



ACORDO DE COOPERAÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA 003/2019
QUE CELEBRAM ENTRE SI O **INSTITUTO AGRONÔMICO DO
PARANÁ**, A **FUNDAÇÃO DE APOIO À PESQUISA E O
INSTITUTO AGRONÔMICO**.

Os Partícipes, o **INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ - IAPAR**, pessoa jurídica de direito público, instituído pela Lei nº 6.292 de 29 de junho de 1972, transformado em autarquia pela Lei n.º 9.663 de 16 de julho de 1991, com sede à Rodovia Celso Garcia Cid km 375, em Londrina-PR, inscrito no CNPJ sob o nº 75.234.757/0001-49, doravante denominado simplesmente **IAPAR**, representado neste ato por seu Diretor de Pesquisa, **RAFAEL FUENTES LLANILLO**, brasileiro, engenheiro agrônomo, casado, portador da Cédula de Identidade RG nº 2.224.761-1 SSP/PR, inscrito no sob CPF nº 010.539.348-74, com endereço profissional situado na Rodovia Celso Garcia Cid, km 375, na cidade de Londrina, Estado do Paraná, nomeado por meio do Decreto Estadual nº 0085, de 09 de janeiro de 2019, publicado no Diário Oficial do Estado do Paraná, nº 10.350 da mesma data, a **FUNDAÇÃO DE APOIO À PESQUISA E AO DESENVOLVIMENTO DO AGRONEGÓCIO - FAPEAGRO**, entidade jurídica de direito privado, sem fins lucrativos, inscrita no CNPJ/MF sob o nº 01.561.218/0001-88, instituída pela Escritura Pública nº 744-N-às folhas 481, lavrado no Cartório Simoni-2º Ofício de Notas, situada na Rodovia Celso Garcia Cid km 375, Londrina-PR, doravante denominada simplesmente **FAPEAGRO**, neste ato representada pelo seu Diretor-Presidente **Heitor Rossitto Néia**, brasileiro, casado, administrador, inscrito no CPF sob o nº 175.418.329-87 e portador do Registro de Identidade nº 916543-6 SESP-PR e o **INSTITUTO AGRONÔMICO - IAC**, pessoa jurídica de direito público, vinculada à Agência Paulista de Tecnológica dos Agronegócios - APTA e Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, inscrita no CNPJ sob o n. 46.384.400/0023-54, com sede na Avenida Barão de Itapura, 1481, em Campinas - SP, através do **Centro de Citricultura Sylvio Moreira**, doravante denominado simplesmente **CENTRO DE CITRICULTURA**, neste ato representado por seu Diretor Técnico de Departamento, **MARCOS ANTÔNIO MACHADO**, brasileiro, engenheiro agrônomo, casado, portador da Cédula de Identidade RG n. M-215.101, inscrito no CPF sob o n. 112.787.061-00, com endereço profissional situado na Avenida Barão de Itapura, 1481, na cidade de Campinas, Estado de São Paulo, nomeado pela resolução de 23 de janeiro de 2019, publicada no Diário Oficial do Estado de São Paulo, nº 129(17) - 21, de 24 de janeiro de 2019.

Considerando que o **IAPAR** é uma instituição pública de ciência e tecnologia do Estado do Paraná que tem como finalidade a pesquisa básica e aplicada, a difusão de conhecimento e a transferência de tecnologia para o desenvolvimento do meio rural e do agronegócio;

Considerando que o **CENTRO DE CITRICULTURA** é uma unidade de ciência e tecnologia do Estado de São Paulo que tem como finalidade gerar e transferir conhecimentos científicos e tecnológicos ao agronegócio da citricultura objetivando melhoria do sistema de produção, desenvolvimento social e econômico e sustentabilidade ambiental;

Considerando que a **FAPEAGRO**, é uma fundação de apoio à pesquisa agropecuária, com autonomia administrativa, econômica e financeira, estruturada para administrar e apoiar projetos de pesquisa, extensão, desenvolvimento institucional e ações que visem o desenvolvimento sustentável da agropecuária e do agronegócio;

Considerando o Acordo de Cooperação assinado entre os Partícipes em 20, de outubro de 2014 que teve como objetivo a junção de esforços para a realização do **13º Congresso Internacional de Citricultura** realizado entre 18 a 23 de setembro de 2016, na cidade de Foz do Iguaçu-PR, que estabeleceu em sua Cláusula Quarta as medidas a serem adotadas na eventualidade de saldo remanescente, cuja transcrição literal diz:

4.1 Na hipótese de saldo remanescente, verificado a partir da prestação de contas, estabelecida na Cláusula Segunda, III, "i", o valor será aplicado da seguinte forma:

10

21

22

- a) 10% (dez por cento) será destinado ao Fundo de Amparo à Pesquisa e Capacitação Técnica mantido pela **FAPEAGRO**, para atividades de pesquisa científica e desenvolvimento tecnológico, e com gestão exclusiva feita pela **FAPEAGRO**;
- b) 90% (noventa por cento) será revertido em projetos técnicos científicos para o estudo da citricultura, a serem apresentados, no prazo de 60 (sessenta) dias após a conclusão da prestação de contas, em colaboração entre o **IAPAR** e o **CENTRO DE CITRICULTURA**, mediante a celebração de um novo Contrato, com o apoio administrativo da **FAPEAGRO**, cabendo à Comissão Executiva descrita na Cláusula 7ª, desse instrumento a decisão exclusiva sobre a destinação do recurso.

A comissão executiva descrita na cláusula 7ª do referido termo é composta por José Pereira da Silva (IAPAR), Eduardo Fermino Carlos (IAPAR) e Dirceu de Matos Júnior (APTA) e considerou pleno e acabado o Congresso acima nominado;

Considerando que em 31/12/2018 foi apurado pela **FAPEAGRO** o saldo remanescente de R\$ 260.367,47 (Duzentos e sessenta mil, trezentos e sessenta e sete reais e quarenta e sete centavos), até a presente data abrigado conta corrente bancária remunerada, os partícipes resolvem celebrar este Acordo sujeitando-se no que couber às disposições da Lei Brasileira de Inovação, n.º 10.973, de 02 de dezembro de 2004, regulamentada pelo Decreto n.º 5.563, de 11 de outubro de 2005, da Lei n.º 13.243, de 11 de janeiro de 2016, às demais disposições legais aplicáveis e as cláusulas e condições abaixo:

CLÁUSULA PRIMEIRA – Do Objeto

1.1 O presente Acordo de Cooperação tem por objeto o estabelecimento das condições básicas de atuação em parceria, visando o desenvolvimento e implementação do projeto "ID260-Introdução, seleção, cruzamentos e biotecnologia no melhoramento genético de *Citrus* sp.", conforme descrito no projeto técnico Anexo I, parte integrante deste Contrato.

CLÁUSULA SEGUNDA – Das Obrigações

2.1 Sem prejuízo do disposto nas demais cláusulas deste Acordo, os Partícipes obrigam-se ao seguinte:

I – Obrigações do IAPAR:

- a) Coordenar, em conjunto com o **CENTRO DE CITRICULTURA**, a execução das atividades do Projeto Técnico – Anexo I;
- b) Prover a infra-estrutura técnica e apoio técnico necessários à execução das atividades constantes do Projeto Técnico – Anexo I, como contrapartida para a realização deste Acordo, excetuando as obrigações de fornecimento de responsabilidade do **CENTRO DE CITRICULTURA**;
- c) Formalizar a avaliação técnica da pesquisa concluída, mediante a elaboração de relatório;
- d) Possuir ou obter todas as licenças, autorizações, alvarás, cadastros e registros exigidos por lei para a execução das atividades objeto deste Contrato, comprometendo-se a mantê-los em situação regular;
- e) Responsabilizar-se por seus empregados, prepostos e terceiros, sobre qualquer dano que venha a ser causado em decorrência da execução da pesquisa objeto deste Acordo, bem como por atender todas as obrigações trabalhistas, previdenciárias e legais;
- f) Os materiais/bens patrimoniais adquiridos com recursos provenientes deste contrato permanecerão na posse e sob a responsabilidade do Responsável Técnico do **IAPAR** constante na Cláusula Terceira, o qual deverá assinar um TERMO DE RESPONSABILIDADE, no momento em que lhe for entregue o referido patrimônio.

II – Obrigações do CENTRO DE CITRICULTURA:

- a) Coordenar, em conjunto com o **IAPAR**, a execução das atividades do Projeto Técnico – Anexo I;
- b) Prover à execução das atividades constantes do Projeto Técnico – Anexo I, como contrapartida para a realização deste Acordo, excetuando as obrigações de fornecimento de responsabilidade do **IAPAR**;
- c) Formalizar a avaliação técnica da pesquisa concluída, mediante a elaboração de relatório;
- d) Possuir ou obter todas as licenças, autorizações, alvarás, cadastros e registros exigidos por lei para a execução das atividades objeto deste Contrato, comprometendo-se a mantê-los em situação regular;
- e) Acordar, em conjunto com o **IAPAR**, o cronograma de desembolso/financeiro prevendo a aquisição de bens, serviços, contratações, viagens e as despesas necessárias para a circulação e movimentação do valor, segmentadas por rubrica e apresentar à **FAPEAGRO**;
- f) Solicitar por escrito, com antecedência de 10 (dez) dias, mediante o preenchimento do Formulário de Compras de Material/Serviço, fornecido pela **FAPEAGRO** as requisições de bens e serviços necessários à execução do Projeto de acordo com o cronograma de desembolso;
- g) Responsabilizar-se por seus empregados, prepostos e terceiros, sobre qualquer dano que venha a ser causado em decorrência da execução da pesquisa objeto deste Acordo, bem como por atender todas as obrigações trabalhistas, previdenciárias e legais;
- h) Os materiais/bens patrimoniais adquiridos com recursos provenientes deste contrato permanecerão na posse e sob a responsabilidade do Responsável Técnico do **CENTRO DE CITRICULTURA** constante na Cláusula Terceira, o qual deverá assinar um **TERMO DE RESPONSABILIDADE**, no momento em que lhe for entregue o referido patrimônio.

