

# USP

*Centro de Energia Nuclear na Agricultura*

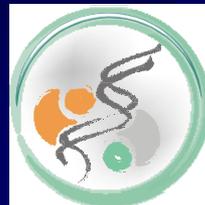
**WORKSHOP “RELAÇÃO ENTRE NUTRIÇÃO DE PLANTAS E  
INCIDÊNCIA DE DOENÇAS”**

## **GENOMA FUNCIONAL: O mapeamento genético como instrumento no controle de doenças de plantas**

**Siu Mui Tsai**

tsai@cena.usp.br

Piracicaba - SP



# **I. Apresentação**

# *Xylella fastidiosa*

- ✓ Indústria de US\$ 2 bilhões de dólares
- ✓ 8 em 10 copos de suco de laranja
- ✓ Patógeno da laranjeira
- ✓ Bactéria limitada ao xilema
- ✓ Associada à doenças em videira, pera, ameixa, pecan, carvalho, café amendoira, etc...

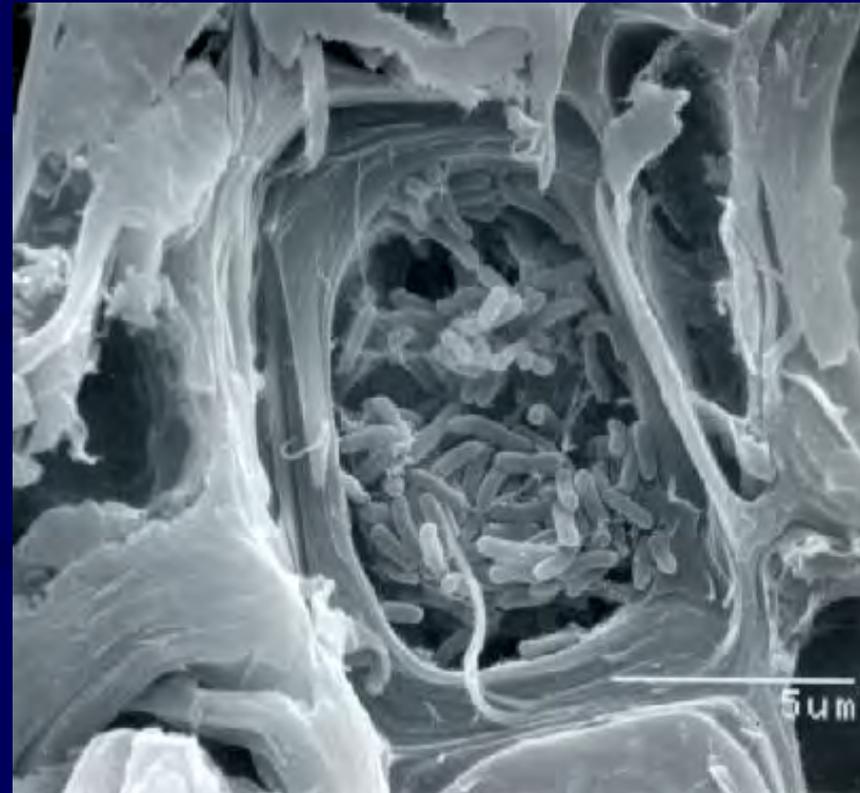


Foto: Fundecitros

**EQUIPE ESALQ/USP: Dr. Adriano Azevedo Filho**  
**(Depto. de Economia, Administração e Sociologia)**

**POTAFOS: Dr. T. Yamada**

**Secretaria da Agricultura: Novais, Catanduva**

**Eng. Agr. Ronaldo Cabrera**

## II. Introdução

### • CVC

#### • Importância – doença dos anos 90

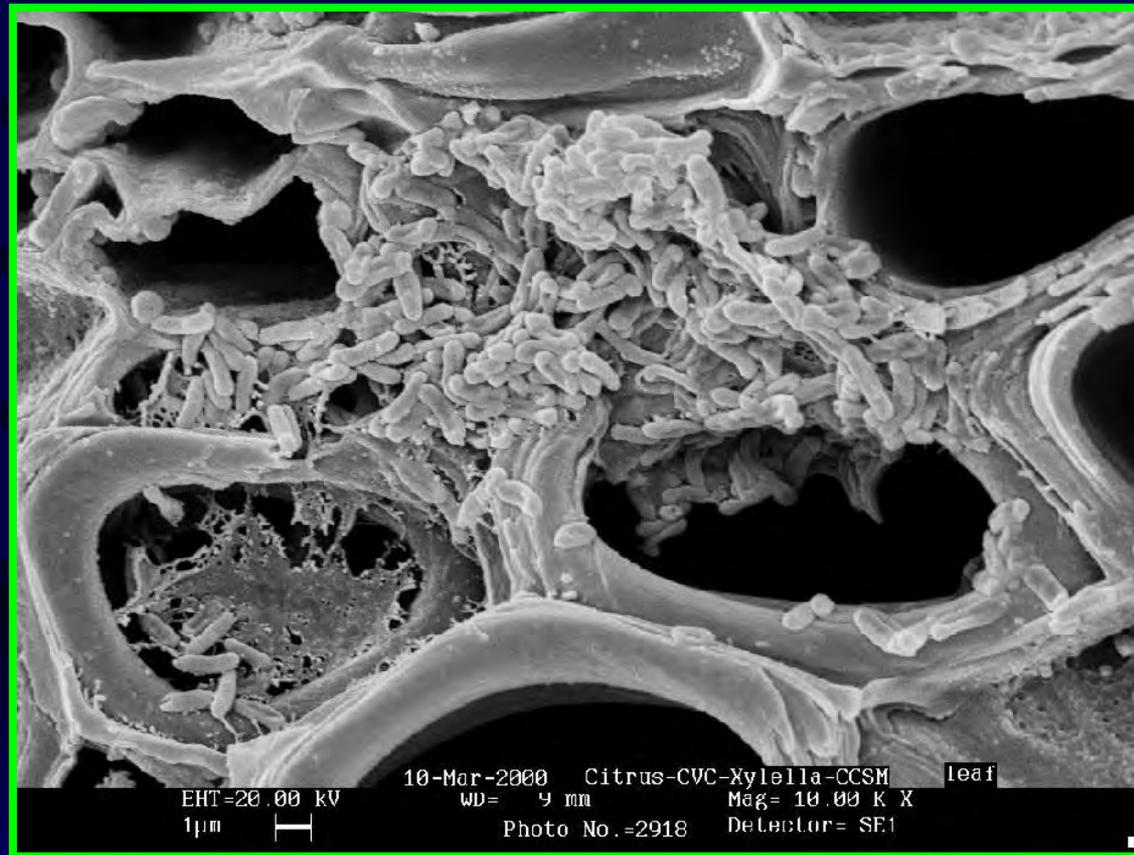
- Uma das doenças mais graves da citricultura
- Sem controle químico, necessita erradicação

