



# Informativo Centro de Citricultura

Cordeirópolis, Novembro de 2013 • Número 222

## Mapa Genético de Citros: ferramenta essencial ao melhoramento

A variabilidade genética em citros é crítica para o avanço nos programas de melhoramento e na conservação e caracterização de germoplasma. A variabilidade genética, fonte de características agrônomicas importantes, pode ser estimada através da diversidade do DNA da espécie em comparação com outra. Em citros, essa diversidade genética, medida através de avaliação do polimorfismo de marcadores moleculares, também conhecida como genotipagem, é relativamente baixa. Embora haja um grande número de espécies de citros, suas diferenças ao nível de DNA não são tão expressivas. Ao longo dos

últimos vinte anos o

de sequenciamento de última geração para identificar polimorfismo no DNA dessas espécies. São marcadores altamente polimórficos e reprodutíveis. Com os avanços de novas tecnologias de sequenciamento, o Programa de Biotecnologia do Centro de Citricultura passou a utilizar marcadores DArT-GBS nos trabalhos de mapeamento genético. Tão importante quanto o número de marcadores disponíveis com a nova tecnologia é o fato desses marcadores serem ancorados no genoma, sendo que a identificação dessas regiões passa a ser possível. Desse modo, possibilitam

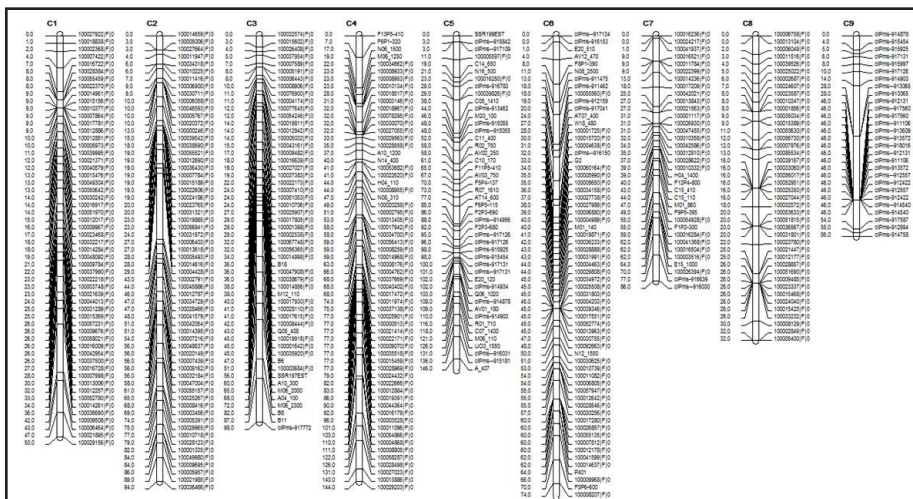
verdadeiro para o limão Cravo. Em conclusão, os marcadores DArT-GBS permitem acessar grande variabilidade genética entre as espécies de citros e são bastante apropriados para os estudos genéticos do grupo.

Os mapas genéticos de citros puderam também ser significativamente melhorados com essa nova classe de marcadores. Os mapas genéticos ou mapas de cromossomos de uma espécie são representações das posições e das distâncias relativas dos genes ou marcadores genéticos. Ou seja, a região ocupada por um gene ao longo da molécula do DNA, transmissora das características

hereditárias, é de extrema importância para compreensão do genoma de uma espécie, possibilitando a utilização das informações obtidas no seu melhoramento. Os mapas devem apresentar alta densidade de marcadores para melhor resolverem a distribuição dos genes no genoma. O uso de marcadores DArT-GBS possibilitou a saturação de diversos mapas genéticos, bases do Programa de Melhoramento de Citros do Centro. Entre esses mapas estão os de tangerina Murcott x laranja Pera, tangerina Sunki x *Poncirus trifoliata* cv Rubidoux, limão Cravo x citrumelo Swingle e tangerina 163 x laranja doce, todos com milhares de marcadores. Tais mapas de ligação gênica possibilitaram o mapeamento de regiões associadas à características de importância agrônoma, como por exemplo, resistência à HLB, CVC, CTV, leprose e seca, época de colheita, altura da variedade copa, produção e qualidade da fruta.

