



## Tecnologia de RNA interferente: potencial no controle de insetos

A ciência traz constantemente para o nosso dia a dia, ferramentas e tecnologias que alteram nossa forma de interagir com o meio ambiente. Nesse contexto, para compreender a tecnologia de RNAi (do inglês, RNA interference) é preciso entender como esse mecanismo funciona naturalmente nas células. As funções vitais de qualquer organismo dependem da expressão de seus genes, isto é, quando a informação contida num gene é transcrita em um RNA mensageiro que será traduzido em uma proteína. Entretanto, todas as células eucariontes possuem o mecanismo de silenciamento gênico que atua como regulador de expressão de seus genes por meio da degradação do RNA mensageiro; assim, mesmo que o gene seja expresso, sua informação não é traduzida em proteína e desse modo diz-se que o gene foi “desligado”.

A técnica de RNAi foi demonstrada pela primeira vez em petúnias, no início de 1990, onde pesquisadores tentaram produzir flores com cores intensas a partir do aumento na expressão do gene chalcona-sintase (*chs*) - responsável pela coloração das

flores - e observaram o desenvolvimento de flores brancas. O que poderia ter ocasionado este resultado? Observou-se que ao aumentar a expressão do gene *chs* ocorria a formação de fitas duplas de RNA (do inglês, double stranded RNAs – dsRNAs).

Dessa forma as células da planta reconheciam o *chs* como um vírus e degradava as moléculas de RNA ocasionando o silenciamento do gene e as flores permaneciam brancas. Este fenômeno foi observado em diversos organismos e em 1998 o mecanismo de RNAi foi desvendado por dois pesquisadores norte-americanos, Andrew Z. Fire e Craig C. Mello, trabalhando com nematoides e que, por essa descoberta, receberam o Prêmio Nobel de Medicina em 2006. Atualmente a técnica é empregada em todas as linhas de pesquisa como forma de inativar genes, inclusive na terapia gênica em doenças humanas.



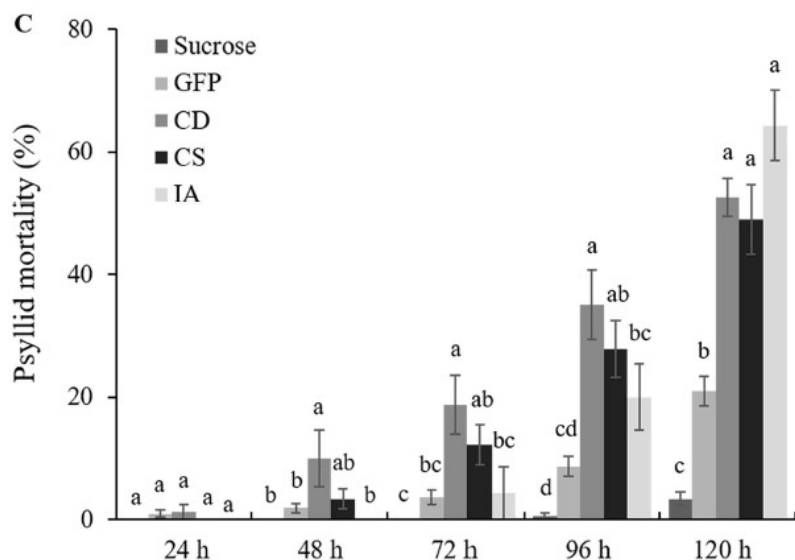
RESEARCH ARTICLE

### Oral delivery of double-stranded RNAs induces mortality in nymphs and adults of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*

Diogo Manzano Galdeano<sup>1,2</sup>, Michèle Claire Breton<sup>1</sup>, João Roberto Spotti Lopes<sup>3</sup>, Bryce W. Falk<sup>4</sup>, Marcos Antonio Machado<sup>1\*</sup>

O mecanismo de RNAi é realizado com base na sequência do gene a ser silenciado. Para isso, as moléculas de dsRNAs são introduzidas nas células dos organismos que então são quebradas no citoplasma em moléculas menores denominadas pequenos RNAs interferentes (do inglês, small interfering RNAs – siRNAs). Os siRNAs são guiados por um conjunto de proteínas até o RNA mensageiro do gene que tem a sequência complementar aos siRNAs e é neste momento que ocorre a “quebra” e destruição do RNA mensageiro causando o silenciamento do gene alvo. É isso que confere à técnica sua grande especificidade. Assim, apesar de o mesmo gene estar presente em diferentes organismos, em cada um apresenta pequenas alterações na sua sequência, permitindo criar um siRNA que afete apenas uma ou um grupo de espécies específicas que partilhem sequências idênticas.