#### • Patógeno: *Xylella fastidiosa*

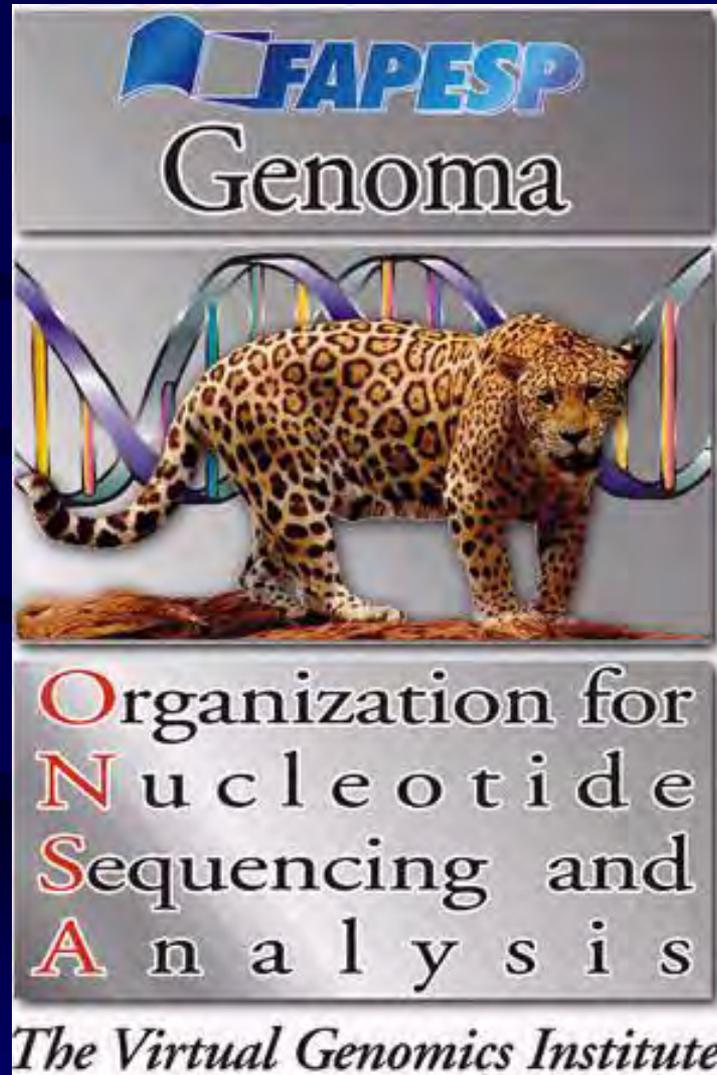
#### • Sintomas

## CVC – *Xylella fastidiosa* (1993)

## Inseto Transmissor – Cigarrinha (1996)



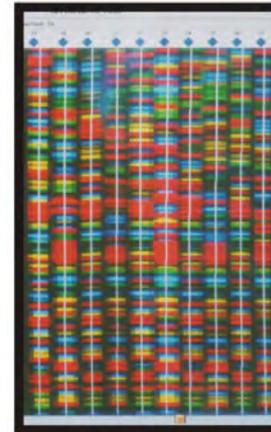
# ESTUDO DO GENOMA DA *Xylella*



# O Programa ONSA - FAPESP



**CENA - USP**

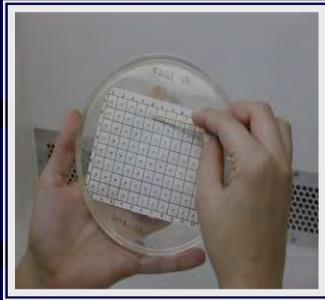


**SEQÜENCIAMENTO  
GENOMA FUNCIONAL - PROTEOMA  
ESTRUTURAL**

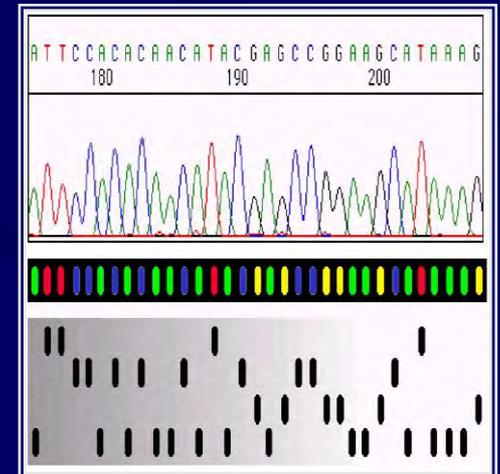
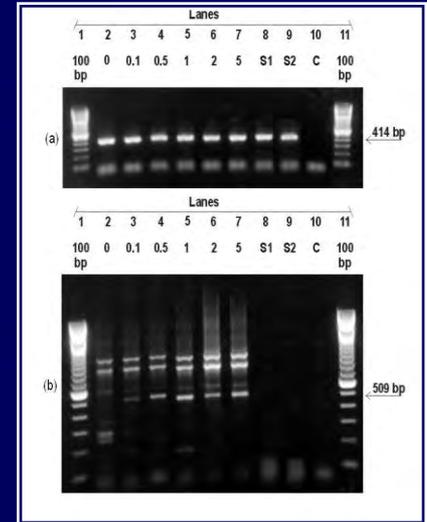
## II. Introdução

- Início: Projeto *Xylella fastidiosa*
- Pesquisas com patógenos
  - *Xylella fastidiosa* - CVC e PD (Citrus e Uva)
  - *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Citrus)
  - *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Brassica)
  - *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Cana)
  - Outros: bactérias, fungos, plantas, câncer humano.