Diversos marcadores de DNA foram desenvolvidos ao longo dos anos, como por exemplo, RAPD, AFLP, SSR e, mais recentemente, os marcadores baseados em sequenciamento. Nesta categoria incluem-se os marcadores DArT-GBS (*Diversity Arrays Technology – Genotyping by sequencing*), os quais representam uma abordagem que consiste na redução da complexidade do genoma usando enzimas de restrição combinada à tecnologia

de sequenciamento de última geração para identificar polimorfismo no DNA dessas espécies. São marcadores altamente polimórficos e reprodutíveis. Com os avanços de novas tecnologias de sequenciamento, o Programa de Biotecnologia do Centro de Citricultura passou a utilizar marcadores DArT-GBS nos trabalhos de mapeamento genético. Tão importante quanto o número de marcadores disponíveis com a nova tecnologia é o fato desses marcadores serem ancorados no genoma, sendo que a identificação dessas regiões passa a ser possível. Desse modo, possibilitam



Mapa de ligação gênica de *Poncirus trifoliata* cv Rubidoux construído com 470 marcadores moleculares: 53 DArT, 351 DArT-NGS, 5 SSR, 48 RAPD e 13 TRAP.

melhor avaliação da diversidade genética do grupo citros. Um exemplo interessante é comparação de espécies tidas como espécies puras de citros, como as toranjas e tangerinas, prováveis progenitores da laranja doce. Ao agrupar essas espécies com marcadores GBS ambas ficam no mesmo grupo genético, associado com os grupos de tangerinas. Esses dados estão de acordo com a hipótese de que as laranjas doces se originaram a partir de uma hibridação entre (toranja x tangerinas) x tangerinas. Do mesmo modo, os marcadores apontam a origem híbrida entre tangerinas e limão

a saturação de diversos mapas genéticos, bases do Programa de Melhoramento de Citros do Centro. Entre esses mapas estão os de tangerina Murcott x laranja Pera, tangerina Sunki x *Poncirus trifoliata* cv Rubidoux, limão Cravo x citrumelo Swingle e tangerina 163 x laranja doce, todos com milhares de marcadores. Tais mapas de ligação gênica possibilitaram o mapeamento de regiões associadas à características de importância agrônoma, como por exemplo, resistência à HLB, CVC, CTV, leprose e seca, época de colheita, altura da variedade copa, produção e qualidade da fruta.

## Editorial

### Lei é lei

Como principal fornecedor de material de propagação de citros com qualidade fitossanitária e genética para o Estado de São Paulo, o Centro de Citricultura está suspendendo essa atividade por tempo indeterminado. Há vinte anos o Centro foi pioneiro na manutenção de material de propagação em ambiente protegido, e ao longo desse período tem sido incentivador dessa inovação tecnológica, a qual há dez anos foi adotada na legislação do Estado face ao inequívoco reconhecimento desse sistema de produção para a qualidade da muda. Não é exagero afirmar que a citricultura paulista passou pelo Centro, pois aqui sempre encontrou segurança na qualidade do material genético melhorado, desenvolvido e fornecido pela Instituição.

Em acordo com a Legislação Estadual o Centro sempre primou pela qualidade do material produzido, tanto que segundo essa Legislação o Centro é o principal, se não o único, habilitado a fornecer material para a renovação de todas as borbulheiras do Estado. No entanto, recentemente uma nova Legislação Federal atualizou a normatização dos sistemas de produção de mudas e sementes, de qualquer natureza. A adequação à Legislação maior, tanto à atual bem como à anterior, implica num volume considerável de documentos e em muita burocracia, cujas exigências nem sempre são absolutamente claras e, quando aparentemente se tornam claras, demandam longo tempo para avaliação e finalização. Há alguns anos o Centro encontra-se num processo de enquadramento e registro, baseado inclusive em um Termo de Ajustamento de Conduta firmado entre o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e o Instituto Agrônomo.