III – Obrigações da **FAPEAGRO**:

- a) Realizar a gestão operacional e administrativa do Projeto Técnico – Anexo I;
- b) Efetuar todas as despesas, aquisições e contratações necessárias à execução do objeto de Acordo de Cooperação;
- c) Caso haja a aquisição de equipamentos e outros bens duráveis ou permanentes, esses bens serão transferidos para o **IAPAR** e o **CENTRO DE CITRICULTURA** ao final dos projetos ou trabalhos contratados, após as formalidades legais, mediante a discriminação do bem e instituição de destino definida em comum acordo entre os Responsáveis Técnicos de cada uma das duas instituições, devendo ser observados os esforços alocados pelas partes durante a execução do projeto;
- d) Atender aos melhores procedimentos de administração quando da contratação dos produtos e serviços, incumbindo ao **IAPAR** e ao **CENTRO DE CITRICULTURA** informar, justificar e especificar à **FAPEAGRO**, quais serão os produtos e serviços necessários para a execução do projeto;
- e) Efetuar os respectivos pagamentos, obter a documentação comprobatória e guardar todos os documentos dos gastos efetuados, sendo que os mesmos devem ser emitidos em nome da **FAPEAGRO**;
- f) Contratar pessoal técnico e científico requerido para o desenvolvimento do projeto em cada trabalho contratado, se necessário;
- g) Disponibilizar pessoal administrativo para o apoio às atividades operacionais, administrativas e financeiras relacionadas ao projeto;
- h) Cumprir todas as obrigações legais de qualquer natureza, notadamente referentes às leis trabalhistas, previdenciárias, fiscais e também acessórias, ficando, dessa forma, expressamente excluída a responsabilidade e solidariedade do **IAPAR** e do **CENTRO DE CITRICULTURA** sobre tal matéria;

- i) Apresentar ao **IAPAR** e ao **CENTRO DE CITRICULTURA**, a prestação de contas, com o demonstrativo de execução de despesas e receitas, incluindo possíveis receitas oriundas de aplicações financeiras, com saldo inicial e final de cada período.

2.2 Para a consecução deste Contrato, consente o **IAPAR** e o **CENTRO DE CITRICULTURA** que a aquisição ou contratação de produto para pesquisa e desenvolvimento, limitada, no caso de obras e serviços de engenharia, a 20% (vinte por cento) do valor de que trata a alínea "b" do inciso I do caput do art. 23 da Lei nº 8.666/93, será realizada pela **FAPEAGRO** na forma de contratação direta por dispensa de licitação, nos termos do inciso XXI, do artigo 24 c/c o inciso XX do artigo 6º, ambos da Lei nº 8.666/93.

CLÁUSULA TERCEIRA – Gestão

3.1 Para acompanhar a execução do Projeto de Pesquisa – Anexo I, objeto deste Acordo, os Partícipes designam desde já, cada uma um técnico integrante dos respectivos quadros de pessoal, conforme abaixo identificados, para serem os gestores únicos do projeto:

I - Pelo IAPAR:

Nome: Eduardo Fermino Carlos

Profissão: Pesquisador

Endereço: Rodovia Celso Garcia Cid, km 375 – Londrina, PR

Telefone: (43) 3376-2164

E-mail: eduardo05061@gmail.com

(Responsável Técnico designado para acompanhamento financeiro e desenvolvimento do projeto)

II – Pelo CENTRO DE CITRICULTURA

Nome: Dirceu de Mattos Junior

Profissão: Pesquisador

Endereço: Rodovia Anhanguera, km 158 – Cordeirópolis, SP

Telefone: (19) 3546-1399

E-mail: ddm@iac.sp.gov.br

(Responsável Técnico designado para o acompanhamento do projeto)

III – Pela FAPEAGRO:

Nome: Alessandra Neves Custódio

Profissão: Gestora de Projeto

Endereço: Rodovia Celso Garcia Cid, Km 375 – Londrina, PR

Telefone: (43) 3025-1601

E-mail: alessandra@fapeagro.org.br

(Responsável pela administração financeira e prestação de contas das parcelas)

CLÁUSULA QUARTA – Da Gestão Administrativa, Operacional e Financeiro

4.1 Ficará sob a responsabilidade da **FAPEAGRO** a gestão administrativa, operacional e financeira do recurso remanescente da realização do 13º Congresso de Citricultura que motivou a formalização deste novo Acordo de Cooperação, cuja quantia apurada em 31/12/2018 pela **FAPEAGRO** contabiliza o total de R\$ 260.367,47 (duzentos e sessenta mil e trezentos e sessenta e sete reais e quarenta e sete centavos).

4.2 Para a cobertura de despesas necessárias na execução do Projeto Técnico – Anexo I, a **FAPEAGRO** reterá a importância de 10% (dez por cento) do valor total discriminado no item 4.1.

CLÁUSULA QUINTA – Dos Direitos de Propriedade Intelectual

5.1 Qualquer invento, aperfeiçoamento ou inovação, obtenção de processo ou produto, privilegiável ou não, oriundo da execução deste Acordo, bem como o direito de exploração econômica de seu resultado, pertencerão ao **IAPAR** e ao **Centro de Citricultura**, devendo ser estabelecido instrumento jurídico

específico para esta finalidade.

5.2 As partes obrigam-se, por si e por seus sucessores, a qualquer título, a observar o disposto nesta cláusula, mesmo após o término da vigência deste acordo.

CLÁUSULA SEXTA – Do Sigilo e da Divulgação dos Resultados

6.1 Todas as Partes obrigam-se a observar o sigilo das informações obtidas no âmbito deste Acordo, de forma a garantir o cumprimento da Cláusula Quinta e possibilitar que qualquer resultado passível de proteção intelectual seja protegido em nome do **IAPAR** e do **CENTRO DE CITRICULTURA**.

6.2 Sem prejuízo do disposto no item 6.1, o **IAPAR** e o **CENTRO DE CITRICULTURA** poderão publicar resultados finais de pesquisas desenvolvidas por força desta Cooperação, sem intuito econômico e para fins meramente de divulgação científica, desde que não comprometa a proteção intelectual, e tenha consentimento prévia de ambos.

6.3 Qualquer menção aos resultados obtidos por meio deste Acordo de Cooperação, deverá constar a cooperação entre **IAPAR, CENTRO DE CITRICULTURA e FAPEAGRO**.

CLÁUSULA SÉTIMA – Da Vigência

7.1 O presente Acordo terá vigência até 31 de dezembro de 2022, contada a partir da data de sua assinatura.

CLÁUSULA OITAVA – Rescisão

8.1 Por descumprimento de qualquer de suas cláusulas ou condições, poderá a parte prejudicada rescindir o presente Acordo, independentemente de prévia interpelação judicial ou extrajudicial, respondendo a parte inadimplente, pelas perdas e danos decorrentes, ressalvadas as hipóteses de caso fortuito ou de força maior, devidamente caracterizadas.

CLÁUSULA NONA – Alterações

9.1 O presente Acordo constitui o compromisso integral entre os Partícipes com relação às matérias aqui contempladas e não poderá ser alterado ou modificado em qualquer de suas cláusulas, salvo mediante celebração de Termo Aditivo, assinado pelas Partes.

CLÁUSULA DÉCIMA – Força Maior e Caso Fortuito

10.1 Qualquer atraso ou falha no cumprimento deste Contrato em relação à execução das atividades, quando ocasionados por motivo de força maior e/ou caso fortuito, conforme dispõe no Artigo 393, do Código Civil Brasileiro, não constituirá motivo para rescisão ou reclamação por nenhuma das partes, sendo que as condições deverão ser revistas em Termo Aditivo para a conclusão do Projeto.

10.2 Na ocorrência de algum evento mencionado acima, a parte prejudicada deverá comunicar a outra no prazo de até 10 (dez) dias da constatação do fato.

CLÁUSULA DÉCIMA PRIMEIRA – Publicação

11.1 O extrato do presente Contrato será levado à publicação, pelo **IAPAR**, no Diário Oficial do Estado do Paraná – DIOE/PR, até o quinto dia útil do mês subsequente ao da sua assinatura, para ser publicado no prazo de 20 (vinte) dias daquela data, sendo a publicação condição indispensável à sua eficácia.

CLÁUSULA DÉCIMA SEGUNDA – Foro

12.1 Para solução de quaisquer dúvidas oriundas do presente Acordo, os Partícipes elegem o Foro da

Justiça Estadual de Londrina, Estado do Paraná, com renúncia a qualquer outro, por mais privilegiado que seja.

Em evidência do que foi aqui expresso e mutuamente acordado, as partes assinam este documento, em 3 (três) vias, no local e data indicados e na presença de testemunhas, para que produza os efeitos legais.

Londrina, 30 de janeiro de 2019.



RAFAEL FUENTES LLANILLO
Diretor de Pesquisa
Instituto Agrônômico do Paraná - IAPAR



Marcos Antonio Machado
Diretor Técnico de Departamento
Instituto Agrônômico - IAC



Heitor Rossitto Néia
Diretor-Presidente
Fundação de Apoio a Pesquisa e ao
Desenvolvimento Agronegócio - FAPEAGRO

Testemunhas:



Nome: Eduardo Fermino Carlos
RG/CPF: 12.645.341.8



Nome: Dirceu de Mattos Junior
RG/CPF: 13.867.064 / 122.444.668-25



RG 13.679.293-5
Paulo Vicente C. Zaccheo
Programa de Gestão da Inovação - PG
DIT



ANEXO I

PROJETO TÉCNICO

TÍTULO:

Responsável técnico - IAPAR: Eduardo Fermino Carlos

Área Técnica: Área de Melhoramento de Plantas (AMG)

Programa de Pesquisa: Programa Fruticultura (PFR)

Responsável técnico - CENTRO DE CITRICULTURA: Dirceu de Mattos Junior

Área Técnica: APTA

Programa de Pesquisa: Nutrição Mineral de Plantas

Período de execução: Início: 01/2019 Término: 12/2022

IDENTIFICAÇÃO DO PROBLEMA:

Características gerais da produção no Paraná. A citricultura é uma realidade no Paraná, e o grande ciclo de desenvolvimento deu-se a partir do final da década de 80. O setor cresceu e possui hoje em torno de 30 mil hectares de citros, incluindo a região de Cerro Azul, ao norte de Curitiba, com produções expressivas de tangerina Ponkan (ANDRADE, 2007). As regiões norte e noroeste do Estado do Paraná produzem principalmente laranjas para o mercado interno de frutas *in natura*, para a produção de suco concentrado congelado, visando o mercado externo, e mais recentemente para a produção de suco pasteurizado já atendendo a diversas regiões no país. Apesar do enorme potencial econômico, o Paraná mantém-se apenas como o quinto produtor nacional, atrás de São Paulo, Bahia, Sergipe e Rio Grande do Sul. Alterna-se com o Rio Grande do Sul na quarta posição do ranking em função das safras obtidas em cada ano.

