

Avanços

Biotecnologia gera produtividade e citros saudios

Gustavo Astua-Monge, Juliana Freitas-Astua e Marcos Antonio Machado *



MATTHEI MARTINO FOLIA/IMAGEM

Produção de frutos saudios por processos biotecnológicos; Araras, SP, 1995

A citricultura é uma das mais importantes agroindústrias do Brasil, respondendo por um faturamento anual da ordem de US\$ 1,5 bilhão. Porém, a produtividade média de 22 t/ha é considerada muito baixa, se comparada à de outros países produtores, como os Estados Unidos. Esse índice justifica-se, em parte, pela expansão simultânea de pragas e doenças e à estreita base genética utilizada. Grande parte da produção de laranjas doces – 93% – é apoiada em apenas quatro variedades – Pêra, Valência, Natal e Hamlin –, com o agravante de utilizar como porta-enxerto poucas espécies, como o limão Cravo (80%) e a tangerina Cleópatra (10%). Portanto, não é surpresa constatar que os desafios da atual citricultura estão quase todos associados a problemas de ordem fitossanitária. As principais doenças limitantes à cultura incluem a clorose variegada dos citros (CVC), o cancro cítrico, a leprose, a tristeza, a morte súbita (MSC), a mancha preta e, mais recentemente, o amarelão ou *huanglongbing* (*greening*).

A biotecnologia consiste no desenvolvimento e aplicação em larga escala (transferência para o setor produtivo) dos avanços científicos e tecnológicos, resultantes de pesquisas em ciências biológicas. Ao longo da história da citricultura, a biotecnologia tem contribuído ativamente no avanço tecnológico dessa atividade, especialmente no controle de doenças. Dentre suas principais contribuições, destacam-se a proteção cruzada (pré-imunização) contra a tristeza, a indexação e limpeza clonal de vírus e viróides, o desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico, a geração de variedades resistentes, a partir de técnicas envolvendo cultura de tecidos e, mais recentemente, o sequenciamento do genoma de citros e de seus patógenos, em combinação com o desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas.

Uma técnica inovadora que pode ser considerada precursora da biotecnologia no controle de doenças em citros é a

pré-imunização, utilizada no controle do vírus da tristeza dos citros (*Citrus tristeza virus* – CTV). Como consequência dos problemas causados pela tristeza, que resultaram na morte de milhões de árvores na primeira metade do século XX, a partir da década de 1950, pesquisadores do Instituto Agrônomo (IAC), em colaboração com colegas norte-americanos, iniciaram os trabalhos visando a encontrar alternativas para o controle da doença, através da utilização de isolados fracos do vírus com efeito protetor contra raças severas. Essa estratégia, associada à substituição por porta-enxertos tolerantes, mostrou-se bastante promissora. No entanto, foi apenas na década de 1960 que isolados coletados das chamadas “plantas elites” apresentaram resultados satisfatórios de proteção.

Plantas elites eram as que permaneciam assintomáticas ou apresentavam poucos sintomas de tristeza, enquanto outras do mesmo talhão desenvolviam sintomas severos da doença. Um desses isolados, obtido a partir de uma laranjeira Pêra e posteriormente denominado “Pêra IAC”, apresentou grande efeito protetor, tendo esse clone sido utilizado em borbulheiras e amplamente distribuído no Estado de São Paulo, além de outros Estados do país. No final da década de 1990, era estimada a existência de mais de 80 milhões de laranjeiras pré-imunizadas no Brasil (Muller et al., 1999) e, há 35 anos, o isolado “Pêra IAC” é utilizado com sucesso na citricultura paulista. Embora tenha sido feita inicialmente de forma empírica, a proteção cruzada revelou-se um modelo extremamente interessante de estudo da interação planta/patógeno, em nível molecular.