Por deter a maior parte dos cultivares de citros registrados no Registro Nacional de Cultivares (RNC), o Centro procura credenciar junto ao Registro Nacional de Sementes e Mudas (RenaseM) todos os cultivares potenciais da citricultura, baseando-se na demanda atual e histórica do setor citrícola por novas cultivares. Mais de 300 materiais estão há alguns anos em processo de registro, nas formas de plantas básicas, plantas matrizes, borbulheiras e jardim clonal. O processo de fiscalização do Ministério, muito mais que um processo de auditoria, visa encontrar não conformidades que, de acordo com a Legislação Federal, inviabilizam todos os requerimentos, mesmo que essas não conformidades sejam pontuais e facilmente sanáveis. Nesse quadro, recente fiscalização concluiu que o andamento e requerimento dos processos de registros estão inadequados, embora o Centro esteja continuando os trabalhos visando sanar as supostas irregularidades encontradas. No entanto, o argumento que lei é lei é irrefutável.

Assim para não colocar em risco o trabalho de décadas, o que pode ocorrer através de interdições legais para o funcionamento, o Centro acata a determinação do Ministério e suspende por tempo indeterminado suas atividades de fornecimento de material de propagação de citros à citricultura brasileira.

## Notas

### Biossegurança no IAC

Diversos pesquisadores do IAC que trabalham com organismos geneticamente modificados (OGMs) participaram no dia 11 de novembro de treinamento em Biossegurança, promovido pela Diretoria Geral da Instituição. No evento, a palestrante Andréia Nakatani (BASF) abordou os principais aspectos que envolvem biossegurança de organismos geneticamente modificados, como as resoluções normativas, a CTNBio e importância e papel da Comissão Interna de Biossegurança (CIBio). Os Pesquisadores Raquel Luciana Boscariol Camargo, Juliana Freitas Astúa, Alessandra Alves de Souza, Marco Aurélio Takita e Marcos Antonio Machado estiveram presentes, assim como todos os membros da CIBio do IAC.

### Workshop Fisiologia da Produção

O Centro de Citricultura conta com quatro programas de Pesquisa e Desenvolvimento (P&D): Biotecnologia, Fisiologia da Produção, Fitossanidade e Melhoramento, onde estão inseridos seus pesquisadores e todos os projetos de pesquisa. Em 06 de novembro, o Programa de Fisiologia da Produção realizou seu 3º Workshop. Duas palestras foram proferidas, e na primeira Marcos Siqueira Neto, pós doutorando do Cena/USP, apresentou de forma completa toda a dinâmica de carbono (C) no sistema solo, planta e atmosfera. Abordou matéria orgânica do solo, cálculo e correção de estoques de C no solo, emissão de gases de efeito estufa e sequestro de C em sistemas agrícolas. A segunda apresentação foi proferida por Simone Raposo Cotta, pós doutoranda da Esalq/USP, sobre indicativos da qualidade do solo via análises microbiológicas. Diversas técnicas foram apresentadas, desde as dependentes de cultivo dos microrganismos como as independentes, a exemplo da metagenômica, que é baseada na análise genômica de DNA microbiano extraído diretamente de amostras ambientais. Com essa técnica os pesquisadores passaram a ter acesso ao genoma de uma maior variedade de microrganismos que não haviam sido isolados em meio de cultura em laboratório. Após as apresentações houve um produtivo debate sobre os temas.

### Curso Prático em Biossegurança

Nos dias 27 e 28 de novembro, a Pesquisadora Raquel Luciana Boscariol Camargo participou do Curso Prático em Biossegurança para Atividades com OGM em contenção. Este curso foi promovido pelo CIB (Conselho de Informações sobre Biotecnologia) e pela faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP e foi direcionado aos membros das CIBios de diversas instituições de pesquisa. A extensa programação nos dois dias de curso abordou a legislação vigente para OGMs, a importância da atuação das CIBios e os órgãos e entidades de registro e fiscalização, como ANVISA e MAPA, além da realização de visitas a laboratórios e exercícios práticos. A participação da pesquisadora, atual presidente da CIBio do IAC, foi essencial para atualização na área de Biossegurança.