O estado do Paraná possui condições edafoclimáticas diversas com solos mais arenosos, clima mais quente e estação de seca mais definida no noroeste, e solos mais argilosos e clima mais ameno com inverno mais húmido nas regiões de maior altitude no norte e nordeste do Estado. Ambas regiões são propícias para o cultivo de citros, e essas regiões vem se destacando em produtividade, embora induzam comportamento distinto em relação à qualidade da fruta produzida. O norte e o noroeste do Paraná contam atualmente com 4 indústrias processadoras de suco de

laranja, sendo três em Paranavaí e uma em Uraí. Existem ainda plantios estendendo-se até Cambará e São Jerônimo da Serra, e outros em Altônia, Cruzeiro do Oeste e proximidades.

A região compreendida entre o norte e o noroeste do Paraná possui excelente condição edafoclimática para se tornar uma das grandes regiões produtoras de citros do mundo. Se houver planejamento e disposição empresarial e política, há potencial para que o Estado se torne o 2º produtor nacional em prazos exequíveis. Entretanto, existem vários desafios, muito semelhantes aos que ocorrem em outras áreas produtivas no resto do país, causadas principalmente pela baixíssima variabilidade genética empregada no sistema de produção. Para quebrar esse paradigma é necessário explorar a diversidade genética existente nos bancos ativos de germoplasmas (BAGs) do país e do exterior (quando possível), na busca de novos genótipos de interesse com potencial produtivo e econômico. Portanto, o **primeiro objetivo** específico desse trabalho é exatamente estabelecer uma nova coleção de citros no Paraná que possa ser utilizada posteriormente pela citricultura comercial.

Consequências da baixa variabilidade. Apenas 4 variedades de copas dentro do grupo das laranjeiras doces (*Citrus sinensis* L. Osbeck), ou seja, a IAPAR 73, a Pera, a Valência e a Folha Murcha, perfazem a grande preferência dos produtores no Paraná, principalmente em função de níveis adequados de produtividade e qualidade dos frutos e por estarem preconizadas dentro da lista de cultivares permitidas no estado, com menor incidência de cancro cítrico (<http://www.adapar.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=252>), lista essa baseada em LEITE JR. & MOHAN, 1990.

Embora não idênticas, essas variedades são similares em algumas características. São suscetíveis a várias doenças como a Leprose dos Citros, a Clorose Variegada do Citros (CVC), o Huanglongbing (HLB, ou *ex-greening*), a Pinta Preta e outras. Diferentes clones de Pera ainda possuem comportamento distinto em relação à doença Tristeza dos Citros (CTV) em função da microrregião (efeito da temperatura local) em que são cultivados. Como consequência, a suscetibilidade a essas doenças imputa custos econômicos e ambientais significativos no controle de cada uma, dentro dos diversos sistemas de produção agrícola de cada propriedade. Por exemplo, a Leprose é uma doença causada pelo vírus denominado de CiLV ('Citrus Leprosis Virus') (KITAJIMA et al, 1964; LOCALI et al, 2003), e causa prejuízos estimados entre 60 e 80 milhões de dólares por ano em toda citricultura brasileira, a CVC em torno de 100 milhões por ano, e o HLB, que é a grande ameaça do momento, impõe perdas e limitações de produção em várias regiões do Brasil e do mundo (FUNDECITRUS, 2015). No Paraná, a região de Cerro Azul, que produz essencialmente a tangerineira Ponkan (*Citrus reticulata* Blanco), é severamente atacada pela doença Pinta Preta, causada pelo fungo *Guignardia citricarpa* (*Phyllosticta citricarpa*).

Além dos problemas com estresses bióticos, como pragas e doenças, existem ainda as dificuldades com estresses abióticos, como seca prolongada e/ou fora de época, frio, baixa fertilidade do solo e outros que impactam significativamente na escolha de cultivares. A ampla utilização do porta-enxerto limoeiro Cravo (*Citrus limonia* Osbeck) pelos produtores é uma resposta a essas demandas uma vez que o Cravo é mais tolerante à seca, e às condições mais rústicas de plantio e cultivo em sequeiro que prevalecem no Brasil (CARLOS et al, 1997). Como consequência dessa baixa variabilidade também empregada para a escolha do porta-enxerto em várias regiões produtoras brasileiras, novamente há relatos de ocorrência devastadora de epidemias, como a doença Morte Súbita dos Citros no norte de São Paulo e no Triângulo Mineiro (BASSANEZI et al, 2003), e de constantes perdas causadas pela anomalia Declínio dos Citros em São Paulo e também no noroeste do Paraná (AULER, et al, 2011). A substituição gradativa do Cravo por outros porta-enxertos, como o citrumeleiro Swingle (*C. paradise* Macfad. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) (HUTCHISON, 1974), não é tão simples e direta, pois o Swingle além de incompatível com a principal copa em uso no país, a laranja Pera, ainda é pouco tolerante a períodos prolongados de déficit hídrico. Outras opções de porta-enxertos também possuem outras limitações bióticas e abióticas.

A ocorrência de pragas e doenças é um fato natural e frequente na natureza, entretanto quando um patógeno encontra uma grande quantidade do mesmo hospedeiro, geneticamente idêntico e susceptível, há a explosão de uma epidemia. Ao longo da evolução das civilizações e da agricultura em sistemas de produção agrícola que visam produtividade em detrimento a estabilidade de produção isso foi frequente, em função do estreitamento da base genética para a utilização da mesma cultivar, ou de cultivares semelhantes, nas áreas de cultivo. Portanto, uma estratégia de produção mais sustentável deverá contemplar o aumento da variabilidade entre as cultivares, incrementando maiores diferenças genéticas nos pomares em produção. Esse é o **segundo objetivo** desse trabalho, que pode ser obtido através da geração de novos híbridos feitos por cruzamentos entre parentais selecionados.

Avaliação de novas cultivares de citros. As cultivares de laranjeiras doces recomendados e em uso no norte e no noroeste do Paraná geram outros grandes desafios e demandas. O setor produtivo demanda informações sobre a estabilidade de produção e qualidade das mesmas em cada região produtora. Embora o IAPAR tenha tradição e experiência em programas de melhoramento genético, principalmente em feijão e trigo, ensaios de competição de cultivares de citros em distintas regiões no Estado ainda não foram realizados, e as consequências são notórias para o setor produtivo. A cultivar Shamouti (IPR 154), ainda recomendada pelo IAPAR, é totalmente improdutiva em condições de cultivo em São Paulo (DONADIO et al, 1996) e há diversas reclamações de

produtores em relação à mesma também no Paraná (GLOBO RURAL, 2013). Alguns clones da cultivar Pera são severamente afetados pela Tristeza quando plantados em regiões mais frias, encontradas nas maiores altitudes no estado. Há perdas expressivas e reclamações constantes de produtores principalmente na região de Rolândia e entorno. A cultivar Navelina, que pertence ao grupo das laranjas de umbigo, como a Bahia e outras, também é recomendada pelo IAPAR e possui comportamento ambíguo, sendo produtiva em alguns pomares e improdutiva em outros, mesmo dentro de uma mesma microregião. Muito possivelmente o material genético não estava fixado adequadamente antes da liberação comercial da mesma. No caso de cultivares precoces, como a IAPAR 73, existe o grande desafio de se encontrar outros materiais mais produtivos e com melhor qualidade de suco. Segundo POMPEU JR. essa cultivar é uma Seleta (comunicação pessoal, 2004) que foi doada pelo CCSM-IAC e foi rebatizada como o novo nome no IAPAR. Pertence ao grupo das laranjeiras Caipiras, com sementes. Há ainda casos onde outras cultivares estão sendo cultivadas com sucesso no estado, mas inexistem informações a respeito, como a Taquari.

A escolha do porta-enxerto deve sempre levar em consideração a tolerância a estresses abióticos, como baixa fertilidade do solo, ocorrência de frio, salinidade e outros, e a tolerância a estresses bióticos, como Gomose, Tristeza, Declínio e outros problemas (CARLOS et al, 1997). A tolerância a esses estresses é importante tanto a nível do produtor por minimizar custos de produção, como em relação à sustentabilidade do complexo citrícola instalado em uma determinada região. A citricultura do Paraná usa essencialmente o limoeiro Cravo como porta-enxerto, e em menor escala algumas outras opções como as tangerineiras Cleópatra e Sunki e o Trifoliata (STENZEL et al, 2003). Atualmente existem várias outras opções possíveis, como outros citrumelos, citrandarins e outras espécies.

Além da demanda por essas informações, existem outras questões importantes para o setor produtivo, e que devem ser considerados em um programa de melhoramento genético de citros. No mínimo três: **a)** A produção está concentrada principalmente entre Julho e Dezembro de cada ano agrícola, aumentando os custos das indústrias que ficam parcialmente, ou completamente, fechadas no primeiro semestre. Essa sazonalidade acentuada afeta a demanda por mão-de-obra tanto no campo quanto nas fábricas. O uso de um maior número de cultivares, especialmente mais precoces ou muito tardias em regiões com distintas amplitudes térmicas, pode contribuir para expandir o período de safra e ajudar na estabilização dos níveis de emprego; **b)** A qualidade do suco é outra característica importante. Regiões mais quentes e com inverno mais definido, normalmente induzem sucos com teores de Sólidos Solúveis Totais (SST) maiores, como ocorre no norte do Estado de São Paulo. Portanto qualquer ganho, mesmo que em frações percentuais pequenas em acúmulo de SST, pode significar um incremento substancial na eficiência da indústria do Paraná, que em última

instância significa maior competitividade frente a outras regiões produtoras do mundo; c) A ampliação do *portfolio* de produtos das empresas produtoras no Paraná é outro grande desafio. A tendência mundial é a produção de suco natural apenas pasteurizado, chamado globalmente de NFC ('not from concentrated'). Para a produção de NFC são necessárias adaptações nas fábricas, estrutura logística apropriada e o uso de cultivares de laranjeiras doces e de porta-enxertos que produzam frutos não apenas com alto SST, mas essencialmente com cor e sabor adequados. Por sua vez, o segmento de frutas frescas *in natura* também demanda novos frutos, com melhor cor e sabor, e preferencialmente com fácil descascamento e sem sementes.