O diagnóstico preciso de doenças é de fundamental importância na prevenção de danos significativos na produção. Através de trabalhos dos principais institutos de pesquisa e universidades do Brasil e do exterior, atualmente é possível obter o diagnóstico preciso e confiável de quase todas as principais doenças dos

citros. Assim, testes sorológicos, como o ELISA, são utilizados para a diagnose da tristeza, e testes moleculares, como PCR e RT-PCR, foram desenvolvidos para a detecção das bactérias causadoras do cancro, CVC e *Huanglongbing* (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, *Xylella fastidiosa* e *Candidatus Liberibacter* spp., respectivamente), os vírus da tristeza e da leprose (*Citrus leprosis virus* – CiLV) e o fungo *Guignardia citricarpa*, causador da mancha preta. Outras doenças, como a gomose dos citros, causada por *Phytophthora* sp., são ainda diagnosticadas com base nos sintomas e cultivo *in vitro*. Porém, o Centro APTA Citros Sylvio Moreira já está desenvolvendo métodos moleculares para o diagnóstico dessa doença.

Já vírus menos prevalentes, como o da sorose, ou viróides, como os da exocorte e cachexia/xiloporose, são muito mais difíceis de serem detectados. A dificuldade no desenvolvimento de testes moleculares sensíveis satisfatórios para a sua detecção acontece porque costumam apresentar baixa concentração nos tecidos, que é comumente dependente de condições climáticas como temperatura e umidade. Além disso, muitos desses patógenos encontram-se distribuídos de forma irregular nos tecidos, o que dificulta a retirada de amostras para a execução de testes. Some-se a essas características o fato de que, com alguma frequência, vírus e viróides em citros não induzem o aparecimento de sintomas em determinadas condições climáticas e combinações copa/porta-enxerto, e pode-se imaginar o problema encontrado para sua detecção. Assim, a indexação biológica ainda é uma ferramenta útil para a diagnose, especialmente de enfermidades causadas por patógenos para os quais não há métodos moleculares adequados para a detecção. Através da inoculação de hospedeiros altamente suscetíveis, geralmente relacionados a citros, é possível aumentar a concentração do patógeno e então proceder sua detecção, seja atra-

vés de testes moleculares, ou apenas pela análise de sintomas típicos apresentados pelo hospedeiro suscetível.

TÉCNICAS DE DIAGNOSE

A diagnose de doenças é extremamente importante para a produção de citros, porque é a partir da utilização de material sadio que se forma uma boa citricultura. Assim, especialmente materiais utilizados para a propagação de borbulhas (matrizes) devem ser livres de quaisquer patógenos. Portanto, a limpeza clonal por microenxertia e sem indução de rejuvenescimento é, sem dúvida alguma, uma aplicação da biotecnologia com conseqüências bastante positivas na citricultura atual. Sua importância se deu, em particular, num passado recente, quando acessos de materiais extremamente importantes comercialmente encontravam-se infectados por vírus e, mais comumente, viróides. Através das técnicas de termoterapia e, principalmente, microenxertia, associadas a posterior pré-imunização contra a tristeza, muitos desses acessos foram limpos e puderam ser multiplicados e reintroduzidos na citricultura, resultando num avanço significativo da citricultura paulista e brasileira, e levando ao que hoje conhecemos como uma citricultura moderna e de vanguarda.

As maiores contribuições da biotecnologia no controle de doenças foram realizadas através de suas aplicações no melhoramento genético. Tradicionalmente, a variabilidade natural existente dentro de uma espécie ou grupo de espécies é utilizada na identificação de características de importância agrônômica, como a resistência a doenças, as quais podem ser transferidas a variedades comerciais, através de técnicas de melhoramento genético convencional. O sucesso de qualquer programa de melhoramento depende principalmente da existência dessas características na população e da possibilidade biológica de transferi-las a outros membros do grupo, por meio de cruzamentos.

No caso de citros, dificuldades de ordem botânica e genética dentro do grupo, tais como esterilidade, incompatibilidade sexual, poliembrionia, embrionia nucelar e alta heterozigosidade têm limitado a produção de novos cultivares através de estratégias de melhoramento genético convencional. Além disso, em alguns casos, a variabilidade natural não é suficiente para identificar fontes de resistência natural para doenças como o cancro cítrico ou o *huanglongbing*. A biotecnologia já contribuiu significativamente e deverá contribuir ainda mais na solução desses problemas, por meio da implementação de ferramentas como a hibridação somática, a variação somaclonal, a manipulação de ploidia (número de cromossomos) e a transformação genética que permitem a geração de variabilidade e facilitam a transferência de genes específicos, em alguns casos, sem carregar consigo o efeito de genes indesejáveis ou deletérios, como é usual no melhoramento tradicional.