Além de sua aplicação na pesquisa básica para estudos de funções gênicas, ou na aplicada à área da saúde em terapias gênicas, a ferramenta de RNAi foi utilizada pela primeira vez em 2006 na agricultura para o controle de pragas. Por exemplo, moléculas capazes de silenciar especificamente genes da lagarta da raiz do milho (*Diabrotica virgifera virgifera*) foram introduzidas nas plantas. Ao se alimentarem dessas plantas as lagartas tiveram seus genes silenciados e morreram. No último mês de junho foi aprovada nos EUA a primeira planta transgênica contendo a tecnologia de RNAi no controle dessa praga.



Aumento na taxa de mortalidade de *Diaphorina citri* tratada com diferentes dsRNA para reduzir a expressão dos genes alvos

## Editorial

### Inovação na Pesquisa

Assim como em outras áreas da ciência, a pesquisa na citricultura está em constante evolução, sempre procurando agregar novas frentes de trabalho e novas tecnologias de modo a avançar nos desafiantes problemas que afetam os citros em todo o mundo. Cada nova etapa incorpora novos conhecimentos, quase sempre transformados em tecnologias que, infelizmente demandam muito tempo para alcançar o usuário final: o citricultor. No entanto, isso não deve servir de desestímulo para a busca constante de inovação, tanto nas atividades de pesquisa quanto nas atividades de produção. Só a assim a cadeia do conhecimento e da produção avançam no sentido da produtividade e da competitividade. Portanto, é imprescindível que aqueles responsáveis pela abertura de novas frentes de trabalho estejam constantemente antenados quanto ao desenvolvimento da ciência, em todas suas áreas.

Nesse sentido, a programação de pesquisa e desenvolvimento do Centro de Citricultura tem procurado, nos limites impostos por questões financeiras e de equipes, incorporar novas frentes de trabalho, sempre focalizando aspectos aplicados que possam representar retorno aos usuários, sem descuidar da qualidade do trabalho. É evidente, cada vez mais, a necessidade de incorporar tecnologias básicas para soluções aplicadas. É imprescindível, portanto, que o produto final – citros – seja o foco central da programação de pesquisa. Não seria diferente para um centro de produto.

Projetos apoiados pelo INCT Citros (CNPq, Fapesp e Capes) têm incorporados atividades de ponta na pesquisa em biotecnologia, como a tecnologia de RNA interferente e a edição de genoma por Crispr. Ambas as tecnologias têm sido apontadas como de grande impacto no futuro próximo para o controle de patógenos e de vetores de doenças, assim como na produção de plantas geneticamente modificadas sem que sejam transgênicas, respectivamente. De particular importância face a questões regulatórias, a tecnologia Crispr amplia as possibilidades de editar o genoma em um mecanismo semelhante ao “corta e cola” da edição de textos. Imprescindível, evidentemente, o conhecimento do gene alvo que se quer modificar. Daí a importância dos estudos sobre genomas.

Embora nem sempre seja suficientemente compreendida, essa pesquisa básica insere-se no conceito amplo de que pesquisa de qualidade sempre encontrará aplicação. Só assim o Centro de Citricultura poderá executar sua missão institucional, legando para o futuro pesquisas de referência para a citricultura mundial.

## Matéria de Capa

Para a eficiente aplicação de RNAi é fundamental a escolha dos genes a serem silenciados e que esses estejam relacionados à funções vitais e de desenvolvimento, podendo alterar o fenótipo ou causar mortalidade de organismo alvo. Outra característica importante para o uso de dsRNAs é como será realizado o fornecimento dessas moléculas para o organismo alvo; afinal essas moléculas devem ser internalizadas nas células a fim de silenciar o gene alvo. Para isso, pode-se lançar mão de estratégias de fornecimento de dsRNAs, por exemplo, pela alimentação via dieta artificial para artrópodes e nematoides, por moléculas de dsRNAs misturadas à água e aplicadas para serem absorvidas pela planta por meio de suas raízes ou pulverizado sobre artrópodes e fungos, ou ainda ser produzido pela própria planta geneticamente modificada.