Existe variabilidade genética no grupo "citros" necessária para superar esses e outros desafios, entretanto é preciso testar adequadamente os novos híbridos e os genótipos candidatos a serem novas cultivares em ensaios regionais de competição de cultivares. Em parceria com o setor produtivo, isso é possível de ser realizado e é o **terceiro objetivo** do presente trabalho.

Melhoramento genético convencional. Os desafios para um programa de melhoramento genético convencional em citricultura são enormes. Citros são plantas perenes que em condições normais de plantio e manejo levam no mínimo 3 anos para entrarem em produção em nível comercial, e por isso avaliações de desempenho horticultural em testes regionais precisam ser plurianuais. O melhoramento genético em laranjeiras doces feito por cruzamento de parentais também apresenta dificuldades biológicas intrínsecas à espécie, como alta taxa de poliembrião (apomixia acima de 98%, ou seja, apenas uma pequena fração de tudo que foi produzido é realmente híbrido), alta semelhança morfológica entre o embrião nucelar e o zigótico durante a fase de pós-germinação (difícil reconhecer e selecionar o híbrido, requerendo normalmente o desenvolvimento de marcadores moleculares ou morfológicos para a seleção assistida), longo período juvenil (podem demandar mais de uma década para serem avaliados no campo), e alta heterozigose (normalmente a população de primeira geração/F1 é altamente diversa dos parentais e com poucas características comerciais desejadas, sendo de interesse a obtenção de híbridos de 2ª. geração/F2). Com todas essas dificuldades, a seleção massal de material elite no campo é uma estratégia empregada com frequência por melhoristas em citricultura. O programa 'Laranja Nota 10' foi um exemplo bem sucedido dessa estratégia (CARLOS et al 2006). Várias outras iniciativas de sucesso foram feitas por J.Teófilo Sobrinho, J.Pompeu Jr., A.Salibe, O.Passos, S.Moreira, L.C.Donadio e outros.

Considerando a parceria proposta com a Estação Experimental de Citricultura de Bebedouro, SP, (EECB), o presente trabalho representa uma oportunidade de continuação do trabalho do prof. Dr. Luiz Carlos Donadio e equipe. A EECB iniciou uma série de cruzamentos em 1995/96 e esses materiais já passaram pela fase juvenil, estando aptos para a produção de híbridos de segunda geração (F2).

Vale citar que esse feito é raro no mundo em função do grande tempo necessário para a sua exequibilidade plena. Será um grande avanço para o programa de melhoramento genético do Paraná, com a economia de no mínimo duas décadas de esforços, já feitos pela EECB através da obtenção de clones elites do cinturão citrícula nacional e da obtenção de híbridos de primeira geração (F1). Uma vez estabelecidos, serão úteis para gerar novas plantas matrizes para o programa de melhoramento genético convencional, e para o programa de engenharia genética em andamento no Laboratório de Biotecnologia do IAPAR. Outra parceria importante é com o Centro de Citricultura Sylvio Moreira do IAC (CCSM-IAC). Essa instituição possui a maior coleção de genótipos protegidos no país, e um legado incontestável do trabalho de seleção genética feito por grandes equipes lideradas no passado por Sylvio Moreira e mais recentemente por Joaquim Teófilo Sobrinho. Essa instituição tem em seu Banco Ativo de Germoplasma a coleção de Citrandarins criadas pelo USDA (BLUMER & POMPEU JR., 2005) e os Citrumelos da série F80, feitos por Mortimer Cohen, da Universidade da Flórida, em 1955 (POMPEU JR., J. & BLUMER, S., 2011).

Com relação ao aspecto genético para aproveitamento de nutrientes das adubações nos pomares, e considerando que o nitrogênio (N) é parte constitutiva essencial das proteínas e na sua deficiência a assimilação de CO₂ pelas plantas em compostos orgânicos é severamente restringida, faz-se necessário avaliar a eficiência de uso deste nutriente por diferentes espécies de *Citrus*, com perspectiva para identificar processos metabólicos ou horticulturais que possam ser aplicados nos novos programas de melhoramento de copas comerciais na citricultura.

Sabe-se que o aproveitamento do N aplicado no solo pelos citros pode variar entre 15 e 85%, sendo o restante perdido ou lixiviado no perfil (MATTOS Jr. et al., 2007). Aspectos sobre a eficiência global do uso do N dependentes da planta, como eficiência de absorção-assimilação e a eficiência de transformação em biomassa devem ser abordados. Isto tem sido ainda pouco explorado na produção citrícola mesmo considerando o impacto que a adubação tem na elevação dos custos de produção no setor (NEVES, 2011) e no potencial de contaminação ambiental do uso excessivo dos fertilizantes (DELGADO et al., 2006).

Neste contexto, o Centro de Citricultura do IAC tem envidado esforços para elucidar porquê para a laranja-doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck), a concentração foliar de N necessária para maximizar a produção é de 27 g kg⁻¹ de massa seca de folhas, enquanto para o limoeiro (*C. limon* L. Burm. f.) o mesmo é ao redor de 18 g kg⁻¹ (QUAGGIO et al., 2002). Também se observa que em limoeiro tanto a área foliar específica (m² kg⁻¹) quanto área foliar total é maior que em laranja; considerando estes fatores, o limoeiro apresenta maior eficiência do uso do N (EUN). Neste contexto, observa-se que, apesar da menor concentração de N foliar, o limoeiro apresenta maior assimilação de CO₂ (P_N) tanto quando medida pontualmente.

Assim, é importante estudar as possíveis diferenças nas características fotoquímicas, bioquímicas e na expressão de AQs em folhas de laranjeira e limoeiro, crescidas em sistemas de vasos em casa de vegetação, como a partição do N na folha e na planta a fim de entender as diferenças observadas na eficiência de uso do nutriente entre duas espécies de interesse econômico altamente emparentadas, contribuindo para o melhoramento genético das espécies estudadas.

Portanto, o **quarto e o sétimo objetivos** do presente trabalho serão executados em parceria com a EECB e o CCSM-IAC.

Engenharia genética e Biotecnologia. A citricultura nacional sofre com diversos problemas que limitam a produção e aumentam os custos de manutenção e manejo dos pomares. Dentre esses pode-se destacar os estresses abióticos (hídrico e nutricional) e bióticos (doenças vasculares como a Clorose Variegada dos Citros, CVC, e o Huanglongbing, HLB, e as não vasculares, como o Cancro). Para cada problema é preciso considerar o metabolismo primário e/ou secundário das plantas que pode ser modificado visando aumentar a tolerância aos mesmos. Isso não é tarefa fácil, pois seres vivos respondem a estímulos ambientais ou de outros organismos ligando e desligando genes de acordo com os sinais percebidos pelas células afetadas, ou expostas. A intrincada teia de moléculas, como proteínas, hormônios e outros compostos, que atuam como receptores, sinalizadores ou intermediários em uma rota de transdução de sinais têm superado a imaginação de pesquisadores a cada dia.

Em plantas com HLB, dois estudos na Flórida relataram a resposta molecular da planta ao processo de infecção (ALBRECHT & BOWMAN, 2008) e a ocorrência de grande diversidade de microrganismos, além de *Candidatus Liberibacter sp.* (SAGARAM et al, 2009), em plantas infectadas. A função desses endofíticos na planta ainda é desconhecida, mas esses podem ser inócuos, ou estimular, ou reprimir a infecção e a resposta da planta ao HLB. Embora não se tenha relatos de resistência natural ao HLB, plantas cítricas respondem molecularmente ao desenvolvimento da doença (ALBRECHT & BOWMAN, 2008). Portanto, estudos de expressão gênica envolvendo outras condições experimentais podem revelar outros genes respondendo ao processo, e revelar também novas estratégias para a construção de resistência ao HLB. Sabe-se por exemplo que o variante Asiático da bactéria *Candidatus Liberibacter sp.* está melhor adaptado a maiores amplitudes térmicas do que o Africano, que não tolera muito bem altas temperaturas (BOVE 2006). O mesmo fato pode ser visto sob a premissa da planta, que sob condições de baixa temperatura dificulta o desenvolvimento do variante Africano. Outras condições podem ser testadas, como o efeito do excesso, ou deficiência, de determinado nutriente mineral no desenvolvimento de respostas moleculares. E finalmente, também não se conhece o desenvolvimento da doença HLB, e as

respostas moleculares em plantas cítricas já transformadas geneticamente com genes que afetam a síntese do aminoácido prolina, do fator de transcrição MAP-Kinases, de genes envolvidos na comunicação entre microrganismos do sistema *Quorum-Sensing*, e outros. Trabalhos prévios do Dr. Luiz G.E. Vieira, no Laboratório de Biotecnologia do IAPAR em Londrina geraram plantas transgênicas com alta capacidade de acumular prolina, e com grande proteção anti-oxidante, que é essencial na estabilização do sistema fotossintético. O Dr. L.G.E. Vieira também gerou plantas com maior expressão de MAP-Kinases e com outras enzimas capazes de afetar a comunicação entre microrganismos. Esses trabalhos são extremamente relevantes: MAP-kinases são enzimas envolvidas em transdução de sinais, entre outras funções, e podem orquestrar sistemas de defesas da planta. O sistema *Quorum-Sensing* pode alterar a capacidade de comunicação entre microrganismos desestabilizando o micro-ambiente onde *Candidatus Liberibacter* sp. está presente, e eventualmente inibir o progresso da doença. Essas estratégias nunca foram testadas contra o HLB, nem contra a CVC e nem contra o Cancro Cítrico. Além disso, a avaliação de expressão gênica dessas plantas transgênicas e controles, sob pressão de HLB, CVC e Cancro, sob determinadas condições experimentais, pode revelar novas estratégias para a construção de resistência a essas doenças. Uma das técnicas usadas para a avaliação geral dos níveis de transcrição de um grande número de genes de um organismo é o sequenciamento em larga escala do transcriptoma da planta estudada, chamado de RNAseq. Posteriormente, alguns genes eleitos, são confirmados por outras técnicas como o PCR (*polymerase chain reaction*) de Tempo Real, e poderão ser usados dentro do programa de melhoramento genético do Laboratório de Biotecnologia do IAPAR.