# ETAPAS: SEQÜENCIAMENTO



QUANTIFICAÇÃO  
SEQÜENCIAMENTO



# III. Geração de Dados

## ● Fases de Seqüenciamento

- Construção de Biblioteca Genômica
- Clonagem, transformação e extração do fragmento de DNA
- Seqüenciamento de DNA
- Bioinformática e Prospecção de Genes

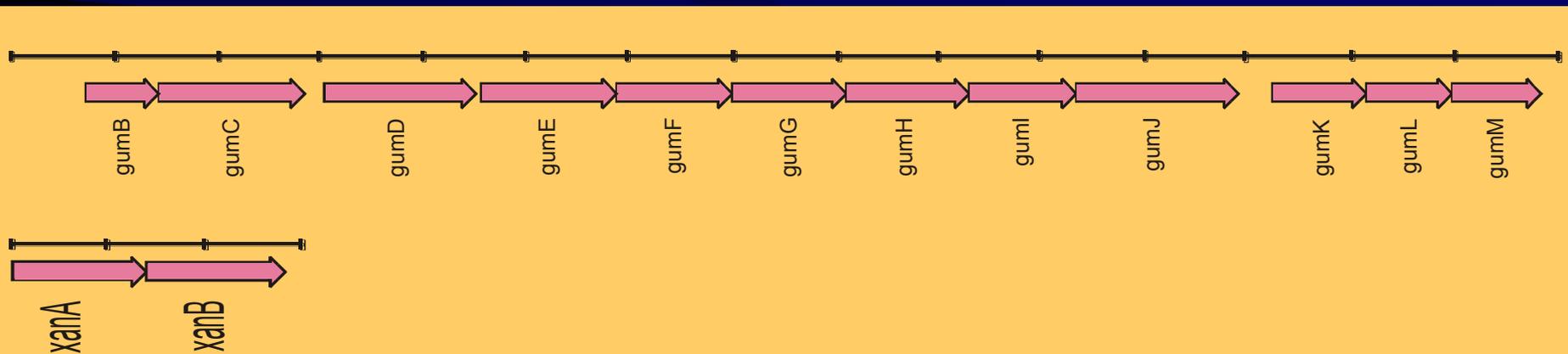
# Anotação por Categorias

- I. Metabolismo intermediário
- II. Biossíntese de pequenas moléculas
- III. Metabolismo de macromolécula
- IV. Estrutura celular
- V. Processos celulares
- VI. Elementos genéticos móveis
- VII. Patogenicidade, virulência e adaptação
- VIII. Genes hipotéticos
- IX. Outras categorias não definidas

# IV. Exemplo de Anotação por Categorias

## • Subcategoria VII.E – *Exopolissarídeos*

- Exopolissacarídeos associados à habilidade de causar doença nas plantas
- Goma xantana – faltam 2 genes em relação à *Xanthomonas*
- Operon Gum completo da *Xanthomonas*:



## **V. Exemplo de Estudo Aplicado:**

### **Sideróforos**

# **Genes de *Pseudomonas aeruginosa* em *Xylella fastidiosa* associados ao transporte de ferro**

## **I – Sideróforos receptores de Ferro:**

**a- fpvA (Ferri-pyoverdine receptor)**

**b- fptA (Ferri-pyochelin receptor)**

**c- pfeA (Ferri-enterobactin receptor)**

**d- fiuA (Ferrioxamine receptor)**

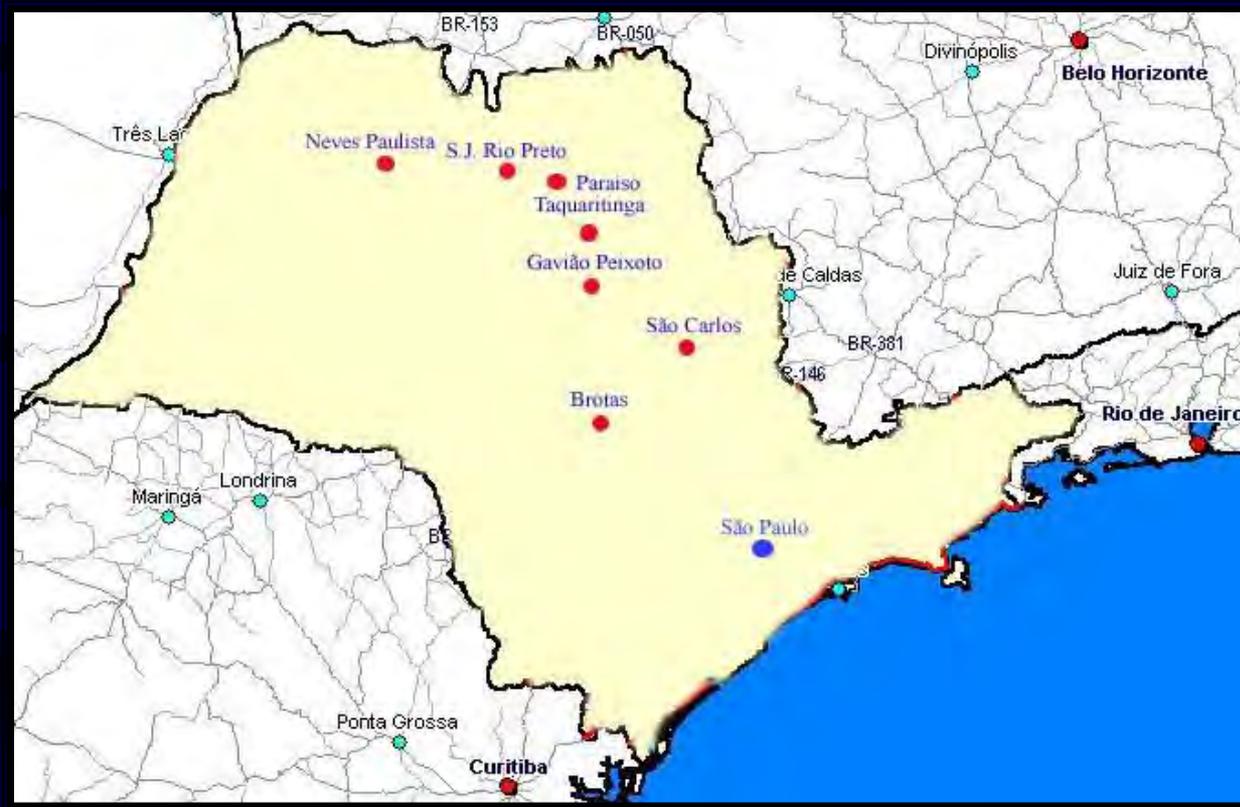
## **II – Biossíntese de sideróforos:**

**a- pchE (Pyochelin biosynthesis)**

**b- pchF (Pyochelin biosynthesis)**



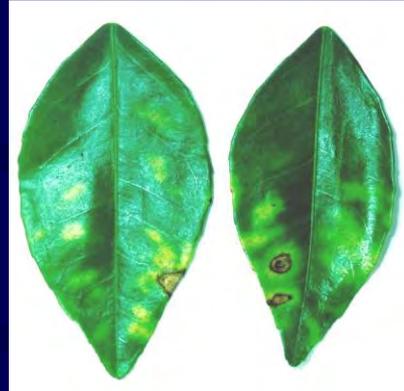
# *Xyllela* = 180 Isolados de áreas com CVC



