



Informativo Centro de Citricultura

Cordeirópolis, Outubro de 2017 • Número 269

Silenciamento gênico em fungos: potencial para controle de doenças

No Informativo Centro de Citricultura do mês de agosto desse ano foi apresentado o potencial da tecnologia de RNA interferente para o controle de insetos. Nessa edição o tema retorna, agora abordando seu potencial no controle de doenças fúngicas.

As células de todos os organismos classificados como eucariontes como as plantas, os animais e os fungos possuem mecanismos que controlam suas funções. Todas as aplicações utilizadas comercialmente, seja como medicamento, seja como moléculas para controle de doenças, são originárias de descobertas seguidas de alterações em processos que ocorrem na natureza.

Recentemente cresce uma tecnologia com potencial para aplicações em um futuro próximo, essa é a tecnologia do RNA interferente (RNAi). Dentro das células da maioria dos organismos eucariontes o RNAi tem a importante função de proteger a célula de ataques de patógenos, como vírus e outras moléculas estranhas de ácidos nucleicos, e também no controle de alguns processos celulares através da regulação da quantidade de alguma determinada

proteína. Quando os cientistas descobriram esse sistema e seu funcionamento fizeram adaptações para utilizá-lo para outras funções ou induziram esse sistema a trabalhar conforme o interesse do pesquisador.

A maquinaria envolvida no RNAi começa a funcionar a partir do momento que são detectadas dentro das células outras estruturas de RNA, os RNA dupla fita (dsRNA). Quando esse dsRNA é detectado pela maquinaria de RNAi, é picotado em vários pedaços menores e uma dessas duas fitas é incorporada na maquinaria de RNAi. Esse complexo, denominado siRNA (RNA de pequena interferência), passa a ser então o identificador de sequências homólogas em outros RNAs mensageiros (mRNA), que são aqueles que levam a informação para a formação de proteínas. Quando ocorre a complementariedade entre eles, o mRNA é degradado, tendo como resultado a falta ou reduzida tradução, isto é, a redução da quantidade da proteína e, em consequência a ausência ou redução da expressão do gene que originou o mRNA. É, portanto, um processo de silenciamento gênico.

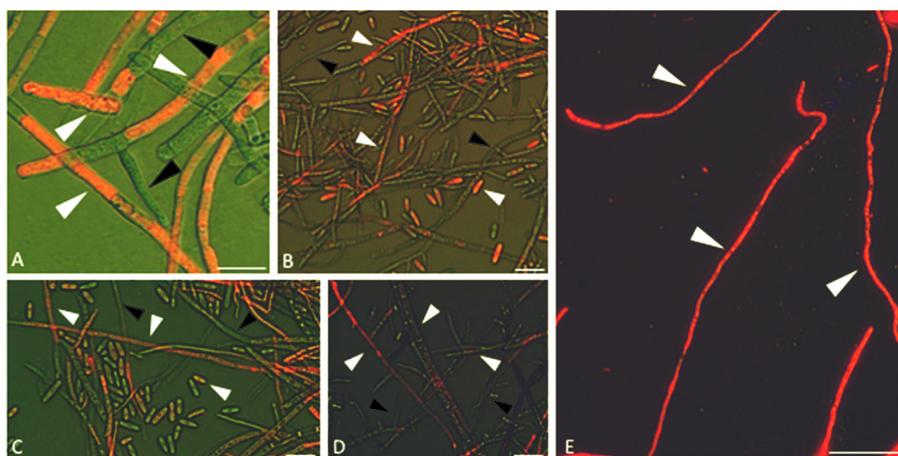
Dessa forma, para que uma proteína dentro da célula seja formada em menor quantidade é necessário que um dsRNA complementar ao mRNA, que formará a proteína, esteja dentro da célula. Assim, a própria maquinaria de silenciamento da célula fará o trabalho. A partir disso, os esforços dos cientistas são como formar ou inserir esse dsRNA dentro das células e quais serão os alvos que se deseja silenciar.

Várias abordagens são utilizadas para a definição dos alvos. Em alguns casos, podem ser usados alvos já conhecidos como eficientes para o controle do patógeno, como por exemplo, os mesmos alvos onde agem pesticidas.

