

AGRICULTURA

A luta contra o dragão amarelo

Os estudos e soluções para combater o *greening*, doença que ataca a citricultura brasileira desde 2004

MARCOS DE OLIVEIRA

Uma verdadeira guerra está sendo travada pela citricultura brasileira contra o *greening*, atualmente a mais devastadora doença dos citros, grupo vegetal que abrange laranjas, limões, tangerinas, limas e pomelos. Identificada em 2004 pela primeira vez no país, ela colocou de um lado as bactérias que infectam as plantas e deixam as folhas amareladas e os frutos deformados e imprestáveis para o consumo. No lado oposto, uma legião de pesquisadores de várias instituições brasileiras e internacionais, do Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus), entidade mantida pelos produtores, que tentam barrar o progresso da enfermidade nos pomares, junto com os citricultores, principalmente no estado de São Paulo, sul de Minas Gerais e no Paraná, regiões responsáveis por quase 90% da produção nacional de frutas cítricas e 60% da produção mundial de suco concentrado congelado.

Os estudos já permitiram desenvolver testes moleculares para identificar as plantas doentes, estabelecer formas de controle como a erradicação dos pés de citros atacados pelo *greening*. Além disso, há pesquisas em andamento para evitar que a doença se alastre ainda mais. “A infecção é severa. Não adianta cortar galhos, é preciso arrancar a árvore inclusive com a raiz com uma máquina para que não volte a brotar”, diz o agrônomo Marcos Antônio Machado, pesquisador e diretor do Centro de Citricultura Sylvio Moreira, vinculado ao Instituto Agronômico (IAC) e à Secretaria de Agricultura e Abastecimento, com sede no município de Cordeirópolis. Segundo o Fundecitrus, mais de 4 milhões de árvores, de um total de cerca de 200 milhões no Brasil, já foram erradicadas, com prejuízos enormes e variados de acordo com a idade de cada planta. Uma laranjeira, por exemplo, pode produzir por mais de dez anos. Em um estudo realizado entre março e abril deste ano pela Coor-

denadoria de Defesa Agropecuária, também da Secretaria de Agricultura de São Paulo, 18% dos pomares paulistas estão afetados com pelo menos uma árvore com *greening*, um aumento de 30% em relação ao ano de 2008.

Machado participou da equipe de pesquisadores que conseguiu identificar em junho de 2004, no município de Araraquara, no interior de São Paulo, pela primeira vez no Brasil a presença da bactéria causadora dessa doença. Essa confirmação foi feita com técnicas de biologia molecular, por meio da amplificação do DNA bacteriano por reação de polimerase em cadeia (PCR, ou *polymerase chain reaction*). Esses testes são agora utilizados de modo rotineiro, tanto no Centro de Citricultura quanto no Fundecitrus, para a comprovação de plantas doentes. Machado conta que o *greening* pode ter chegado ao Brasil por meio de borbulhas ou gemas, material de propagação vegetativa há mais de dez anos. “Alguém, provavelmente, achou bonita uma variedade lá fora e trouxe o material para o Brasil.” A doença é relatada na Ásia, desde o século XIX, continente de origem dos citros, presentes principalmente na Índia e na China, país em que a doença foi primeiro descrita. Lá recebeu o nome de *huanglongbing*, ou HLB, o que significa doença do dragão amarelo. O termo *greening* foi criado na África do Sul e se tornou mundialmente conhecido. Ele se refere aos frutos que não amadurecem e ficam verdes. “Preferimos chamar pelo nome oficial da doença em chinês pela primazia da descrição”, diz Machado.

O inseto que dissemina a bactéria é um velho conhecido dos agricultores brasileiros. Chegou aqui não se sabe como no início da década de 1940, provavelmente no meio de mudas infestadas. Ele se adaptou bem ao clima, mas não era considerado uma praga porque não produzia prejuízos, embora estivesse relacionado à transmissão da bactéria causadora do HLB na China e em outros países da Ásia. Os olhares dos

citricultores brasileiros em relação ao *Diaphorina citri*, também conhecido pela ciência como psilídeo, que mede de 2 a 3 milímetros de comprimento, só mudaram com a confirmação do *greening* em São Paulo. Ele transmite ou adquire as bactérias das plantas doentes quando se alimenta, ao sugar os vasos do floema, no sistema de circulação da seiva da árvore.

