



Informativo Centro de Citricultura

Cordeirópolis, Novembro de 2014 • Número 234

Origem Genética da Laranja Doce

Considerada a principal espécie de citros no mundo em função de sua importância comercial e industrial, a laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osb) é definitivamente uma espécie não pura! Seus progenitores são preponderantemente toranja (*C. maxima*) e tangerina Ponkan (*C. reticulata*), além de uma outra espécie desconhecida de citros. Essa foi uma das conclusões da pesquisa do sequenciamento do genoma de nove espécies de citros no Consórcio Internacional do Genoma Citros, recentemente publicada na prestigiada revista científica Nature Biotechnology. Este Informativo conta um pouco dessa história.

Sempre se suspeitou que a laranja fosse de fato um híbrido natural, não podendo ser caracterizada como uma espécie botânica pura. Informações de ordem botânica, bioquímica e molecular evidenciavam essa característica híbrida. No entanto, sem conhecimento de maiores detalhes, que poderiam ser obtidos do genoma de laranja, essa hipótese ficaria de difícil comprovação. Embora essa pergunta não tenha sido a razão principal para sequenciar o genoma dessa espécie, essa seria uma boa história a ser contada e confirmada.

A partir de 2006, o Consórcio Internacional do Genoma Citros, reunindo grupos do Brasil, Estados Unidos, França, Itália, Espanha e China, decidiu que o sequenciamento do genoma de laranja doce seria extremamente custoso e demorado, em função de sua complexidade híbrida. A tecnologia até então usada para sequenciamento era cara e de rendimento relativamente baixo. Assim, ficou decidido que o melhor seria escolher um genoma com menor complexidade e que pudesse ser utilizado como genoma de referência, isto é, aquele que passaria a ser utilizado para alinhar todos os genomas de citros. Assim, selecionou-se o genoma da tangerina Clementina, espécie de tangerina base da citricultura espanhola. A existência de uma

Clementina haplóide, isto é, com metade da carga genética original, foi importante para essa escolha.

Com recursos do INCT Citros (Fapesp e CNPq), MP2 da Embrapa, Citrus Research and Development Foundation (CRDF) da Flórida e Instituto di Genomica Aplicada (Udine, Itália), o sequenciamento foi iniciado nos laboratórios da HudsonAlpha Institute (Alabama), Joint Genome Institute (Califórnia) e Genoscope (França). Paralelamente, iniciou-se o

Inicialmente, os chineses participavam do Consórcio Internacional, entretanto, se afastaram e conduziram trabalho paralelo, sequenciando um clone de laranja Valência di-haplóide e uma Clementina diplóide, ou seja, praticamente o mesmo projeto do Consórcio. O trabalho do grupo chinês teve avanço mais rápido, e foi publicado em dezembro de 2012 na revista Nature Genetics. Assim, para dar continuidade aos trabalhos e visando aumentar conhecimentos, no projeto do Consórcio foram incluídos outros genótipos de citros, para ampliar a base de comparação dentro do grupo. Desse modo, além de Clementina haplóide e laranja doce (Pineapple), foram incluídos Clementina diplóide, tangerina Ponkan, mexerica do Rio, tangor W. Murcott, laranja azeda Seville, laranja doce Washington Navel, toranja Chandler e toranja Siamesa de baixa acidez. Assim, todas as espécies candidatas a parentais de laranja doce foram incluídas no novo projeto.

Os resultados obtidos com esse conjunto de informações foram muito interessantes. Concluiu-se que Clementina é um híbrido de laranja doce com mexerica, mas com partes do genoma de outro ancestral desconhecido. Contrariamente aos resultados do trabalho dos chineses, nos genomas estudados pelo Consórcio observou-se que cerca da metade é composto de sequências repetitivas transposons e retro transposons, responsáveis pela alta taxa de mutação somática no grupo citros. Confirmou-se que o genoma de laranja doce é altamente polimórfico, como havia sido previamente avaliado, confirmando-lhe o caráter híbrido entre tangerina Ponkan e toranja. No entanto, contrariamente à hipótese do trabalho chinês, que propõe a laranja como um híbrido F1 de toranja com tangerina



sequenciamento de laranja doce com uma nova tecnologia de sequenciamento, em uma parceria da Universidade da Flórida e a Roche. A expectativa seria ter dois genomas finalizados e que pudessem dar suficiente informação da filogenia do citros, além de explicar o caráter específico de grupo de citros. Observe-se que a mudança na tecnologia de sequenciamento ampliou as possibilidades de conhecer outros genomas.