Nesse contexto, pesquisa desenvolvida no Centro de Citricultura Sylvio Moreira busca avaliar o funcionamento desse sistema da RNAi no fungo *Colletotrichum abscissum*, causador da podridão floral dos citros, para que as novas tecnologias baseadas em RNAi possam ser testadas para os estudos e controles dessa doença.

Inicialmente, busca-se a comprovação de que o patógeno possui a maquinaria de RNAi, ou seja, se ele seria capaz de reconhecer dsRNA, processar e induzir o silenciamento de um alvo conhecido. Como prova de conceito foi utilizado um *C. abscissum* transformado geneticamente para produzir uma proteína que emite fluorescência vermelha, facilmente identificável em microscopia. Fornecendo-se o dsRNA homólogo ao gene da proteína vermelha foi comprovado que houve silenciamento desse gene, avaliado pela redução na quantidade de proteína vermelha produzida pelo fungo.

Com esse resultado, comprovou-se que é possível a aplicação de diferentes estratégias baseadas na tecnologia de RNAi tanto para estudos como para controle desse fungo. A partir disso, ainda como parte do mesmo projeto, a mesma estratégia foi aplicada para o silenciamento de outros genes alvos,



Silenciamento via RNAi da proteína vermelha DsRed, visualizadas ao microscópio de fluorescência. As setas pretas indicam as regiões onde houve silenciamento e as brancas onde não houve. A a D são de diferentes *C. abscissum* que apresentam silenciamento. E é o controle positivo, que não teve indução de silenciamento.

Editorial

Perspectivas para a ciência brasileira

Tem crescido as manifestações da comunidade de ciência e tecnologia sobre os profundos cortes orçamentários feitos pelo Governo Federal ao setor de pesquisa, ensino e desenvolvimento. Com cerca de 40% de corte em relação aos anos anteriores e com a lei de tetos nos gastos públicos, que não permite ampliar o orçamento em relação ao ano anterior, as perspectivas não são boas. Capes e CNPq já refletem essa redução orçamentária neste ano.

Já é amplamente conhecido o exemplo de países que priorizam os aspectos relacionados à educação e pesquisa científica e em como eles promovem avanços que beneficiam toda a sociedade. Por outro lado também, já é conhecido como os espasmos orçamentários no Brasil, associado ao baixo investimento do setor privado em P&D, comprometem nossa competitividade e até nossa credibilidade internacional. Basta mencionar que poucas são as empresas que efetivamente investem em pesquisa fundamental para avanço de conhecimento. Quando se buscam parcerias nessas áreas, empresas reconhecidamente investidoras em pesquisa, como as conhecidas multinacionais de defensivos, não parecem ter capacidade de decisão no Brasil e aguardam aprovação de seus setores de P&D em suas sedes.

Como principal apoiador do setor de P&D, os recursos públicos, principalmente os de origem federal, sofrem os espasmos regulares, muitas vezes representados por programas bem intencionados, como PADCT, Pronex, Institutos do Milênio e INCTs, concebidos inicialmente para não terem solução de continuidade. A realidade demonstra que a própria existência de diferentes programas comprova a falta de continuidade. Portanto, não é de espantar que importantes atividades sejam abandonadas ou descontinuadas.

Sem dúvida alguma, o principal prejuízo para todo o setor de ciência e tecnologia reside na formação deficiente de pesquisadores que em futuro próximo poderiam assumir lideranças. É um círculo vicioso com moto contínuo, principal reflexo dessas políticas para o País ou da falta delas. Infelizmente o setor não tem nenhuma liderança que o possa defender no Congresso Nacional.

Como parte integrante do setor de ciência e tecnologia o Centro de Citricultura tem mantido suas atividades apoiados pelas agências de fomento, principalmente graças à qualificação de sua equipe e à importância dos temas aqui desenvolvidos. Isso tem permitido que seus pesquisadores aprovem seus projetos junto à Fapesp, sem dúvida alguma, um diferencial no financiamento de P&D no Brasil.

Desse modo, embora o Estado de São Paulo conte com a eficiência e qualidade da Fapesp, é lamentável verificar que os rumos do setor de ciência e tecnologia no Brasil estão a mercê de políticos e da falta de políticas de continuidade.

