



Informativo Centro de Citricultura

Cordeirópolis, Janeiro de 2017 • Número 260

INCT Citros: Plataformas de genômica comparativa, funcional e melhoramento assistido de citros

Estima-se que mais de 80% dos custos de produção de citros no Brasil estejam relacionados ao controle fitossanitário de pragas e doenças. Entre estas destacam-se *huanglongbing*, leprose, clorose variegada dos citros, mancha preta dos citros ou pinta preta, mancha marrom de alternária, morte súbita, cancro cítrico, gomose e tristeza. O esgotamento do modelo de convivência ou de controle químico de vetores de doenças com seus altos custos financeiros e ambientais tem destacado a importância dos trabalhos de melhoramento genético, como estratégia abrangente e duradoura de controle de doenças.

O Centro de Citricultura Sylvio Moreira do Instituto Agrônomo de Campinas e a Embrapa atuam há vários anos no melhoramento dos citros, desenvolvendo trabalhos de produção e avaliação de novos materiais genéticos incorporando ferramentas de biotecnologia para acelerar ganhos genéticos. Como sede do INCT Citros, o Centro de Citricultura ampliou o banco de dados de genomas de citros, integrando melhoramento genético, genoma comparativo e funcional de citros e alguns de seus patógenos. Além de gerar o maior banco de dados de genoma de citros no mundo, esse projeto ampliou sobremaneira o número de novos híbridos de copa e porta-enxertos em avaliação de campo, além de marcadores moleculares para mapeamento genético e descobriu novos genes potencialmente associados à resistência a doenças.

A proposta aprovada pela CNPq, Capes e Fapesp (Edital 016/2014 dos INCT) representa a continuidade e expansão do programa do INCT Citros, com os principais grupos de pesquisa que trabalham no Brasil, focalizando os temas relacionados ao melhoramento genético e genoma comparativo e funcional de citros e seus patógenos. Essa proposta do INCT Citros mantém a estrutura de três plataformas, otimizando-as e procurando integrá-las, com foco no desenvolvimento de novos conhecimentos e tecnologia ao setor citrícola.

Plataforma de genômica comparativa: com foco nos estudos de genoma comparativo de mais genótipos de citros, conclusão dos genomas de importantes patógenos, além de ampliar a base de dados sobre miRNA e processos com regulação epigenética. O entendimento das relações citros e seus patógenos, a prospecção de genes e promotores, a diversidade genômica do grupo citros (plataforma de SNPs) e a regulação de processos genéticos são aspectos mais relevantes nessa plataforma.

Plataforma de genômica funcional: reúne projetos específicos em todos os patossistemas com objetivo de ampliar os conhecimentos potencialmente aplicáveis nas fases seguintes do programa. Todas as propostas têm focos específicos derivados dos conhecimentos gerados no INCT anterior.



INCT Citros

Plataforma melhoramento assistido: é a plataforma mais tecnológica do INCT Citros e representa a interface avançada do melhoramento na qual muitas das informações geradas previamente (marcadores, mapas, genes, promotores), assim como material genético (híbridos de cruzamento controlado e eventos de transformação genética já obtidos) estão sendo validados em condições de campo, permitindo uma razoável aproximação da estratégia de melhoramento assistido por marcadores.

O programa conta com a participação das principais equipes de pesquisadores no Brasil que atuam em pesquisa e desenvolvimento em citricultura. Vários colaboradores externos foram convidados por serem líderes em suas áreas e pela disponibilidade de receber alunos e pesquisadores em seus grupos. A sede do INCT será novamente o Centro de Citricultura Sylvio Moreira, do Instituto Agrônomo de Campinas. Participam também do INCT como laboratórios associados, Embrapa (Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA e Clima Temperado, Pelotas, RS), Universidade de São Paulo (Instituto de Química, Esalq e Cena), Universidade Estadual Paulista (Unesp, Rio Claro), Instituto Biológico, Universidade Federal do Paraná, Laboratório Nacional de Biociências (LNBio, Campinas), Universidade Estadual de Santa Cruz (Ilhéus, BA), Universidade Federal de Campina Grande, PB, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (Vitória da Conquista, BA), Universidade Estadual de Maringá, PR e Instituto Agrônomo do Paraná (Iapar, Londrina, PR). Como colaboradores externos incluem-se University of Florida (Citrus Research and Education Center, Lake Alfred), University of Califórnia (Davis e Berkeley), John Innes Centre (Norwich, Inglaterra), Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA, Espanha), Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Halle, Alemanha), US Department of Agriculture (USDA, Fort Pierce e Fort Collins), Instituto per la Protezione Sostenibile delle Piante (Bari, Itália) e Ghent University (Ghent, Bélgica). Participa ainda como colaborador a empresa Citrosuco SA.

