



# Informativo Centro de Citricultura

Cordeirópolis, Fevereiro de 2011 • Número 189

## Genoma completo de Citros tem sua primeira versão concluída

O Consórcio Internacional do Genoma dos Citros, do qual faz parte o Centro de Citricultura/IAC e tem apoio da Fapesp, CNPq e Embrapa/Funarb, concluiu o primeiro rascunho do genoma completo de citros. O anúncio foi feito durante a XIX Conferência do Genoma de Plantas e Animais, realizada em janeiro em San Diego, Califórnia. “O volume de informações geradas nesse trabalho permite vislumbrar uma sólida base para os trabalhos futuros com citros em todo o mundo”, afirma o pesquisador Marcos A. Machado, que representou o Centro de Citricultura no evento. Para ele, a capacidade de aplicar essas informações está associada diretamente à de usá-las e integrá-las aos problemas que afetam a citricultura mundial.

Genomas, genômica e transcriptômica são termos que já estão consolidados em nosso vocabulário científico e não representam mais nenhuma novidade. No caso da citricultura, esse processo começou há mais de dez anos, quando do início dos trabalhos visando o sequenciamento do genoma da *Xylella fastidiosa*, a bactéria causadora da CVC. “O tempo passou mas o Centro de Citricultura continuou trabalhando fortemente nesses temas para o fortalecimento do setor. Passaram-se os genomas de *Xylella fastidiosa* e *Xanthomonas axonopodis* sp. citri e o Centro deu um passo adiante, voltando-se para estudos do genoma de citros”, conta Machado. Assim foi desenvolvido o maior banco de seqüências de citros do mundo, o CitEST, resultado do projeto Institutos do Milênio, do CNPq/MCT.

### Coordenação

Mas, havia novos desafios, como o sequenciamento do genoma completo de citros, grande objetivo dos mais diversos grupos de pesquisa em citros do

mundo. E o Centro de Citricultura foi escolhido para coordenar um projeto dos Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia do CNPq/MCT/Fapesp, o INCT-Citros que visa aprofundar estudos com a planta em três diferentes plataformas: de informação genômica, para aplicação genômica e de aplicação genética. O genoma completo de citros está distribuído em 18 cromossomos diplóides com cerca de 367 milhões de pares de base.



O banco de dados de seqüências de genoma de citros do Centro de Citricultura é o maior do mundo, mas ainda assim é importante ampliar essa base de informação. Com isto e com foco em estudos de interação da planta com seus patógenos, como CVC, cancro cítrico, leprose, morte súbita dos citros (MSC) e *huanglongbing* (HLB), foram realizados sequenciamentos de RNA de limão Cravo, laranja doce e tangerina Ponkan. Para o patossistema CVC, a base de dados do Centro conta com 72.670.604 seqüências, totalizando 7.339.731.004 bases; já para MSC, o total de seqüências é de 219.033.446 e de bases, 22.122.378.046. No patossistema HLB, o número de seqüências é de 217.866.495 com 22.004.515.995 bases. Estas seqüências

foram obtidas com a tecnologia Illumina e permitiram ampliar o banco de dados de uma forma gigantesca.

Em termos de comparação, havia 562.490 seqüências no banco produzidas com tecnologia Sanger. Apesar de seqüências Sanger serem até oito vezes maiores do que as produzidas por Illumina, ainda assim o número de bases produzidas neste projeto já superou em muito o que existia no banco de dados. Estas seqüências estão sendo usadas para análises que promoverão um maior entendimento desses patossistemas, além da biologia de citros de um modo geral.

Paralelamente, o Centro de Citricultura participa do esforço de sequenciamento do genoma completo de citros, outra das áreas abrangidas pelo INCT-Citros. Dentro deste quadro, o Centro é responsável pelo sequenciamento de 1x o genoma de citros. O que isto significa? O genoma de citros tem 367 Mb, ou seja 367 milhões de bases, se fosse considerado apenas um único cromossomo do par (genoma haplóide). Isso porque, tal qual os seres humanos, os citros têm pares de cromossomos mas, para efeito de genômica, consideramos o genoma haplóide. Assim sendo, o Centro é responsável pelo sequenciamento de 367 milhões de bases com tecnologia Sanger. Esse serviço foi feito em parceria com o HudsonAlpha Institute for Biotechnology, da Universidade do Alabama.