Em relação aos estresses abióticos causados por déficit hídrico ou por condições inadequadas em fertilidade de solo, há inúmeras respostas celulares. O déficit hídrico causa à planta uma série de mudanças fisiológicas, iniciando pelo decréscimo de pressão de turgor da célula (BAJAJ et al., 1999). A prolina é um composto orgânico não tóxico de baixo peso molecular, que pode ser acumulado pelas plantas em resposta ao déficit hídrico (RHODES & SAMARAS, 1994). Esse aumento de prolina na célula resulta em decréscimos do potencial hídrico (Ψ_s) o que favorece a manutenção da absorção de água e da pressão de turgor da célula, contribuindo assim para a manutenção de processos como abertura estomática, fotossíntese e crescimento da planta (TURNER & JONES, 1980). Além disso, o aminoácido prolina está envolvido na proteção de estruturas celulares, e de vários processos metabólicos (RHODES et al., 1986; RATHINASABAPATHI et al., 2000) em função de sua ação anti-oxidante.

A principal via de síntese da prolina inicia-se com a conversão do glutamato em ácido glutâmico - γ - semialdeído (GSA) pela enzima Δ^1 - pirrolina - 5 - carboxilato sintetase (P5CS). O GSA é convertido espontaneamente a Δ^1 - pirrolina - 5 - carboxilato (P5C), que é finalmente reduzido à

prolina pela P5C redutase (P5CR) (DELAUNEY & VERMA, 1993). A P5CS é limitante na biossíntese da prolina, cujo acúmulo inibe a síntese da enzima por mecanismos de *feedback* (ZHANG *et al.*, 1995). Estes mesmos autores observaram que a enzima mutante P5CSF129A de *Vigna aconitifolia* apresenta as mesmas características enzimáticas da P5CS, porém não é inibida pela prolina, promovendo maior acúmulo do aminoácido nos tecidos em plantas contendo esse gene.

Trabalhos prévios no Lab.de Biotecnologia do IAPAR indicaram que plantas de citrumelo Swingle transgênicas contendo o gene *P5CSF129A* sob controle de promotor constitutivo 35S CaMV acumularam mais prolina do que plantas não transformadas (BARICHELLO *et al.*, 2017), enquanto que usando o promotor indutivo RD29A a prolina só é produzida sob estresse, diminuindo assim o gasto energético da planta (FARINACIO *et al.*, 2017).

Essas informações permitem a execução dos **objetivos cinco, seis e sete**.

Poliploidia e a produção de citros sem sementes. Dentro do grupo dos citros, as tangerinas são especialmente degustadas como fruta fresca, sem processamento industrial. Essa demanda do mercado também estimula a busca de cultivares de tangerinas que além de cor de casca e sabor adequados, descasquem com facilidade e preferencialmente não possuam sementes. Essa última característica pode ser obtida com cruzamentos de parentais tetraplóides (4n) com diplóides (2n) normais, ou de multiplas ploidias, que geram descendentes estéreis, triploides (3n) ou outros. Essa estratégia foi utilizada no programa de melhoramento genético na Itália conduzido por Angelo Starrantino e equipe em Acirealle e na Flórida por Jude Grosser e equipe em Lake Alfred. GROSSER & GMITTER, 1990 produziram poliploides por fusão de protoplasto, enquanto GMITTER *et al.*, 1991, obtiveram poliploidia induzida por erros na meiose causados pelo agente mutagênico Colchicine. O grupo italiano também trabalhou com raios gama para indução de Clementina Monreal sem sementes (SPINA *et al.*, 1991) e com cultivo *in vitro* diversos para obtenção de embriogênese nucelar (STARRANTINO *et al.*, 1978).

Embora as estratégias citadas para obtenção de híbridos poliplóides sem sementes não sejam novas, estas utilizaram métodos conhecidos e possíveis de serem executados, permitindo com isso que o **oitavo objetivo** seja também exequível.

PALAVRAS-CHAVE: OGM, germoplasma, engenharia genética, transgênicos, laranja.

OBJETIVOS

O objetivo geral é introduzir, selecionar e melhorar por cruzamentos convencionais e por biotecnologia espécies cítricas de interesse visando a geração de novas cultivares de copas e de

porta-enxertos para a citricultura. Para isso serão necessários:

- 1) Introduzir, estabelecer e multiplicar germoplasma do grupo "citros" oriundos das coleções de plantas protegidas em estufa da Estação Experimental de Citricultura de Bebedouro-SP (EECB), do Centro de Citricultura Sylvio Moreira (CCSM-IAC), da Universidade Federal do Paraná (UFPR) e de outras fontes se disponíveis.
- 2) Estabelecer cruzamentos entre esses genótipos visando aumentar a variabilidade genética disponível.
- 3) Selecionar genótipos elites em ensaios de competição de cultivares de copas e de porta-enxertos em diferentes regiões produtoras (incorporando os objetivos do projeto ID414 encerrado em 23 Ago 2017).
- 4) Avaliar genótipos candidatos quanto à produção, qualidade de frutos, estresses abióticos (hídrico e nutricional) e bióticos (doenças vasculares, como CVC e HLB, e não vasculares, como Cancro).
- 5) Gerar novas plantas matrizes para o programa de melhoramento genético convencional, e para o programa de engenharia genética em andamento no Laboratório de Biotecnologia do IAPAR.
- 6) Transformar geneticamente cultivares de interesse de copa e de porta-enxertos com genes que interfiram no metabolismo associado a estresses abióticos e bióticos.
- 7) Avaliar porta-enxertos transgênicos e não transgênicos sob diferentes condições nutricionais.
- 8) Avaliar tangerinas candidatas a serem poliplóides, produzidas pela UFPR, para utilizá-las em futuros cruzamentos visando a obtenção de cultivares com frutos sem sementes.

RESULTADOS ESPERADOS

A introdução e a utilização de novos genótipos de laranjeiras doces de Bebedouro (EECB), de porta-enxertos de Cordeirópolis (CCSM-IAC) e de tangerinas candidatas a serem poliplóides da Universidade Federal do Paraná (UFPR) trarão diversos benefícios para o estado, com perspectivas a curto, médio e longo prazos. Imediatamente, o grande benefício é a própria obtenção dessas coleções, contendo centenas de acessos. Uma vez estabelecidas, serão úteis para diversos interesses científicos dentro do programa de melhoramento convencional e de engenharia genética do Laboratório de Biotecnologia do IAPAR. A rotina de cruzamentos e as técnicas de Biotecnologia entre parentais selecionados gerarão novos genótipos visando atender os objetivos dessa proposta. Espera-se no futuro o lançamento de novas cultivares comerciais de citros com maior qualidade de produção, sem sementes e resistentes aos estresses bióticos e abióticos importantes, gerando benefícios ambientais e socio-econômicos para o setor produtivo e para a sociedade de modo geral.

METODOLOGIA

Para atender o objetivo 1. Por mais de 20 anos o prof. Dr. Luiz Carlos Donadio (UNESP/Jaboticabal, SP) e a sua equipe (Eduardo S. Stuchi, Otávio R. Sempionato, Eduardo F. Carlos e outros, nos anos 1990 e 2000) da Estação Experimental de Citricultura de Bebedouro-SP (EECB) acumularam clones de citros coletados em várias regiões produtoras do Brasil e do exterior. São materiais com alguma característica elite, pois já passaram por seleção prévia de campo e estão atualmente preservados e protegidos sob estufas teladas.

Dentro dessa coleção estão híbridos (F1) feitos entre 1995 e 96 pela mesma equipe, através do cruzamento de Toranja (*Citrus grandis* L.) com a laranjeira cultivar Tobias (*Citrus sinensis* L. Osbeck). Seleções desses híbridos sobreviveram à incidência de HLB, Declínio, Gomose, CVC, Leprose, seca, baixa fertilidade e altos níveis de Alumínio no solo, e outros estresses na área experimental da EECB. Atualmente são materiais fisiologicamente maduros, sem juvenilidade. Serão usados em cruzamentos com outros genótipos de interesse na geração de híbridos de citros de segunda geração (F2) e em retrocruzamentos com laranjeiras doces.

Também serão testados Citrandarins e Citrumelos, respectivamente produzidos pelo USDA e pela Universidade da Flórida, além de outros produzidos pelo grupo de pesquisa em melhoramento de citros do CCSM-IAC e transferidos em TTM's (termo de transferência de material) para testes de campo locais.

Outros genótipos ainda poderão ser importados a medida que houver interesse e disponibilidade para preservá-los visando uso futuro dentro do programa contínuo de melhoramento e engenharia genética da instituição.

Para atender o objetivo 2. Os cruzamentos serão feitos no Laboratório de Biotecnologia do IAPAR em telado protegido com tela anti-afídica, mas sem controle de temperatura, para que os materiais vegetais possam sofrer indução fisiológica adequada, e conseqüentemente, terem um florescimento em abundância. As flores de genótipos preferencialmente monoembriônicos serão emasculadas em fase de pré-abertura para assegurar a posterior hibridização controlada com o parental masculino de interesse. Os ramos serão marcados e indentificados em cada cruzamento. Todo o desenvolvimento dos frutos nos ramos marcados será monitorado, culminando com a colheita dos mesmos, a separação e a preservação das sementes no ano seguinte. Essas serão então colocadas para germinar em bandejas dentro das estufas do Laboratório de Biotecnologia do IAPAR, assegurando-se que condições ideais em cuidado e manutenção das mesmas sejam garantidas. Após um período de 12 meses crescendo adequadamente em estufa, esses genótipos juvenis estarão

prontos para serem desafiados em condições de campo no Paraná e em Bebedouro, SP, sob pressão de estresses bióticos e abióticos.