Em função de problemas orçamentários a proposta levou mais de dois anos para ser anunciada como aprovada e foi contratada em dezembro de 2016. O orçamento está distribuído entre as agências financiadoras em 50% Fapesp, 45% CNPq e 5% Capes.

Editorial

Renovação e continuidade

O sistema de ciência e tecnologia no Brasil atua essencialmente na avaliação pelos pares de projetos e publicações, de modo a permitir oportunidade a todos os pesquisadores e grupos de pesquisa obterem recursos para suas atividades. O modelo vigente em São Paulo até a década de 1970 com o Estado provendo todos os custos de execução de um projeto de pesquisa não sobrevive às condições atuais. Mesmo a nível federal, tal modelo até recentemente em funcionamento em instituições dos ministérios da Agricultura e da Saúde, encontra-se em cheque. No atual modelo, as agências de fomento, como CNPq e Fapesp, desempenham papel essencial.

O grupo de pesquisadores do Centro de Citricultura, cientes da importância de buscar recursos para conduzir seus projetos de pesquisa, estão em constante participação em vários editais, bem como submetem regularmente suas propostas em sistema de fluxo contínuo, como na Fapesp, de modo que praticamente todos têm condições de melhorar a produtividade e a qualidade de seus resultados. O sistema de certa forma procura estimular o pesquisador a ser produtivo, o que poderá lhe garantir novos recursos. Essa tem sido a sistemática de trabalho do Centro de Citricultura. E sem dúvida alguma é uma sistemática que tem sido bem-sucedida.

Ao longo dos últimos anos o Centro tem sido contemplado com grande e importantes programas nacionais e estaduais. Mais recentemente dois projetos temáticos foram aprovados pela Fapesp, abordando temas como interação nutrição e doenças de citros e interação planta-patógeno visando o controle de CVC e cancro cítrico. Já o INCT de genômica funcional e comparativa para melhoramento assistido de citros foi contratado pelo CNPq e está em processo de contratação pela Fapesp. A aprovação de projetos com tal envergadura e em redes com outras instituições representa um claro reconhecimento por parte das agências de fomento da competência do grupo em assumir tais responsabilidades. O desafio é um fator motivador para todos os pesquisadores do Centro de Citricultura.

Ao serem aprovados, renovados e contratados, os projetos de pesquisa mantêm em funcionamento uma rede de inovação que procura alcançar os usuários do setor citrícola. Evidentemente que a transferência de tecnologia gerada nesses projetos nem sempre é rápida como seria desejável. Isso, no entanto, não impede que a busca de conhecimento e inovação seja a tônica dos trabalhos conduzidos pelo Centro de Citricultura.

Portanto, renovação de projetos e manutenção de sua continuidade é a certeza de produzir inovação para a citricultura brasileira.

Pesquisa Aplicada

Controle Biológico: manejo sustentável para a citricultura

A comunidade de microrganismos tem um papel importante na manutenção do equilíbrio ecológico do solo. As interações entre a comunidade microbiana e as plantas têm grandes influências sobre a sanidade e nutrição das mesmas. Os microrganismos do solo podem ser divididos, em relação ao efeito que causam às plantas, em prejudiciais, benéficos ou neutros. Os prejudiciais são divididos ainda em patógenos menores e maiores, de acordo com os sintomas que causam às plantas. Os microrganismos benéficos, simbiotes e não simbiotes, podem influenciar o crescimento das plantas através do aumento na disponibilidade de nutrientes minerais, da produção de hormônios de crescimento, como giberelinas e auxinas e, da supressão de microrganismos deletérios da rizosfera de plantas. Dentre os microrganismos benéficos, as rizobactérias, assim denominadas por colonizarem o sistema radicular, merecem destaque.

