



Informativo Centro de Citricultura

Cordeirópolis, Janeiro de 2012 • Número 200

Avanço nas Pesquisas para Controle da CVC

A clorose variegada dos citros (CVC) é uma das principais doenças que afeta os pomares de laranja no Brasil. Seu agente causal é a bactéria *Xylella fastidiosa*, que coloniza o xilema das plantas, obstruindo o transporte da seiva da raiz para a parte aérea. Durante seu crescimento no xilema, as bactérias agregam-se uma às outras e às paredes dos vasos por meio de proteínas e polissacarídeos extracelulares produzidos e secretados por elas mesmas.

Após o sequenciamento do genoma desta bactéria vários estudos funcionais, que tem por finalidade elucidar o papel biológico de seus genes, têm sido realizados. Isto permitiu associar um dos principais mecanismos de patogenicidade dessa bactéria à sua eficiente capacidade de adesão e colonização dos vasos do xilema, culminando na formação de um biofilme, ou seja bactérias multiplicando e crescendo em agregados (Fig. 1).

Desse modo, uma hipótese de trabalho para reduzir a capacidade de colonização seria inibir a formação

do biofilme. Muitas bactérias patogênicas de humanos também formam biofilmes desencadeando, por exemplo, doenças severas do trato respiratório e placas bacterianas em dentes. Princípios ativos antibacterianos incluem agentes mucolíticos que tem a capacidade de reduzir a formação de biofilmes. Estes agentes são substâncias que interagem com proteínas e polissacarídeos do muco, possibilitando sua eliminação mais eficientemente.



Fig. 1: Biofilme de *Xylella fastidiosa* em um vaso de xilema.

Agentes mucolíticos mais comumente utilizados são análogos do aminoácido cisteína., especialmente um análogo de cisteína, denominado N-acetil cisteína. Esses compostos

são moléculas antioxidante que possivelmente atuam reduzindo a formação das pontes de sulfeto entre as proteínas responsáveis pelas interações das células bacterianas e outras superfícies. Tais moléculas ainda não haviam sido testadas em sistemas bacterianos de plantas. Essa tem sido uma das abordagens do programa de melhoramento de citros para resistência ou tolerância à CVC em laranja doce. O programa inclui não somente a busca por genótipos mais resistentes, através de cruzamento entre cultivares, como também estratégias de manejo da doença baseadas na redução de colonização da bactéria na planta.



Fig. 2: Plantas teste com sintomas de CVC.



Fig. 3: Plantas tratadas com análogo de cisteína em sistema hidropônico. Controle não tratado (A) e tratadas com 120mg (B), 600mg (C) e 1500mg (D).

Editorial

Patente e Inovação

Na agricultura, um dos aspectos relevantes do setor de ciência e tecnologia nacional é a reduzida transferência de conhecimento e tecnologia para o setor de produção de bens e serviços. Entre os fatores associados a isso estão a baixa capacidade de absorver inovação pelas empresas e a falta de mecanismos de interação e transferência entre os setores. O setor agrícola é particularmente crítico em relação a absorção e uso de novas tecnologias. Mais recentemente, com as vantagens de cultivares geneticamente modificadas, o setor agrícola passou a incorporar mais novas tecnologias. As evidências apontam a citricultura como uma cadeia com potencial de absorção de novas tecnologias, o que estaria associado ao aumento de produtividade alcançado por muito produtores, em que pese a média ainda ser baixa. Evidentemente que a incorporação de novas tecnologias tem um preço imposto pela necessidade de se manter competitivo.

Como parte do setor de P&D, o Centro de Citricultura tem procurado ampliar seu escopo de ação, preocupando-se com propriedade intelectual em várias frentes de atuação. Assim, como representante do Instituto Agrônomo, o Centro tem procurado se apresentar como detentor de novas cultivares de citros, junto ao Ministério da Agricultura, e de patentes, no Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI). Embora os procedimentos de proteção intelectual sejam distintos, ambos ampliam o reconhecimento e as expectativas futuras de garantia que a transferência ao usuário será feita sob guarda da legislação, com respeito pelo trabalho realizado. O setor agrícola ainda está longe de se comparar ao industrial, quanto ao reconhecimento da importância da propriedade intelectual, mas alguns passos já foram dados.

Ao buscar o registro de novas cultivares ou a patente de produtos e processos, o Centro de Citricultura vai ao encontro da legislação de proteção intelectual, procurando mecanismos mais transparentes e legais de relacionamento com o setor de produção, que é afinal o único capaz de fazer inovação tecnológica, pois sem uso, a tecnologia passa a ser letra morta.

É certo que muitos ainda considerarão tais iniciativas inócuas, pois até então tinham nos centros de pesquisa a certeza de obtenção e utilização de tecnologia sem custo. No entanto é preciso destacar que ao se alinhar com a modernidade, o Centro procura estabelecer relações sólidas com seus usuários, razão principal para geração de novos produtos e processos científicos e tecnológicos.