Editorial

Urge compatibilizar

Uma das grandes conquistas tecnológicas da citricultura paulista é o sistema de produção de mudas em ambiente protegido. Imposto pela necessidade de estabelecer uma barreira entre as plantas e alguns de seus patógenos sistêmicos, principalmente bactérias, a tecnologia de produção de mudas em ambiente protegido contribuiu para a redução da clorose variegada dos citros e é fator preponderante para produção nos tempos atuais, devido à existência do Huanglongbing (HLB).

Ao ser inserida na legislação federal de sementes e mudas (Lei nº 10711, de 05/08/2003 e o Decreto 5153, de 23/07/2004), principalmente através da Instrução Normativa nº 48 de 28/09/2013, o sistema de produção de mudas de citros encontra-se em franca incompatibilidade com a legislação estadual. A legislação federal impõe várias etapas regulatórias, estabelecendo o conceito de muda certificada, registro de plantas básicas, matrizes, borbulheiras e jardins clonais, com claro objetivo de manter rastreabilidade de origem, produção e responsabilidade técnica. A legislação estadual, por sua vez, regulamenta apenas borbulheiras e áreas de produção de sementes, com cadastro de instalações e produção. A legislação federal também impõe limites de utilização de borbulhas de borbulheiras para formação de novas borbulheiras, assim como permite, mediante credenciamento no Registro Nacional de Cultivares (RNC) e no Registro Nacional de Sementes e Mudanças (RenaseM), que o produtor tenha posse de suas próprias plantas básicas ou plantas matrizes. No entanto, a utilização de plantas matrizes e borbulhas delas derivadas somente poderá ser feita se o detentor do material estiver credenciado para certificação própria.

A ambiguidade da legislação aumenta não só a burocratização do processo de regulamentação, como expõe e onera desnecessariamente o produtor. Ou se compatibilizam as duas legislações ou se mantém somente uma norma em ambas.

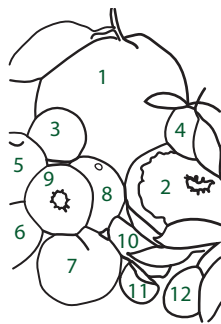
Como centro difusor de material genético de qualidade, o Centro de Citricultura tem empenhado esforços para regulamentação, de modo a garantir o fluxo de fornecimento de material para o setor. A interrupção temporária desse trabalho, a que foi obrigado recentemente, foi resultado do próprio processo de regulamentação junto ao MAPA. Pela legislação do MAPA, o Centro não pode fornecer borbulhas para formação de outras borbulheiras sem que seja credenciado como certificador próprio. Por outro lado, a legislação estadual determina que formação e/ou renovação de borbulheiras devem ser feitos com borbulhas do Centro de Citricultura.

É opinião desse Centro que a compatibilização das legislações é essencial para o bom andamento do sistema de produção de mudas.

Matéria de Capa

Ponkan retrocruzado com tangerina, a laranja é híbrido entre essas duas espécies, mas também com outro ancestral desconhecido. A linhagem materna de laranja é a toranja, mas o híbrido original com tangerina deve ter retrocruzado com toranja, não com tangerina, como proposto no modelo chinês. Destaque-se que o volume e a qualidade dos dados dos genomas do Consórcio suportam seus resultados.

A origem da laranja doce e de outras espécies de citros foi somente um dos resultados entre inúmeros aspectos estudados no projeto genoma do Consórcio. A partir do conjunto dessas informações é que realmente a ciência poderá desvendar vários aspectos que caracterizam essas espécies, inclusive tolerância ou resistência a pragas e doenças. Com essas informações é possível pensar na possibilidade de reconstituir o genoma da laranja melhorando-a em relação a cultivar estabelecida.



Genótipos de citros sequenciados pelo Consórcio Internacional do Genoma de Citros: Toranjas (1 e 2); tangerinas (3 a 7, 9 e 11); laranjas doce (8 e 10) e laranja azeda (12).

Notas

Congresso de Pós Colheita

Entre os dias 09 a 18 de novembro, a Pesquisadora Lenice Magali do Nascimento Abramo participou, em Quito, Equador, do “VIII Congresso Iberoamericano de Tecnologia Póscolheita y Agroexportaciones – AITEP 2014”, ocorrido na Universidad Tecnológica Equinoccial, onde apresentou palestra como conferencista convidada sobre “Tecnologias de Pós-colheita de Citros no Brasil”. No decorrer da sua participação destacaram-se também os contatos realizados com diferentes pesquisadores que trabalham com pós-colheita de frutas dos diversos países envolvidos com a Associação Iberoamericana de Tecnologia Pós-colheita. Na ocasião também foram realizadas visitas técnicas em laboratórios de tecnologias de alimentos da Universidade, onde a pesquisadora tomou conhecimento dos trabalhos de pesquisas da instituição.