Rizobactérias

Trabalhos realizados no Laboratório de Fitopatologia e Controle Biológico (LFCB) do Centro de Citricultura Sylvio Moreira obtiveram resultados positivos para o controle de *Phytophthora nicotianae* em porta-enxertos de limão Cravo e tangerina

Sunki, após microbiolização de sementes ou, tratamento do substrato com isolados de bactéria láctica. Dentre esses resultados, dois isolados apresentaram potencial de biocontrole, independente do método de aplicação. O estudo compreendeu também a avaliação da aplicação de 16 isolados bacterianos para promoção de crescimento de três porta-enxertos de citros: limão Cravo, tangerina Sunki e citrumelo Swingle. Os resultados mostraram que algumas bactérias foram capazes de promover o crescimento, porém, a resposta dependeu do genótipo da planta e do isolado (Figura 1).

Bacillus

A bactéria antagonista do gênero *Bacillus* está entre os microrganismos mais utilizados no biocontrole de doenças da parte aérea dos citros. Esse microrganismo apresenta grande vantagem face à sua capacidade para formar endósporos, os quais suportam períodos secos, temperaturas extremas, deficiências temporárias de nutrientes, além de apresentarem tolerância a alguns pesticidas e fertilizantes.

Um estudo realizado em laboratório demonstrou o potencial de compostos orgânicos voláteis produzidos por *Bacillus* spp. no controle da mancha preta do citros, sendo assim uma alternativa ao uso de fungicidas sintéticos. A fração volátil produzida pelos isolados bacterianos foi identificada através de cromatografia gasosa e os metabólitos foram classificados como álcool, fenol, cetona, amina, ácido ou hidrocarboneto. Compostos voláteis produzidos por dois



Figura 1: Crescimento de limão Cravo (A) e citrumelo Swingle (B), 150 dias após a semeadura e tratamento com diferentes isolados bacterianos. Mixture: BM24+BL06+ACT5. Fonte: Valdionei Giassi.

isolados de *Bacillus* não permitiram que 86% das manchas sardentas avaliadas evoluíssem para os sintomas de mancha dura em frutos cítricos.

Leveduras

As principais doenças que ocorrem na fase de pós-colheita dos citros são os bolores verde e azul, causados por *Penicillium digitatum* e *P. italicum*, respectivamente, e a podridão azeda, causada pelo fungo leveduriforme *Geotrichum citri-aurantii*. Tais patógenos diminuem a qualidade e a quantidade dos frutos, bem como prejudicam valores nutricionais e de mercado.

Atualmente, o controle do bolor verde em *packinghouse* baseia-se no tratamento dos frutos com fungicidas, como imazalil e tiabendazol. Estes fungicidas são utilizados sozinhos, em misturas ou aplicados separadamente e em sequência. Eles são os mesmos utilizados há mais de 25 anos, o que contribui para a proliferação de linhagens do patógeno resistentes aos princípios ativos utilizados. Com relação à podridão azeda, a doença é relatada em todos os países produtores afetando todas as espécies e cultivares de citros. No Brasil, em particular, o fitopatógeno não é controlado por nenhum dos fungicidas registrados e utilizados no beneficiamento de frutos cítricos.

Espécies de leveduras vêm sendo utilizadas como agentes de biocontrole contra fitopatógenos que ocorrem na fase de pós-colheita, não só em citros, mas em diversas culturas. Esses organismos apresentam algumas características que são importantes, principalmente,

quando se pensa em produtos para consumo *in natura*, pois não deixam resíduos nos frutos. As leveduras são ativas consumidoras de nutrientes e colonizam os fermentos ocasionados em decorrência da colheita, transporte e beneficiamentos dos frutos, competindo dessa maneira com os patógenos, podendo também ser indutoras de resistência. Algumas espécies de leveduras podem, ainda, apresentar a habilidade de produzir compostos antimicrobianos, como a toxina *killer*, que pode causar a morte de fungos filamentosos.