A espécie escolhida para este sequenciamento foi uma planta haplóide (somente um conjunto de nove cromossomos) de clementina (*Citrus clementina*), obtida no programa de melhoramento do IVIA, Espanha. O fato de a planta ser haplóide facilita em muito a montagem do genoma através da bioinformática.

(Continua na página 2)

## Editorial

### Pesquisar não é preciso

*A consolidação de novas tecnologias em todas as áreas do conhecimento somente se dá com o constante e árduo trabalho de Pesquisa e Desenvolvimento (P&D). Ampliar novos conhecimentos exige um mergulho profundo em áreas básicas, além da constante necessidade de integração da informação, de modo a possibilitar que ela se torne tecnologia a ser transferida ao usuário, que fará assim a necessária inovação tecnológica.*

*Como centro de Pesquisa e Desenvolvimento, o Centro de Citricultura tem procurado, ao longo desses últimos vinte anos, ampliar suas linhas de atuação, agregando equipe, novas linhas de pesquisa e novos projetos. Para tanto, ampliou sobremaneira sua participação em projetos de área básica, sendo um dos principais responsáveis pelo sequenciamento do genoma de *Xylella fastidiosa*, há dez anos. A partir daí, o Centro passou a coordenar um esforço, que se tornou internacional, para o sequenciamento do genoma de citros. Desvendar genoma significa ampliar a base de informação sobre o grupo citros, estruturando uma base de dados que será tanto mais útil quanto maior for a capacidade em utilizá-la. É a construção do futuro da pesquisa.*

*Apesar do grande volume de informações, genomas não têm a precisão apregoada normalmente na mídia e necessitam de integração em vários níveis. Como portal de informação, os genomas representam a oportunidade de conduzir importantes descobertas sobre o organismo e isso não está sendo diferente para citros. De particular destaque são os novos genes descobertos na interação da plantas com vários de seus patógenos, assim como os estudos de diversidade genética do grupo. A expectativa do entendimento de como a planta reage às infecções deverá ser o caminho para o controle efetivo de várias doenças que afetam os citros. No entanto, as imprecisões ainda são consideráveis para que se vislumbrem “soluções milagrosas” a partir dessas informações e em curto prazo. Qualquer que seja esse prazo, as ações devem começar para que os resultados caminhem nessa direção.*

*Os desafios são vários e crescentes. Sem a necessária abordagem multidisciplinar, integração e esforço cooperativo, vamos depender cada vez mais de lances de casualidade para vislumbrar soluções. Conhecer a imprecisão do sistema biológico que envolve os citros é o caminho para a solução. O genoma é mais um componente dessa imprecisão. Conhecê-lo será mais uma etapa nesse quebra-cabeça. Daí a paródia com o poeta português Fernando Pessoa: pesquisar não é preciso.*

## Matéria de Capa

### Responsabilidades

A parte que coube ao Centro já foi feita, bem como as sob responsabilidade dos outros integrantes do Consórcio Internacional de Citros: Estados Unidos (2x), Espanha (4x) e Itália (1x). Atualmente, todas as sequências foram montadas e existe um primeiro rascunho do genoma completo de citros, que agora passa por uma análise mais rigorosa onde serão obtidas as sequências separadas de cada um dos cromossomos. Por que isso é importante? Genomas completos possibilitam estudos de evolução de espécies, o que é importante para citros que apresentam uma filogenética tão estranha por conta de cruzamentos e mais cruzamentos naturais. Além disso, permitem um maior conhecimento sobre a biologia das plantas, um entendimento de como elas “funcionam”, o que terá um enorme impacto na direção de pesquisas básicas ou aplicadas, em um futuro próximo.

Para o Centro, pela grande tradição em melhoramento genético clássico, também é importante para o desenvolvimento de marcadores moleculares que vão saturar os mapas genéticos já feitos. “A possibilidade de cruzarmos os mapas genéticos com os mapas físicos também é estimulante na medida em que possibilitará a concreta identificação de genes responsáveis por diversas características agrônomicas, como por exemplo, resposta de defesa à doenças, qualidade de frutos, e resistência à seca”, diz Machado.