Atualmente, o Centro de Citricultura vem desenvolvendo projetos com foco na aplicação da tecnologia de RNAi para controle de pragas na citricultura buscando genes que são vitais na sobrevivência de fungos, ácaro da leprose do citros e *Diaphorina citri*. Em 2017, foi publicado o trabalho de RNAi desenvolvido no Centro de Citricultura pelo Pós-doutorando Diogo M. Galdeano em parceria com o Prof. Bryce W. Falk, da Universidade da Califórnia (Davis). Neste trabalho, moléculas de dsRNAs de três genes foram fornecidas via alimentação para ninfas e adultos de *D. citri*, em plantas e dieta artificial, respectivamente. Os pesquisadores puderam constatar que alguns genes causaram 60% de mortalidade e também houve redução na expressão dos genes alvos dos insetos, demonstrando assim que a ferramenta de RNAi pode ser utilizada futuramente no manejo do *huanglongbing* (HLB).

## Notas

### Defesa de Mestrado

No dia 31 de agosto a aluna Amanda de Carvalho Bernardi obteve seu título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados da UFSCar, defendendo sua dissertação intitulada “Otimização de parâmetros para edição de genoma via Crispr/Cas9 em citros”. A aluna foi orientada pelo Pesquisador Marco Aurélio Takita e participaram de sua banca os também Pesquisadores Raquel Luciana Boscariol Camargo, do Centro de Citricultura e Ricardo Harakava, do Instituto Biológico de São Paulo.

### Defesa de Doutorado

Eduardo Henrique Goulin, aluno do Curso de Genética e Biologia Molecular da Unicamp e orientado do Pesquisador Marcos Antonio Machado defendeu sua tese de doutorado no dia 29 de agosto. Com o título “RNA interferente no estudo e controle de fungos patogênicos de citros” o trabalho estabeleceu a tecnologia de silenciamento gênico de genes envolvidos na ação de fungicidas em *Colletotrichum abscissum*, agente da podridão floral dos citros. A tecnologia tem o potencial de substituir fungicidas em futuro próximo, sendo considerada altamente específica e sem os efeitos ambientais provocados por defensivos tradicionais. Como parte de seu trabalho de tese o genoma do fungo foi completamente sequenciado com tecnologia Illumina.

### Congresso Brasileiro de Fitopatologia

Durante os dias 21 a 23 de agosto foi realizado em Uberlândia, MG, o 50º Congresso Brasileiro de Fitopatologia, com participação de 1200 inscritos e mais de 800 trabalhos apresentados. O Centro de Citricultura teve participação impactante com diversas palestras, apresentações de trabalho e a obtenção de um prêmio de destaque. O Pesquisador Marcos A. Machado proferiu a palestra intitulada: “Os desafios do *huanglongbing* (HLB) para a citricultura brasileira” na mesa-redonda *Citrus Greening meeting* realizada em parceria com a APS (Sociedade Americana de Fitopatologia).

O Pós-doutorando Ronaldo J. D. Dalio proferiu palestra intitulada “Forma, função e dinâmica de expressão: efetores na interação citros e seus principais patógenos”. O Pós-doutorando Celso G. Litholdo Jr apresentou o trabalho intitulado “Identification of genes that encodes to the RNA silencing machinery in citrus and analysis of their differential expression during the interaction with *Phytophthora parasitica*”.

O aluno de Doutorado Heros José Máximo apresentou os trabalhos: “Effector Triggered Susceptibility (ETS) in citrus plant via CRN effectors of *Pytophthora parasitica*”, e “Influence of citrus root extracts on *Phytophthora parasitica* metabolome analyzed by mass spectrometry”.