A hibridação somática é realizada através da fusão de protoplastos e subsequente regeneração *in vitro* de plantas. Tais fusões podem ser realizadas com parentais sexualmente compatíveis ou incompatíveis e, em combinação com a manipulação de ploidia, podem aumentar a variabilidade genética e as possibilidades de combinações promissoras. No Brasil, a hibridação somática é utilizada para o melhoramento de diversos cultivares de porta-enxertos, com o propósito de gerar híbridos com resistência a CTV, MSC e declínio (Mourão Filho, 2002). Programas similares ao brasileiro são também desenvolvidos em outros países, como Estados Unidos, França, Japão, Espanha e Israel.

Os primeiros trabalhos sobre cultivo de tecidos das diferentes espécies e variedades de citros datam do final da década de 1950, os quais foram seguidos por um grande número de estudos que até hoje já definiram sistemas de cultivo *in vitro* utilizando calos, células em suspensão, embriogênese somática,

organogênese e isolamento e cultivo de protoplastos. No início da década de 1980, o termo variação somaclonal foi introduzido para definir a variabilidade genética observada em plantas reproduzidas através de cultura de tecidos. Desde então, múltiplos relatos descreveram os efeitos da variação somaclonal em características como altura da planta, juvenilidade, produtividade e resistência a doenças. Vários programas de melhoramento, em países como os Estados Unidos, já incorporaram a utilização da variação somaclonal no melhoramento de variedades de copa e porta-enxertos. O potencial da técnica e a relativa facilidade com que tais variantes são gerados fazem com que sua implementação seja desejável para a obtenção de variantes resistentes ou tolerantes às diferentes doenças que afetam a citricultura moderna.

Dentre as contribuições da biotecnologia no controle de doenças, a transformação genética talvez seja uma das mais importantes alternativas, não só para acelerar o processo de melhoramento genético tradicional, mas também para maximizar a utilização das informações genômicas geradas pelos programas de seqüenciamento. O primeiro relato de transformação genética de citros vem do final da década de 1980, quando o DNA foi introduzido com sucesso diretamente em protoplastos de laranja doce. Atualmente, a maioria dos trabalhos realizados utiliza a bactéria *Agrobacterium tumefaciens* como veículo para a introdução de genes em espécies cítricas.

No controle de doenças, a maior parte dos progressos obtidos baseia-se na resistência derivada do patógeno, a qual consiste na expressão de partes de seu genoma, principalmente quando se trata de vírus, nas plantas geneticamente modificadas. Plantas transgênicas de laranjas doce e azeda, limão galego e pomelo expressando o gene da capa protéica do vírus da tristeza foram desenvolvidas com o propósito de obter resistência ao vírus

homólogo. O gene que codifica a replicase do vírus também foi utilizado na modificação genética de citros. Os resultados desses trabalhos, apesar de promissores, ainda estão em avaliação.

Devido às limitações associadas à resistência derivada do patógeno, alta especificidade e durabilidade desconhecida, estratégias alternativas foram implementadas. Plantas de pomelo foram transformadas com o gene *gna*, o qual codifica uma proteína conhecida como aglutinina, tóxica contra o afídeo vetor do vírus da tristeza. No Brasil, o gene que codifica uma toxina com reconhecido efeito antibacteriano, a sarcotoxina IA, foi utilizado com sucesso na transformação de laranja doce cultivar Pêra. As plantas transgênicas dessa variedade mostraram um aumento significativo da resistência ao cancro cítrico, em testes realizados em casa de vegetação.

Outra abordagem consiste na utilização de genes de plantas com funções associadas à resistência a doenças na transformação genética de citros. A esse respeito, Fagoaga et al. (2001) introduziram o gene que codifica a proteína PR-5 de tomate em laranja doce cultivar Pineapple. As plantas transgênicas mostraram-se resistentes à *Phytophthora citrophthora*. Mais recentemente, plantas de laranja doce das variedades Hamlin, Valência e Pêra foram transformadas com os genes *Xa21* e *attA*, os quais codificam, respectivamente, uma proteína relacionada com resistência a *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* e outra com atividade antibacteriana conhecida como atacina A (Boscariol, 2004). Atualmente, tais plantas estão sendo avaliadas com respeito à sua capacidade de resistir a infecções com *Xylella fastidiosa* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, causadoras do CVC e cancro cítrico, respectivamente.

