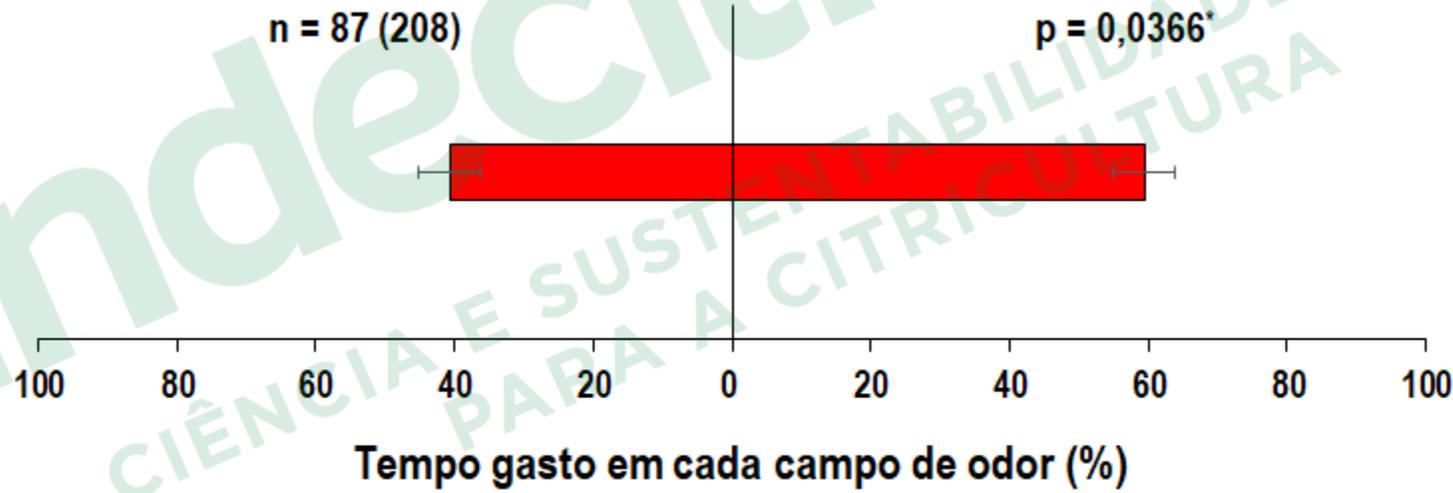
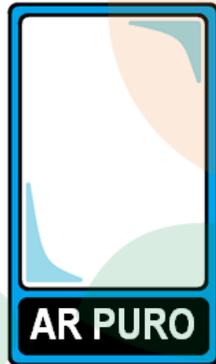
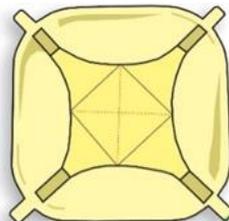
Bioensaio em olfatômetro de 4 vias



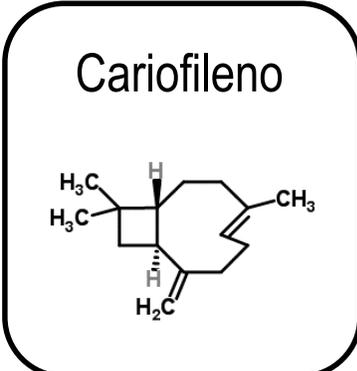
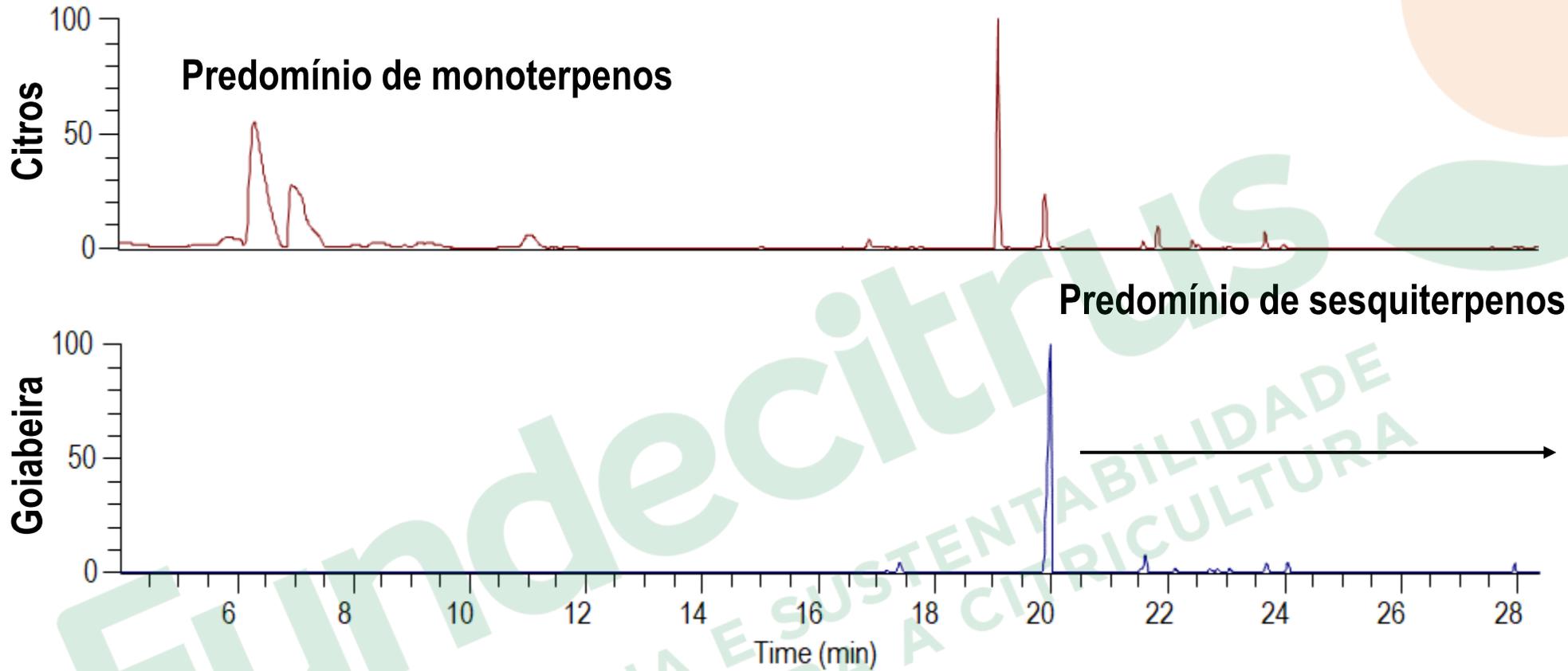
Temperatura da sala: $25 \pm 2^\circ\text{C}$
UR: $60 \pm 10\%$
3000 lux (luzes de LED)