A importância desse vetor no âmbito da doença logo acionou os pesquisadores da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (Esalq) da Universidade de São Paulo (USP), mais precisamente, o professor José Roberto Postali Parra, que iniciou um projeto temático sobre o inseto, apresentado à FAPESP ainda em 2004 e iniciado em 2005 com financiamento da Fundação. “Até aquele momento o inseto não era estudado profundamente. O nível populacional desse psilídeo não justificava estudos e um controle maior por parte do produtor. Com o temático procuramos conhecer melhor o inseto e indicar medidas biológicas, patógenas, comportamentais e recomendar o uso de inseticida de forma racional sem desequilibrar o ambiente e sem matar os seus inimigos naturais, como algumas vespas”, explica Parra. “Identificamos



JOSE ROBERTO POSTALI PARRA/ESALO-USP

Inseto transmissor da bactéria

que o inseto se desenvolve melhor em outras plantas, principalmente na murta (*Murraya paniculata*) usada em cercas vivas e pertencente à mesma família dos citros, a das rutáceas. A fêmea coloca os ovos nas brotações das plantas. Nos citros ela coloca uma média de 160 ovos, enquanto em outras plantas chega até a 348.” Depois da eclosão, saem as ninfas, que se transformam em adultos. “Estabelecemos parâmetros climáticos e zoneamento de onde a praga ocorre mais intensamente. A maior prevalência acontece nos municípios de São Carlos, Bariri, Botucatu, Lins e Araraquara.”

A expansão avassaladora da doença pode ser sentida em um experimento realizado pela equipe de Marcos Machado, dentro de outro projeto temático financiado pela FAPESP, iniciado em 2006, em parceria com o Fundecitrus, que tem objetivos de estudar a bactéria em relação ao diagnóstico, à biologia e à forma de combatê-la. “Isolamos um pomar novo de laranjas em Araraquara com 10 mil plantas sem HLB, cercada por plantações de cana e distante três quilômetros de qualquer outro pomar. Fizemos controle químico com inseticidas, com diferentes tipos de aplicações. Depois de três anos, 15% das plantas tinham a doença. O vento levou o inseto. A situação não é simples, porque é possível que tenham chegado ali 99 insetos, mas apenas um poderia ser o portador e ter transmitido a doença”, diz Machado.

No campo da pesquisa, uma série de alternativas para eliminar o psilídeo está em estudo. “Uma delas é a adoção de bactérias, chamadas de simbioses, que interferem no comportamento e biologia dos insetos, além de fungos que podem ser utilizados como agentes de controle”, diz Parra. Esse tipo de controle biológico é feito de forma semelhante a inseticidas industriais com a aplicação de fungos microscópicos, da espécie *Beauveria bassiana*, misturados à água, sobre os insetos e nas plantações. O fungo é inerte para os vegetais e ao homem e parasita tanto o inseto adulto como as ninfas, deixando-os secos como se estivessem mumificados. A equipe do professor Parra também leva em conta possível isolamento de feromônios sexuais, substâncias secretadas pela fêmea para atrair insetos machos. Esses feromônios poderiam ser usados em armadilhas para eliminar os machos e diminuir a população do inseto. Mas é nas goiabeiras onde deve estar a mais promissora substância para barrar a investida do psilídeo. “A goiabeira produz algumas substâncias que repelem o inseto, como foi observado inicialmente no Vietnã, onde se planta goiaba e laranja nos mesmos pomares, de forma intercalada”, diz o agrônomo José Belasque Júnior, pesquisador do Fundecitrus.

Estudos para identificação e síntese dessas substâncias voláteis da goiabeira estão sendo feitos em nível internacional pelo Instituto Nacional de Ciência



FUNDECITRUS

A doença provoca o abortamento das sementes



Depois de infectada, a planta apresenta sintomas em até um ano

e Tecnologia (INCT) de Semioquímicos na Agricultura, financiado pela FAPESP e pelo Ministério da Ciência e Tecnologia, que tem sede na Esalq e é coordenado pelo professor Parra, mais a Universidade da Pensilvânia, nos Estados Unidos, Universidade de Valência, na Espanha, e Instituto Max Planck, na Alemanha. “A ideia é produzir essas substâncias no futuro nas próprias laranjeiras por meio de técnicas de transgenia com o objetivo de espantar o inseto”, explica Parra. Ele também inclui entre os armamentos para combater o inseto o manejo ecológico com o uso de uma vespa, a *Tamarixia radiata*, que não causa danos à agricultura e ao homem, para parasitar as ninfas do inseto. Em estudos realizados no município de Araras, a soltura da vespa em pomares da região teve resultados entre 51% e 72% de eliminação das ninfas do inseto. “Os resultados são razoáveis, mas precisamos estudar mais em laboratório e em outras regiões.”