Já os alunos de Mestrado, Mariana M. Tarallo e Henrique A. S. Bergamo também apresentaram seus trabalhos, respectivamente, “Expressão do gene ACTT1 responsável pela síntese da toxina

ACT do patógeno de citros *Alternaria alternata* em resposta a extratos de citros” e “Efeito do N-acetilcisteína na atividade de enzimas antioxidantes em laranja doce infectadas com *Candidatus Liberibacter asiaticus*”.

Por fim os alunos de Iniciação Científica (IC) Rodolfo B. Montelatto, Leticia M. Ferreira, Leticia Montelatto, Thiago A. de Lima e Rafaela Gasparotto, também apresentaram os seguintes trabalhos respectivamente: “Imunidade desencadeada por PAMPs de *Phytophthora parasitica* (PTI) em plantas de citros e tabaco”, “Aquisição do *Citrus leprosis virus C* por diferentes espécies de *Brevipalpus* spp. (Acari: Tenuipalpidae)”, “Validação de protocolo para fornecimento de double-stranded RNAs (dsRNAs) para controle do ácaro da leprose via interferência por RNA (RNAi)”, “Indução de sintomas de mancha preta dos citros em frutos de laranja doce (*Citrus sinensis*)” e “Material de propagação cítrico no Estado de São Paulo: dados de cinco anos de análises clínicas”.

O trabalho apresentado pelo aluno Rodolfo Montelatto ganhou o prêmio Dr. José Tadashi Yrinori de melhor trabalho de iniciação científica. Ronaldo Dalio foi eleito em Assembleia da Sociedade Brasileira de Fitopatologia para continuar atuando como editor-chefe do periódico Revisão Anual de Patologia de Plantas (RAPP). O volume 25 da RAPP foi publicado durante o 50º Congresso Brasileiro de Fitopatologia e esse tem em seu índice duas excelentes revisões publicadas por pesquisadores do Centro de Citricultura: “Transgenia como ferramenta para estudo funcional de genes”, das Pesquisadoras Raquel Luciana Boscarol Camargo e Alessandra Alves de Souza, e “The role of MicroRNA in plant-pathogen interactions, do Pós-doutorando Celso G. Litholdo Jr”.

### **International Plant Nutrition Colloquium 2017**

No período de 21 a 24 de agosto os pesquisadores do Centro de Citricultura Dirceu de Mattos Jr. e Rodrigo M. Boaretto participaram do 18th International Plant Nutrition Colloquium (IPNC), realizado em Copenhague, Dinamarca. O IPNC é o principal evento da área de nutrição mineral de plantas e contou com a participação de mais de 600 especialistas mundiais no assunto. O evento teve como tema “Nutrição vegetal para o crescimento verde global”, o qual foi escolhido para destacar a importância dos nutrientes para a intensificação bem-sucedida da

produção mundial de alimentos. Na oportunidade foram divulgados três trabalhos resultantes de pesquisas geradas no Centro, os quais abordaram temas sobre eficiência no uso de micronutrientes na citricultura.

### **Conselho Internacional de Nutrição de Plantas**

O pesquisador do Centro de Citricultura, Dirceu de Mattos Jr, foi indicado membro do International Plant Nutrition Council (IPNC), - Conselho Internacional de Nutrição de Plantas - durante evento recente realizado na Dinamarca, na cidade de Copenhague. O convite apresentado por Jan Schjørring, Presidente do IPNC e Diretor do Departamento de Plantas e Ciências Ambientais da Universidade de Copenhague, é baseado em uma decisão conjunta entre os membros atuais do Conselho, composto por representantes de vários países, e reflete o reconhecimento das principais contribuições do convidado na área de nutrição mineral de plantas. Essas contribuições têm sido valiosas na promoção da nutrição vegetal como uma forte disciplina científica que oferece conhecimentos para o desenvolvimento de plantas eficientes no uso de nutrientes, para o estabelecimento bem-sucedido de sistemas sustentáveis de manejo de nutrientes e para uma melhor compreensão do ciclo de nutrientes em ecossistemas naturais.