Com o advento do seqüenciamento em grande escala e a disponibilidade de equipamentos mais rápidos e eficientes, o mapeamento de genomas de organismos vivos é hoje uma realidade. O Brasil foi

o primeiro país a seqüenciar o genoma de uma bactéria fitopatogênica, *Xylella fastidiosa*, e é hoje o líder mundial no seqüenciamento do genoma de citros (Instituto do Milênio/CNPq/MCT). Apesar do caráter preliminar das informações genômicas, a disponibilidade da seqüência completa do genoma das bactérias causadoras do cancro cítrico e da CVC tem contribuído ao entendimento dos

principais mecanismos de patogenicidade desses microrganismos, facilitando assim o desenvolvimento de novas estratégias para o controle de doenças. Os resultados decorrentes dessas informações estão em fase de desenvolvimento e, em poucos anos, novas tecnologias derivadas dessas informações estarão disponíveis para os produtores e a indústria.

Material vegetal de citros cultivado in vitro, Laboratório de Biotecnologia de Plantas Hortícolas, Departamento de Produção Vegetal USP ESALQ, 2004



PAULO SOARES/USP ESALQ



Plântulas de citros cultivadas em meio específico. Laboratório de Biotecnologia de Plantas Hortícolas, Departamento de Produção Vegetal USP ESALQ, 2004

NOVOS BIOPESTICIDAS

As informações geradas pelo seqüenciamento do genoma de patógenos e plantas já produziram resultados com aplicações práticas. Graças aos conhecimentos adquiridos dos mecanismos de patogenicidade de bactérias, vírus e fungos e ao descobrimento das rotas metabólicas envolvidas na resistência de plantas a patógenos, uma nova geração de biopesticidas foi desenvolvida. Esses biopesticidas, ao contrário dos pesticidas tradicionais, não agem diretamente nos patógenos, mas induzem a ativação dos mecanismos naturais das plantas responsáveis pela resistência a doenças. Compostos como benzothiadiazoles, ácido salicílico e a proteína harpin já foram identificados como indutores de resistência a doenças. Nos últimos anos, vários biopesticidas derivados desses compostos têm sido comercializados, visando a controlar doenças de maneira

menos nociva ao ambiente e ao homem, além de acarretar menor risco de desenvolvimento de resistência dos patógenos. Apesar de recomendados a citros, alguns testes iniciais com harpin (Messenger®) e acibenzolar (Bion®) não se mostraram efetivos para o controle do cancro cítrico no Brasil (Graham e Leite Jr., 2004). Já para o controle de doenças fúngicas, como verrugose, melanose e mancha de alternaria, vários produtos indutores de resistência foram testados e, em geral, resultaram em níveis de controle intermediários, sendo melhores que as testemunhas e geralmente inferiores ao controle químico tradicional (Agostini et al., 2003).

Como resultado dos esforços realizados pela equipe do laboratório de Biotecnologia do Centro APTA Citros Sylvio Moreira, iniciou-se em 2002 um programa de pesquisa do Instituto do Milênio, financiado pelo CNPq/MCT,

focalizando diferentes aspectos relacionados ao seqüenciamento do genoma de citros. O projeto inclui o seqüenciamento de diferentes variedades de laranja e tangerina, além de lima ácida Tahiti, Kunquat, laranja azeda, limão galego, lima da Pérsia, limão cravo, e *Poncirus* spp. A abordagem escolhida teve como foco principal a identificação e caracterização das respostas das plantas ao ataque de patógenos importantes na citricultura e também a estresses de natureza abiótica, como seca e toxidez. Até o momento, mais de 195 mil seqüências já foram produzidas, das quais aproximadamente 55 mil representam seqüências únicas. Dentre os genes identificados, destacam-se os relacionados com resistência a doenças e pragas (>1000), resistência à seca e outros relativos a diferentes características qualitativas do fruto e do suco, tais como cor, teor nutricional e acidez, entre outros.