Outra vertente do projeto INCT-Citros é o sequenciamento do genoma de outras espécies de citros, como limão Cravo (*Citrus limonia*) e tangerina Ponkan (*Citrus reticulata*), e *Poncirus trifoliata*, um gênero próximo. Este sequenciamento foi feito com outra tecnologia, conhecida por pirosequenciamento. O sequenciamento do limão Cravo produziu 6.154.732 sequências, englobando 2.094.498.415 bases. Já para tangerina Ponkan foram feitas 4.873.205 sequências e 1.748.231.954 bases. Por fim, para trifoliata foram obtidas 5.305.360 sequências com 1.900.776.496 bases. Isto significa mais de quatro vezes de cobertura do genoma para cada uma das espécies trabalhadas. “Este sequenciamento permitirá a identificação de variações espécie-dependentes que podem ser utilizadas posteriormente tanto em programas de melhoramento genético clássico quanto em transgenia, permitindo assim o melhoramento de plantas visando a resistência à doenças, principal foco do Centro, bem como a qualidade de frutos”, explica Marcos Machado.

## Notas

### Trabalho do Centro é premiado

O trabalho intitulado “Avaliação da expressão gênica diferencial em híbridos para resistência à leprose dos citros”, de autoria da aluna de iniciação científica Fernanda Nara Maurício, sob orientações da pesquisadora Mariângela Cristofani-Yaly e da aluna de doutorado Karen Kubo, recebeu o Prêmio Victória Rossetti, concedido ao melhor trabalho apresentado no XXXIV Congresso Paulista de Fitopatologia que aconteceu de 15 a 17 de fevereiro, em Campinas.

### Seminário científico

No dia 16 de fevereiro, foi realizado neste Centro o seminário “Transformação genética de cultivares de laranja doce a partir de explantes de plantas adultas”, apresentado pela aluna Pâmela Fávero, orientada do Prof. Francisco Mourão Filho, da Esalq/USP.

Ainda dentro das atividades do Seminário Científico do Centro de Citricultura, o Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli, da Unesp de Araraquara, apresentou palestra no dia 1º de fevereiro, sobre “Peptídeos antimicrobianos”. O professor tem auxiliado o trabalho de tese da aluna Rosângela Inui, sobre prospecção de peptídeos antimicrobianos no genoma de citros.

### Transformação genética

A pesquisadora Raquel L. Boscariol Camargo, a pós-doutoranda Polyana K. Martins e a pós-graduanda Raquel Caserta participaram da conferência internacional Plant Transformation Technologies II, que aconteceu em Viena, Áustria, entre os dias 19 e 22 de fevereiro. Na ocasião, foram apresentados três trabalhos sobre transformação genética e prospecção gênica desenvolvidos no Centro de Citricultura.

O evento foi organizado pela Vienna International Plant Conference Association e contou com a participação de 270 pesquisadores de vários países, como China, EUA, Rússia, Alemanha, Reino Unido, Espanha, Bélgica e Itália. Foram apresentados 124 trabalhos na forma de pôster e 44 apresentações orais em temas como: transformação de culturas importantes, ferramentas para transformação, vetores, promotores e marcadores, transformação de plastídios e plantas transgênicas como biofábricas.

### Participações em bancas

O pesquisador Jorgino Pompeu Junior participou da Comissão Julgadora da Defesa de Dissertação de Mestrado de Greicy Andrea Sarria Villa, intitulada “Indução de resistência em citros contra *Phytophthora citrophthora* e *Phytophthora nicotianae*: método de inoculação, seleção de indutores, aspectos fisiológicos e bioquímicos”, realizada em 1º de fevereiro na Esalq/USP.

Em 25 de fevereiro, os pesquisadores Alessandra Alves de Souza e Helvécio Della Coletta Filho participaram da banca examinadora de defesa de dissertação de mestrado em Biotecnologia, na Universidade de Mogi das Cruzes (UMC), em Mogi das Cruzes (SP), do aluno Deibs Barbosa, que defendeu o trabalho intitulado “Análise genômica comparativa de isolados de *Xylella fastidiosa* obtidos de cafeeiros”.

No mesmo dia, o pesquisador Marcos A. Machado participou da banca de tese de doutorado da aluna Maria Teresa Federici Rodriguez, da Unesp de Jaboticabal. Sob orientação da Profa. Dra. Eliana Lemos, a tese, intitulada “Análise da expressão de genes relacionados à patogenicidade da bactéria *Xylella fastidiosa* em plantas de citros”, focalizou a expressão gênica diferencial de *Xylella fastidiosa* em plantas suscetível e tolerante à CVC.

Sob orientação do Pesquisador Marcos A. Machado e co-orientação de Alessandra Alves de Souza, a aluna Carolina Munari Rodrigues defendeu com sucesso seu exame de qualificação na Unesp de Botucatu. Sua tese de doutorado concentra-se no estudo de expressão diferencial de genes em laranja e tangerina, respectivamente, suscetível e tolerante à CVC.