### **Participação em Bancas e Eventos**

A Pós-doutoranda Paula M. M. Martins participou em 23 de agosto da banca de mestrado da aluna Jelena Puric, da Unesp de Rio Claro. A aluna do Curso de Bioquímica e Microbiologia desenvolveu trabalho sobre “Fungos de sedimentos marinhos da Antártica: produção de metabólitos secundários e avaliação da atividade contra espécies de *Xanthomonas*”.

O Pesquisador Marco Aurélio Takita participou no dia 29 de agosto da banca de defesa de tese de doutorado de Maria Manuela Hashimoto Venâncio, do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Unicamp. Além do pesquisador, participaram da banca os Pesquisadores Nilson Borlina Maia e Luiz Henrique Chorfi Berton, do IAC, e os professores da Unicamp Márcio José da Silva e Paulo Mazzafera (orientador). A tese teve como título “Análise da expressão de genes envolvidos na composição e rendimento de óleo em frutos de macaúba (*Acrocomia aculeata*)”.

## **Pesquisa**

### **Leprose dos citros: novidades e perspectivas**

A leprose dos citros, doença viral, comumente causada pelo *Citrus leprosis virus C* (Cilevirus) está associada a ácaros *Brevipalpus* (Acari: Tenuipalpidae). Nos últimos anos diversos estudos possibilitaram ampliar o conhecimento sobre a leprose dos citros e seu vetor, destacando-se a recente revisão taxonômica para o chamado “grupo *B. phoenicis*”, a qual teve algumas sinonímias recuperadas e novas espécies descritas para o grupo. Após esta revisão, estudos de campo concluíram que a espécie mais comum associada à leprose é *B. yothersi*. Este reposicionamento teve implicação direta na interação vírus-vetor, voltando-se a investigação aos estudos de diversidade e de uma possível especificidade na aquisição e inoculação do vírus da leprose.

De fato, resultados preliminares de pesquisas do Centro de Citricultura e parceiros, indicaram certa especificidade vírus-vetor, bem como, a possibilidade de marcadores moleculares contribuírem no contexto taxonômico integrativo e da utilização de dados de genômica e transcriptômica para avançar no conhecimento e controle do vetor.

Os estudos têm sido direcionados para a interação vírus-vetor, com a perspectiva de agregar informações sobre este importante patossistema, tendo como estratégia principal a genômica funcional e dados de expressão gênica.

Nesse sentido, estão sendo investigadas as diferentes espécies de *Brevipalpus* spp quanto à capacidade de aquisição e inoculação do vírus da leprose; a busca por genes e metodologias que permitam a investigação da técnica de RNA interferente (RNAi) aplicada ao vetor; e a comparação do perfil de expressão gênica de populações virulíferas e avirulíferas de ácaros, via dados de transcriptoma (RNAseq). Estes trabalhos, com colaboração de instituições nacionais e internacionais, de Pós-doutorandos e alunos de IC e PG, alinham-se com a missão de desenvolver pesquisa e transferir conhecimento para o negócio citrícola, somando-se à extensão e à formação de recursos humanos, tendo como foco principal uma das doenças de maior impacto aos produtores. Portanto, a expectativa é fornecer subsídios para que, em um futuro próximo, ferramentas inovadoras possam ser disponibilizadas ao manejo sustentável da doença nos pomares.

Valdenice Moreira Novelli

## Pesquisa Aplicada

### Aplicação foliar de fontes pouco solúveis na citricultura

A adubação foliar tem sido uma prática comum para o manejo de micronutrientes na citricultura, embora a eficiência desta técnica possa variar dependendo da fonte fertilizante empregada. As respostas agrônômicas distintas podem ser atribuídas a diversos fatores como ao íon acompanhante, à solubilidade da fonte em água, ao ponto de deliquescência, ao tamanho de partícula e aos adjuvantes adicionados ao fertilizante.

Segundo a Instrução Normativa nº 46, de 22/11/2016, editada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), os fertilizantes minerais, quando destinados à aplicação foliar, deverão apresentar seus nutrientes totalmente solúveis em água. Os sais

solúveis usualmente recomendados para a aplicação foliar são aqueles a base de sulfatos, clorretos e nitratos, mas que em altas concentrações e/ou em mistura com outros produtos podem provocar queima no tecido foliar.

