



# Informativo Centro de Citricultura

Cordeirópolis, Outubro de 2015 • Número 245

## Transferência de Tecnologia: uma missão institucional

Uma das missões institucionais do Centro de Citricultura, como centro de produto, é a transferência de tecnologias para os usuários do setor citrícola. Em que pese a importância desse conjunto de atividades, elas nem sempre são bem caracterizadas, muito menos avaliadas em sua eficiência. O que de fato é transferir tecnologia? O que isso tem a ver com inovação? Quem inova? Quem gera a tecnologia ou informação. Quem as usa? Esse Informativo discute esses pontos.

### **Borbulhas e Sementes**

O Centro de Citricultura tem no melhoramento de citros a espinha dorsal de suas atividades de pesquisa e desenvolvimento. Na interface da interação com o setor de produção essa atividade é representada principalmente pelo fornecimento de borbulhas e sementes de plantas básicas, plantas matrizes e borbulheiras que servem de base à citricultura paulista. Essa atividade sempre esteve apoiada na diversidade de cultivares existentes

no banco ativo de germoplasma de citros. Essa coleção foi feita ao longo dos anos e representa o esforço de vários produtores e pesquisadores que selecionaram, caracterizaram e mantiveram esse material à disposição do setor. Nos últimos anos e, em função da necessidade de proteção contra vetores de doenças e da observância à legislação federal, o sistema de produção e fornecimento de material dessas coleções passou por profundas alterações, com maior garantia de sanidade e qualidade genética. O Centro de Citricultura tem atualmente o maior acervo de Plantas Básicas, Plantas Matrizes, Borbulheiras e Jardins Clonais do Brasil com registro no Registro Nacional de Sementes e Mudas (Renasem), contendo mais de 200 cultivares, assim como o maior detentor de cultivares registrados no Registro Nacional de Cultivares (RNC).

Não há dúvida que o plantio de mudas produzidas com sementes de porta-enxerto e borbulhas de copa com origem genética conhecida e comprovada, assim como a necessária qualidade fitossanitária,

é a primeira e mais importante etapa no estabelecimento de um pomar. Nos últimos anos o Centro de Citricultura tem sido fonte principal de borbulhas para a renovação de borbulheiras para todo o estado de São Paulo. Com a adequação do sistema de produção à Instrução Normativa 48 do MAPA, borbulheiras não são autorizadas a fornecer borbulhas para outras borbulheiras, o que tem levado o setor a um impasse. Provavelmente a solução seja a transformação das atuais borbulheiras em jardins clonais de Plantas Básicas.

Desse modo, é patente a importância do sistema de produção de borbulhas e sementes do Centro de Citricultura como atividade de transferência de tecnologia para o setor citrícola brasileiro. O Centro conta ainda com um grande número de cultivares potenciais que estão sendo liberados de acordo com a adesão de interessados ao programa Citricultura Nota 10. O certo é que se o setor citrícola quiser diversidade de cultivares copa e porta-enxerto, o Centro de Citricultura os tem à disposição.



## Editorial

### Estigma e realidade

Com frequência o assunto defensivos agrícolas ou agrotóxicos é trazido à mídia, destacando em geral os aspectos mais negativos de seu uso. Quase sempre a mensagem repassada ao consumidor é que esses produtos são altamente letais e prejudiciais às pessoas, aos animais e ao ambiente. Sem dúvida alguma todas essas informações têm procedência quando estão baseadas em resultados de uso inadequado desses produtos. De modo geral, pouco se menciona sobre o real uso e fim dos defensivos agrícolas. O termo agrotóxico parece estar mesmo estigmatizado na mídia.