Mesmo com tantas alternativas, o professor Parra, há mais de 40 anos realizando pesquisas com insetos ligados à agricultura e, inclusive, criando insetos para estudos na universidade, sente que o desafio é grande, talvez o maior de sua carreira. “O inseto é complicado, de difícil manejo na criação, o que nos faz dependentes da captura no campo. Há também o problema das populações desses insetos que são variáveis ao longo do ano, das estações e de condições de temperatura e chuva, sem uma sistemática, o que nos impediu de estabelecer modelos de sua presença no campo”, diz Parra. Dentro do projeto temático, que tem também parcerias com o Fundecitrus, o Instituto Agrônomo (IAC), o Instituto Biológico e a Universidade da Califórnia, em Davis, o grupo do professor Parra constatou um outro problema: alguns produtos químicos usados como inseticidas contra o psilídeo não são mais eficientes, mas podem matar as vespi-

> OS PROJETOS

1. *Bioecologia e estabelecimento de estratégias de controle de Diaphorina citri Kuwayama (hemiptera: psyllidae) vetor da bactéria causadora do greening nos citros*

2. *Estudos da bactéria Candidatus Liberibacter spp., agente causal do huanglongbing (ex-greening) dos citros: diagnóstico, biologia e manejo*

3. *Epidemiologia molecular e manejo integrado do huanglongbing (asiático e americano) no estado de São Paulo*

MODALIDADE

Projeto Temático

COORDENADORES

1. JOSÉ ROBERTO POSTALI PARRA - USP
2. MARCOS ANTONIO MACHADO - IAC
3. ARMANDO BERGAMIN FILHO - USP

INVESTIMENTO

1. R\$ 513.245,14 e US\$ 14.266,09 (FAPESP)
2. R\$ 1.058.519,78 e US\$ 215.009,98 (FAPESP)
3. R\$ 1.105.255,22 e US\$ 68.824,87 (FAPESP)

Óptica aplicada à agricultura e ao meio ambiente

MODALIDADE

Centro de Pesquisa, Inovação e Difusão (Cepid)

COORDENADORA DO PROJETO

DÉBORA MILORI - Embrapa - Centro de Pesquisa em Óptica e Fotônica de São Carlos

INVESTIMENTO

R\$ 25.000,00 e US\$ 40.000,00 (FAPESP)

Deteção de cancro cítrico por imagem de fluorescência no campo

MODALIDADE

Auxílio Regular a Projeto de Pesquisa

COORDENADOR

LUÍS GUSTAVO MARCASSA - USP

INVESTIMENTO

R\$ 15.582,50 e US\$ 12.536,61 (FAPESP)



Inspeções frequentes são fundamentais para frear o *greening*

FUNDECITRUS

patógeno de uma planta no mundo a ter um genoma sequenciado, experimento finalizado em fevereiro de 2000 por pesquisadores de universidade e institutos paulistas financiados pelo programa Genoma FAPESP, que também sequenciou a *Xanthomonas*. “O menor genoma da *Liberibacter* significa que ela é mais especializada ainda que as outras”, diz Machado. Ele coordena também o recém-criado Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) de Genômica para Melhoramento de Citros, que engloba institutos e universidades de São Paulo, Bahia, Paraíba e a Universidade da Flórida, nos Estados Unidos. Esse estado norte-americano também é atacado pelo *greening*, onde a doença foi identificada em agosto de 2005. A Flórida, com mais de 70 milhões de pés de laranja, é o segundo produtor mundial de citros atrás de São Paulo, estado líder no Brasil, com cerca de 80% do total de frutas. Flórida e São Paulo somados são responsáveis por cerca de 40% da produção mundial.

Mas se não bastassem as duas bactérias *Liberibacter*, em 2007 foi identificado um fitoplasma, bactéria sem parede celular, em plantas com os mesmos sintomas do *greening*, mas sem nenhuma presença das *Liberibacter*, situação comprovada em testes moleculares de PCR. Com a colaboração do pesquisador francês Joseph Bové, do Inra, e do professor Kitajima, os pesquisadores do Fundecitrus anunciaram a má notícia e prepararam um novo teste que já está em uso. Estudos estão sendo realizados por vários grupos para entender melhor essa bactéria e sua ação nos citros.