Matéria de Capa

principalmente genes alvos de fungicidas químicos utilizados comercialmente e que agem bloqueando a respiração das células do fungo, induzindo-o a morte. Assim como aconteceu com o silenciamento da proteína vermelha foi verificado que houve também diminuição desses novos alvos, tornando-se promissores para utilização no controle do patógeno.

Tecnologias baseadas em RNAi já começam a ser uma realidade, mas existe muito potencial de aplicação na agricultura, como relatado em um artigo de dois cientistas alemães (A. Koch e K. Kogel) intitulado “New wind in the sails: improving the agronomic value of crop plants through RNAi-mediated gene silencing”, no qual eles discorrem sobre o aumento do valor agrônomo nas culturas através da tecnologia de RNAi. Isso provavelmente ocorrerá também na citricultura e, com os resultados relatados aqui e por outros do grupo de pesquisadores do Centro de Citricultura, há fortes indícios que essa tecnologia poderá ser eficientemente aplicada para controle de patógenos e vetores de doenças que acometem os citros.

Notas

Visitas ao Centro

No dia 10 de outubro representantes da empresa espanhola de biotecnologia Biomass Booster - BMB (www.biomassbooster.es) estiveram em visita no Centro de Citricultura com objetivo de apresentar um produto biotecnológico obtido pela empresa. Segundo seu Diretor Científico, Alfredo Martínez Rodriguez, o gene patenteado BMB-707, que codifica uma adrenomedulina de mamíferos, quando clonado em plantas resultou num incremento de até 21% na biomassa produzida. A empresa busca por parceiros para testes usando construções deste gene e clonagem em diferentes espécies vegetais, inclusive citros.

O Grupo de Nutrição de Citros do Centro de Citricultura recebeu a visita do Diretor Adjunto no Brasil do International Plant Nutrition Institute (INPI), Valter Casarin, acompanhado da Gerente de Comunicações do IPNI nos Estados Unidos, Abena Williams e do Vice Presidente da PAQ Interactive, também dos Estados Unidos, Quentin Rund, no último dia 10

de outubro. Na oportunidade, discutiram os resultados mais recentes de projetos coordenados pelos Pesquisadores Dirceu Mattos Jr e Rodrigo Marcelli Boaretto, cuja contribuição suporta os preceitos 4R's (fertilizante certo, dose certa, local certo na época certa) amplamente divulgado pelo IPNI para a manutenção da sustentabilidade da agricultura mundial. Os visitantes ainda conheceram as novas instalações do Laboratório de Fisiologia e Nutrição dos Citros do Centro de Citricultura que deverão estar disponíveis para outros trabalhos em breve. Visitaram ainda o projeto de cultivo de citros protegido coordenado pelo Pesquisador Sergio Alves Carvalho. Ao final do encontro firmaram intenção de ampliação das relações entre o IPNI e o Centro de Citricultura para divulgação mais ampla desses trabalhos.

No dia 24 de outubro, alunos do último ano do curso de Ciências Biológicas, da Unesp Rio Claro, realizaram uma visita técnica ao Centro de Citricultura onde foram recebidos pela Pesquisadora Raquel L. Boscariol Camargo, que apresentou os trabalhos em Biotecnologia desenvolvidos pelo grupo de pesquisadores do Centro, com ênfase em transformação genética.

Participação em Bancas

A Pesquisadora Mariângela Cristofani-Yaly participou no dia 23 e 24 de outubro como membro titular dos exames de Qualificação de Willian Naves Duarte e Cesar Augusto Zanello, discentes do Programa de Pós Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados, da UFSCar, *campus* de Araras. Os trabalhos apresentados respectivamente foram: “Propagação de amoras dos gêneros *Rubus* e *Morus*” e “Propagação *in vitro* de orquídeas *Phalaenopsis* por segmentos foliares e de inflorescências.