Os híbridos produzidos no IAPAR com as matrizes da EECB serão formados nas estufas do Laboratório de Biotecnologia do IAPAR e também nas estufas da EECB, para garantir que em caso de acidente em uma localidade, pelo menos parte da nova coleção de genótipos (F1 e F2) seja preservada e multiplicada. Isso infelizmente ocorreu nas estufas do LBI-IAPAR entre 25 e 30 de outubro de 2015 (durante o Congresso Internacional de Biologia Molecular de Plantas em Foz do Iguaçu), que ficaram sem irrigação por aproximadamente uma semana, levando à morte centenas de híbridos ainda na fase inicial de crescimento. Essas perdas já foram relatadas no sistema SEPAC. Plantas sobreviventes e outros híbridos produzidos posteriormente estão descritos no **Quadro 2**.

Quadro 2) Cruzamentos dirigidos efetuados entre parentais femininos e masculinos dentro das estufas do LBI-IAPAR.

W

W

W

M

Lote	Mãe			Pai	
	Nome	RG(lacre)		Nome	RG(Lacre)
191	Tang. Clementina 15	CCS		Murcote	Pvai
193	Tang. Clementina 15	CCS		Murcote	Pvai
194	Tang. Clementina 15	CCS		Murcote	Pvai
210	TT7	7129		Hamlin c.v	18671
218	TT21	7147		Pera Bianchi	Pl.2,9,7
228	TT17	7433		Ponkan	Assaí
219	TT17	7433		Ponkan	Assaí
226	TT20	7156		Limão cravo	301
227	TT33	7104		Ponkan	Assaí
230	TT17	7433		Limão cravo	301
237	TT34	7152		Hamlin	18657
242	Tang. Clementina	Atalaia CCSM		Hamlin	18657
241	Tang. Clementina	Atalaia CCSM		Hamlin	18657
243	Tang. Clementina 1	Atalaia CCSM		Limão cravo	311
244	Tang. Clementina 1	Atalaia CCSM		Limão cravo	311
252	Tang. Clementina 15	Atalaia CCSM		Limão cravo	311
256	TT33	7104		Hamlin	18671
257	TT33	7104		Limão cravo	319
259	TT17	7433		Limão cravo	319
271	TT17	7433		Limão cravo	311
263	TT21	7147		Limão cravo	519
272	TT4	7140		Limão cravo	311
275	TT25	7139		Limão cravo	311
282	Tang. Clementina 15	Atalaia CCSM		Hamlin c.v	18671
297	Tang. Clementina 5	Atalaia CCSM		Ponkan	Assaí
298	Tang. Clementina 5	Atalaia CCSM		Ponkan	Assaí
299	Tang. Clementina 5	Atalaia CCSM		Ponkan	Assaí
309	TT35	7131		Ponkan	Assaí

A formação das plantas jovens será conduzida em estufa em um período de aproximadamente 12 meses para posterior plantio a campo para cada genótipo. Por apresentarem longo período juvenil, os novos híbridos serão plantados dentro das áreas experimentais do IAPAR e da EECB, e não em áreas privadas comerciais, pois serão improdutivas no período contido desse trabalho. Entretanto, serão avaliados anualmente para desenvolvimento sob pressão de estresses bióticos e abióticos. Na área experimental do IAPAR serão avaliados principalmente para crescimento em condições com inverno definido, presença de HLB, presença de ervas daninhas e outros fatores associados à baixa manutenção de um pomar. Na EECB serão avaliados para baixa fertilidade e altos teores de Alumínio no solo, presença de CVC, Declínio e seca prolongada. A avaliação de híbridos de segunda geração (F2) poderá revelar com maior probabilidade plantas com resistência a estresses bióticos e/ou abióticos e com características desejadas agronomicamente, como por exemplo novos

porta-enxertos resistentes à seca, mas com outras características desejadas. Com isso, até 2021 espera-se que novos genótipos sejam selecionados sob essas condições distintas de cultivo, sendo, portanto, aptos para multiplicação e para testes em outras localidades.

Em função da qualidade fitossanitária de origem (material de estufa), os genótipos matrizes foram introduzidos a partir de gemas (borbulhas) coletadas nas estufas da EECB. Esse material foi transportado para o Paraná, e multiplicados em casa de vegetação apropriada (telada, com controle parcial de temperatura), dentro da área de melhoramento genético do Laboratório de Biotecnologia do IAPAR, para posterior uso. Quando necessário, esses materiais poderão ser amostrados para indexação molecular de patógenos usando testes de PCR ("polymerase chain reaction") de Tempo Real e sondas radioativas marcadas com Fósforo 32 ou 33, se necessário. Todos os testes moleculares serão realizados dentro das dependências dos Laboratórios de Biotecnologia do IAPAR. Sondas Taqman serão sintetizadas de acordo com o sistema de PCR de Tempo Real da AppliedBiosystem SDS 7500 FAST (www.appliedbiosystem.com) utilizando-se as sequências e a metodologia de CARLOS et al (2008) e COLETTA FILHO et al (2010). Poderão ser também testados e indexados para doenças vasculares com a CVC, HLB, Cancro, CTV e outros vírus e viroides, se houver interesse e disponibilidade.

Para atender o objetivo 3. Será preciso testar a campo os genótipos obtidos no presente trabalho. Os clones elites candidatos a serem novas cultivares serão submetidos a ensaios de competição de cultivares em regiões distintas no Paraná. Para cada região será considerado um tipo de ensaio, onde preferencialmente será utilizado o delineamento em blocos ao acaso (DBC), com tratamentos principais (genótipos de copas e de porta-enxertos), organizados em esquema de parcelas sub-divididas (se necessário para estudar um tratamento secundário) e com no mínimo 4 repetições (blocos). Havendo área disponível, cada parcela terá 2 plantas úteis na linha de plantio, entre outras 2 de bordadura. Dessa forma, a análise de variância contemplará as seguintes causas de variação:

Causa de variação

Bloco

Fator 1 (Copas e/ou
porta-enxertos)

Resíduo A

Fator 2 (outro)

F1x F2

Resíduo B

Total

 





Em função da escassez de recursos humanos no IAPAR, a quantidade de experimentos conduzidos vai depender do apoio recebido da iniciativa privada para a implantação e a condução de cada experimento. Havendo apoio, espera-se implantar esses experimentos em 3 regiões distintas: de baixa (~300m), média (~500m) e alta (~900m) altitude em relação ao nível do mar em função da influência climática, principalmente amplitude térmica, na performance dos genótipos. Também será possível considerar 3 tipos de experimentos em função da época potencial de maturação dos frutos: genótipos precoces, de meia-estação e tardios. Com isso, havendo apoio, espera-se a instalação de 9 ensaios de competição de cultivares no Estado, que ao longo de pelo menos 3 safras (2018/19, 2019/20 e 2020/21) possam gerar dados importantes para o lançamento, ou não, de uma determinada cultivar.

Já existem ensaios implantados de **porta-enxertos** de citros em Rancho Alegre, Guairaçá, Nova América da Colina, Assaí e São Jerônimo da Serra, instalados durante a execução do projeto ID414, encerrado em 23 Ago 2017. Foram implantados em blocos casualizados em Guairaçá e Rancho Alegre e inteiramente casualizados nas demais localidades. O **Quadro 1** abaixo mostra todos os ensaios de competição de porta-enxertos instalados em cada área. Resultados parciais do experimento em Guairaçá já foram apresentados no relatório final do projeto ID414, no qual a dissertação de Mestrado do aluno **Ciro Daniel Marques Marcolini** faz parte. Esse relatório foi submetido ao sistema SEPAC em 27 de Outubro de 2017.

Quadro 1) Descrição dos ensaios de competição de porta-enxertos em diferentes localidades no estado do Paraná instalados entre 2012 e 2013.

P

S

M

NUM. LOCAL	PRODUTOR	DELINEAMENTO	ALTITUDE	LATITUDE	LONGITUDE	1	2	3	4	5	6
						Guairaca	RAlegre	NAColina	SSAmorei	Assai	SJSerra
						Cocamar	Fernando	Heriberto	Alessandr	Marcelo	Egon
						DBC	DBC	DIC	DIC	DIC	DBC
						469,39	380,9	529,19	650,39		950
						Mar.2012	Dez.2012	Abr.2013	Ago.2013	Abr.2013	Jul.2013
PLANTIO	Trat	PORTA ENXERTO / Número de acesso/Origem	BAG-CC	Presença (1) ou nao (X) do tratamento							
	1	Citrandarin Changsha x English Large - HRS 853	1454	1	1	1	1	1	1	1	1
	2	Citrandarin Changsha x English Small - HRS 801	1710	1	1	1	X	X	X	X	1
	3	Citrandarin Cleopatra x English	1483	1	1	1	1	1	1	1	1
	4	Citrandarin Cleopatra x Rubidoux	1600	1	1	1	1	1	1	1	X
	5	Citrandarin Sunki x Benecke - HRS 812	1697	1	1	X	1	1	1	1	1
	6	Citrandarin Sunki x English - 256	1628	1	1	1	1	1	1	1	1
	7	Citrumelo F. 80 - 18	1461	1	X	X	1	1	1	1	X
	8	Citrumelo F. 80 - 3	1460	1	1	1	1	1	1	1	1
	9	Citrumelo F. 80 - 5	1457	1	1	X	X	X	X	X	X
	10	Citrumelo F. 80 - 6	1456	1	1	1	X	X	X	1	1
	11	Citrumelo F. 80 - 7	1458	1	1	1	X	X	X	X	X
	12	Citrumelo F. 80 - 8	1459	1	1	1	X	X	X	X	X
	13	Citrumelo W- 2	1455	1	1	1	1	1	1	1	1
	14	Citumelo Swingle	401	1	1	1	1	1	1	1	1
	15	L. Cravo x Lar. Azeda	1468	1	X	X	X	X	X	X	X
	16	Sianese Pumelo x Gotha - Road Trifoliata - HRS 802	1699	1	1	X	X	X	X	X	X
	17	Tangor Morcott x Trifoliata - 9	1470	1	1	X	X	X	X	X	X
	18	Poncirus trifoliata	Pratinha-	1	1	1	1	1	1	1	X
	19	Flying Dragon	Eduardo	1	1	X	1	1	1	1	X
	20	Limão Cravo	Querênci	1	1	X	X	X	X	X	X
	21	L. Rugoso da Florida	Pratinha-	X	1	X	X	X	X	X	X
	22	Tangerina Sunki	Pratinha-	X	1	X	X	X	X	X	X
	23	Citrango F. 81 - 13	1489	X	X	1	1	1	1	1	1
	24	L. Rugoso Africa	Pratinha-	X	X	X	1	1	1	1	1
	25	Citrumelo F. 80 - 18	1488	X	X	X	X	X	1	1	X
TOTAL DE TRATAMENTOS				20	20	13	13	14	11		

Ainda foram instaladas 2 áreas demonstrativas com alguns porta-enxertos nas estações experimentais do IAPAR na Lapa (dentro do projeto sob gerência do colega Cláudio Medeiros da Silva) e em Santa Helena (dentro do projeto sob gerência do colega Paulo Vicente Contador Zaqueo). Havendo apoio todas estas áreas serão mantidas e gerarão informações importantes para atender esse objetivo.