### Planejamento Estratégico no IAC

Nos dias 12 e 13 de novembro o Conselho do Instituto Agrônomo, sob liderança do Diretor Geral, Sérgio Augusto Carbonell, se reuniu no Centro de Cana em Ribeirão Preto, SP, para discussão das ações e documentos sobre planejamento estratégico dos últimos vinte anos na Instituição. Foi oportunidade para análise de problemas recorrentes que afetam a missão institucional, muitos deles já identificados há vários anos. Pelo Centro de Citricultura participaram os Pesquisadores Marcos Antonio Machado e Marco Aurélio Takita.

### Participação em evento internacional

A Pesquisadora Juliana Freitas-Astúa participou do "Workshop Internacional em Tolerância a Estresses Bióticos e Abióticos em Plantas: o Desafio do Século 21". O evento foi organizado por instituições brasileiras e francesas e ocorreu entre os dias 6 e 8 de novembro em Ilhéus (BA). Com mais de 110 participantes, sendo cerca de 40% estrangeiros, o workshop abordou as principais técnicas de biologia avançada utilizadas para entender e mitigar os principais estresses bióticos e abióticos de 16 culturas agrícolas. A pesquisadora apresentou a palestra "Interação entre citros e *Candidatus Liberibacter spp.*: o que aprendemos sobre esse complexo patossistema?"

### Curso de Microscopia

Nos dias 12 a 14 de novembro ocorreu o Curso de Microscopia Aplicada à Citricultura, ministrado pelo Dr. João Paulo Rodrigues Marques, Pós doutorando da Fapesp na Esalq/USP. Foram apresentados aspectos fundamentais da histologia de citros, com foco nas alterações que ocorrem nas principais doenças de citros. Com aulas teóricas e aulas práticas, o curso foi oferecido a pesquisadores e estudantes do Centro de Citricultura.

### Visitas no Centro

Atendendo solicitação da Coordenadoria de Defesa Agropecuária, no dia 05 de novembro o Centro de Citricultura recebeu um grupo de fiscais do serviço de Defesa Agropecuária do Estado de Alagoas. O grupo, com interesse em doenças de citros, especialmente huanglongbing e cancro cítrico, foi recebido pelos Pesquisadores Marcos Antonio Machado e Helvécio Della Coletta Filho, que fizeram apresentação sobre o Centro e sobre essas duas doenças, respectivamente.

Produtores de limão Tahiti da Empresa Limones Piruanos do Peru, em missão técnica no Brasil com a empresa PKelco de Limeira (SP), efetuaram visita ao Centro de Citricultura no dia 6 de novembro. Estiveram acompanhados por técnicos da PKelco e foram recebidos pelo Pesquisador Marcos Antonio Machado, que apresentou o Centro e discutiu possibilidades de colaborações.

O Diretor do Escritório do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), Michael J. Fay, acompanhado de Sérgio Barros, funcionário do Consulado americano em São Paulo, visitou o Centro no dia 18 de novembro. Foram recebidos pelo Diretor do Centro, que fez uma apresentação da estrutura de funcionamento e programação de pesquisa. O Sr. Fay assumiu recentemente a posição no Brasil e é responsável pelos assuntos do setor agrícola entre o Brasil e os Estados Unidos.

Estudantes do Curso de Agronomia do Instituto Federal do Triângulo Mineiro visitaram o Centro no dia 22 de novembro. O objetivo principal foi conhecer o programa de produção de mudas de citros desenvolvido para o Estado de São Paulo. Os Pesquisadores Sérgio Alves de Carvalho e Marines Bastianel apresentaram palestras que abordaram temas relacionados à

produção de mudas de citros sob o ponto de vista tecnológico e da legislação vigente e ao Banco Ativo de Germoplasma de Citros (BAG Citros-IAC). Sob orientação do Engº Agrº José Dagoberto De Negri os alunos conheceram o BAG Citros-IAC e a produção de material de propagação feita nas Plantas Matrizes e Borbulheiras da Instituição.