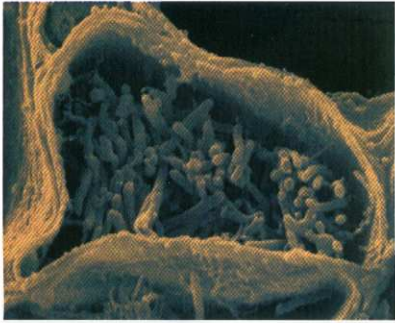
A complexidade da doença exige cada vez mais pesquisas, como demonstra um terceiro projeto temático financiado pela FAPESP, iniciado em 2008. “Nosso objetivo é epidemiológico: estudamos a disseminação da doença em função do tempo, a rapidez como a infecção atinge as plantações e o inseto, e do espaço, averiguando hábitos de voo do psilídeo que pode ser levado pelo vento a centenas de metros, tudo com base em análises moleculares nas várias etapas da doença”, diz Armando Bergamin Filho, também professor da Esalq-USP. “Uma das nossas preocupações é o papel da murta como hospedeira do inseto e da bactéria. Vamos verificar a necessidade de erradicá-la também”, diz Bergamin, que espera ter novas propostas de con-

nhas usadas no controle biológico. “O controle químico chega a ser exagerado, feito até duas vezes por mês. É impossível conter a doença apenas controlando o inseto, além de faltar conhecimento maior sobre esse tipo de aplicação”, diz Machado, do centro de citricultura.

Se o inseto é complicado, a bactéria não é menos. Ela só foi identificada em laboratório na França, em 1970. Ainda hoje ela não tem uma identificação taxonômica definitiva ou um nome científico aceito em todo o mundo. Por isso ela é chamada de *Candidatus Liberibacter* e possui três espécies, a *Ca. L. asiaticus*, presente em maior número no Brasil e causadora da infecção mais deletéria, a *Ca. L. africanus*, mais amena e ausente dos pomares brasileiros, e a *Ca. L. americanus*, pouco presente no país, mas perigosa e descrita em 2004 por um grupo de pesquisadores da Esalq, do Fundecitrus e franceses do Instituto Nacional de Pesquisa Agronômica (Inra, na sigla em francês). A identificação foi feita por sequências de trechos de DNA. Ela permanece candidata porque os pesquisadores não conseguem cultivá-la em laboratório, *in vitro*, e depois isolá-la. Mas essa situação pode mudar porque em maio deste ano um grupo do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (Usda, na sigla em inglês) conseguiu cultivá-la em laboratório, segundo artigo publicado na revista

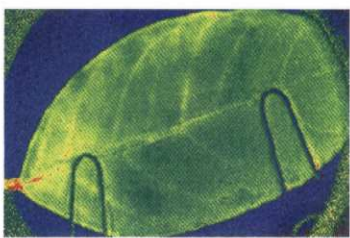
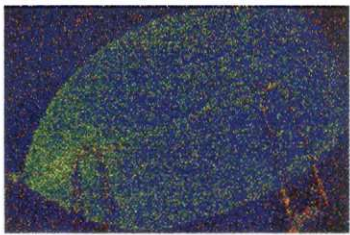
científica *Phytopathology*. “É preciso um caldo de que ela goste e isso é feito por meio de sequências de tentativa e erro”, diz o professor Elliot Kitajima, também da Esalq, especialista em microscopia eletrônica. Ele e o professor Francisco Tanaka fizeram uma das melhores imagens da *Liberibacter* em um floema da vinca ou maria-sem-vergonha [*Catharanthus roseus*], uma planta ornamental. “A concentração na laranjeira é muito baixa, não é possível fazer imagens como a obtida com a vinca”, diz. “Não existe a relação de concentração da bactéria e estrago no floema”, diz Machado. Mesmo assim as poucas bactérias devem secretar toxinas que prejudicam a funcionalidade do floema. “Rapidamente, em cerca de meia hora depois de o inseto portador da bactéria picar a planta, ela se torna infectada, mas a evolução é lenta e os sintomas podem se manifestar até um ano depois da inoculação”, diz Parra.

O combate ao dragão amarelo envolve também o conhecimento do genoma da bactéria. O sequenciamento genético da *Liberibacter asiaticus* foi finalizado em 2008 pelo Usda. A espécie asiática da doença possui um genoma pequeno com cerca de 1,2 milhão de pares de base, enquanto a bactéria *Xylella fastidiosa*, que causa a clorose variegada dos citros (CVC), tem 2,4 milhões de pares, e a *Xanthomonas axonopodis citri*, bactéria causadora do cancro cítrico, possui 4,5 milhões de pares. A *Xylella* foi o primeiro



FRANCISCO TANAKA E ELLIOT KITA/JIMA/FESALD-USP

Floema
(canal por onde
a seiva percorre)
da vinca, planta
ornamental
recheada de
bactérias
do gênero
*Candidatus
Liberibacter* que
ataca os citros



Sequência
de foto digital
de folha
com *greening*
e imagens obtidas
depois de expostas
à luz de LEDs
mostra alterações
captadas pela
reflexão da
luminosidade