Em relação às copas, também serão implantados experimentos com cultivares de que possam atender a demanda do setor produtivo em relação à produtividade, qualidade dos frutos e época de produção. As áreas a serem implantadas dependerão do apoio de produtores que efetuarão o plantio e cuidarão das plantas. Essas áreas serão definidas em breve com o setor produtivo.

Para atender ao objetivo 4. Plantas consideradas elites, tanto nos ensaios de competição de cultivares quanto nos campos de avaliação de híbridos serão utilizadas como fonte da característica desejada nos trabalhos de melhoramento clássico e de engenharia genética em curso no Laboratório de Biotecnologia (LBI) do IAPAR. Genótipos transgênicos de porta-enxertos produzidos pelo LBI para tolerância a estresses abióticos serão testados nas estufas do LBI, para tolerância à seca, e do CCSM-IAC, para condições distintas de nutrição mineral.

Também a eficiência fotoquímica e a bioquímica podem ser ao menos em parte, a origem do melhor aproveitamento do N assimilado pelo limoeiro. A fim de explicar as diferenças genéticas dessas espécies na EUN, o grupo de pesquisa em fisiologia e nutrição do CCSM-IAC propõe estudar as características fotoquímicas e bioquímicas (IRGA, Li-6800 acoplado com câmara de fluorescência, Inc. Lincoln, EUA), a partição do N na folha e na planta (pelo método Kjeldahl para amostras secas a 65 °C e moidas de folhas, ramos e raízes) e a partição da massa seca em plantas de limoeiro e laranja cultivadas em vasos, ao longo do crescimento e submetidas a dois níveis de adubação nitrogenada (baixo e adequado). Serão avaliadas a assimilação diurna de CO₂, eficiência fotoquímica, limitações bioquímicas, estomáticas e do mesofilo, partição do N e acúmulo, distribuição de carboidratos nas plantas e expressão de aquaporinas facilitadoras da difusão de CO₂ no mesofilo foliar. Para identificação dos homólogos da aquaporina 1 em *Citrus*, as sequências de aminoácidos das proteínas identificadas em *N. tabacum* (NtAQP1), *A. thaliana* (AtPIP1;2) e *H. vulgare* (HvPIP2;1) serão usadas em busca de homologia no genoma de *Citrus sinensis* (www.phytozome.net).

As medidas serão feitas em função da variação dos elementos naturais durante o dia em folhas maduras, completamente expostas localizadas entre a terceira e quinta posição do ramo. A densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFFA) no início de cada medida será fixada e utilizada para as demais réplicas de medidas equivalentes ao mesmo horário. As variáveis medidas em relação ao ambiente serão: temperatura do ar (T_{ar}) e da folha (T_f) e diferença de pressão de vapor entre folha e ar (DPVfolha-ar). Em relação às trocas gasosas serão medidas: assimilação de CO₂ (P_N, μmol m⁻² s⁻¹), condutância estomática (g_s, mol m⁻² s⁻¹), transpiração (E, mmol m⁻² s⁻¹) e a concentração intercelular de CO₂ (C_i, μmol mol⁻¹). As variáveis em relação à fluorescência da clorofila a serão: fluorescência mínima (F_o) e máxima (F_m), medidas após adaptação no escuro (30 min) e fluorescência no estado de equilíbrio dinâmico (F') e máxima (F_{m'}) medidas após adaptação à luz.

Espera-se então identificar um ou mais fatores genéticos/fisiológicos que contribuem para a maior EUN no limoeiro quando comparado com laranja, e a contribuição de cada um destes ao processo global de formação da produção de frutos em *Citrus*. Os novos conhecimentos poderão contribuir para o melhoramento genético da citricultura com a seleção e manejo de variedades-copa mais econômicas no consumo de nutrientes para a produção no campo.

Para atender os objetivos 5, 6 e 7. Serão usadas construções gênicas distintas, com os genes: mutante Δ1-pirrolina-5-carboxilato sintetase (*P5CS*) que codifica a enzima limitante na biossíntese de prolina em plantas, visando obter uma concentração maior de prolina na planta e conseqüentemente maior tolerância a estresse abióticos, como seca e condições distintas de fertilidade de solo; o gene *aiiA* codifica a enzima AHL-lactonase. Essa enzima inativa as acil homoserinas lactonas (AHLs)

produzidas por bactérias fitopatogênicas, impedindo que esse componente de comunicação entre as mesmas (*quorum-sensing*) funcione em plantas transgênicas, e potencialmente impedindo o desenvolvimento do processo de doença em plantas inoculadas. Será testada também para CVC e Cancro; o gene mutante *NPK1* expressa uma MAP-Kinase responsável por colaborar em transdução de sinais que podem levar uma planta transgênica a uma resposta mais acentuada sob determinadas condições. Está sob o controle do promotor 35S e o gene de resistência à glufosinato de amônio. O gene *bar* (*phosphinothricin acetyl transferase*) confere resistência ao herbicida *bialaphos* e *phosphinothricin* (PPT) será utilizado para seleção. As transformações serão realizadas em explantes de seções transversais finas de epicótilo de plântulas cultivadas in vitro e de tecidos de maduros (ramos) com co-cultivação com *Agrobacterium tumefaciens* estirpe EHA 105 contendo o plasmídeo com o transgene de interesse sob determinado promotor, de acordo com a construção utilizada. As plantas transgênicas obtidas serão testadas sob pressão de doenças de citros (HLB, CVC e Cancro). As plantas geneticamente modificadas obtidas estão sendo mantidas em casa-de-vegetação, e alguns eventos com o gene *aiiA* foram transferidos para o Fundecitrus, em Araraquara, SP, para avaliações de performance. Porta-enxertos transgênicos com acúmulo de Prolina poderão ser testados nas estufas do LBI-IAPAR para estresse hídrico e no CCSM-IAC em Cordeirópolis, SP, sob estresse nutricional.

Os materiais transgênicos produzidos nesse projeto e nos anteriores (IDs 275, 278, 421 e 427) estão sendo testados nas estufas do LBI para tolerância ao estresse hídrico, plantas com o transgene P5CS, e para tolerância ao HLB, como o transgene *aiiA*. Detalhes e resultados anteriores estão descritos nos respectivos relatórios no sistema SEPAC.

Serão usadas avaliações quimiométricas (metaboloma), moleculares (transcriptoma), fisiológicas, nutricionais e testes empregando sondas frias ou radioativas (marcadas com Fósforo 32 ou 33) na fenotipagem de cada genótipo e outras técnicas de biologia molecular acordo com o interesse e necessidade.

Para atender o objetivo 8. As plantas produzidas na UFPR, por MARÍLIA PEREIRA MACHADO, durante seu pós-doutorado (MACHADO 2012), foram transportadas para as estufas do Laboratório de Biotecnologia (LBI) do IAPAR e estão atualmente ainda em fase de crescimento juvenil em vasos individualizados. Estas são tangerineiras das cultivares Cravo, Mexerica-do-rio, Ponkan e Montenegrina candidatas a serem poliplóides, pois foram tratadas com Colchicine em suspensões celulares e em calos embriogênicos. Para os períodos subseqüentes, serão feitas novas análises de citometria de fluxo e cariotipagem em amostras dessas plantas para a confirmação do nível de ploidia das mesmas. Genótipos tetraploides (4n) são de maior interesse, pois após as plantas atingirem a fase de maturidade fisiológica, serão usadas como parentais em cruzamentos com tangerineiras

diplóides (2n) normais para gerarem híbridos triplóides (3n) estéreis, e conseqüentemente sem sementes.

ORÇAMENTO

Item de dispêndio	Descrição (geridos pela FAPEAGRO)	R\$ Total	% Total
1) Materiais consumíveis	Materiais de escritório e de laboratório (reagentes, limpeza, segurança, acessórios de equipamentos, materiais de campo).	19.547,81	7,50
2) Material permanente	Equipamentos de medição, ambiência e mobiliário.	18.421,30	7,10
3) Serviços de terceiros	Serviços em obras de adequação de edificações, editoração de material impresso e/ou digital, publicações de resultados de pesquisa, contratação de técnico agrícola.	20.674,33	7,90
4) Bolsas de estudo	Capacitação técnica em aperfeiçoamento profissional, participação em reuniões técnicas, encontros científicos e treinamento no Brasil e no exterior.	80.249,80	30,80
5) Despesas de transporte, Estadia e Alimentação	Viagens de campo, participação em reuniões técnicas e encontros científicos.	82.648,59	31,70
6) Outros itens	Despesas variáveis a título de reserva técnica, aplicáveis em qualquer item de dispêndio	11.828,20	5,00
7) Despesas Bancárias	Despesas com movimentações financeiras	1.203,70	0,46
8) Administração Fapeagro	Taxa	26.063,74	10,00
TOTAL		260.637,47	100,00

CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO

Trata-se de um trabalho de longo prazo, em função das características biológicas e hortícolas da cultura de citros. As espécies possuem um longo período juvenil (normalmente de 7 a 10 anos), a produção de mudas cítricas leva mais de um ano em condições de estufas, e o crescimento das plantas no campo requer 3 anos para o início das avaliações de safra e qualidade dos frutos. Com isso, o presente trabalho deverá durar mais de uma década. Entretanto, prevê-se uma reavaliação do mesmo em 2 ou 3 anos, e com isso o cronograma está ajustado apenas até 2020.