Testados com primers específicos  
(CVC-1 and 272-2)



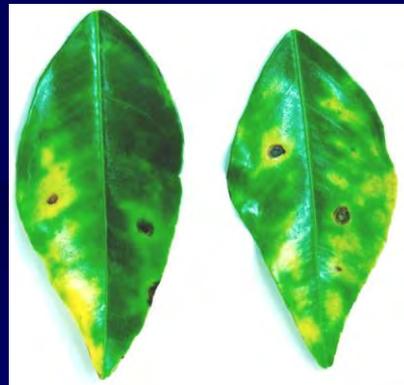
*Xylella fastidiosa*  
CVC



**Gavião Peixoto**

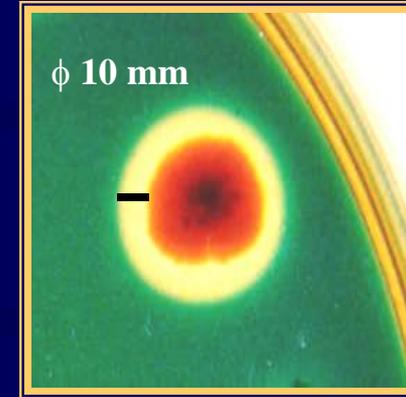


**S.R. Passa Quatro**



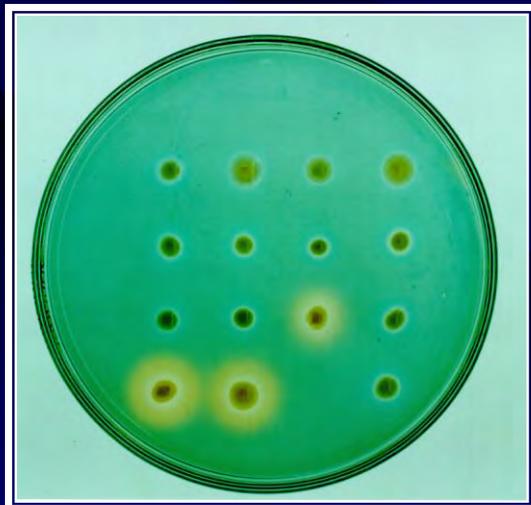
**Neves Paulista**

# SIDERÓFOROS



*Agrobacterium tumefaciens* isolado 523

*Xylella fastidiosa* (Paraíso-SP)