Visitas ao Centro

Cumprindo a missão de capacitar recursos humanos, o Centro de Citricultura recebeu no dia 7 de novembro a visita de 27 alunos de agronomia do Instituto Federal do Triângulo Mineiro - IFTM Campus Uberlândia, acompanhados pelo Prof. Ernesto José Resende Rodrigues, para conhecer a produção de material de propagação de citros desenvolvida pela unidade. Foram recepcionados pelo Eng. Agr. José Dagoberto De Negri, que apresentou as atividades do Centro de Citricultura, proferiu palestra sobre propagação de citros e acompanhou os visitantes nas estufas de plantas matrizes e borbulheiras, mostrando todo o sistema sobre o qual se baseia a produção de mudas de citros executada pelos viveiristas do estado de São Paulo e de alguns estados vizinhos. O assunto despertou grande interesse entre os participantes, demonstrado pelo grande número de questionamentos e discussões.

Workshop Fisiologia e Melhoramento

No Centro de Citricultura foi realizado no dia 5 de novembro o *Workshop* anual dos programas de pesquisa “Melhoramento Genético” e “Fisiologia da Produção”, com participação de mais de 40 pessoas. A programação contou com dois painéis de discussão, e no primeiro, denominado “Experimentação em tempos de HLB”, Renato B. Bassanezi (Fundecitrus) abordou “Como o HLB pode interferir na experimentação de citros no campo”, seguindo-se Cristiano A. Andrade (Embrapa Meio Ambiente), que apresentou “Experimentos no campo: delineamentos e análises estatísticas”. O segundo painel, com o tema “Uso eficientes de nutrientes: perspectivas para caracterização genética”, contou com as palestras “Componentes da eficiência de uso do nitrogênio: bases fisiológicas em citros”, ministrada por Veronica Lorena Dóvis (Pós Doutaranda) e “Abordagens de genômica funcional para nutrição mineral: ionoma e transcriptoma”, apresentada por Douglas da Silva Domingues (Iapar). O evento trouxe temas e discussões interessantes, atuais e complementares, que sem dúvida servirão para fomentar trabalhos e novas abordagens nos programas de pesquisa da instituição.

Projetos Universal CNPq

Mais uma vez a equipe do Centro de Citricultura demonstrou competitividade e competência na aprovação de projetos no edital Universal 2014 do CNPq. A equipe submeteu onze propostas distintas, tendo sete aprovadas, nas diferentes faixas do edital. Foram aprovados os projetos:

- Avaliação de efetores na interação de *Phyllosticta citricarpa* e laranja doce (*Citrus sinensis* (L.) Osb.). Coordenação: Carolina Munari Rodrigues, Pós Doutaranda CNPq;

- Estudo da transmissão do *Citrus leprosis virus C* por diferentes populações de *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae). Coordenação: Maria Andréia Nunes, Pós Doutaranda Fapesp;

- Estudo da imunidade basal em citros: respostas de defesa desencadeadas por padrões moleculares associados aos patógenos (PTI). Coordenação: Ronaldo José Durigan Dalio, Pós Doutorando CsF/ CNPq;

- Porta-enxertos para citros: ensaios com novas variedades e diferentes espaçamentos no plantio. Coordenação: Mariângela Cristofani-Yaly;

- Criopreservação de citros visando a conservação de germoplasma. Coordenação: Rodrigo Rocha Latado;

- Moléculas antioxidante e bactericida em plantas cítricas infectadas por *Xylella fastidiosa* e *Ca. Liberibacter asiaticus*: efeito

no patógeno, hospedeiro e na aquisição. Coordenação: Helvécio Della Coletta Filho;

- Análise funcional de potenciais efetores de *Ca. Liberibacter asiaticus*, agente do huanglongbing dos citros. Coordenação: Marcos Antônio Machado.

Workshop de Estatística em Biologia

No dia 13 de novembro foi realizado no Centro de Citricultura um *Workshop* em Estatística, organizado pelo Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento. O evento teve como palestrantes Marcelo Ribeiro Alves (Instituto Nacional de Infectologia), Evandro Chagas (INI/FIOCRUZ), Benilton de Sá Carvalho (Departamento de Genética Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp) e Rodrigo Gazaffi (Centro de Ciências Agrárias da UFSCar). O *Workshop* contou com aproximadamente 40 participantes, do Centro de Citricultura, UFSCar e Esalq/USP. O foco foi estatística em Ômicas e Melhoramento, e suscitou importantes discussões.