Palestra Nanocell

O Pesquisador Marcos Antonio Machado proferiu palestra no dia 18 de outubro no evento ‘Novas Vertentes Biotecnológicas para o Desenvolvimento Tecnológico-Social do Brasil’, organizado pelo Instituto Nanocell (www.institutonanocell.org), no Instituto de Química da USP, em São Paulo. Com o tema “Biotecnologia em citros e na citricultura” a palestra versou sobre os progressos e desafios da aplicação da biotecnologia para avanços no conhecimento científico e tecnológico de citros.

Participação em Eventos

Nos dias 17 e 31 de outubro o Pesquisador Fernando Alves de Azevedo proferiu aulas sobre planejamento, implantação e tratamentos culturais para citros, aos alunos da Universidade Federal de São Carlos, na disciplina de Fruticultura, dos cursos de Agroecologia e Agronomia, respectivamente.

O aluno de doutorado Rodrigo Martinelli, orientado pelo Pesquisador Fernando Alves de Azevedo, foi convidado pelo governo francês e pelo INRA para proferir palestra sobre seu trabalho de mestrado e doutorado, intitulado “Roçagem ecológica com *Urochloa* spp.: opção de manejo integrado de plantas daninhas que promove a agricultura de conservação em citros”, no CIAG (Carrefours de l’Innovation Agronomique). O evento ocorreu em Macouria, na Guiana Francesa, de 23 a 24 de outubro e reuniu mais de 200 pessoas, entre produtores rurais, pesquisadores e autoridades do governo francês.

Ainda no mês de outubro, no dia 27, o doutorando Rodrigo Martinelli participou do I Workshop de Fruticultura em Jaíba, MG, promovido pela ASLIM (Associação de Produtores de Limão e outras frutas). Na oportunidade proferiu a palestra “Manejo de plantas de cobertura do solo na sustentabilidade da citricultura” para cerca de 200 participantes, desde produtores rurais até pesquisadores.

Em 25 de outubro, a Pós-doutoranda do Centro de Citricultura, Maria Andreia Nunes apresentou o trabalho “Transmission specificity of plant viruses by *Brevipalpus* mites and RNAi approach” no 9th Spider Mite Genome Meeting, em Logroño, La Rioja, Espanha. Nesse evento pesquisadores de diversos países como Brasil, Espanha, França, Bélgica, Canadá, Japão, Dinamarca entre outros apresentaram trabalhos nas áreas de genômica, interação planta-ácaro, ecologia e manejo integrado de pragas.

Decreto Nº 62.817, de 04/09/17

Com organização da Fundação de Apoio à Pesquisa Agrícola (Fundag) foi realizado a mesa redonda sobre novas diretrizes dadas pelo Decreto nº 62.817, de 4 de setembro de 2017, do Governo do Estado de São Paulo. O decreto regulamenta as ações dos órgãos de fomento, instituições privadas e instituições científicas, tecnológicas e de inovação do Estado com os núcleos de inovação tecnológica das instituições públicas. De modo geral, ele representa um avanço no estabelecimento de procedimentos legais no relacionamento entre diferentes parceiros do setor de P&D e a iniciativa privada. O foco do decreto é a inovação tecnológica.

Treinamento em Pulverização

No dia 3 de outubro Marcelo Scapin, Pesquisador do Fundecitrus, esteve no Centro de Citricultura ministrando treinamento sobre tecnologia de aplicação de produtos fitossanitários para pesquisadores, técnicos e estudantes. Na oportunidade ele demonstrou os procedimentos para a regulagem de turbos pulverizadores e a forma de avaliar a eficiência da aplicação. Mostrou também o aplicativo SPIF (Sistema de Pulverização Integrado do Fundecitrus) que auxilia na regulagem e escolha de pontas de pulverização. As técnicas apresentadas são importantes para obtenção de melhores resultados e garantia de eficiência no controle de doenças e pragas, além da diminuição do risco de contaminação ambiental por usar produtos fitossanitários de forma mais eficiente.

Reunião Comissão Técnica

A Comissão Técnica de Citricultura, presidida pelo Pesquisador Marcos Antonio Machado reuniu-se no Centro de Citricultura no dia 23 de outubro para discutir as minutas de portaria para o setor de mudas de citros no Estado. Na oportunidade foram feitas sugestões de ajustes da nova legislação em consonância com a legislação federal definida na IN 48 do MAPA. A nova legislação deverá regulamentar, a nível estadual, aspectos relacionados a Plantas Básicas, Plantas Matrizes, Borbulheiras, Viveiros e Metodologia de Coleta de Material de Citros, para análises.