A realização de um projeto de pesquisa financiado pela Fapesp e coordenado pela Pesquisadora Katia Cristina Kupper apresentou resultados sobre os possíveis mecanismos de ação de leveduras com potenciais para controle *in vivo* do bolor verde (*P. digitatum*) e da podridão azeda (*G. citri-aurantii*). Parte dos resultados obtidos mostrou que um isolado de *Saccharomyces cerevisiae* apresentou múltiplos modos de ação e, dentre esses, a produção de toxina *killer* e atividades de β 1-3 glucanase e quitinase, sendo considerado um forte candidato ao biocontrole das doenças. Outros isolados, identificados como *Aureobasidium pullulans* (ACBL-77) e *Sporobolomyces koalae* (ACBL-42), também apresentaram atividade *killer* nos testes de laboratório e foram eficientes no controle *in vivo* da podridão azeda.

O fenômeno *killer* é caracterizado por leveduras que produzem e excretam proteínas ou glicoproteínas que são inibidoras de células microbianas sensíveis. A Figura 2 ilustra a atividade *killer* de *A. pullulans* (ACBL-77) sobre células de uma levedura sensível (*S. cerevisiae* NCYC 1006),

em meio de cultura YEPD + azul de metileno, pH 4,5, contido em placa de Petri. Atualmente, pesquisas estão sendo realizadas e financiadas pela Fapesp com o intuito de se obter informações sobre a natureza dessas toxinas *killer*, produzidas pelos respectivos isolados de leveduras, e suas atividades antagonicas. Acredita-se que essas informações poderão contribuir para a elaboração de uma nova tecnologia a ser empregada no setor citrícola.

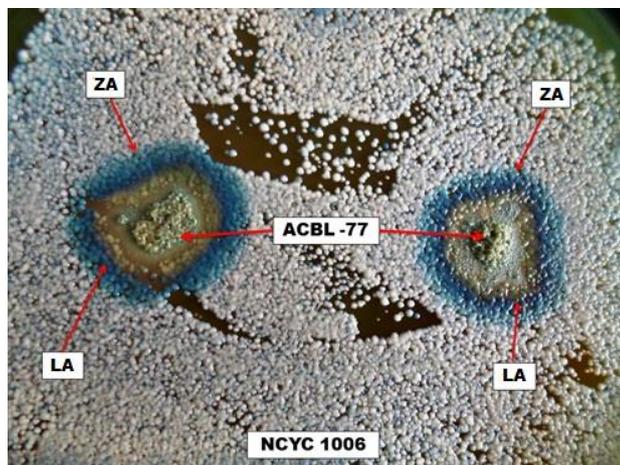


Figura 2. Atividade *killer* de *Aerobasidium pullulans* (ACBL-77) mostrando a zona azul e a linha azul (indicativos de morte celular da levedura sensível (NCYC 1006) ao fator *killer*) em meio de cultura. Fonte: Luriany P. Ferraz.

Pesquisa

Mecanismos moleculares no desenvolvimento da mancha preta dos citros

A mancha preta dos citros (MPC), causada pelo fungo *Phyllosticta citricarpa*, é uma doença responsável por enormes prejuízos à produção brasileira, além de ser considerada quarentenária A1 pelos países da Europa e quarentenária A2 pelo EUA. Apesar de sua importância no cenário citrícola, pouco se sabe sobre as respostas genéticas de plantas suscetíveis e do fungo durante a interação, o que resulta nos sintomas típicos dessa doença.

A necessidade de um maior conhecimento sobre esse patossistema, aliada ao avanço das novas tecnologias de sequenciamento e análise da expressão gênica em grande escala, resultou em um trabalho desenvolvido no Centro de Citricultura, que analisou o transcriptoma de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) e de *P. citricarpa* no momento da interação, o que nos permitiu assim avaliar as modulações transcricionais ao mesmo tempo em que o patógeno ataca e a planta tenta se defender. Esse estudo poderá resultar na identificação de genes do fungo responsáveis por causar a doença, além de conhecer os mecanismos de suscetibilidade da planta hospedeira.

Uma estratégia fundamental dos fungos é a liberação dos chamados efetores ou proteínas eliciadoras, os quais manipulam os mecanismos de defesa das plantas resultando assim na doença. Nesse estudo encontramos quatro genes candidatos super expressos, os quais ainda não possuem função conhecida. Já a planta ativou vários mecanismos de defesa relacionados principalmente ao estresse oxidativo e às vias de morte celular. Além disso, as vias hormonais do ácido salicílico, ácido jasmônico e principalmente etileno, que está diretamente ligada às respostas ao estresse oxidativo, também foram destaques nessas análises. Em geral, os resultados indicam que as respostas da planta induzem a formação das lesões típicas de MPC o que favorece o patógeno, uma vez que o último provavelmente é um organismo que se alimenta e reproduz em material vegetal morto.