Fundecitrus
CIÊNCIA E SUSTENTABILIDADE
PARA A CITRICULTURA

▶ Repelência ao psilídeo em goiabeiras

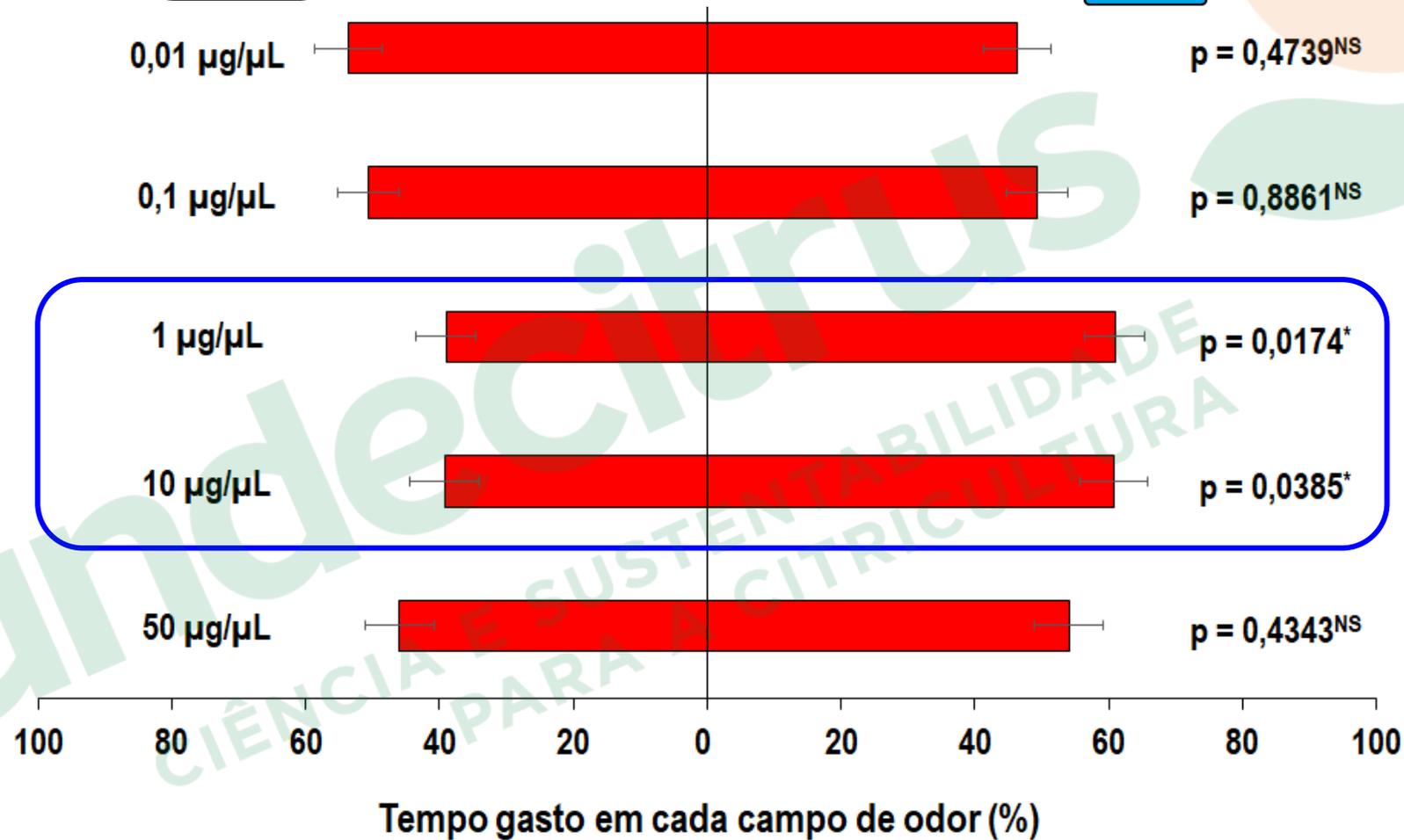
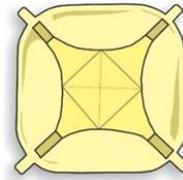
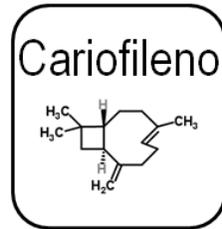