Das comparações realizadas, os perfis de expressão de milhares de genes foram caracterizados em plantas de citros afetadas por CVC, tristeza, cancro, leprose e gomose. As informações obtidas através dessas comparações servirão para aprofundar o conhecimento das respectivas doenças e desenvolver novas e mais eficientes alternativas de controle. Como consequência direta do projeto, cabe também ressaltar as contribuições realizadas na área de melhoramento genético, especialmente as relacionadas com o desenvolvimento de marcadores moleculares e a saturação de mapas genéticos. Atualmente, mais de 65 mil marcadores moleculares candidatos do tipo microssatélites (SSR) e mais de 3000 do tipo SNP já foram identificados e se encontram na fase de validação. O desenvolvimento de marcadores moleculares e a saturação de mapas genéticos permitirão o desenvolvimento de ferramentas de certificação genética mais sensíveis, ao mesmo tempo em que facilitarão a clonagem e transferência de genes de importância comercial.

O histórico da biotecnologia na citricultura diz muito sobre seu papel no desenvolvimento de diferentes estratégias para o controle de doenças em citros. Porém, o futuro parece ainda mais promissor. A história recente de aplicação da biotecnologia mostrou que suas ferramentas são tão mais úteis quanto mais difícil e demorado é o programa de melhoramento de uma espécie. Com o início da revolução do gene e os resultados obtidos recentemente nas áreas de genômica e transformação genética de citros, as fronteiras da citricultura serão expandidas além do que hoje podemos prever. Os desafios futuros serão maiores e mais difíceis, mas, quaisquer que sejam os problemas por vir, a única certeza que podemos ter é que a biotecnologia sempre será uma importante aliada na defesa de nossos pomares e no desenvolvimento da citricultura brasileira e mundial. 

Gustavo Astua-Monge e Marcos Antonio Machado são pesquisadores do Centro APTA Citros Sylvio Moreira do IAC (gamo@centrodecitricultura.br) e (marcos@centrodecitricultura.br); **Juliana Freitas-Astua** é pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo (jfastua@centrodecitricultura.br)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGOSTINI, J. P., BUSHONG, P. M., TIMMER, L. W. Greenhouse evaluation of products that induce host resistance for control of Scab, Melanose, and alternaria brown spot of Citrus. *Plant Disease*, v. 87, p. 69-74, 2003.
- BOSCARIOL, R. L. Transformação genética de laranja doce com os genes *manA*, *atacina A* e *Xa21*. 2004. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo, 2004.
- GRAHAM, J. H., LEITE JR., R. P. Lack of control of Citrus Canker by induced systemic resistance compounds. *Plant Disease*, v. 88, n. 7, p. 745-750, 2004.
- FAGOAGA, C., RODRIGO, I., CONEJERO, V., HINAJEROS, C., TUSET, J.J., ARNAU, J., PINA, J.A., NAVARRO, L., PEÑA, L. Increase tolerance to *Phytophthora citrophthora* in transgenic

orange plants constitutively expressing a tomato pathogenesis related protein PR-5. *Molecular Breeding*, 7. p. 175-185, 2001.

MOURÃO FILHO, F. A. A. Hibridação somática para melhoramento de porta-enxertos em São Paulo. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE CITROS, 7. Bebedouro, SP, Brasil: Melhoramentos, 2002. p. 134.

MULLER, G. W., TARGON, M. L. P. N., MACHADO, M. A. Trinta anos de uso do clone pré-imunizado ‘Pêra IAC’ na citricultura paulista. *Laranja*, v. 20, n. 2, p. 399-408, 1999.

Doce Prevenção.

Laranja contém vitamina C e evita a diabetes.

Reduza as chances de hiperglicemia consumindo laranja.

Tecnologia DuPont para a cultura da laranja:

Qualidade



DuPont

DuPont

Savey

Kocide

Grimectin



0800 701-0109



Os milagres da ciência*

ATENÇÃO: Este produto é perigoso à saúde humana, animal e ao meio ambiente. Leia atentamente e siga rigorosamente as instruções contidas no rótulo, na bula e na receita ou faça-o a quem não souber ler. Utilize sempre os equipamentos de proteção individual. Nunca permita a utilização do produto por menores de idade. Consulte sempre um Engenheiro Agrônomo. Venda sob receituário agrônomico.



* marca registrada DuPont. © Copyright 2003-2004, DuPont do Brasil S.A. - Todos os direitos reservados.
**Grimectin® e Kocide®: marcas registradas da Griffin Brasil e distribuídas pela DuPont do Brasil S.A.