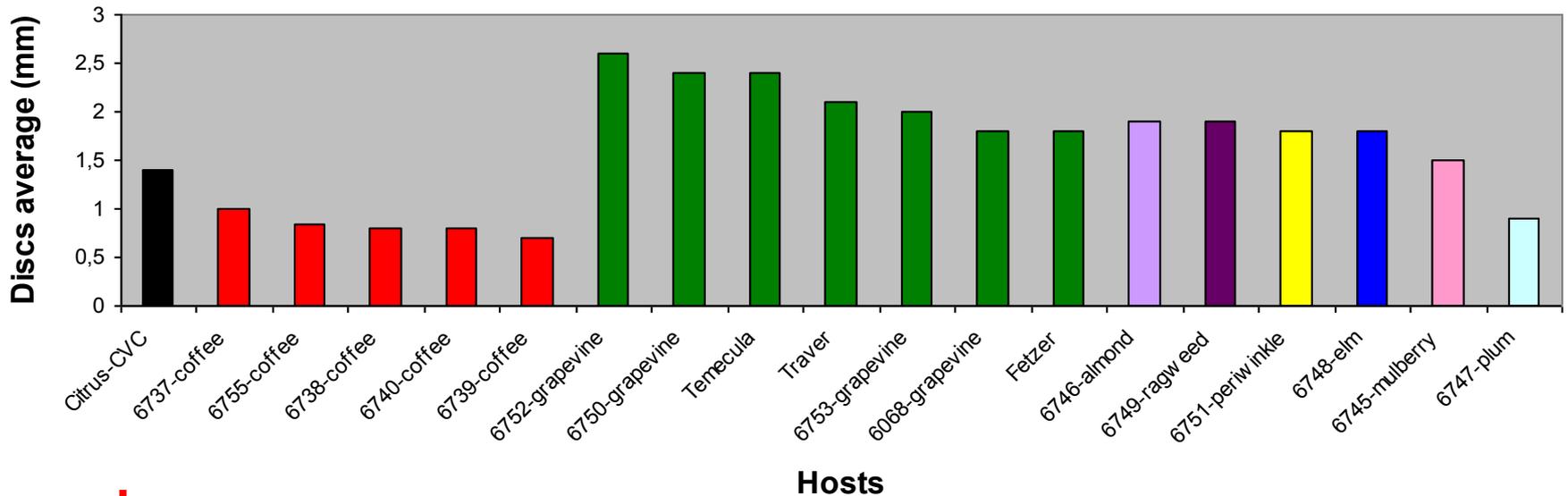
*Rhizobium* sp

632, 3AC, 3AA – Positivos

3E, 899 – Negativos

Ref.: **Enilson S. de Sá**

# Produção de Sideróforos

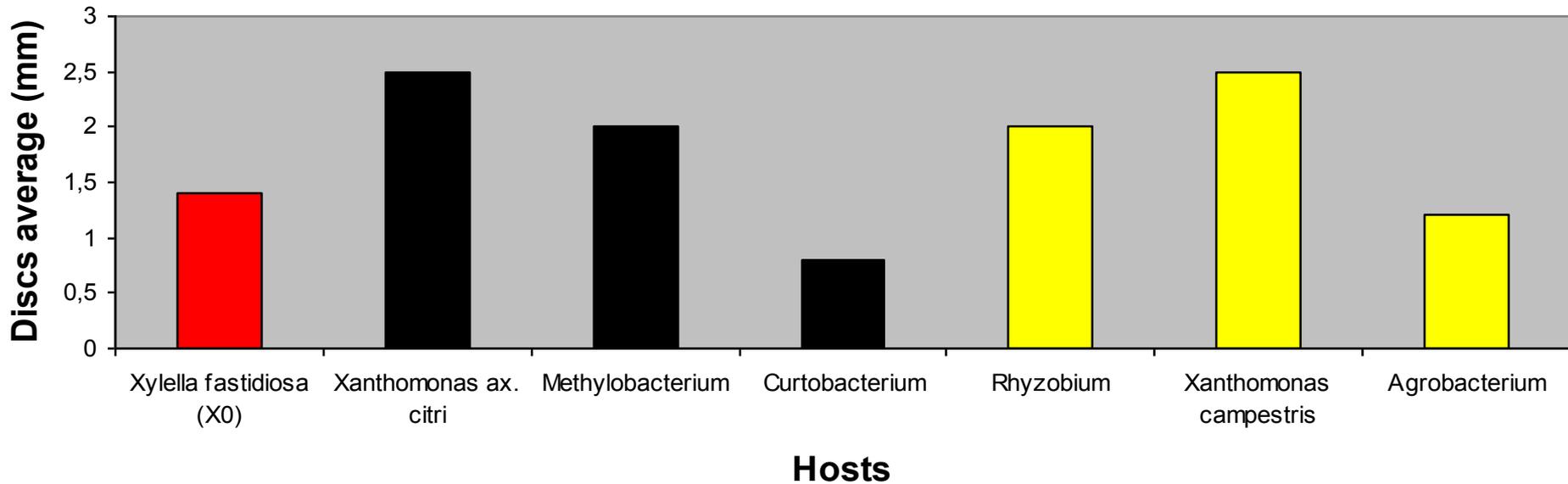


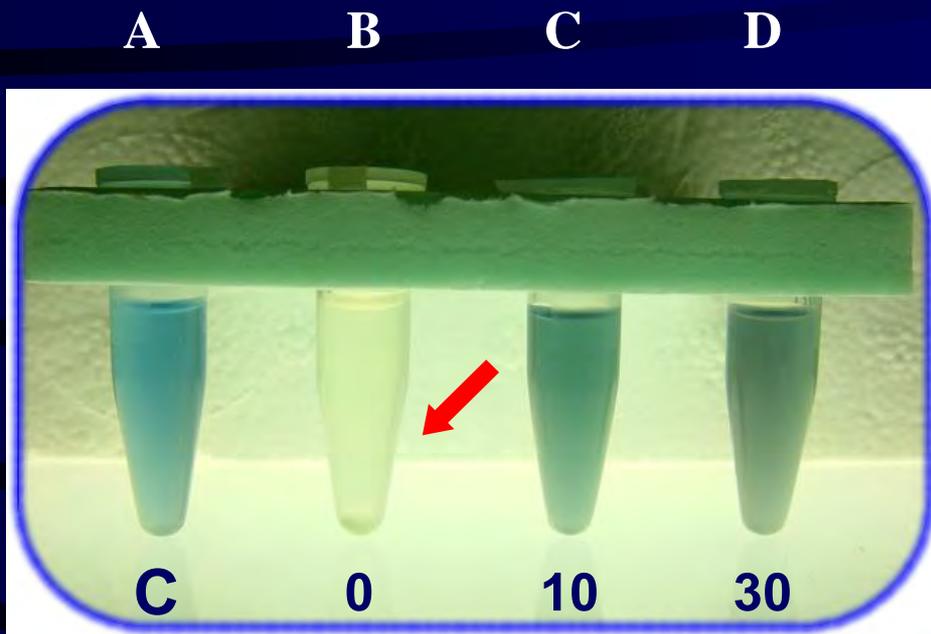
**CVC**

Média de 70  
positivos (90%)

**X.f. - PD**

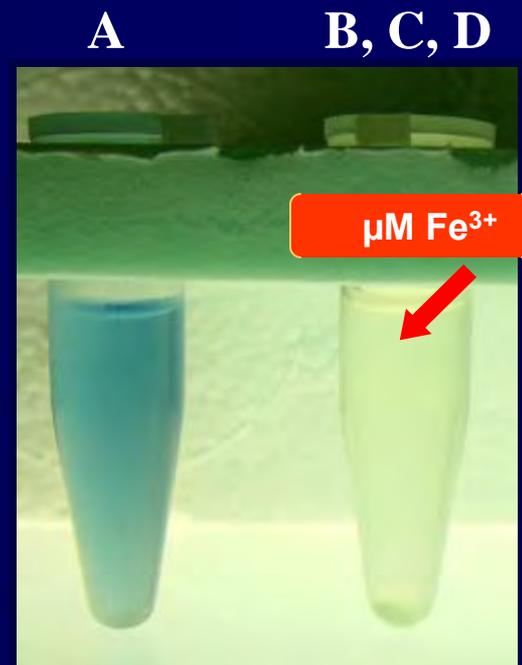
# Produção de sideróforos por bactérias encontradas dentro de plantas hospedeiras





(C = controle, sem bacteria)

*Xylella fastidiosa*



C

0, 0.1 and 30

*Methylobacterium*

*Xylella fastidiosa* - PD

MEIO SELETIVO MM9 + CAS  
 SOB CONDIÇÕES DE DEFICÊNCIA DE Fe

***GENOMA FUNCIONAL DA Xylella fastidiosa***



**CVC ESTARIA ASSOCIADA À DEFICIÊNCIA NUTRICIONAL?**





**E QUANTO À DEFICIÊNCIA DE  
ZINCO?**



**CVC TEM SINTOMAS DIFERENTES**



## ANÁLISE DE SOLO

pH CaC	5,4
H + Al	1,8
N	
Ca	2,4
Mg	0,9
K	0,28
P	45
MO	1,5
CTC	5,38
V %	66,35
Ca %	44,61
K %	5,20
Mg %	16,73
H+Al %	33,46
Al %	
S	10,3
B	0,2
Fe	39
Mn	26,5
Cu	1,2
Zn	4,5