Recentemente a citricultura foi apontada como o segundo maior usuário de defensivos agrícola no Brasil. Em que pese o questionamento que se possa fazer desse levantamento, é claro que isso está associado à alta incidência de doenças, pragas e vetores. A expansão do HLB e a manutenção do controle do ácaro da leprose, assim como de pinta preta e do cancro cítrico respondem pela quase totalidade dos defensivos agrícolas utilizados na citricultura. A expansão acelerada da citricultura paulista sobre reduzida base genética e a deficiência no controle da introdução de material contaminado são fatores intrinsecamente associados à alta incidência de pragas e doenças na citricultura. Impossível prever a produção de citros para a indústria ou para o mercado de fruta fresca em quase todas as áreas do Estado sem o uso intensivo de defensivos. Essa é uma realidade na citricultura. No entanto, deve ser destacado que a legislação sobre agrotóxicos é suficientemente robusta para garantir a qualidade na produção e a sustentabilidade ambiental. Erros em consequência de mau uso não deveriam estigmatizar essa tecnologia.

Como centro de pesquisa de um produto importante do agronegócio, o Centro de Citricultura tem em seus focos de trabalho a geração de novas cultivares de citros, tanto de copas quanto de porta-enxertos, que apresentem maior resistência a várias pragas e doenças limitantes à produção. Tais cultivares tem o potencial de permitir produção sustentável na medida em que poderão reduzir sobremaneira o uso de defensivos e, em consequência, os custos de produção e a longevidade do pomar. Esse trabalho tem demandado anos de esforços e recursos e pode ser considerado o mais ousado no mundo, pois implica na adoção de novas tecnologias para melhoramento, ao mesmo tempo em que aposta fortemente no aproveitamento desse material pelo setor.

É a ciência a serviço do setor cítrico. Com certeza o futuro reconhecerá nesse trabalho um importante componente na sustentabilidade e continuidade da citricultura brasileira.

## Matéria de Capa

### Eventos

O Centro de Citricultura é tradicional ponto de encontro da citricultura brasileira, principalmente em seus eventos regulares, como a Semana da Citricultura e a Expocitros, os dias temáticos e os cursos. Com essas atividades os participantes recebem informações atualizadas sobre os mais diversos temas. Destaque-se que nesses eventos o Centro busca em todo o setor as experiências de pesquisadores e técnicos para atualizar informações e que esses eventos têm acesso livre a todos os interessados. É a comunicação direta entre a pesquisa e seus usuários.

### Serviços

Através de sua Clínica Fitopatológica e de outros laboratórios, o Centro presta importante serviço de diagnóstico de patógenos de citros, bem como limpeza clonal de plantas matrizes e testes de produtos. A Clínica é o único laboratório credenciado no MAPA para diagnóstico de doenças de citros no estado de São Paulo. Além de diagnóstico de CVC, HLB, nematoides, gomose e cancro cítrico, a Clínica está credenciada para diagnóstico de pinta preta pelo método de indução.

### Novas Tecnologias

Além de borbulhas e sementes de novas cultivares, o Centro tem continuamente gerado novas tecnologias ao setor, como o uso de N-acetil cisteína no controle alternativo de doenças bacterianas, especialmente CVC, a tecnologia de manejo de mato nas entrelinhas para potencializar o uso de defensivos, adubos e maior proteção do solo, a tecnologia para otimizar uso de adubos em fertirrigação e em viveiros, a tecnologia de limpeza clonal por microenxertia de plantas matrizes, o diagnóstico de patógenos de citros por métodos moleculares e a tecnologia de criopreservação de germoplasma, dentre outras.

Dessa forma, o Centro de Citricultura tem cumprido sua missão institucional de geração e transferência de tecnologia a todos os segmentos da citricultura, sejam eles locais, estaduais ou mesmo internacionais.