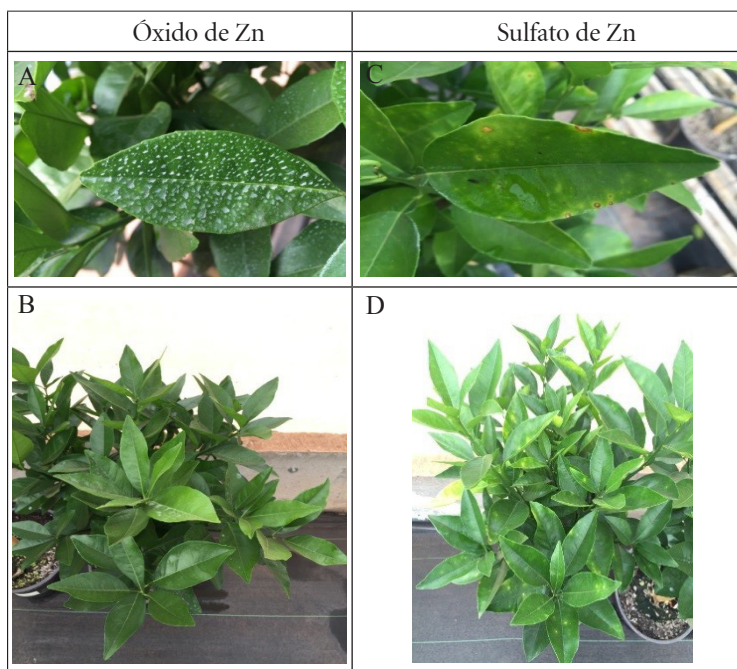
Assim sendo, fontes pouco solúveis a base de óxidos e carbonatos, as quais em muitas situações possuem registro para aplicação no solo, são comumente utilizadas para a aplicação foliar devido a sua menor interação com outros produtos na mistura do tanque e maior praticidade de aplicação. A eficácia da aplicação desses fertilizantes pouco solúveis se baseia na premissa de que essas fontes, quando microparticuladas, têm sua disponibilidade aumentada, o que favorece a absorção do nutriente pela planta.

Desse modo, atendendo a uma demanda do setor, o Grupo de Nutrição dos Citros do IAC iniciou um conjunto de experimentos para avaliar a viabilidade do fornecimento foliar de fontes pouco solúveis de micronutrientes microparticulados

(boro, cobre, manganês e zinco), comparando-as com as fontes solúveis usualmente recomendadas.

Os dados obtidos nos experimentos demonstraram que as fontes de micronutrientes pouco solúveis, caracterizadas como microparticuladas, possuem capacidade de suprir as plantas de forma semelhante às fontes solúveis normalmente utilizadas. Foram observadas respostas nos teores foliares desses micronutrientes, as quais explicaram variações na produção de biomassa, na área foliar, na atividade de enzimas ligadas ao estresse oxidativo e no estado nutricional das plantas cítricas.

Os resultados mostram o potencial dessas fontes pouco solúveis no suprimento de micronutrientes via foliar para os citros, o que viabilizaria um novo registro junto ao MAPA. Contudo, ainda são necessários estudos mais específicos, pois a eficácia desses fertilizantes pouco solúveis estará diretamente relacionada ao tamanho das partículas e aos adjuvantes presentes na composição dessas fontes.



Folha jovem de citros pulverizadas com óxido de Zn (A), visão superior de planta jovem de citros aplicada com óxido de Zn (B), folha jovem de citros aplicada com sulfato de Zn (C), visão superior de planta jovem de citros aplicada com sulfato de Zn (D)



#### Expediente

Informativo Centro de Citricultura

#### Conselho Editorial

José Dagoberto De Negri  
Marcos Antonio Machado  
Vivian Michelle dos Santos

#### Colaboração

Diogo Manzano Galdeano  
Dirceu de Mattos Jr.  
Marco Aurélio Takita  
Rodrigo Marcelli Boaretto  
Ronaldo J. D. Dalio  
Valdenice Moreira Novelli

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

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

#### Mala Direta Básica

CNPJ-61705380/0001-54-DR/SPI  
Fundação de Apoio  
à Pesquisa Agrícola