FONTE  
SOLUBOR ARGENTINO = 17,4% B

TRAT. 1	TESTEMUNHA
TRAT. 2	1 ppm B
TRAT. 3	2 ppm B
TRAT. 4	3 ppm B

PLANTIO = 03/03/2000

AVALIAÇÃO = 22/08/2000



**E QUANTO À DEFICIÊNCIA DE B?**

ppm B

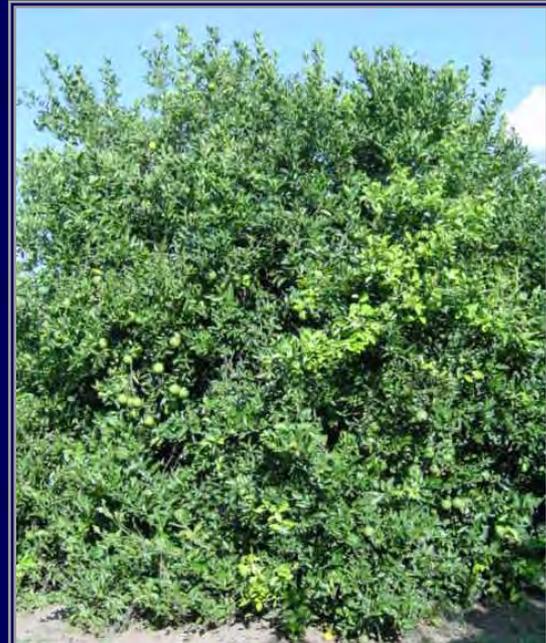
3

## APLICAÇÃO DE B – 3 ANOS APÓS





**DEFICIÊNCIA DE B**



**3 ANOS APÓS A APLICAÇÃO DE B**





## **CONTROLE ALTERNATIVO DO MATO**

**O MATO É UMA BOA FONTE DE MATÉRIA ORGÂNICA E PODE PROTEGER O SOLO DE ESTRESSE HÍDRICO E ALTAS TEMPERATURAS**



# HÚMUS CONTROLA DECLÍNIO NA FLÓRIDA

Recuperação de Plantas Doentes  
(23/28 plantas) após 2 anos

20.2% de aumento do Ø do tronco  
laranja doce (jovem) após 1,5 anos

**VALÊNCIA**  
(12 ANOS)

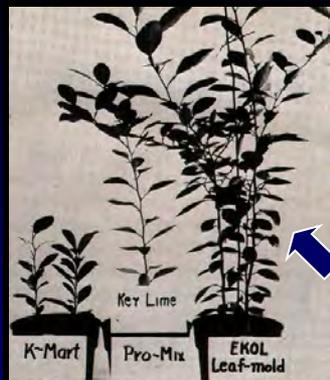
2 anos

Com Húmus

Produção > 14,8%  
Sem perdas de plantas

38,6% de ganho

Produção < 23,8%  
15% perdas de plantas



LIMA

POINSETTIA





**MANEJO  
SUSTENTADO  
PODE EVITAR  
A ERRADICAÇÃO  
DO CITRUS  
DEVIDO AO CVC**



**E QUANTO À  
PRODUÇÃO?**

**ANTES DO TRATAMENTO:**

**4 CAIXAS**

**APÓS O TRATAMENTO :**

**ATÉ 12 CAIXAS**



**O TAMANHO E A QUALIDADE DOS FRUTOS  
SÃO SUPERIORES**

Amarelinho

# O papel do citricultor

Pomar com árvore sadia em meio a plantas severamente afetadas.  
Pesquisadores pedem ajuda na busca de plantas resistentes ou tolerantes.