Citricultura na Selva Central Peruana

Entre os dias 17 e 21 de novembro, o Pesquisador Helvécio Della Coletta Filho esteve em visita técnica à citricultura da Selva Central Peruana, a convite do SENASA (Serviço Nacional de Sanidad Agraria – Perú) e da ProCitrus (Asociación de Productores de Cítricos del Perú). Localizada numa altitude próxima a 600 m, com chuvas bem distribuídas, temperaturas entre 24°C e 30°C e com relevo bastante acidentado, a citricultura da Selva Peruana é composta basicamente por laranja Valência enxertada sobre tangerina Cleópatra ou limão Rugoso. Alguns poucos pomares de tangerinas e pomelos também podem ser encontrados. As plantas se estendem em inúmeras pequenas propriedades, totalizando uma área ao redor de 25.000 hectares. A maioria das plantas tem entre 30 e 40 anos, produzindo bons frutos, porém com baixa produtividade, face ao baixo nível tecnológico. Os maiores problemas fitossanitário hoje são a mosca das frutas (*Anastrepha fraterculus*), a alternariose para as tangerinas e pomelos (cujos plantio estão diminuindo face a este problema) e o complexo do vírus da sorose. Devido a importância social e econômica da atividade para a região, e tendo em conta as características próprias dessa citricultura, os técnicos do SENASA estão apreensivos, mas ao mesmo tempo reforçando inspeções em fronteiras secas com outros países e trabalhando de forma educativa junto aos produtores, visando minimizar o risco de entrada de pragas e doenças quarentenárias, como HLB e psilídeo, cancro cítrico e pinta preta.

Pesquisa

Estudo de terpeno sintases de citros

Plantas sintetizam uma ampla gama de componentes de baixo peso molecular conhecidos como metabólitos secundários. Estes metabólitos são produtos naturais e seus estudos levaram a um foco atual na descoberta de novas drogas, antibióticos, inseticidas e herbicidas, entre outros. Os terpenos constituem a maior e mais diversa classe de produtos naturais, e são sintetizadas por proteínas conhecidas como terpeno sintases, que produzem hemiterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, sesterpenos, triterpenos, tetraterpenos (carotenóides) e politerpenos. Em citros, são os principais componentes do óleo essencial, obtido principalmente da casca dos frutos. Como em todas as plantas, o rendimento da extração deste óleo em citros é muito baixo, variando de 0,2 a 2 %. Destes, o principal componente do óleo essencial de citros é o d-limoneno, que responde por 85 a 95% do total. O rendimento de óleo essencial obtido a partir da casca de frutos varia conforme seu estágio de desenvolvimento, aumentando conforme a fruto se desenvolve. Em trabalho realizado no Centro de Citricultura mostrou-se que este aumento na quantidade de óleo essencial relaciona-se com um aumento da expressão gênica destas terpeno sintases, refletindo também na sua qualidade. O sequenciamento do genoma de citros permitiu a identificação de uma ampla gama de possíveis terpeno sintases, porém, a grande maioria destes genes não estão caracterizados, o que vem sendo abordado pelo Centro de Citricultura. Para tanto, estes genes estão sendo expressos *in vitro* e utilizados em ensaios enzimáticos, verificando-se os produtos obtidos em cromatógrafo a gás acoplado a espectro de massa. Através disso, pôde-se caracterizar um destes genes como sendo responsável pela produção de geraniol, por exemplo. Os trabalhos agora encaminham-se para síntese destes produtos em sistemas heterólogos, ou seja, outros organismos são usados para expressão dos genes e, conseqüentemente, para obtenção de seus produtos. Assim, a expectativa é que tenhamos a produção destes terpenos em grande quantidade, permitindo uso mais amplo destes produtos.

Marco Aurélio Takita

Diretor Geral do IAC no Centro

O Diretor Geral do Instituto Agrônomo, Pesquisador Sérgio Augusto Moraes Carbonell, apresentou palestra a funcionários e estagiários do Centro no dia 19 de novembro, abordando vários aspectos de gestão de pesquisa e desenvolvimento no IAC. Na oportunidade efetuou também uma ampla comparação entre aspectos de produtividade científica e tecnológica dos diferentes Centros do Instituto. É propósito da Diretoria Geral levar essas informações pelo menos duas vezes ao ano em cada Centro fora de Campinas.