## Notas

### Visita ao Centro

O Centro de Citricultura recebeu no dia 26 de outubro a visita de um grupo técnico composto por 13 profissionais envolvidos com a citricultura mexicana. A visita ao Brasil, que abrangeu também os estados da Bahia e Sergipe, foi coordenada pela Embrapa sob demanda do Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) e da Agencia Mexicana de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AMEXCID) junto ao governo brasileiro, visando ampla colaboração técnica para treinamento de agricultores daquele país. Os visitantes foram recebidos pelo Pesquisador Dirceu de Mattos Júnior, que apresentou as principais linhas da estrutura e organização dessa unidade do IAC. Na sequência o Pesquisador Fernando Alves de Azevedo proferiu palestra sobre 'Aspectos técnicos da citricultura'. A Pesquisadora Juliana de Freitas Astúa, da Embrapa Mandioca e Fruticultura, abordou os principais aspectos da leprose dos citros. Na parte da tarde, acompanhados pela Pesquisadora Marinês Bastianel e o Eng<sup>o</sup> Agr<sup>o</sup> José Dagoberto De Negri os visitantes conheceram os trabalhos e visitaram *in loco* as instalações do Banco Ativo de Germoplasma e Sistema de Matrizes e Borbulheiras, ambos protegidos com tela a prova de vetores de doenças de citros. Finalizando o evento, os visitantes receberam informações sobre economia cítrica através de palestra de Gilberto Tozatti (Gconci).

No dia 20 de outubro, o Centro de Citricultura recepcionou o Professor Ernesto José Rezende Rodrigues acompanhado de 32 alunos do curso de graduação em agronomia do Instituto Federal do Triângulo Mineiro - Campus de Uberlândia, MG. Os visitantes foram recebidos pelo Eng<sup>o</sup> Agr<sup>o</sup> José Dagoberto De Negri que proferiu palestra sobre condução de plantas matrizes para a obtenção de borbulhas e produção de mudas certificadas de citros, seguida de visita às instalações do BAG Citros IAC e do complexo contendo plantas matrizes e borbulheiras, de fidelidade e sanidade vegetal comprovadas. Esse material serve de base para a manutenção da alta qualidade das citriculturas paulista e nacional.

### **Workshop anual do Programa de Melhoramento**

No dia 6 de outubro foi realizado o Workshop anual do Programa de Melhoramento do Centro de Citricultura. Com participação de pesquisadores e alunos foram apresentadas as principais linhas de pesquisa do programa, com os projetos e pesquisas em andamento. Foi amplamente discutido com o grupo a necessidade de se ampliar os trabalhos de novas variedades de laranjas para a indústria, com a possibilidade de submissão de um projeto temático sobre laranja para suco integral ou NFC (*not from concentrate*). Também foi apresentado o status do Programa Citricultura Nota 10: Da Pesquisa para a Mesa. O programa está tendo uma boa aceitação pelos produtores de frutas para mesa.

### **Seminário Científico**

No dia 13 de outubro foi ministrado o seminário científico “Síntese de parede celular bacteriana e controle de divisão celular: potencial para controle de *Xanthomonas*”, ministrado pelo Dr. Dirk-Jan Scheffers, da Universidade de Groningen, Holanda. Na oportunidade foram apresentados os principais resultados de pesquisas envolvendo divisão e parede celular bacteriana, com intuito de conduzir trabalhos para o desenvolvimento de antimicrobianos que inibam a divisão em *Xanthomonas*.

### **Participação em Eventos**

A 28ª edição do Congresso Brasileiro de Microbiologia ocorreu nos dias 18 a 22 de outubro, no Centro de Convenções de Florianópolis, em Santa Catarina. O evento contou com a participação de pesquisadores e vários alunos de pós-graduação do Centro de Citricultura. Durante o congresso a Pesquisadora Alessandra Alves de Souza ministrou palestra intitulada: “From the knowledge of bacterial genomes to plant disease control: how genes from pathogens can be used to alter plant-pathogen interaction”. A palestra abordou estratégias da biotecnologia onde genes do patógeno podem ser usados contra eles mesmos visando à obtenção de plantas resistentes a CVC e ao cancro cítrico.