Matéria de Capa

Para avaliação do potencial dessas moléculas, foi escolhida o análogo de cisteína, denominado N-acetil cisteína (NAC) e feitos testes tanto com a bactéria isolada quanto em plantas infectadas e sintomáticas para CVC. Foi assim possível observar efeito direto de inibição sobre o crescimento da bactéria e na redução de formação do biofilme. Embora os resultados em laboratório tenham sido promissores, cabia ao grupo de pesquisa do Centro de Citricultura testar o efeito desse composto em plantas com CVC.

Para isso, plântulas de laranja Pera foram enxertadas por encostia lateral em plantas fontes da bactéria (Fig. 2A), resultando em plantas testes com altos níveis de população bacteriana e sintomas da doença (Fig. 2B). As plantas foram mantidas em hidroponia, onde receberam doses semanais de 120, 600 e 1500 mg de NAC, favorecendo assim sua absorção pelo sistema radicular.

O experimento foi conduzido em duas épocas do ano, com quatro repetições por tratamento. Após três meses de tratamento com o análogo de aminoácido houve uma significativa redução dos sintomas nas doses de 120 e 600 mg, com toxidez em doses de 1500 mg (Fig. 3).



Fig. 4: Evolução temporal em plantas tratadas com NAC durante 6 meses. Controle não tratado (A), fertirrigação (B) e fertirrigação e injeção (C).

Avaliações por cromatografia de alta pressão confirmaram a absorção do composto pela raiz e sua dispersão na parte aérea da planta. Três meses após a suspensão do composto

na solução houve reaparecimento dos sintomas de CVC. Portanto, aparentemente o composto não é bactericida, embora iniba o crescimento de *Xylella fastidiosa* sem matar toda a população. As mesmas plantas transferidas para solo e mantidas com fertirrigação com o análogo, mostraram novamente remissão de sintomas após seis meses (Fig. 4).

Esses resultados demonstram que esses análogos tem alto potencial para uso na agricultura, uma vez que é uma molécula pequena e de uso seguro para animais e humanos. O desafio agora é buscar a melhor formulação para aplicação do composto, de preferência em sistemas de fertirrigação com liberação lenta, possivelmente em nano partículas. Para tanto, estão sendo estabelecidas parcerias com empresas com interesse em explorar o potencial dessa molécula. Os primeiros testes de campo serão estabelecidos em 2012.

O potencial da molécula poderá ser ampliado através de complexação com outros compostos antimicrobianos, como cobre e zinco. O uso dessas moléculas para potencial controle de doenças bacterianas em plantas encontra-se em processo de patenteamento nacional e internacional (018110011623 – INPI e PTC/BR 2012 – 000003), com o Instituto Agrônomo como proprietário. As custas de submissão do pedido de patente foram cobertas pelo INCT Citros.

Ainda não se sabe ao certo o efeito exato dessa molécula sobre a bactéria após sua absorção pela planta. Um modelo hipotético do possível mecanismo de ação deste composto é apresentado na Fig. 5.

As bactérias começam um processo de adesão entre si e na superfície do xilema, com a formação de biofilme, responsável pela obstrução de vasos. O análogo de aminoácido, representado em azul, por competição de uso com o aminoácido normal se ligaria as pontes de sulfeto das proteínas fimbriais (responsáveis pelo movimento da bactéria) e/ou afimbriais (responsáveis pela adesão célula-célula). Em consequência, as proteínas alteram sua conformação comprometendo sua função, seja na colonização sistêmica,

ou na formação do biofilme. Devido a possível desestruturação do biofilme, o fluxo de água e nutrientes é restaurado permitindo reestabelecimento da planta.

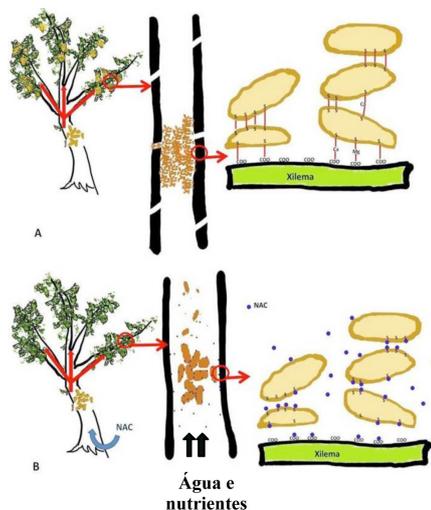


Fig. 5: Modelo hipotético de ação de NAC na redução do biofilme de *Xylella fastidiosa* dentro dos vasos do xilema.