▶ Repelência ao psilídeo em goiabeiras





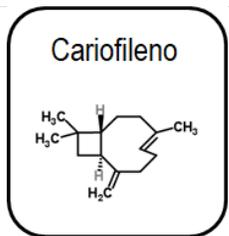
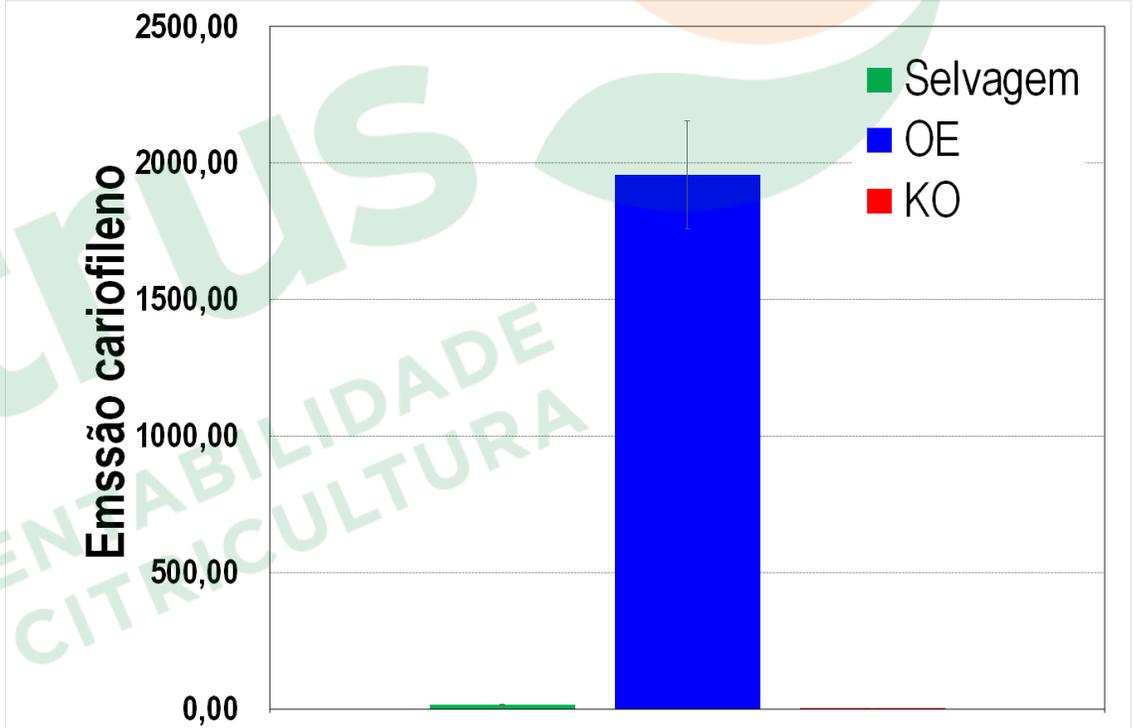
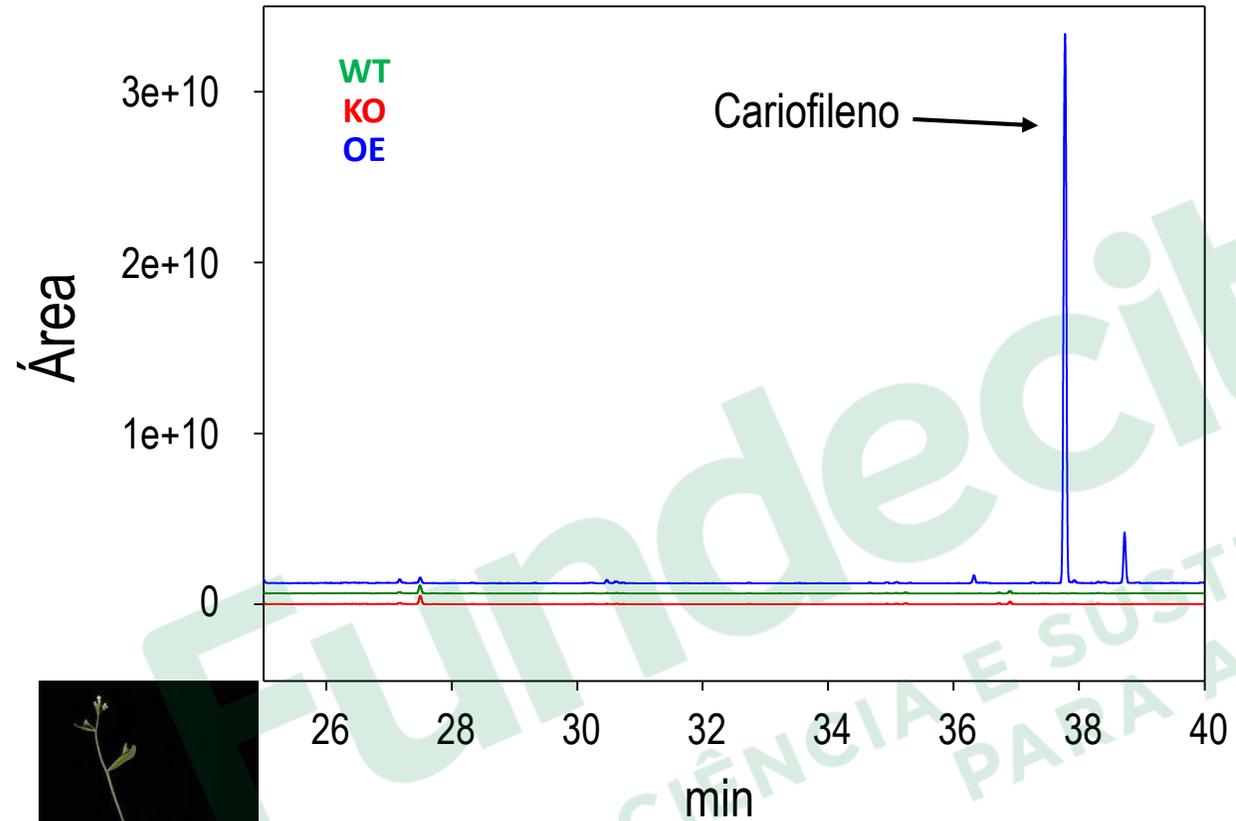
Repelência ao psilídeo com cariofileno



Fundecitrus
CIÊNCIA E SUSTENTABILIDADE PARA A CITRICULTURA

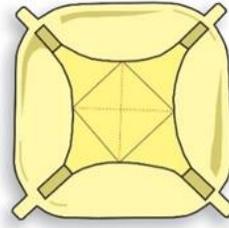
▶ Repelência ao psilídeo com cariofileno