Tangerina Maria é destaque nacional

A tangerina Maria, a primeira cultivar de tangerina genuinamente brasileira e obtida pelo Programa de Melhoramento de Citros do Centro de Citricultura foi destaque na edição do dia 21 de outubro no Jornal Nacional. Com informações fidedignas e edição primorosa a reportagem destacou a trajetória do trabalho de obtenção dessa cultivar, híbrido entre tangor Murcott e laranja Pera. Como cultivar protegida pelo MAPA a tangerina Maria inicia agora sua fase de expansão a produtores credenciados pelo Centro. Reveja a reportagem no Portal G1 da Rede Globo (<http://g1.globo.com/jornal-nacional/noticia/2017/10/primeira-tangerina-brasileira-ganha-registro-do-ministerio-da-agricultura.html>).

Pesquisa

Redução de juvenildade em porta-enxertos de citros através da transgenia

A maioria das plantas lenhosas perenes apresenta um período prolongado de juvenildade, durante o qual a parte aérea da planta produz somente ramos vegetativos. Em *Citrus* este período pode variar de 5 a 10 anos, o que dificulta o melhoramento genético e estudos relacionados à fase produtiva da planta.

No processo de florescimento está envolvida uma complexa rede de genes que é compartilhada entre diferentes espécies. Sinais florígenos universais controlados pelo gene *Flowering Locus T* (FT) de *Arabidopsis*, *Single Flower Truss* (SFT) de tomate e seus ortólogos em outras espécies já foram identificados como responsáveis pelo florescimento. Este sinal, denominado florígeno, é transmissível por enxertia e pode induzir o florescimento em copas.

Através da superexpressão do gene responsável pela produção do florígeno em tomate (SFT) por meio da transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens*, utilizando diferentes porta-enxertos de citros, foi possível induzir o florescimento em plantas ainda na fase de regeneração *in vitro*. Porta-enxertos citrange Carrizo, limão Cravo e citrumelo Swingle transformados a partir de segmentos de epicótilo de plantas juvenis, apresentaram florescimento em média 60 dias após o processo de transformação. As plantas foram aclimatizadas e transferidas para casa de vegetação onde mantiveram o florescimento e, em alguns casos, formaram frutos. Os resultados mostraram que o gene SFT de tomate que codifica o florígeno é conservado entre espécies e que também em citros é o responsável pela indução do florescimento, mesmo em material juvenil. As respostas fenotípicas da planta estão sendo monitoradas, assim como a alteração na expressão em outros genes da via do florescimento que podem interagir com o transgene inserido.

Os porta-enxertos transgênicos obtidos receberão a enxertia de copas juvenis, para verificar se há translocação do florígeno para estas e indução do florescimento, o que pode facilitar o estudo de características fenotípicas e acelerar etapas do melhoramento genético de citros.

Raquel Luciana Boscaroli-Camargo

Pesquisa Aplicada

Respostas de plantas cítricas com HLB aos tratamentos com agentes antioxidantes

Estudos vêm sendo realizados procurando-se entender os possíveis efeitos benéficos de agentes antioxidantes e bactericidas, como o N-acetilcisteína (NAC) em plantas com HLB. Devido à presença do grupo tiol em sua estrutura, o NAC tem alto potencial de aceitar elétrons livres, inativando espécies reativas do metabolismo do oxigênio (ROS) diretamente ou indiretamente, através do fornecimento de cisteína para a síntese e produção de enzimas antioxidantes do ciclo da glutatona/ascorbato, eliminando desta forma os agentes causadores do estresse oxidativo.