FOTOS: LUÍS GUSTAVO MARCASSA/FSC-USP

trole da doença no final do projeto em 2012. Bergamin enfatiza a erradicação das árvores de citros doentes como controle fundamental. “A retirada das árvores doentes já está em lei federal, mas muitos produtores preferem apenas aplicar inseticidas e cortar galhos. Não adianta um produtor erradicar as plantas e o vizinho não.” Ele acredita que a fiscalização dos órgãos governamentais também deveria ser mais efetiva tanto na observação da erradicação de plantas doentes como na adoção de mudas saudáveis, embora no estado de São Paulo exista lei que exige a compra de mudas desenvolvidas em viveiros protegidos por telas e certificados até para evitar a disseminação de outras doenças.

“O desafio é convencer o citricultor de que ele deve arrancar a planta, principalmente entre médios e pequenos agricultores, que representam a maioria”, diz Belasque, da Fundecitrus. Em São Paulo, são mais de 5 mil propriedades com citros. “Temos uma equipe com 21 agrônomos espalhados pelo estado em contato com produtores, fazendo palestras e acompanhando os casos da doença que já se espalha por todas as regiões citrícolas do estado.” Belasque acredita que a melhor solução seriam variedades de citros resistentes ao *greening*, mas isso deve demorar ainda de duas a três décadas. Enquanto isso, os produtores têm que cumprir uma série de inspeções por ano nos pomares. A Secretaria de Agricultura recomenda três anuais, desde o início deste ano, inclusive com a emissão obrigatória de relatórios.

A esperança mais próxima de uma inspeção mais rápida e segura de plantas doentes no campo está em sistemas eletrônicos que estão em desenvolvimento por dois grupos de pesquisadores de São Carlos. Os experimentos utilizam o princípio da fluorescência, com técnicas e procedimentos diferentes que usam a emissão de luz pela folha após ter sido iluminada por um laser ou diodo emissor de luz, chamado LED. Um estudo é conduzido pelo professor Luís Gustavo Marcassa, do Instituto de Física de São Carlos da USP, como uma sequência de outro estudo em que os pesquisadores usaram laser para identificar o cancro cítrico (ver Pesquisa FAPESP nº 80). “Chegamos a um resultado que mostra, ao analisar as folhas, que 95% tinham algo de errado, se

comparadas a uma folha sadia, enquanto 65% comprovadamente tinham cancro”, diz Marcassa. O estudo consiste em iluminar a folha com a luz de uma fibra óptica e captar, com outra fibra, a absorção da luz com a reflexão alterada pela bactéria. Os dados enviados a um computador mostram em um gráfico a possibilidade de a planta estar infectada. Marcassa está fazendo um estudo semelhante para o *greening*. “Agora não uso o laser, que requer mais cuidados e é mais caro, mas LEDs de alta potência em diferentes cores. Chegamos a coletar 16 mil imagens em que emitimos uma cor (frequência de onda eletromagnética) e coletamos a emissão em outra cor”, diz Marcassa. O experimento com *greening* está no início e a ideia é levar o equipamento para o campo, num futuro próximo, ou deixá-lo num local que possa ser acessado, em média, um dia após a coleta, tempo em que a folha ainda não demonstra alterações. O diagnóstico sai em alguns minutos.

O segundo experimento é conduzido pela pesquisadora Débora Milori, da Embrapa Instrumentação Agrícola, unidade da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, que estuda o uso de feixes de laser para diagnosticar precocemente o *greening*. Débora e sua equipe desenvolveram um equipamento portátil que permite, junto com outros tipos de aparelhos de precisão, fazer um levantamento de mapas de infestação da doença de forma economicamente viável. “Hoje a inspeção visual pode levar a erros de 30 a 60%, inclusive na confusão com outras doenças que apresentam sintomas semelhantes”, diz Débora. “Em laboratório, com calibração do aparelho para cada variedade de citro, conseguimos índices de acerto entre 80 e 90%, e o resultado sai em um minuto. Uma grande vantagem se comparado ao exame PCR que leva em torno de dez dias”, diz ela. Esse estudo recebe apoio do Centro de Pesquisa em Óptica e Fotônica de São Carlos, um dos centros de Pesquisa, Inovação e Difusão da FAPESP. Além disso, a pesquisadora coordena uma rede de pesquisa financiada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) voltada para a biofotônica aplicada ao diagnóstico do *greening*, que inclui parcerias com a Universidade da Flórida, Centro de La Papa, do Peru, e Universidade Mayor, do Chile. ■