### Bancas, Palestras e Aulas

No dia 8 de novembro o Pesquisador Rodrigo Marcelli Boaretto participou como membro titular da banca de defesa de Tese de Doutorado de Ana Carolina Ribeiro Granja, intitulada “Separação dos isótopos estáveis de boro, por troca iônica em sistema cascata, e obtenção de  $H_3^{10}BO_3$  enriquecido em  $^{10}B$ ”, junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências, na área de concentração Química na Agricultura e Ambiente do CENA/USP.

Também em novembro, o Curso de Mestrado Profissionalizante em Controle de Doenças e Pragas dos Citros do Fundecitrus contou mais uma vez com a colaboração de pesquisadores do Centro de Citricultura, que ministraram aulas na disciplina Manejo de Doenças dos Citros Causadas por Virus, coordenada pelo Pesquisador Nelson Arno Wulff. No dia 01 Sérgio Alves de Carvalho abordou o tema “Plantas livres de patógenos: matrizes e borbulheiras”, e no dia 08 Maria Andréia Nunes ministrou aula sobre “Leprose: histórico, distribuição no mundo e Brasil, sintomatologia, características do vírus, relação vírus-vetor, plantas hospedeiras e resistência em citros”.

No dia 21 de novembro, a convite da CATI o Pesquisador Fernando Alves de Azevedo proferiu palestra para produtores de Leme, SP, sobre técnicas de manejo para a citricultura de mesa, abordando temas relacionados ao manejo do solo, desde o plantio ao manejo de plantas daninhas, passando por adubação e poda. O evento foi realizado no Bairro Taquari e contou com a participação, principalmente, de pequenos produtores.

No dia 26 de novembro o Pesquisador Marco Aurélio Takita ministrou palestra intitulada “A Pesquisa nas Diferentes Áreas da Genética: Um outro Olhar sobre Biofilme de *Xylella fastidiosa*”, com foco em bioinformática, no IV Workshop do Programa de Pós-Graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, realizado no período de 25 a 28 de novembro de 2013.

## Pesquisa

### Bioinformática no Centro de Citricultura

O termo bioinformática nasceu em 1970, sendo uma área interdisciplinar que envolve ciências da computação, matemática e engenharia, voltada ao processamento de dados biológicos. A “revolução genômica” dos anos 90 fez a bioinformática renascer com o estabelecimento de bancos de dados de DNA e proteínas. Seguindo este padrão mundial, também no Centro de Citricultura o mesmo pode ser observado, com a necessidade crescente de bioinformática para processar, analisar e armazenar os dados gerados tanto no sequenciamento de ESTs, no Instituto do Milênio quanto no de próxima geração, como feito no INCT-Citros. Hoje já temos os genomas completos de clementina e laranja doce, além de inúmeras sequências de limão cravo, pomelo, cidra, ponkan e poncirus. A bioinformática está nos ajudando a montar o genoma de limão cravo e possibilitando um entendimento maior sobre as características desta espécie, como o grande vigor e a alta resistência à estresse hídrico.

Em relação a patógenos de citros, para *Xylella fastidiosa* a bioinformática tem identificado genes diferencialmente expressos durante o desenvolvimento de seu biofilme, com uma profunda reprogramação na expressão gênica, atingindo seu ponto máximo entre o quinto e décimo dias. Estas alterações levam ao amadurecimento do biofilme e, no final, ao desprendimento de células desta estrutura. Para *Phyllosticta citricarpa* e *Phyllosticta capitalensis*, fungos patogênicos (causador da mancha preta dos citros) e endofítico, respectivamente, temos os genomas sequenciados e uma análise de expressão gênica comparando as duas, verificando-se que enzimas de degradação de parede celular, transportadores e sinalizadores são possíveis elementos do processo de infecção do fungo patogênico. Por fim, análises de bioinformática estão sendo realizadas com *Phytophthora parasitica*, causadora da gomose, com plantas com morte súbita dos citros, avaliando-se a população viral e com identificação de respostas de diferentes cultivares de laranja doce à infecção de *Ca. Liberibacter spp.*

Deste modo, a bioinformática contribui com o desenvolvimento de novas tecnologias e variedades para a citricultura.