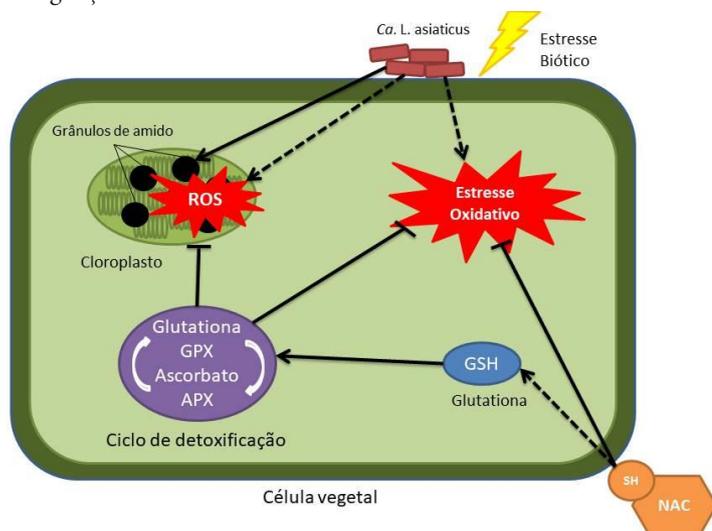
Enzimas antioxidantes estão estritamente relacionadas à ativação de mecanismos de defesa contra patógenos. O favorecimento de um meio celular livre de estresse oxidativo e o aumento da atividade dessas enzimas poderiam contribuir para uma melhor resposta da planta frente à infecção. Desta forma esta sendo conduzidos experimentos com plantas infectadas com *Candidatus Liberibacter asiaticus*-Las (agente causal do HLB), tratadas ou não com o NAC, para avaliar o efeito antioxidante desta molécula.

Foi observado, após quatro meses de tratamento, em condições de casa-de-vegetação, que tanto nas plantas infectadas com Las ou sadias houve um aumento significativo na atividade de ascorbato peroxidase (APX) e uma diminuição da atividade de catalase (CAT), quando comparadas com o controle não tratado. O favorecimento via glutatona/ascorbato está relacionada à detoxificação de ROS principalmente nas organelas membranosas como os cloroplastos.

Plantas com *Ca. L. asiaticus*, principalmente as sintomáticas, são afetadas entre outros efeitos, pelo acúmulo de amido nos cloroplastos. Sugere-se que este acúmulo de amido pode levar ao comprometimento funcional do cloroplasto, sendo esses fatores os possíveis causadores dos sintomas característicos da doença (mosqueamento e clorose). Uma maior atividade antioxidante direcionada a esta organela poderia prevenir seu comprometimento via peroxidação lipídica, possibilitando uma melhor resposta da planta frente ao patógeno. Estudos estão em andamento para melhor entendimento destes efeitos a nível de cloroplasto.

O modelo hipotético do efeito antioxidante do NAC nas células das plantas infectadas é apresentado no esquema abaixo. Frente ao estresse biótico há a produção de ROS pela planta e o acúmulo de amido nos cloroplastos, gerando estresse oxidativo. O NAC, através do grupo tiol, teria a capacidade direta de detoxificação dessas espécies reativas, além de influenciar indiretamente, servindo de fonte de cisteína para a síntese de glutatona (GSH), um tripeptídeo chave para a detoxificação via enzimas do ciclo glutatona/ascorbato (GPX/APX), que agiriam diretamente ao nível de cloroplasto.

É importante salientar que embora tenham sido observadas respostas positivas na produção de enzima relacionada a detoxificação de ROS ao nível de cloroplasto em plantas com *Ca. L. asiaticus*, ainda não se conhece se este processo seria suficiente para atenuar os efeitos HLB sobre as plantas e principalmente sobre a produção de frutos. Experimentos são necessárias para averiguação destes efeitos.



Modelo ilustrativo sobre o estresse oxidativo ocasionado por *Ca. L. asiaticus* nas células e ação direta e indireta do NAC quanto a detoxificação de ROS.



Expediente

Informativo Centro de Citricultura

Conselho Editorial

José Dagoberto De Negri
Marcos Antonio Machado
Vivian Michelle dos Santos

Colaboração

Dirceu de Mattos Jr
Fernando Alves de Azevedo
Eduardo Henrique Goulin
Helvécio Della Coletta Filho
Maria Andreia Nunes
Mariangela Cristofani-Yaly
Marinês Bastianel
Raquel Luciana Boscarior-Camargo

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

www.ccsm.br
informativo@ccsm.br

Mala Direta Básica

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