### Bioinformática em ação

Em 28 de fevereiro, o pesquisador científico Marco Aurélio Takita foi a Brasília para uma reunião com o grupo do Laboratório de Bioinformática do Cenargen da Embrapa. As discussões foram coordenadas pelo pesquisador Georgios Pappas Júnior e contaram com a participação de outros pesquisadores da Embrapa, como Natália F. Martins, Marcos Mota Costa, Orzenil Bonfim de Silva Júnior e Roberto Togawa. Ferramentas genômicas pautaram as discussões, com os pesquisadores apresentando os trabalhos sendo desenvolvidos para toda a Embrapa e o pesquisador do Centro de Citricultura mostrando os dados de genoma que estão sendo gerados no projeto INCT Citros.

### Reunião no MAPA

A pesquisadora Mariângela Cristofani-Yaly e o Eng. Agr. José Dagoberto De Negri estiveram em Brasília, em 28 de fevereiro, para discutir aspectos relacionados ao registro e proteção de cultivares de citros. O Centro de Citricultura tem feito esforços para registrar todo o seu acervo genético de citros, sendo que vários desses materiais já podem entrar em processo de proteção, como prevê a Lei de Proteção de Cultivares.

### Congresso Paulista de Fitopatologia

A convite da comissão organizadora, o pesquisador Marcos A. Machado apresentou a palestra ‘Manejo de HLB’, no XXXIV Congresso Paulista de Fitopatologia, realizado em Campinas, no dia 16 de fevereiro.

### Defesa de tese de doutorado

A aluna Mariana Silva e Souza, do Curso de Biologia Funcional e Molecular, da Unicamp, orientada e co-orientada, respectivamente, pelos pesquisadores Marcos A. Machado e Alessandra Alves de Souza, defendeu sua tese de doutorado no dia 21 de fevereiro. Com o título “Caracterização de genes de adesão na formação do biofilme e na patogenicidade de *Xylella fastidiosa* e expressão diferencial de proteínas”, o trabalho se concentrou na produção de mutantes de *Xylella fastidiosa* para a produção de biofilme e proteoma da bactéria em condição de biofilme (virulenta) e planctônico (não virulenta). O objetivo principal foi comparar a patogenicidade da bactéria nessas duas condições. Ficou mais uma vez comprovado o papel do biofilme no desenvolvimento da CVC.

### Fruta de qualidade no interior do RS

De 21 a 25 de fevereiro, a pesquisadora Lenice Magali do Nascimento e Eng. Agr. José Dagoberto De Negri visitaram a Fazenda Santa Eulália, em Santa Margarida do Sul (RS), para conhecer sua produção de citros de mesa de boa qualidade. Segundo os pesquisadores, a região conta com um clima bastante favorável para a obtenção de coloração de fruta muito desejável e a empresa realiza um trabalho totalmente voltado à busca da melhor qualidade e satisfação do consumidor.

## Pesquisa do Centro

### Estudos de elicitores na indução de resistência

A produtividade brasileira de citros no Brasil tem sido afetada por duas importantes doenças: *huanglongbing* (HLB) e a clorose variegada dos citros (CVC). O HLB é uma doença devastadora, causada por *Candidatus Liberibacter* spp., que afeta todas as variedades de citros. A CVC, causada pela *Xylella fastidiosa*, afeta todas as variedades de laranja doce. Essas doenças carecem de medidas efetivas de controle. Considerando o manejo integrado de doenças em plantas, uma estratégia que pode trazer grandes contribuições é a indução de resistência em plantas, um método de ativação dos mecanismos de defesa latentes da planta através de tratamentos prévios com elicitores.

Dentre os compostos que vêm sendo amplamente pesquisados em outros patossistemas, encontram-se a quitosana e o ácido salicílico, os quais têm demonstrado potencial na indução de respostas de defesa em plantas contra fitopatógenos. Com intuito de avaliar o efeito destes elicitores em plantas de laranja Pêra, estudos estão sendo conduzidos, em ambiente protegido, no Centro de Citricultura Sylvio Moreira/IAC envolvendo o tratamento prévio das plantas com a quitosana ou ácido salicílico seguido pelo desafio com as bactérias. As amostras coletadas após a inoculação estão sendo avaliadas quanto a expressão gênica específica, por RT-qPCR, incluindo importantes famílias de fatores de transcrição (como os NPR1, TGA e WRKY) e também dos genes relacionadas à patogênese.