Simpósio Internacional de Citricultura

O Pesquisador Dirceu Mattos Jr. apresentou trabalho de pesquisa sobre impactos do manejo de nutrientes em pomares com HLB durante o XVI Simpósio Internacional de Citricultura, realizado durante 20 e 21 de novembro em Ciudad Victoria, no Estado de Tamaulipas, no México. O Estado é um dos principais produtores de laranjas para suco e mercado de frutas frescas do país, com cerca de 40 mil hectares de área plantada. Até o momento não foram constatadas plantas infectadas pelo HLB na região, embora já tenham encontrados psilídeos (insetos vetores do HLB) infectivos mais ao sul do estado. A produção de laranjas é oriunda de milhares de propriedades de pequeno porte, onde a potencial entrada da doença aponta para grandes prejuízos econômicos e sociais para o México. Participaram do simpósio pesquisadores mexicanos e da Argentina, Brasil, Cuba e Estados Unidos da América.

Pesquisadora deixa o Centro

A Pesquisadora Juliana Freitas-Astúa, da Embrapa Mandioca e Fruticultura, deixa de compor o quadro de pesquisadores do Centro de Citricultura a partir de 1º de dezembro. Após doze anos de trabalhos no Centro, ela deverá atuar em outras áreas da virologia vegetal. Durante suas atividades nesses anos, liderou o grupo de leprose dos citros, agregando projetos e vários alunos. Parte de seus projetos foram transferidos para outros pesquisadores, inclusive para alunos de Mestrado e Doutorado.

Pesquisa Aplicada

Efetores: proteínas fundamentais na interação planta-patógeno

As plantas, sendo organismos sésseis, estão em constante contato com micro-organismos, seja no solo ou na parte aérea. Alguns micro-organismos são benéficos para a planta, no entanto outros podem causar doenças. Diferentemente de nós seres humanos, as plantas não apresentam um sistema imune adquirido, com células especializadas como os macrófagos que reconhecem os patógenos. No entanto, as plantas apresentam um sistema imune inato muito eficiente, onde cada célula tem o potencial de reconhecer e se defender contra o ataque de patógenos. O reconhecimento dos micro-organismos se dá através de receptores na membrana e proteínas especializadas dentro da célula. Quando há o reconhecimento, em sua maioria das vezes, a planta consegue se defender com êxito mantendo-se sadia.

Por outro lado, os patógenos desenvolveram proteínas que são empregadas para burlar ou dificultar o reconhecimento da infecção pela planta, o que impede a ativação de defesa e resulta em doença. Na fitopatologia, essas proteínas são chamadas de efetores.

Nos últimos meses, pesquisadores e pós-graduandos do grupo de Genoma Funcional/Bioinformática do Centro têm focado seus esforços no estudo de efetores dos patógenos de citros. A estratégia é baseada na identificação de candidatos a efetores e, posteriormente, na caracterização funcional destas proteínas.

Como alguns patógenos de citros já tiveram seu genoma sequenciado é possível utilizar ferramentas de bioinformática para obter candidatos a efetores. Até o momento foram identificados 28 candidatos para *Xylella fastidiosa*, bactéria causadora de CVC, 28 para *Ca. Liberibacter asiaticus* e 20 para *Ca. Liberibacter americanus*, bactérias causadoras de HLB e 171 candidatos de uma única família de efetores de *Phytophthora parasitica*, oomiceto causador da gomose e podridão de raízes.

Recentemente foi demonstrado que alguns efetores são fundamentais para o desenvolvimento de doença e que a desativação destas proteínas pode causar uma total perda de virulência do patógeno. Espera-se que este tipo de estratégia possa

ser empregada no contexto da citricultura brasileira, gerando novas tecnologias e mecanismos de controle de doenças.

Ronaldo José Durigan Dalio,
Pesquisador Pós Doutorando, CNPq/CsF



Micélio de *Phytophthora* parasítica, isolado IAC 01-95, causador de gomose em citros, que teve recentemente seu genoma sequenciado e que é alvo da busca por proteínas efetoras.



Expediente

Informativo Centro de Citricultura

Conselho Editorial

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

Colaboração

Dirceu Mattos Jr.
Hélcio Della Coletta Filho
Jorgino Pompeu Jr.
Lenice Magali do Nascimento
Marco Aurélio Takita
Marinês Bastianel
Ronaldo José Durigan Dalio

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

www.centrodecitricultura.br
informativo@centrodecitricultura.br