Os Pesquisadores Marcos Antonio Machado, Raquel Luciana Boscarior-Camargo, Mariângela Cristofani-Yaly, a pós-doutoranda Carolina Munari Rodrigues e alunos de pós-graduação

do Centro de Citricultura participaram do “11th International Congress of Plant Molecular Biology”, realizado entre os dias 25 e 30 de outubro, em Foz de Iguaçu, PR. Este evento reuniu cerca de 1.000 participantes que puderam apresentar e discutir seus trabalhos em áreas como epigenética, biologia sintética, interações bióticas e abióticas, desenvolvimento reprodutivo, biologia de sistemas, biotecnologia de plantas, genômica, sinalização celular, nanotecnologia, entre outras. Neste congresso foram apresentadas duas sessões plenárias diárias, oito sessões temáticas simultâneas, além de 877 trabalhos na forma de pôster. Entre os 17 trabalhos apresentados com o tema citros, 10 foram do Centro de Citricultura.

No dia 30 de outubro os Pesquisadores Dirceu de Mattos Jr. e Rodrigo Marcelli Boaretto participaram do workshop “Manejo de HLB”, organizado pela Citrosuco, em Araraquara. O evento debateu as possíveis oportunidades de melhoria no manejo da doença e contou com a presença de inúmeros pesquisadores e especialistas ligados a citricultura. Na ocasião o Pesquisador Dirceu apresentou resultados da pesquisa sobre Manejo Nutricional e HLB, geradas no projeto que vem sendo conduzido pelo grupo de Nutrição dos Citros do IAC em parceria com pesquisadores do Fundecitrus e Esalq/USP.

### **Participação em Bancas**

A aluna do Curso de Doutorado em Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa, MG, Itamara Bomfim Gois, orientada do Prof. Aluizio Borém e coorientada pela Pesquisadora Mariângela Cristofani-Yaly, qualificou-se no dia 20 de outubro com o trabalho “Acurácia da seleção genômica ampla em *Citrus*”. Sua banca contou também com os Professores Marcos Deon Vilela de Resende, Eveline Teixeira Caixeta e Rodrigo Reis Mota.

No mesmo dia em Araras, SP, a Pesquisadora Valdenice Moreira Novelli participou da banca de defesa de trabalho de conclusão de curso em Licenciatura e Bacharelado em Ciências Biológicas da Uniararas, do aluno Marcelo Campos dos Santos. O tema apresentado foi “Validação de protocolo para extração de RNA total de *Brevipalpus* spp. e prospecção de genes para RNA interferente (RNAi)”. O trabalho teve apoio da Fapesp e contribuiu com informações inéditas para o avanço das pesquisas em genômica e expressão gênica, com vistas à estratégias inovadoras para o controle do ácaro da leprose dos citros.

## **Pesquisa**

### **Produção de plantas haploides e duplo-haploides de laranjeiras**

Haploides são plantas com o número de cromossomos igual ao de gametas (pólen ou óvulos) enquanto duplo-haploides são plantas haploides que sofreram duplicação cromossômica (naturalmente ou artificialmente). Ambos apresentam genoma completamente homocigoto e têm grande potencial para uso no melhoramento de plantas, assim como para estudos envolvendo o sequenciamento de genomas. Plantas quase que completamente homocigóticas também podem ser obtidas por meio de cruzamento, após várias autofecundações. No entanto, em citros este método é muito mais complexo e demorado pois realizar cruzamentos controlados é muito difícil.

Uma alternativa rápida para a obtenção de plantas homocigotas seria a produção de plantas haploides ou duplo-haplóides com auxílio de cultura de tecidos, podendo ser realizado em apenas um ciclo de cultivo. As técnicas mais citadas na literatura seriam a androgênese (exemplos: cultura de anteras e cultura de micrósporos isolados) ou a ginogênese (exemplos: cultura de óvulos isolados ou partenogênese *in situ*).