Emissão de cariofileno em planta modelo *Arabidopsis thaliana*
selvagem = WT, sem cariofileno = KO e cariofileno +++ = OE



Repelência ao psilídeo em *Arabidopsis* (planta modelo)

Emissão



$16 \pm 2 \text{ ng.g}^{-1}\text{FW.h}^{-1}$

Selvagem

$p = 0,4016^{\text{NS}}$

$0.01 \text{ ng.g}^{-1}\text{FW.h}^{-1}$

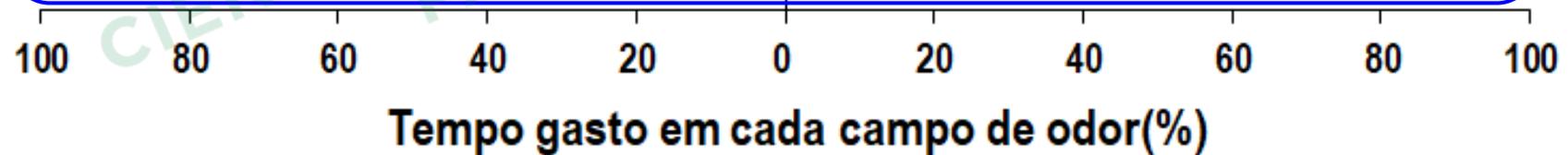
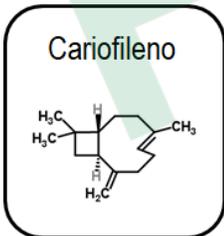
Sem cariofileno

$p = 0,6763^{\text{NS}}$

$1.955 \pm 197 \text{ ng.g}^{-1}\text{FW.h}^{-1}$

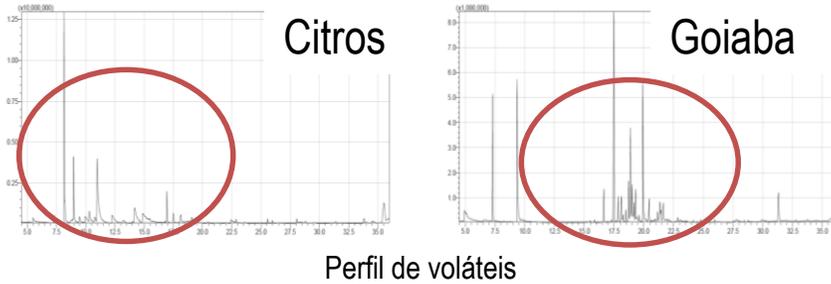
Cariofileno +++

$p = 0,0120^*$



▶ Repelência ao psilídeo em laranjeira doce

Objetivo: tornar a laranja repelente ao psilídeo, pelo aumento da emissão de cariofileno, um volátil repelente e produzido pelas folhas da goiabeira.



Isolar e inserir genes para produção do cariofileno



→ [7 configurações dos genes de interesse]



Citros Repelente

Etapas do processo:



Caracterização molecular



Análises químicas



Comportamento do Inseto

▶ Repelência ao psilídeo em laranjeira doce

Laboratório

Campo

	Pera	Valencia	Molecular/ Química	Olfatometria	Emissão Voláteis	Crescimento e Frutificação	Repelência (HLB e psilídeos)
➤ Combinação genes A	6	17	23	-	5	6	-
➤ Combinação genes MA	27	34	61	11	-	6	-
➤ Combinação genes TA	11	20	31	6	-	6	-
➤ Combinação genes FA	27	18	45	-	8	6	-
➤ Combinação genes MFA	21	23	44	4	-	6	-
➤ Combinação genes FTA	28	14	42	6	1	6	1
➤ Combinação genes HB	10	10	20	7	10	20	3
	266 plantas		266	34	24	56 plantas	4 plantas

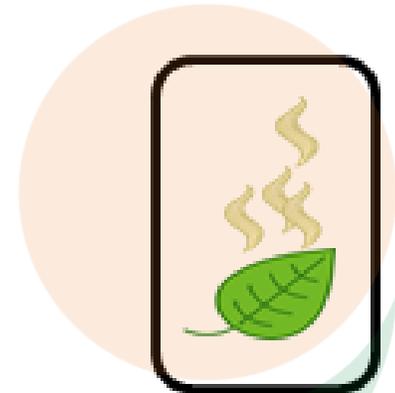
▶ Repelência ao psilídeo em laranjeira doce

Laboratório

Campo

	Pera	Valencia	Molecular/ Química	Laboratório		Crescimento e Frutificação	Repelência (HLB e psilídeos)		
				Olfatometria	Emissão Voláteis				
➤ Combinação genes A	6	17	23	-	5	6	-		
➤ Combinação genes MA	27	34	61	11	-	6	-		
➤ Combinação genes TA	11	20	31	6	-	6	-		
➤ Combinação genes FA	27	18	45	-	8	6	-		
➤ Combinação genes MFA	21	23	44	4	-	6	-		
➤ Combinação genes FTA	28	14	42	6	1	6	1		
➤ Combinação genes HB	10	10	20	7	10	20	3		
	266 plantas		266	34		24		56 plantas	4 plantas

▶ Repelência ao psilídeo em laranjeira doce



Emissão de até 3.000 % mais cariofileno



Repelência ao psilídeo em laranjeira doce

Emissão



40 ± 4 ng.g⁻¹FW.h⁻¹

1.261 ± 83 ng.g⁻¹FW.h⁻¹

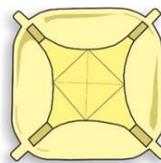
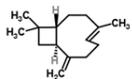
850 ± 59 ng.g⁻¹FW.h⁻¹