Marco Aurélio Takita

## Ary Aparecido Salibe: uma vida à citricultura

No último dia 19, a citricultura brasileira perdeu uma grande liderança com o falecimento do Prof. Dr. Ary Aparecido Salibe. Um dos mais importantes pesquisadores de citros no Brasil, o Prof. Salibe foi de uma geração de desbravadores da ciência e tecnologia na citricultura. Com forte vínculo com o Centro de Citricultura, onde trabalhou como Pesquisador sob a liderança de Sylvio Moreira e depois como colaborador após sua aposentadoria da Unesp de Botucatu, ele foi decisivo no conhecimento sobre vírus e viróides de citros e pelo programa de clones nucleares, trabalhos aqui desenvolvidos e bases da atual citricultura brasileira.

Engenheiro Agrônomo pela Esalq/USP (1956), com especialização em Virologia em Citricultura pelo USDA e Universidade da Flórida (1959), o Prof. Salibe doutorou-se pela Esalq/USP e pós doutorado pelo Centro Nationale de Recherche Agronomique. Foi Pesquisador Científico do Instituto Agrônomo, transferiu-se para a Unesp de Botucatu e orientou inúmeros alunos de graduação e pós graduação, constituindo uma referência em citricultura, consultado por todo o setor. Junto com o Prof. Otto Crócomo, da Esalq/USP, desenvolveu uma nova plataforma de cultivares micro-enxertados e pré imunizados, atendendo projeto da Citrovida Agrícola.

Após sua aposentadoria da Unesp o Prof. Salibe voltou a colaborar com o Centro de Citricultura, orientando novas gerações e auxiliando na edição do Informativo Centro de Citricultura. Também escrevia regularmente para a Gazeta de Limeira, relatando sua vasta experiência internacional na citricultura, principalmente quando foi consultor da FAO na área de sanidade e melhoramento de citros. Assim como a Pesquisadora Victória Rossetti, o Prof. Salibe sempre mostrou forte preocupação com as perspectivas de introdução do huanglongbing no Brasil.

Além de divulgador de ciência e tecnologia, o Prof. Salibe teve importante participação na estruturação do Banco Ativo de Germoplasma de Citros do Centro de Citricultura, um dos mais importantes do Brasil. Juntamente com Dr. Dalmo Giacometti, diretor da FAO, introduziu o clone peruano da lima ácida Tahiti. Introduziu também vários acessos de limão Cravo e Poncirus trifoliata, que posteriormente passaram a ser utilizados na citricultura brasileira. Com os Pesquisadores Jorgino Pompeu Jr, do Centro de Citricultura, e Orlando Passos, da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, foi o idealizador da Sociedade Brasileira de Fruticultura. Foi também presidente e membro ativo da Organização Internacional de Virologistas de Citros (IOCV), tendo sido homenageado na última conferência da IOCV no Brasil, em 2010.



### Expediente

*Informativo Centro de Citricultura*

### Conselho Editorial

Arthur A. Ghilardi  
José Dagoberto De Negri  
Marcos Antonio Machado  
Vivian Michelle dos Santos

### Colaboração

Fernando Alves de Azevedo  
Jorgino Pompeu Jr  
Juliana Freitas-Astúa  
Marco Aurélio Takita  
Mariângela Cristofani-Yaly  
Raquel L. Boscarol-Camargo  
Rodrigo M. Boaretto  
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)

Para atender as Normas de Produção e Comercialização de Material de Propagação de Citros exigidas pela Instrução Normativa nº 48, de 24/09/2013, e a Legislação Brasileira sobre Sementes e Mudanças (Lei 10711, de 05/08/2003), o Centro de Citricultura suspendeu o fornecimento de materiais de propagação de citros. Não existe previsão de quando esse processo será retomado. Tudo dependerá da adequação de documentação e de auditorias do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento no Centro de Citricultura.

Todo o material continua sendo mantido nas mesmas condições de proteção e qualidades fitossanitária e genética exigida pela legislação.

Assim, aqueles que contavam com esse material para eventual renovação de borbulheiras devem se dirigir à Coordenadoria de Defesa Agropecuária (CDA), responsável estadual por esses procedimentos.