Os fatores mais importantes para o sucesso na cultura de anteras e de micrósporos isolados são: a variedade, o estágio de desenvolvimento dos micrósporos (grãos de pólen imaturos) e a composição dos meios de cultivo. Os resultados mais expressivos têm sido obtidos pelo grupo da Universidade de Palermo (Itália), que já obtiveram plantas haploides e duplo-haploides de muitas variedades de tangerina Clementina. O Centro de Citricultura Sylvio Moreira desenvolve pesquisas com estas técnicas desde 2009, com maior enfoque para laranjeiras doces, com o objetivo de obter plantas haploides ou duplo-haploides desta espécie.

A técnica de partenogênese *in situ* também tem sido utilizada e consiste na polinização de flores com grãos de pólen estéreis (esterilizados por radiação), seguido de polinização. Apesar de não conseguirem fertilizar os óvulos, os grãos de pólen podem estimulá-los a se dividirem, o que resultará em embriões haploides. O resgate e o cultivo *in vitro* de embriões imaturos complementa a técnica. Os resultados tem sido promissores pois já foram obtidas dezenas de plântulas por este método, e elas se encontram nas fases mais avançadas de avaliação da sua ploidia.

Os pesquisadores esperam que, em breve, plantas haploides ou duplo-haploides de laranjeiras sejam produzidas nestes experimentos e sejam disponibilizadas à comunidade citrícola brasileira.

*Rodrigo Rocha Latado*

## Pesquisa Aplicada

### Tecnologia de RNA interferente

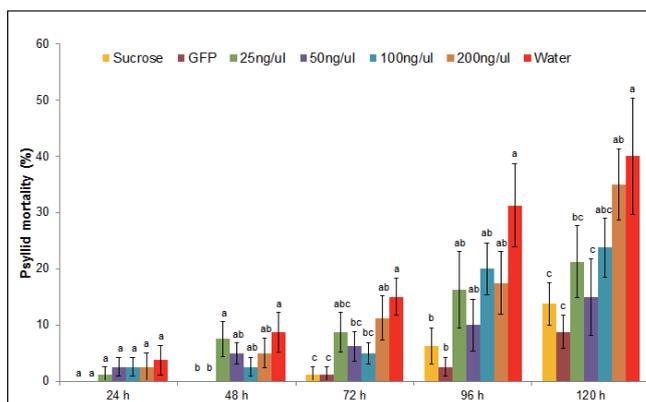
Nas últimas décadas houve considerável aumento das informações sobre as funções do RNA nos processos celulares. De moléculas somente carreadoras da informação genética, os RNAs passaram a ter funções amplas no controle da expressão de genes. Nessas circunstâncias a molécula de RNA recebe a denominação genérica de RNA interferente (RNAi). Entre as funções destacadas incluem-se o silenciamento de genes, tanto na sua transcrição (de DNA a RNA mensageiro) quanto na sua tradução (de RNA mensageiro a proteína). Portanto, considerando-se o alvo (gene) sobre o qual se quer interferir, a técnica de RNAi é extremamente poderosa e relevante para o avanço da ciência e tecnologia. O Centro de Citricultura tem ampliado sobremaneira seus projetos com essa nova tecnologia, tanto na busca de genes que possam interferir com os processos infecciosos causados por fungos, especialmente pinta preta, quanto nos processos de desenvolvimento de *Diaphorina citri*. Ambos fazem parte de teses de doutorado de alunos no Centro de Citricultura.