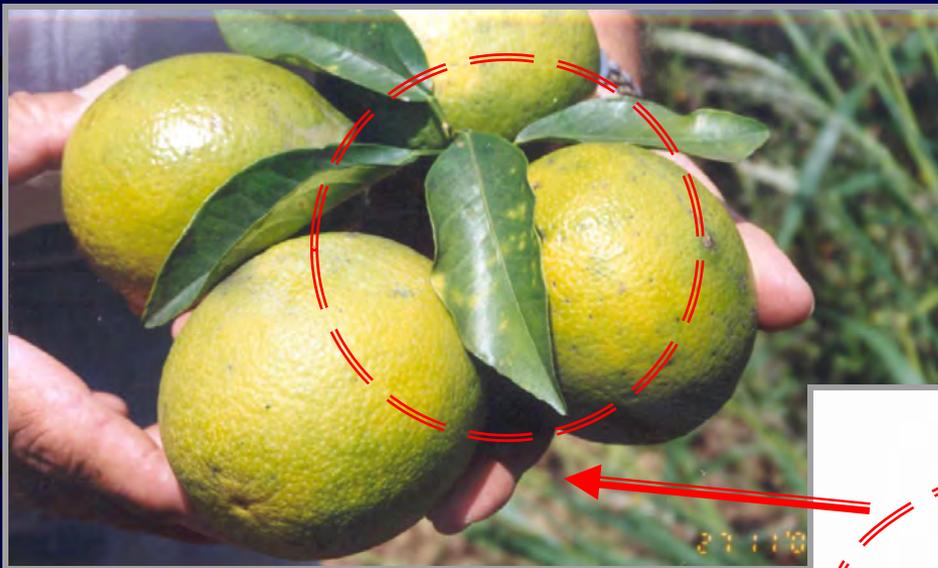


1989

# Manejo do Solo e da Cultura:

## Haveria algum hospedeiro mais tolerante?





**Plantas escapes: elas  
conteriam X.f.?**

**Plantas escapes produzem  
normalmente, mesmo com alguns  
sintomas de CVC**



**As Filhas da Mãe no campo**



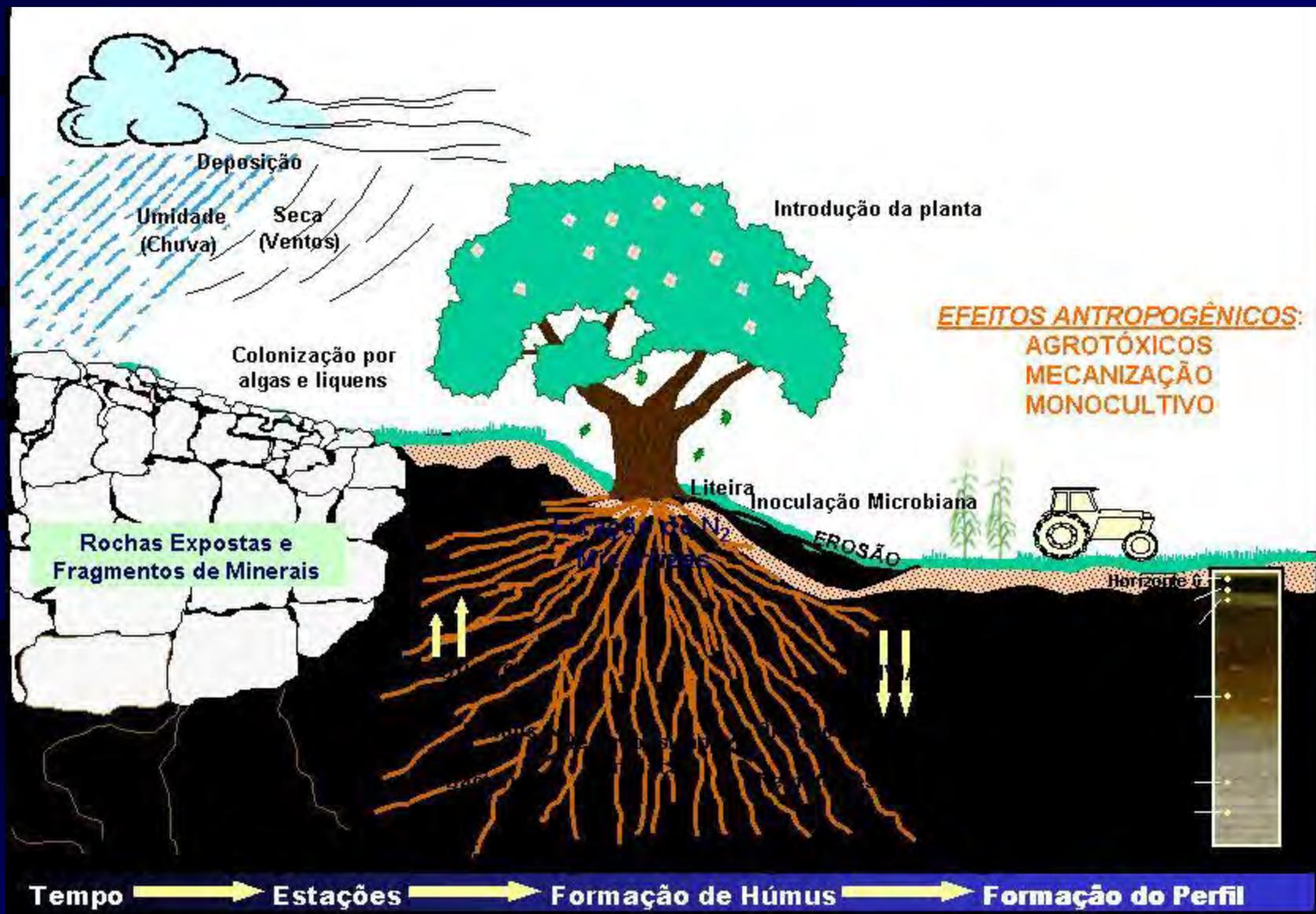
**Sr. Eliseu Gil (Novais-SP) está  
orgulhoso da sua planta  
escape, pois tem agora mais de  
15.000 filhas e netas**



**Experimento em Novais – teste de substratos para melhoria da resistência de mudas de citros**

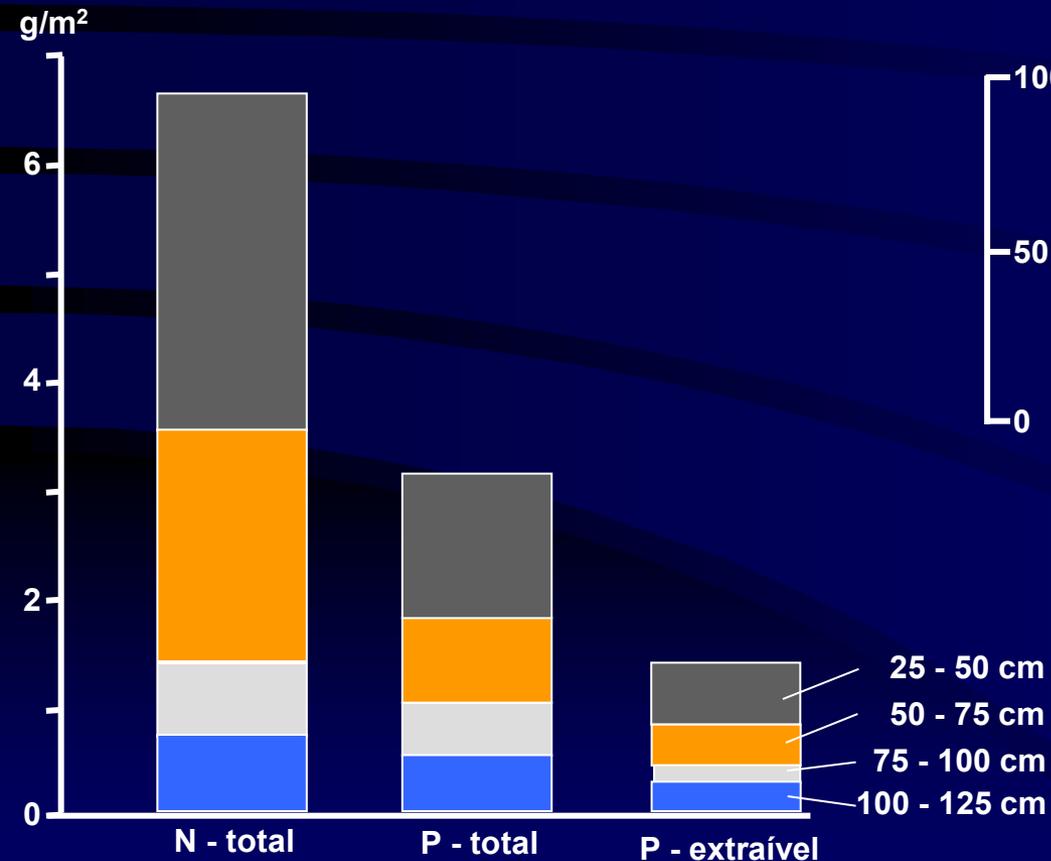
**As plantas parecem muito saudáveis em presença de substratos orgânicos, tais como húmus**