Notas

Projeto FAPESP

O projeto “Caracterização horticultural e seleção de acessos de tangerinas e híbridos para o Estado de São Paulo”, coordenado pela pesquisadora Marinês Bastianel, recebeu apoio da Fapesp para os próximos dois anos. Ele visa caracterizar a grande diversidade de cultivares de tangerinas existente no Banco Ativo de Germoplasma (BAG Citros IAC) e selecionar cultivares fáceis de descascar (*easy peelers*) ou do tipo Ponkan (*Ponkan-like*), que podem atender demanda do mercado consumidor. Essas cultivares serão avaliadas juntamente com pelo menos dez novos híbridos de tangerina x laranja, pré-selecionados quanto à época de maturação, características físico-químicas de frutos e resposta à mancha marrom de alternaria. Espera-se com este trabalho selecionar novos materiais com potencial comercial que possibilitem a expansão da época normal da safra de tangerinas, trazendo grandes benefícios econômicos aos produtores de frutos de mesa do Estado de São Paulo.

Bolsas de Mestrado FAPESP

A Fapesp aprovou várias bolsas de alunos de Mestrado orientados por pesquisadores do Centro de Citricultura. Alguns alunos são do Curso de Genética e Biologia Molecular da Unicamp, outros do Curso de Genética da Unesp de Jaboticabal:

Carolina Sardinha Francisco. ‘Estrutura de populações e inoculações recíprocas de *Xylella fastidiosa* subesp. *pauca* com ocorrência em cultivos vizinhos de *Citrus sinensis* e *Coffea arabica* sob condições do Estado de São Paulo. Orientador: Helvécio Della Coletta Filho;

Bárbara Caroline Niza Silva. ‘Estudo da interação *Xylella fastidiosa*-hospedeiro: efeito do movimento e colonização in planta e transmissão pelo inseto vetor. Orientadora: Alessandra Alves de Souza;

Willian Eduardo Lino Pereira. ‘Estudo funcional de genes de *Citrus reticulata* associados a resistência a clorose variegada dos citros através da superexpressão em *Citrus sinensis* e *Arabidopsis thaliana*. Orientadora: Alessandra Alves de Souza;

Tiago Silva de Oliveira. ‘Expressão de genes da via do ácido salicílico em resposta à infecção por *Candidatus Liberibacter* spp, agente do *huanglongbing* dos citros’. Orientador: Marcos A. Machado.

Curso de Citricultura a Distância

O Centro de Citricultura Sylvio Moreira iniciou no último dia 16 o Curso de Citricultura a distância atendendo a demanda para treinamento em diversas áreas de interesse da citricultura. Com conclusão prevista para 29 de junho próximo, o curso pretende fornecer informações sobre a cadeia produtiva dos citros para a capacitação de recursos humanos e a promoção de intercâmbio entre profissionais, com o objetivo de aprimoramento do conhecimento acerca da cultura, suas características e ferramentas de manejo, visando a melhoria da produção e, conseqüentemente, o desenvolvimento do agronegócio. O programa de trabalho contará

Pesquisa do Centro

Seleção de cultivares de mexericas

A produção de mexericas no Estado de São Paulo se concentra no Vale do Ribeira. Um expressivo diferencial das mexericas é a maior resistência à mancha marrom de alternaria (MMA), principal doença das tangerinas. Nos últimos anos, tem se observado um crescente interesse dos produtores pelas mexericas, provavelmente associado ao impacto econômico de se manter os pomares de tangerina Ponkan e, principalmente, de tangor Murcott.

Um dos principais problemas da citricultura de mesa está relacionado à oferta e demanda de frutas para o mercado, uma vez que o período de safra da maioria das cultivares comerciais se concentra no período de maio a julho. A necessidade de cultivares precoces e tardias, que possam ampliar o período de oferta tem sido uma das mais importantes demandas do setor.

Assim, em 2011, foram avaliados 34 acessos de mexericas do Banco de Germoplasma de Citros do IAC, em Cordeirópolis, SP, tanto para qualidade físico-química dos frutos, quanto para a resposta à doenças. Incidência e severidade à mancha preta dos citros (MPC) e MMA foram avaliadas. Todas as cultivares foram suscetíveis à MPC, porém 80% dos acessos foram resistentes à MMA, comprovando a maior resistência das mexericas a esse patógeno.

As avaliações físico-químicas dos frutos foram realizadas no período de colheita (abril a agosto). Verificou-se que a maturação de cinco e de onze acessos foi, respectivamente, mais precoce e mais tardia do que a mexerica do Rio (IAC 194), cultivar padrão, cujo período de colheita é de maio a junho. Assim, algumas cultivares representam boa alternativa para a ampliação do período de safra de mexericas no Estado de São Paulo. Com base nestes resultados, quinze acessos promissores foram selecionados e serão avaliados em diferentes porta-enxertos nas Regiões do Vale do Ribeira e Central, a partir desse ano.