O controle de vetores e pragas com a tecnologia de RNAi é visto como grande potencial para, em um futuro próximo, substituir o uso de defensivos. A tecnologia é altamente específica e sem efeitos ambientais significativos ou ainda não avaliados. Como de fato funciona essa metodologia no controle de desenvolvimento de pragas? Primeiramente é essencial que se identifique genes alvos que possam ser silenciados. Para identificação desses genes é essencial que eles sejam conhecidos através de sequenciamento de DNA e análise de suas funções. Através do silenciamento ou inibição da expressão desses genes sua função também fica suprimida resultando em distúrbios no desenvolvimento ou alimentação do inseto. Esses insetos reduzem ou alteram seus

ciclos de vida e, em consequência, ocorre redução na reprodução e migração. Como o gene alvo é específico daquele inseto o tratamento com RNAi não afetará outros insetos. O projeto do Centro de Citricultura com esse tema em *D. citri* está testando pelo menos seis genes potenciais. O fornecimento das moléculas que interferirão na expressão está sendo testado tanto em alimentação com dieta artificial como por fornecimento através da planta. Alguns genes testados induzem mais de 60% de mortalidade aos insetos. Parte desse projeto está sendo executado em parceria com o Prof. Bryce Falk, da Universidade da Califórnia, em Davis, USA.

A mesma tecnologia está sendo utilizada na tentativa de avaliar genes de fungos, principalmente *Phyllosticta citricarpa* e *Colletotrichum acutatum*, agentes da pinta preta e podridão floral, respectivamente, que possam ser silenciados para reduzir patogenicidade. Também é uma tecnologia com grande potencial para substituir fungicidas de amplo espectro, testes para esse controle vem sendo realizados com sucesso em experimentos preliminares. Também aqui uma das etapas mais críticas é identificar genes candidatos que possam ser silenciados, para isso, bibliotecas de mutantes vem sendo prospectadas, além de pesquisa intensa de genes já descritos como envolvidos na patogenicidade de outros fungos filogeneticamente próximos.

Os genomas de ambos os patógenos sequenciados e já disponíveis para pesquisas do Centro de Citricultura são essenciais para viabilizar os estudos de genômica funcional desse projeto. Esse projeto tem parceria com o Prof. Holger B. Deising, na Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, em Halle, Alemanha.



Taxa de mortalidade de *Diaphorina citri* em alimentação artificial e com doses crescentes de dsRNA para silenciamento gênico (DM Galdeano)

Marcos Antonio Machado, Pesquisador  
Diogo Manzano Galdeano e  
Eduardo Henrique Goulin, doutorandos



#### Expediente

Informativo Centro de Citricultura

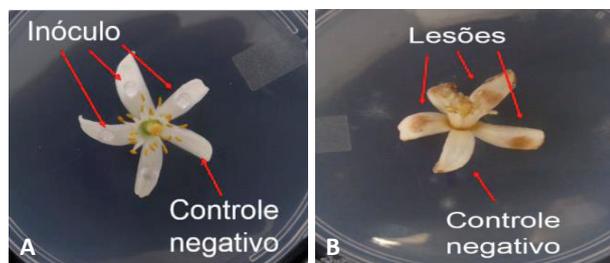
#### Conselho Editorial

José Dagoberto De Negri  
Marcos Antonio Machado  
Vivian Michelle dos Santos

#### Colaboração

Alessandra Alves de Souza  
Diogo Manzano Galdeano  
Eduardo Henrique Goulin  
Mariângela Cristofani-Yaly  
Marines Bastianel  
Raquel Luciana Boscarol-Camargo  
Rodrigo Marcelli Boaretto  
Rodrigo Rocha Latado  
Sérgio Alves de Carvalho  
Valdenice Moreira Novelli  
Rod. Anhanguera, km 158  
Caixa Postal 04, CEP 13490-970,  
Cordeirópolis, SP  
Fone/fax: (19) 3546-1399

[www.centrodecitricultura.br](http://www.centrodecitricultura.br)  
[informativo@centrodecitricultura.br](mailto:informativo@centrodecitricultura.br)



Sistema de inoculação de *Colletotrichum acutatum* em flor destacada. A) Inoculação de solução de esporos e controle negativo. B) Lesões de podridão floral causadas por *Colletotrichum acutatum*, e controle negativo, 3 dias após inoculação. (EH Goulin)