1.037 ± 244 ng.g⁻¹FW.h⁻¹

626 ± 36 ng.g⁻¹FW.h⁻¹

947 ± 144 ng.g⁻¹FW.h⁻¹

Cariofileno



Planta

Ar Puro

Controle

HB_GM1

HB_GM2

HB_GM3

HB_GM5

HB_GM6

p = 0,2794^{NS}

p = 0,0006^{**}

p = 0,018^{*}

p < 0,0001^{**}

p < 0,0001^{**}

p = 0,0005^{**}

100 80 60 40 20 0 20 40 60 80 100

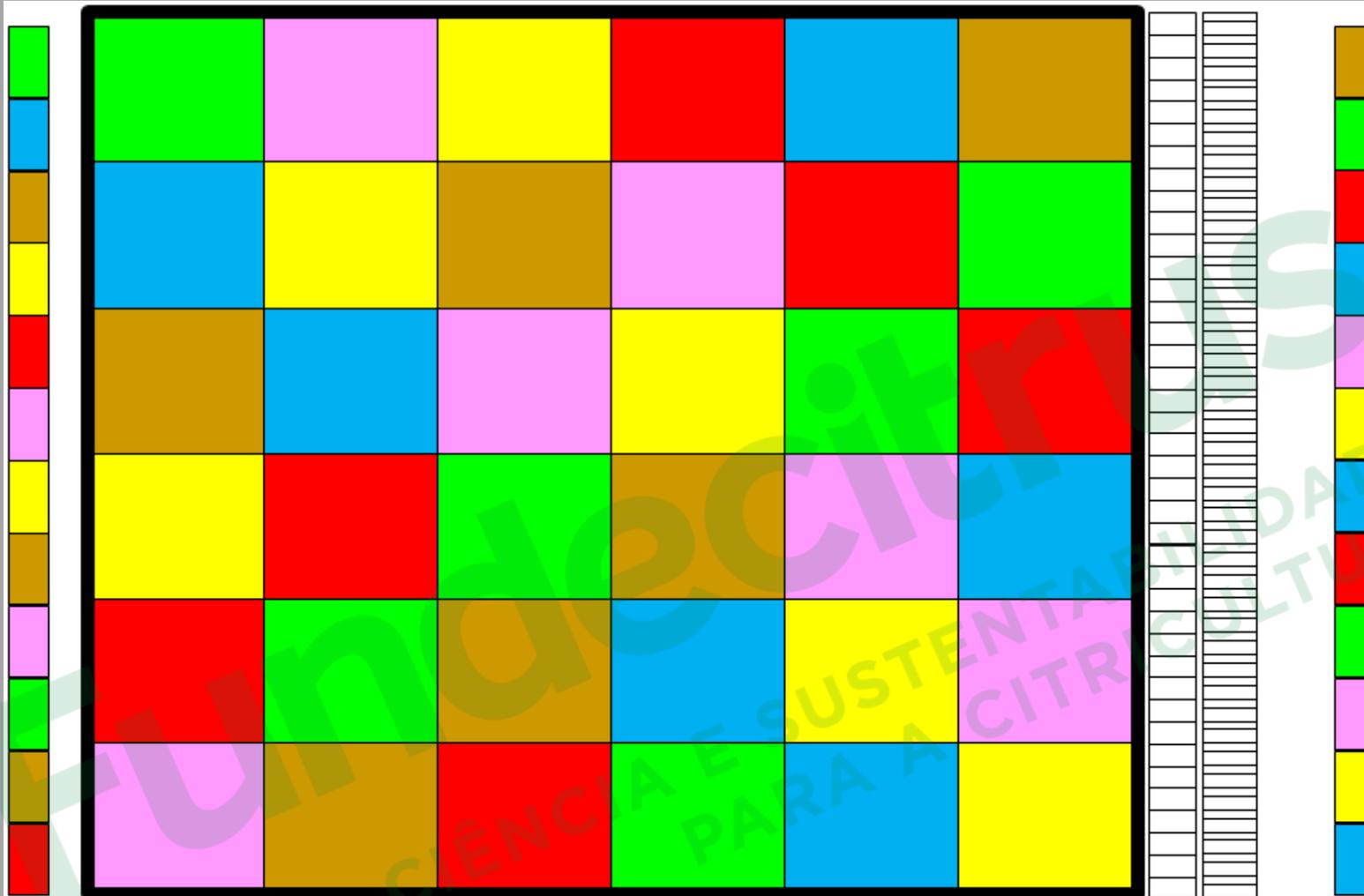
Tempo gasto em cada campo de odor (%)

REPELÊNCIA!



Repelência ao psilídeo em laranjeira doce

Bordadura de Biossegurança



6 tratamentos:
6 repetições X 352 plantas

- Pera
- Valência
- V-GM1
- P-GM2
- V-GM3
- V-GM4

6 tratamentos:
4 repetições X 42 plantas

Incidência de HLB e de psilídeos em experimento de campo (5 anos)

▶ Borda de murta (citros) letal ao psilídeo

Objetivo: produzir planta letal ao psilídeo de forma que sua atração natural possa ser usada como planta isca, e que mate o psilídeo durante a alimentação nesta planta.



Resultado preliminar: redução de 40% na população de psilídeos no pomar de laranjeiras

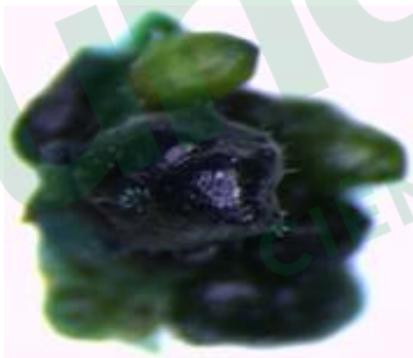
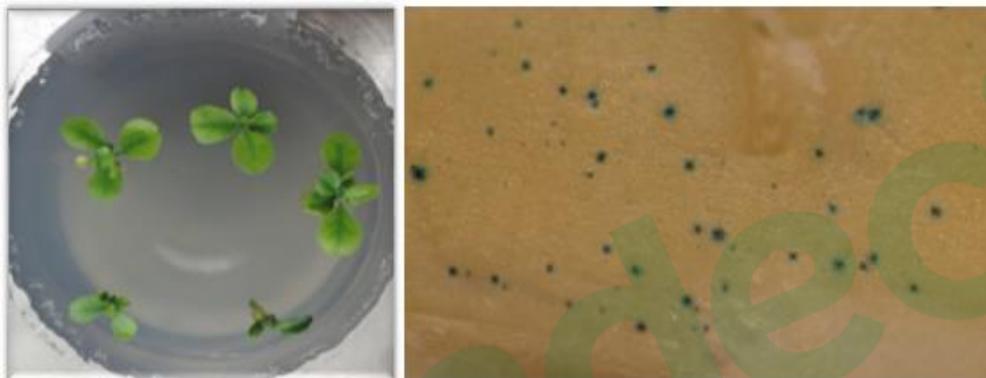