Com isso, espera-se selecionar cultivares de mexerica com diferentes épocas de produção, possibilitando a expansão da época normal da safra, trazendo benefícios econômicos a produtores da região. Além disso, propõe-se também, selecionar o melhor porta-enxerto que induza maior produção e qualidade da fruta para as diferentes regiões do Estado.

Responsável: Marinês Bastianel e Lilian M. Simonetti, DTI/INCT Citros.

com 18 módulos de estudo, com acompanhamento do corpo docente, composto por profissionais de ensino e pesquisa. Aulas e atividades discentes serão ministradas a distância, via internet, e culminarão com aulas presenciais no Centro e em empresas da região. Profissionais dos setores de produção, extensão, pesquisa, ensino e estudantes de áreas afins são público-alvo do curso. O conteúdo do curso aborda história e economia; distribuição, genética, fisiologia e características das variedades copa e porta-enxerto; tecnologia de produção: material básico e propagação, água, solos, manejo nutricional, mecanização e práticas culturais; fitossanidade: pragas e doenças e manejo do pomar e qualidade, colheita e beneficiamento dos citros. A coordenação do curso está a cargo do Pesquisador Científico Dirceu de Mattos Júnior e do Engº Agrº José Dagoberto De Negri.

Conferência sobre Genoma de Plantas e Animais

A 20ª Conferência sobre Genoma de Plantas e Animais (PAG XX) ocorreu mais uma vez em San Diego, Califórnia, no período de 14 a 18 de janeiro. O evento contou com 2800 participantes e abordou todos os atuais aspectos relativos a genoma, transcriptoma, proteoma, mapeamento genético e genoma funcional de organismos modelos ou de interesse agrônomo. É considerada a maior reunião anual do gênero. Foram 27 workshops de empresas de biotecnologia e genômica e 116 workshops sobre temas específicos, entre eles o de citros, realizado dia 14. O número de apresentações em cada workshop variou de 5 a 20, com o total de 2012 resumos distribuídos entre os workshops e as sessões de pôsteres.

O pesquisador Marcos A. Machado participou com apresentação oral

sobre 'Transcriptoma of Ponkan in the early infection of *Xylella fastidiosa*.' Destacam-se também os pôsteres 'Introns and exons in citrus genome', 'Genetic mapping of early fruiting and number of seeds per fruit in hybrids of Rangpur lime and Swingle citrumelo' e 'Role of CC-NBS-LRR-like in the perception/colonization of *Arabidopsis thaliana* by *Xylella fastidiosa*', todos de pesquisadores do Centro de Citricultura. Maiores detalhes poderão ser obtidos em www.intlpag.org.

Edital Universal do CNPq

O Centro de Citricultura teve sete propostas aprovadas no recente Edital Universal do CNPq. A contratação dos projetos deverá ser efetivada no início de 2012. Todos atendem à programação de Pesquisa & Desenvolvimento do Centro e demonstram a competitividade de seus pesquisadores. São eles:

'Caracterização funcional de terpeno sintases de laranja doce com foco em produção de biocombustíveis. Coordenação: Marco Aurélio Takita;

'Otimização e comparação de formulações líquidas e sólidas à base de *Bacillus subtilis* para controle de *Colletotrichum acutatum*.' Coordenação: Kátia Cristina Kupper;

'Transportadores de potássio e eficiência da absorção do nutriente em porta-enxertos de citros'. Coordenação: Dirceu de Mattos Júnior;

'Validação e seleção de marcadores microsatélites para o estudo genético de espécies e populações segregantes de citros'. Coordenação: Valdenice M. Novelli;

'Seleção de clones superiores de laranjeira Pera para cultivo em diferentes regiões do Estado de São Paulo'. Coordenação: Sérgio Alves de Carvalho;

'Novas variedades de copas e porta-

enxertos para citros'. Coordenação: Mariângela Cristofani-Yaly;

'Avaliação do efeito de N-acetil-L-cisteína na colonização de *Xylella fastidiosa* em laranja doce e reversão de sintomas de CVC.' Coordenação: Alessandra Alves de Souza.

Bolsa de Produtividade do CNPq

Os pesquisadores Marco Aurélio Takita, Marinês Bastianel e Valdenice Moreira Novelli tiveram seus projetos de Bolsa de Produtividade em Pesquisa aprovados pelo CNPq. Mais uma demonstração da capacidade competitiva dos pesquisadores do Centro de Citricultura.



Expediente

Informativo Centro de Citricultura

Editora e jornalista responsável

Conselho Editorial

José Dagoberto De Negri
Marcos Antonio Machado

Colaboração

Alessandra Alves de Souza
Arthur Antonio Ghilardi
Hélcio Della Coletta Filho
Lillian M. Simonetti
Marinês Bastianel

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



**GOVERNO DO ESTADO
SÃO PAULO**

Secretaria de Agricultura
e Abastecimento