ATIVIDADE	2009 - 2011	2012 - 2015	2016 - 2017	2018 - 2019	2020
Importação dos genótipos	X	X			
Cruzamentos		X	X		
Preparo das mudas		X	X		
Preparo do terreno			X		
Plantio no campo			X	X	
Avaliações de tamanho de copa			X	X	X
Avaliações de estresses, produção e qualidade de frutos			X	X	X
Elaboração de relatório final e recomendações					X

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

ALBRECHT, U.; BOWMAN, K.D. Gene expression in *Citrus sinensis* (L.) Osbeck following infection with the bacterial pathogen *Candidatus Liberibacter asiaticus* causing Huanglongbing in Florida. *Plant Science*, v.175, p.291–306, 2008.

ANDRADE, P.F.S. Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Paraná/DERAL, 2007.

AULER, P.A.M., PAVAN, M.A., NEVES, C.S.V.J., CARLOS, E. F. Ocorrência de declínio dos citros na região Noroeste do Paraná. *Revista Brasileira de Fruticultura* (Impresso), v.33, p.286 - 290, 2011.

BARICHELO, D. ; FARINACIO, R. ; dos Santos, CCN ; ANDRADE, Giselly Aparecida ; Nagashima, GT ; Garbúglio, D.D. ; Yada, IFU ; Travençolo, RF ; Bianchi, B.C. ; VIEIRA, L. G. E. ; CARLOS, E. F. . Drought-tolerant transgenic Swingle Citrumelo controls accumulation of proline modulating the expression of key genes of the proline metabolism. *Citrus Research & Technology*, v. 38, p. 1-12, 2017.

BASSANEZI, R.B.; FILHO, B.A.; AMORIN, L.; FERNANDES, N.G.; GOTTWALD, T.R.; BOVÉ, J.M. Spatial and temporal analyses of citrus sudden death as a tool to generate hypotheses concerning its etiology. *Phytopathology*, vol. 93, n. 4, p.502- 512, 2003.

BAJAJ, S.; JAYAPRAKASH, T.; LI-FREI, L.; HO, T.H.D.; WU, R. Transgenic approaches to increase

- dehydration-stress tolerance in plants, *Molecular Breeding*, v. 5, p. 493–503, 1999.
- BLUMER, S.; Pompeu Junior, J. Avaliação de citrandarins e outros híbridos de trifoliata como portaenxertos para citros em São Paulo. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.27, n.2, p.264-267, 2005.
- BOVÉ, J.M. Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology* v.88, p.7-37, 2006.
- CARLOS, E.F., MATTOS JR, D., DE NEGRI, J.; POMPEU JR, J., LATADO, R. R., AZEVEDO, F.A., BASTIANEL, M., CRISTOFANI, M. Seleção de plantas elites e o concurso Laranja Nota 10. *Laranja* 27: 131-146, 2006.
- CARLOS, E.F., COLETTA-FILHO, H.D., ALVES, K.C.S., LOTTO, L.L., FENDER, L.C., BONATO, F., EUGÊNIO, M., MACHADO, M. Huanglongbing (HLB) research and control strategy in the State of São Paulo, Brazil. *ISC Congress*, Abstract 79: 48, 2008.
- CARLOS, E.F.; STUCHI, E.S.; DONADIO, L.C. Porta-enxertos para a citricultura paulista. Jaboticabal: FUNEP, 1997. 47p. (*Boletim Citrícola*, 1).
- COLETTA FILHO, H.D., CARLOS, E.F., ALVES, K.C.S., PEREIRA, M.A.R., BOSCARIOL-CAMARGO, R., MACHADO, M.A. In planta multiplication and graft transmission of 'Candidatus Liberibacter asiaticus' revealed by Real-Time PCR. *European Journal of Plant Pathology*, v.126, p.53 - 60, 2010.
- DELAUNEY, A. J.; VERMA, D. P. S. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *The Plant Journal*, v. 4, p. 215-223, 1993.
- DELGADO, J.A.; ALVA, A.K.; FARES, A.; PARAMASIVAM, S.; MATTOS JR., D.; SAJWAN, K. Numerical modeling to study the fate of nitrogen in cropping systems and best management case studies. *Journal of Crop Improvement*, v.15, n.2, p.421-470, 2006.
- DONADIO, L.C., BANZATTO, D.A., SEMPIONATO, O.R., STUCHI, E.S. A comparison of Seleta and other sweet orange cultivars in Sao Paulo. *Proc. Int. Soc. Citriculture*, p.116-118, 1996.
- FARINACIO, R. ; BARICHELLO, D. ; ANDRADE, Giselly Aparecida ; LEITE, D. A. C. ; SANTOS, C. C. N. ; FELICIO, M. S. ; MOLINARI, H. B. ; CAMPOS, Marília Kaphan Freitas de ; Alcantara, G.B. ; VIEIRA, L. G. E. ; CARLOS, E. F. . Enhanced Drought Tolerance In Transgenic Swingle Citrumelo Overexpressing VaP5CS Under The Control Of Stress Induced Rd29A Promoter. *Citrus Research & Technology*, v. 38, p. 1-12, 2017
- FUNDECITRUS, 2015 (www.fundecitrus.com.br).
- GLOBO RURAL, 2013 (www.g1.globo.com/economia/agronegocio/noticia/2013/11/agricultores-do-pr-que-apostaram-na-laranja-enfrentam-problemas.html).
- GMITTER, F. G.; LING, X. B.; CAI, C.Y.; GROSSER, J. W. Colchicine-induced polyploidy in *Citrus* embryogenic cultures, somatic embryos, and regenerated plantlets. *Plant Science*, v. 74, p. 135-141, 1991

- GROSSER, J. W.; GMITTER, F. G. Protoplast fusion and citrus improvement. *Plant Breed Rev*, v. 8, p. 339-374, 1990.
- HUTCHISON, D.J. Swingle citrumelo - a promising rootstock hybrid. *Florida State Horticultural Society*, p. 89-91, 1974.
- KITAJIMA, E.W., SILVA, D.M., OLIVEIRA, A.R., MUELLER, G.W., COSTA, A.S. Thread-Like Particles Associated with Tristeza Disease of Citrus. *Nature* 201: 1011-1012, 1964.
- LEITE JR., R.P.; MOHAN, S.K. Integrated management of the citrus bacterial canker disease caused by *Xanthomonas campestris* pv. *citri* in the State of Paraná, Brazil. *Crop Protection*, v.9, p.3-7, 1990.
- LOCALI, E.C., FREITAS-ASTUA, J., DE SOUZA, A.A., TAKITA, M.A., ASTUA-MONGE G., ANTONIOLI, R., KITAJIMA, E.W., MACHADO, M.A. Development of a molecular tool for the diagnosis of leprosis, a major threat to citrus production in the Americas. *Plant Disease* 87: 1317-1321, 2003.
- MACHADO, M.P. Indução de poliploidia em tangerinas pelo uso de agentes antimitóticos em suspensões celulares para obtenção de linhagens tetraploides. BOLSISTA DE PÓS-DOUTORADO JÚNIOR - CNPq; supervisor Luiz Antonio Biasi; Colaboradores: Claudine Maria de Bona (lapar), Neusa Maria Colauto Stenzel (lapar), Zuleide Hissano Tazima (lapar), e Eduardo Fermino Carlos (lapar). RELATÓRIO TÉCNICO 2012 E PROPOSTA DE ATIVIDADES PARA 2013. 36p., 2012.
- MATTOS Jr, D.; QUAGGIO, J.A.; CANTARELLA, H.; BOARETTO, A.E. Nitrogênio e enxofre na cultura dos citros. In: International Plant Nutrition Institute. (Org.). Nitrogênio e enxofre na agricultura brasileira. Piracicaba: International Plant Nutrition Institute, p. 413-443. 2007.
- NEVES, M.F.; TROMBIN, V.G.; MILAN, P.; LOPES, F.F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. O retrato da citricultura brasileira. Ribeirão Preto – SP. Citrus BR. 138p. 2011.
- QUAGGIO, J.A.; MATTOS JR, D.; CANTARELLA, H.; ALMEIDA, E.L.E.; CARDOSO, S.A.B. Lemon yield and fruit quality affected by NPK fertilization. *Scientia Horticulturae*, v.96, p.151-162, 2002.
- RHODES, D; HANDA, S; BRESSAN, R.A. Metabolic changes associated with adaptation of plant cells to water stress. *Plant Physiology*. v. 82, p. 890-903, 1986.
- RHODES, D.; SAMARAS, Y. Genetic control of osmoregulation in plants, *CRC Press, Boca Raton, Fla*, 1994.
- SAGARAM, U.S.; De ANGELIS, K.M.; TRIVEDI,P.; ANDERSEN, G.L.; LU, S.E.; WANG, N. Bacterial diversity analysis of Huanglongbing pathogen-infected citrus, using phyloChip arrays and 16S rRNA gene clone library Sequencing. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.75, p.1566-1574, 2009.
- SPINA, P., REFORGIATO RECUPERO, G., STARRANTINO, A., & MANNINO, P. Use of mutagenesis at the Istituto Sperimentale per l'Agrumicoltura Acireale: Results and prospects for the future. International Atomic Energy Agency (IAEA), vol.22, n.14, p. 257-262, 1991.

- STARRANTINO, A., SPINA, P., & RUSSO, F. Embriogenesi nucellare e sviluppo di piantine in vitro dalle nucelle di alcune specie di agrumi, *Giornale botanico italiano*, Volume 112, Issue 1-2, , pag.41-52, 1978.
- STENZEL, N.M.C.; NEVES, C.S.V.J.; GOMES, J.C.; MEDINA, C. Performance of 'Ponkan' Mandarin on Seven Rootstocks in Southern Brazil. *HortScience*, v.38, n.2, p.176-178, 2003.
- TURNER, N. C.; JONES, M. M. Turgor maintenance by osmotic adjustment: a review and evaluation. In: N.C. Turner, P.J. Kramer (Eds.), **Adaptation of Plants to Water and High Temperature Stress**, Wiley, New York. p. 87-103, 1980.
- ZHANG, C. S.; LU, Q.; VERMA, D. P. S. Removal of feedback inhibition of delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase, a bifunctional enzyme catalyzing the first 2 steps of proline biosynthesis in plants. *Journal of Biological Chemistry*, n. 270, p. 20491-20496, 1995

2

u

3

3

u