Pomar de Laranja

Borda de Murta

Borda de murta (citros) letal ao psilídeo

- Desenvolvimento do protocolo de regeneração de murta *in vitro*;
- Transformação genética da murta com *Agrobacterium* ou Biobalística;
- Seleção de genes eficazes para silenciamento gênico no psilídeo pela técnica de RNAi;

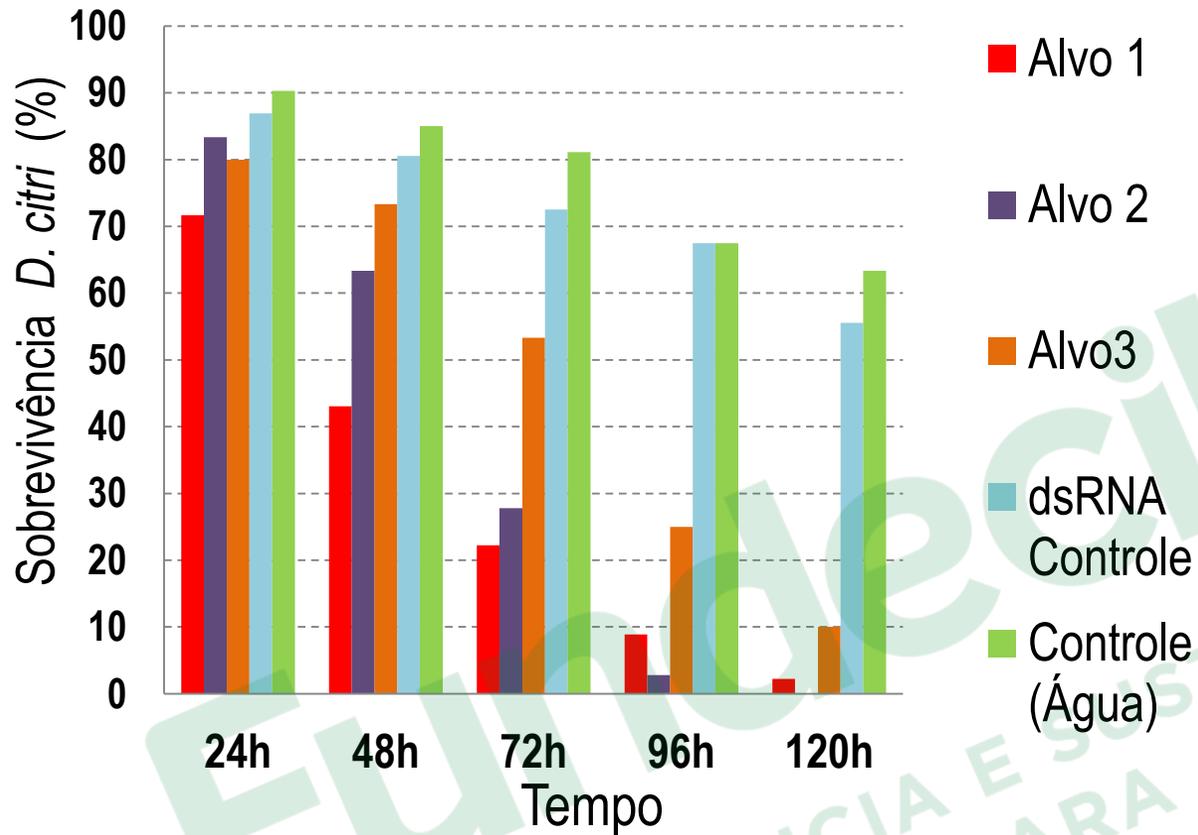


Alternativa: *Bergera koenigii* ou *M. koenigii*
Curry

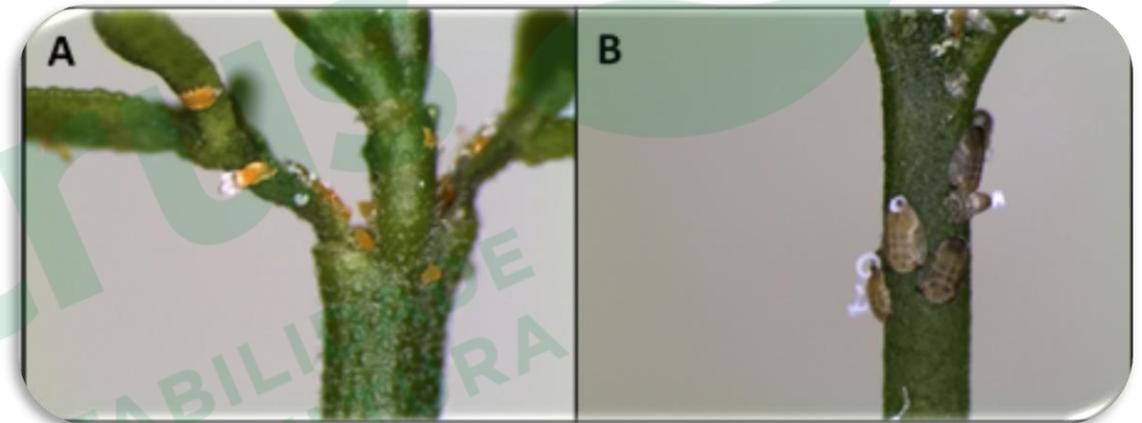


Borda de murta (citros) letal ao psilídeo:

- Seleção de genes eficazes para silenciamento gênico no psilídeo pela técnica de RNAi;



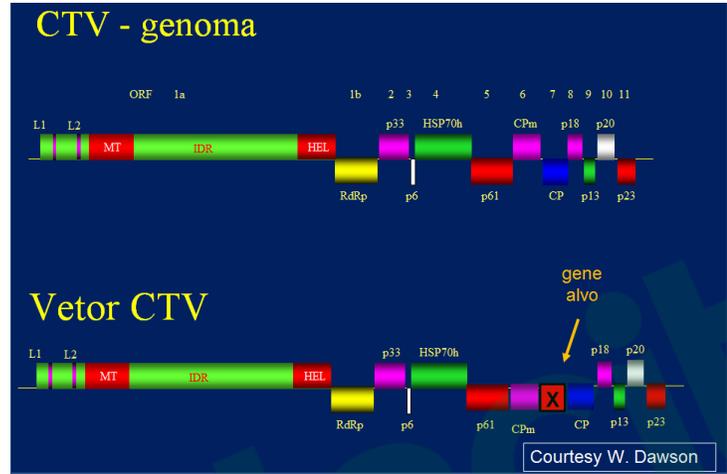
Seleção de genes para testar alvos de RNAi;



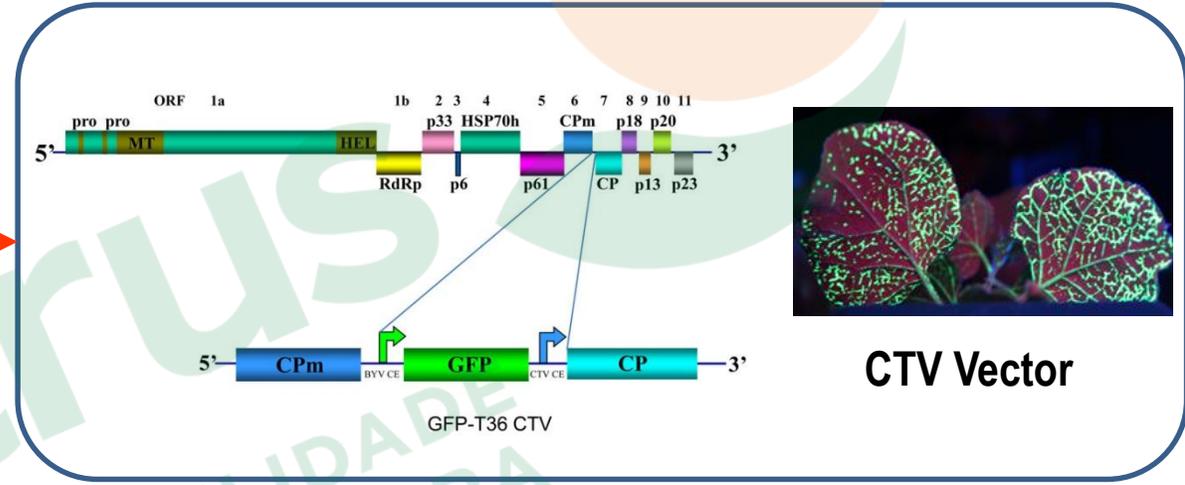
Borda de murta (citros) letal ao psilídeo:

- Obtenção de plantas com expressão da característica letal ao psilídeo

Laranja (validação):
Geração de plantas GM



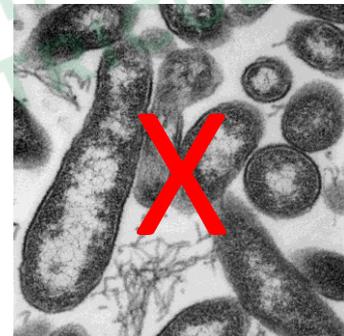
Vetor CTV:



CTV Vector



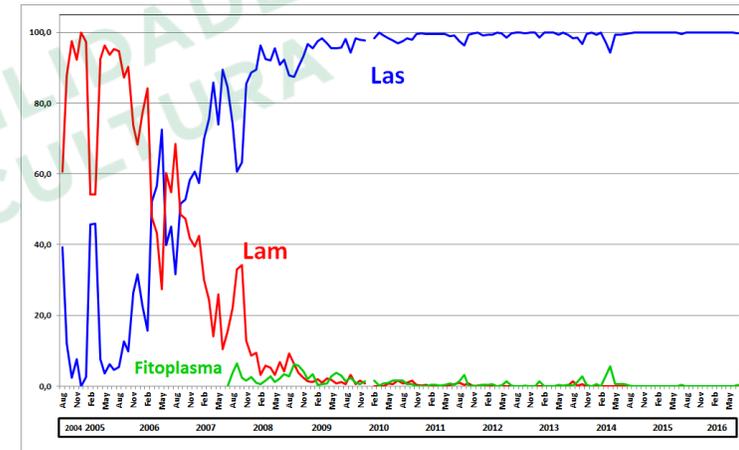
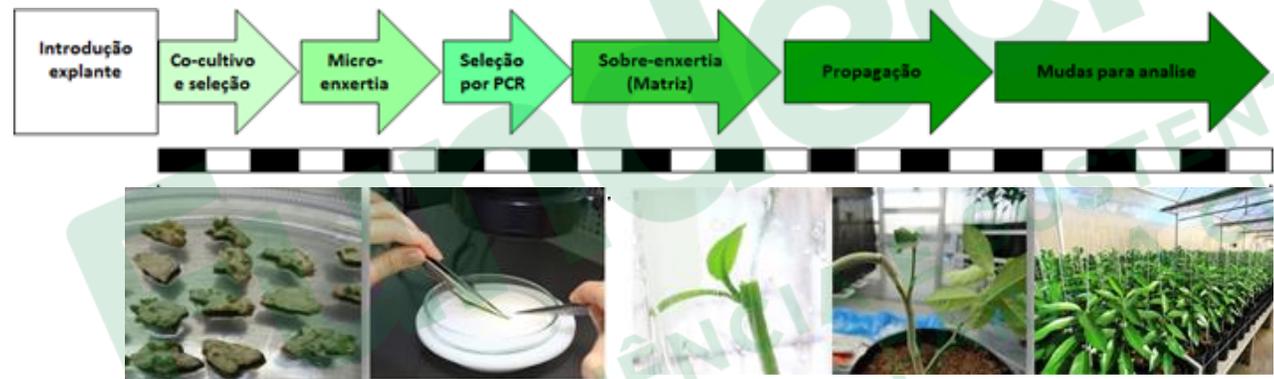
Citrus Tristeza Virus (CTV)