Os resultados da pesquisa ampliam as estratégias para o controle e entendimento da mancha preta dos citros.

Carolina Munari Rodrigues,
pós-doutoranda Fapesp
Marcos Antonio Machado

Programa Citricultura Nota 10

O Programa Citricultura Nota 10 foi lançado em 2015, amplamente divulgado junto ao setor citrícola, recebendo inúmeros formulários de interesse por parte de produtores, resultando em diversas parcerias e no planejamento de 25 áreas de validação. Estas áreas estão distribuídas em oito diferentes locais do Estado de São Paulo e Minas Gerais e contemplam diferentes combinações de copa e porta-enxerto, selecionadas pelos pesquisadores do Centro, junto a cada produtor, visando atender aos seus interesses e aptidão agrícola da propriedade. Após o planejamento inicial, as sementes dos porta-enxertos foram colhidas e semeadas, tendo iniciado o processo de formação de mudas pelo Centro de Citricultura. As áreas planejadas nesta primeira fase do programa irão contemplar nove variedades, incluindo os principais porta-enxertos comerciais e quatro novos citrandarins, sendo estes semiananizantes e resistentes à gomose e à seca. As enxertias estão programadas para o primeiro semestre de 2017, e as variedades copa incluem quatro variedades de laranjas comuns, cinco laranjas de baixa acidez, seis laranjas de umbigo, quatro laranjas de polpa vermelha, duas laranjas sanguíneas, três tangerinas, seis tangerinas tipo Ponkan, quatro tangores tipo Murcott e seis mexericas. As primeiras áreas de campo serão estabelecidas no final de 2017.

Laranja Charmute de Brotas IAC 2007

Variedade de origem desconhecida, provavelmente selecionada no município paulista de Engenheiro Coelho e posteriormente introduzida no Centro de Citricultura. Caracteriza-se por apresentar altas produções de frutos de elevada qualidade, com pequeno número de sementes (média de 2,8 sementes por fruto) e longo período de colheita, que se estende de outubro a abril em vista da permanência dos frutos na planta sem a perda de suas qualidades organolépticas. O peso do fruto e o rendimento de suco são semelhantes aos da Valencia e Folha Murcha, mas com maior teor de sólidos solúveis por caixa no período de novembro a janeiro e início de maturação mais precoce que ambas. Apresenta em média, no pico de maturação (janeiro), massa de 228 g/fruto, com 50% em rendimento em suco, 0,57% de acidez, 10,4 °Brix (teor de sólidos solúveis) e *ratio* de 18,1. Em função



destas características, a variedade foi incluída no Programa Citricultura Nota 10 do Centro de Citricultura Sylvio Moreira, e já possui registro no RNC para plantio e comercialização, sob o nome de Charmute de Brotas IAC 2007.

EVENTOS 2017	Data
11º Dia do Porta-Enxerto	16 de março
18º Dia do Limão Tahiti	6 de abril
12º Dia de Campo da Tangerina	26 de maio
39ª Semana da Citricultura, 43ª Expocitros e 48º Dia do Citricultor	5 a 8 de junho
8º Dia dos Citros de Mesa	30 de junho
24º Curso de Citricultura	3 a 7 de julho
9º Encontro de Citricultura na Região Sudoeste do Estado de São Paulo	27 de julho
23º Dia do Viveirista de Citros	10 de agosto
13º Curso de Doenças de Citros e seu Manejo	19 a 21 de setembro

**Expediente**

Informativo Centro de Citricultura

Conselho Editorial

*José Dagoberto De Negri
Marcos Antonio Machado
Vivian Michelle dos Santos*

Colaboração

*Carolina Munari Rodrigues
Katia Cristina Kupper
Marinês Bastianel*

*Rod. Anhanguera, km 158
Caixa Postal 04, CEP 13490-970,
Cordeirópolis, SP
Fone/fax: (19) 3546-1399*

www.centrodecitricultura.br
informativo@centrodecitricultura.br