## Decomposição da Matéria Orgânica a partir da vegetação:

- a) Formação de húmus
- b) Disponibilidade de nutrientes e micronutrientes



## FORMAÇÃO DE HÚMUS



## **MÉTODO EFICIENTE:**

- **CONTROLE DE PATÓGENOS E OUTROS ORGANISMOS**
- **MANUTENÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICAS E QUÍMICAS ATRAVÉS DA ELEVADA CTC**
- **NÃO HÁ FORMAÇÃO DE RESÍDUOS**
- **FORNECIMENTO DE NUTRIENTES E MICRONUTRIENTES**
- **PRODUÇÃO DE FITOHORMÔNIOS**

# MANEJO DA MATÉRIA ORGÂNICA

## PRECONCEITOS

ATIVIDADE EXÓTICA

ESCALA REDUZIDA

BAIXA DISPONIBILIDADE

HETEROGENEIDADE

ALTO TEOR DE NUTRIENTES

PRODUTIVIDADE INCERTA

ALTO CUSTO DE PRODUÇÃO

PROCESSO DEMORADO

MANEJO DIFÍCIL

## CONCEITOS

PRODUÇÃO RACIONAL

TECNIFICAÇÃO

ABUNDANTE

HOMOGENEIDADE

CTC-CAPACIDADE DE TROCA

ALTA PRODUTIVIDADE

CUSTO ACESSÍVEL

AGILIDADE NA FORMAÇÃO

MANEJO SIMPLIFICADO

**DIAGNÓSTICO DE CVC ATRAVÉS DA  
DETECÇÃO DE *Xylella fastidiosa*  
EM CAMPO**

## NOVAIS-SP APÓS 4 ANOS DE MANEJO ALTERNATIVO



**POSITIVO:** Xf-X<sub>0</sub> (2)

CVC-Positiva (7)

Planta Escape Filha (9)

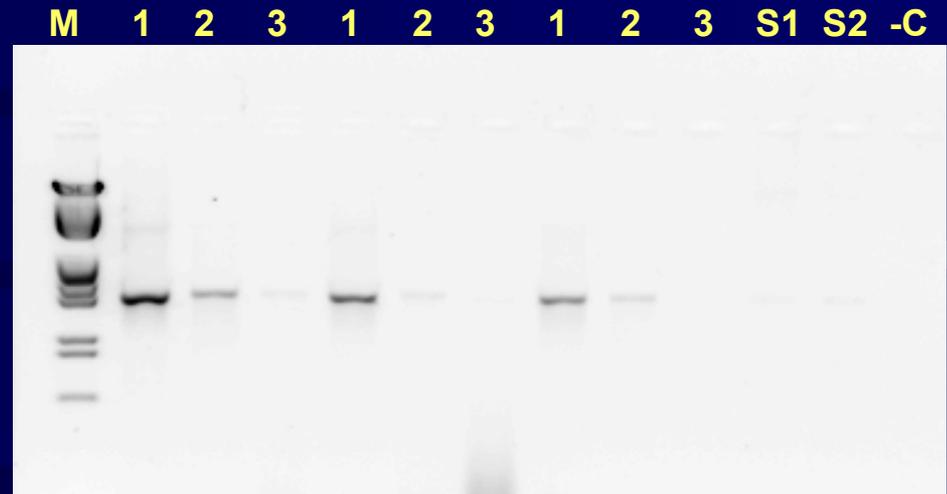
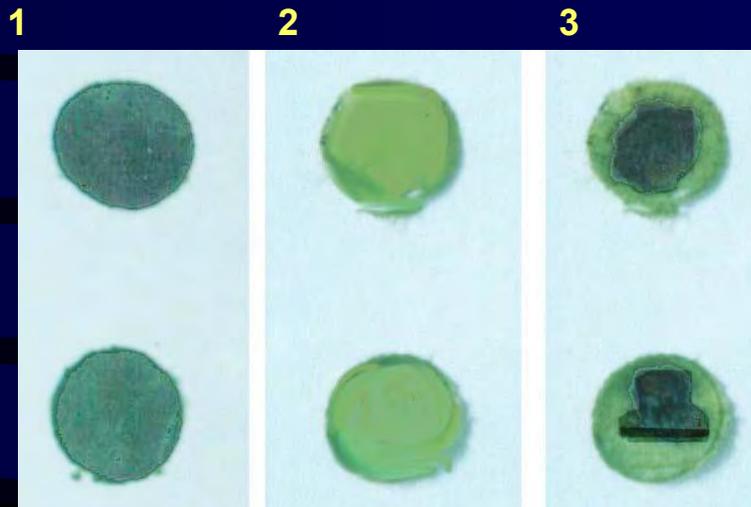
**NEGATIVO:** plantas com manejo alternativo por 4 anos (3, 5, 8) – B, PD

Planta escape (4)

Mato ao lado de plantas CVC-positivas (6)

**CONTROLE:** 11 (sem DNA)

# Detecção de *Xylella fastidiosa* em plantas doentes



**Folhas:**

1. Área assintomática,
2. Área clorótica,
3. Área necrótica,

S1: Folha de planta sadia,  
S2: Folha de planta sadia,  
-C: Controle negativo  
(H<sub>2</sub>O)

# EQUIPE – CENA/USP



David Moon



Tsai



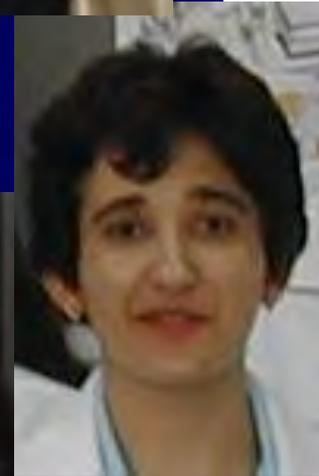
Linda



Fabiana



Renata



Marília



Eduardo Formighieri



Elias



Eliane



Matheus

# **GENOMA FUNCIONAL**

**PESQUISADORES PÓS-DOCTORES**

**FLÁVIA T. H. PACHECO**

**MARIA ESTELA DA SILVA**

**JORGE L. M. RODRIGUES**

**AUGUSTO ETCHEGARAY JR.**