▶ Seleção de genes anti-Liberibacter

Objetivo: testar resistência contra *Ca. Liberibacter asiaticus*

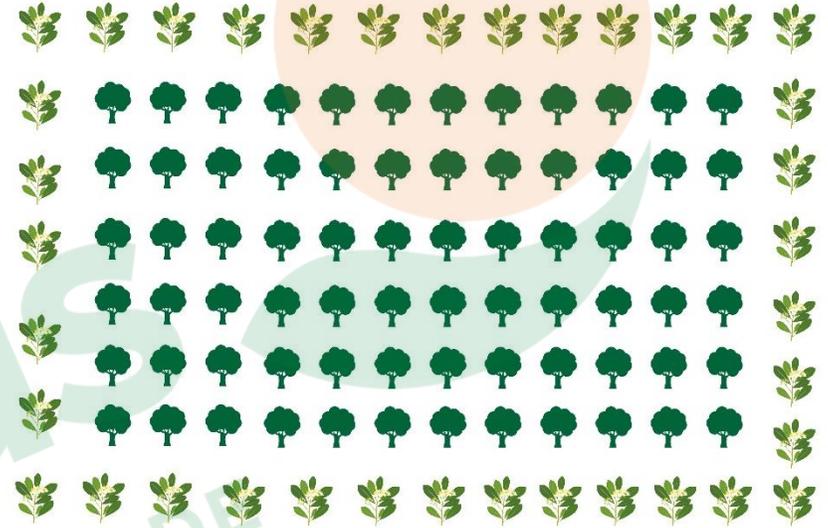
- A inversão da proporção das bactérias Las e Lam, com o predomínio de Las em detrimento de Lam e o estudo do genoma destas bactérias, permitiu abordar estratégias para o controle da bactéria através de plantas geneticamente modificadas (GM);
- Seleção de genes com características antimicrobianas;
- Etapa atual: geração de plantas GM (testes com HLB em dois anos)





Perspectivas biotecnológicas no controle do greening (HLB)

- Laranjeira repelente
- Borda letal atraente
- Estratégia *Push & Pull* (+ *Kill*) = Repele, Atrai & Mata
- Genes anti-Liberibacter
- Manejo = 10 mandamentos do greening.



Fundecitrus
CIÊNCIA E SUSTENTABILIDADE
PARA A CITRICULTURA

Resistência ao Huanglongbing (greening)

“O sistema de manejo do HLB (sanidade de mudas, controle de psílídeos e erradicação de plantas sintomáticas) como descrito aqui é apenas uma solução de curto prazo para manter a indústria de citros viva e ganhar tempo para que **soluções de longo prazo**, provavelmente baseadas em **citros geneticamente modificados**, cheguem dentro de cinco a dez anos. Enquanto isso, pesquisas sobre controle de psílídeos e identificação de árvores infectadas, mas ainda sem sintomas, podem melhorar o controle.”

Dr. J. M. Bové



Genetic engineering





Ana Claudia Novaes
Andre Sanches
Diva C. Teixeira
Eder A. Souza
Elaine C. Martins
Fabricio J. Jaciani
Haroldo X. L. Volpe
Jennifer Delfino
Juliano Ayres
Marcelo P. de Miranda
Marcia R. Almeida
Mateus A. Santos
Priscila A. da Silva
Rafael Garcia
Renato Freitas
Rejane Luvizotto
Rodrigo F. Magnani
Rosangela I. Kishi
Tatiana Mulinari
Victória Esperança
Victória Almeida

Ana Rodríguez
Berta Alquézar
Elsa Pons
Josep Peris
Leandro Peña

Harro Bouwneester

Fernando Cônsoli
Francisco Aragão
Glaucia Cabral
Edson Rodrigues Filho
Luis Alberto B. de Moraes
Roberto P. Parra
Maurício Bento

Dr. Joseph M. Bové

Andréia Henrique
André Signoretti
Newton Noronha
Roberta Borges
Viviani V. Marques



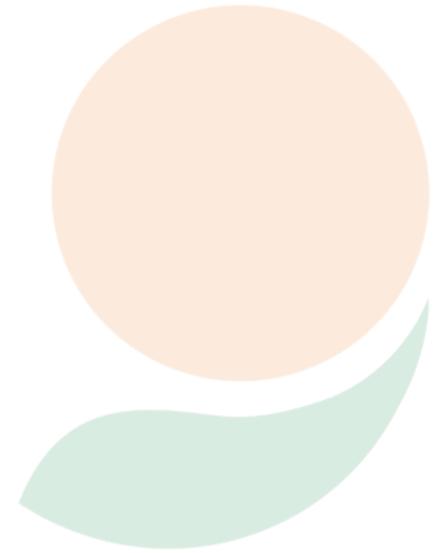
OBRIGADO

nelson.wulff@fundecitrus.com.br



Fundecitrus

CIÊNCIA E SUSTENTABILIDADE
PARA A CITRICULTURA



www.fundecitrus.com.br