Posteriormente, será avaliada a expressão gênica global por meio do transcriptoma de plantas de laranja Pêra tratadas ou não com os elicitores e desafiadas ou não com as bactérias. Com isso, pretende-se contribuir com estudos funcionais de genes de defesa dos citros, os quais poderão conduzir ao melhor entendimento dos mecanismos de defesa induzidos pelo tratamento prévio com elicitores contra *Ca. L. asiaticus* e *X. fastidiosa*, e também gerar conhecimento que poderá servir à adoção de procedimentos alternativos para o controle das doenças em questão.

Danila Souza Oliveira Coqueiro,  
doutoranda, Unicamp  
Marcos A. Machado, orientador

## Workshop: Programa de Fisiologia da Produção

O Centro de Citricultura Sylvio Moreira/IAC, por meio do Programa de Fisiologia da Produção dos Citros, realizou no dia 3 de março o "1 Workshop sobre Processos Fisiológicos e Eficiência da Produção dos Citros". O encontro teve o objetivo de discutir estado da arte e potenciais linhas de pesquisa sobre a formação da produção dos citros que contribuam para o avanço do conhecimento e atendimento da demanda de informações do setor. Contou com a participação de público formado por pesquisadores e estudantes de iniciação científica e pós-graduação do IAC, Esalq/USP e FCAV/Unesp. Foram apresentadas, numa primeira sessão, conferências sobre: (i) a eficiência fotos-

sintética dos citros em três níveis principais de abordagem da fisiologia, onde destacou-se a resposta de porta-enxertos à diferenças de temperatura do ambiente sobre a produção da planta, pelo Dr. Rafael V. Ribeiro do Centro de Ecofisiologia/IAC; (ii) a identificação de genes transcritos para resistência dos citros à seca, como parte dos avanços de informações obtidos dentro do programa INCT Citros, pelo Dr. Márcio G.C. Costa, da Universidade Estadual de Santa Cruz; (iii) o manejo da água de irrigação em experimentos de campo, efeitos de lâminas de irrigação e perspectivas do déficit hídrico controlado sobre o florescimento e produção de laranjas, pela Dr. Regina C.M. Pires, também do Centro

de Ecofisiologia/IAC. Na segunda sessão, foram apresentados resultados obtidos em projetos de pesquisa recentes nas áreas de expressão gênica e florescimento dos citros, eficiência de uso de nitrogênio e fósforo, e efeitos da poluição ambiental com flúor sobre espécies de citros. Também foram discutidos novos projetos de pesquisa sobre o uso de micronutrientes, manejo cultural da entrelinha e aspectos fitotécnicos, físico-químicos e histoquímicos em tangerineiras resistentes à mancha marrom de alternária. Assim, ampliou-se a divulgação e fomentou-se perspectivas de trabalho e colaborações entre especialistas nas áreas da nutrição, pós-colheita, propagação e manejo cultural dos citros.



### 12º Dia do Limão Tahiti

**31 de março de 2011**

13h 30min	Recepção e Abertura
14 h	Comercialização da lima ácida Tahiti: cenário atual <i>Margarete Boteon, Cepea/Esalq/USP</i>
15 h	Coffee break
15 h 30 min	Atualização sobre o manejo de pragas em Tahiti <i>José Luiz Silva, Gravena ManEcol Ltda</i>
16 h 30 min	Manejo da "estrelinha" em limão Tahiti <i>Márcio Augusto Soares, Agroteneras S.A. Citrus</i>
17 h 30 min	Encerramento
Coordenadores:	Fernando Alves de Azevedo e José Dagoberto De Negri

Informações  
eventos@centrodecitricultura.br



#### Expediente

Informativo Centro de Citricultura  
**Editora e jornalista responsável**  
*Cristina Rappa (MTB 15.213)*

#### Conselho Editorial

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

#### Colaboração

*Arthur A. Ghilardi*  
*Danila Souza Oliveira Coqueiro*  
*Dirceu de Mattos Júnior*  
*Fernando Alves de Azevedo*  
*Helvécio Della Coletta Filho*  
*Jorgino Pompeu Jr*  
*Lenice Magali do Nascimento*  
*Marco Aurélio Takita*  
*Mariângela Cristofano-Yaly*  
*Raquel Luciana Boscarior-Camargo*  
*Rosângela Naomi Inui*

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)



SECRETARIA DE  
AGRICULTURA E ABASTECIMENTO

