



Mecanismos moleculares no desenvolvimento da MMA

A mancha marrom da alternaria (MMA) é a mais séria doença fúngica que afeta as tangerinas e seus híbridos. Além da Dancy, as variedades mais suscetíveis são tangerina Ponkan e tangor Murcott, justamente as mais cultivadas no estado de São Paulo, que é o maior produtor dessa espécie de citros no Brasil. Como poucas variedades compõem a citricultura brasileira, tanto para a indústria quanto para o mercado de frutas frescas, a produção de tangerinas e seus híbridos torna-se vulnerável a problemas fitossanitários, especialmente à MMA.

Em folhas jovens os sintomas incluem pequenas manchas necróticas marrons ou pretas, que podem estar acompanhadas de um halo amarelado (Figura 1A). Essas lesões podem se expandir aumentando assim a área foliar afetada e chegar até atingir as nervuras, além de provocar deformação como a curvatura lateral das folhas (Figura 1 B e C). Os sintomas nos ramos são semelhantes aos observados em folhas e, em condições mais severas da doença, pode ocorrer intensa desfolha e seca de ramos (Figura 1D). Nos frutos os sintomas são pequenas manchas necróticas marrons, que podem evoluir e ocorrer abscisão precoce dos frutos,

o que limita a produtividade da planta ou deprecia o fruto para o consumidor (Figura 1E).

O agente causal dessa doença é o fungo *Alternaria alternata*, que se multiplica em condições de alta temperatura e umidade relativa do ar. A principal característica desse fungo é a produção de uma toxina específica denominada ACT (*Alternaria Citri Toxin*), que está diretamente relacionada ao sintoma de necrose produzido por esse patógeno.

Apesar de a toxina ACT ser essencial para a patogenicidade da *A. alternata* em tangerinas esse não é o único fator determinante do fungo, que possui outros mecanismos pelos quais consegue perceber sinais da planta, ativando vias de sinalização que irão ajudá-lo a ter sucesso na colonização do vegetal. Em *A. alternata* algumas dessas vias já são conhecidas, como a de HOG1 e AP1 que estão relacionadas com estresses osmótico e oxidativo, respectivamente. Essas vias são fundamentais para a sobrevivência do fungo no interior da planta, uma vez que, quando genes dessas vias são deletados, o fungo perde a capacidade de formação de lesões necróticas, mesmo mantendo a capacidade de produção da toxina ACT.

Na tentativa de entender melhor sobre o fungo e outros mecanismos empregados por ele quando se prepara para a infecção da planta, o grupo de pesquisadores do Centro de Citricultura composto pela mestrandia Mariana Massoco Tarallo, pós-doutoranda Carolina Munari Rodrigues e pelo Pesquisador Marco Aurélio Takita trabalharam nesse tema. Foi utilizada a técnica de RNA-seq para identificação dos genes de *A. alternata* expressos quando o fungo se encontra na presença de extratos da planta suscetível, que mimetiza o ambiente *in planta*. Foi avaliada a expressão gênica global de *A. alternata* na presença de extrato de folhas de tangor Murcott, identificando-se processos biológicos envolvidos na patogenicidade do fungo, onde se pôde verificar a presença de algumas classes de proteínas que se mostram importantes não só para esse fungo, mas também para outros fitopatógenos. Dentre elas estão as proteínas P450, HSPs, enzimas degradadoras de parede celular vegetal, transportadores e fatores de transcrição, envolvidos na formação de apressórios, síntese de toxinas e outros metabólitos secundários, além de detoxificação.



Figura 1: Lesões características da mancha marrom da alternaria em tangelo Nova. (A) Lesões necróticas escuras acompanhadas de halos cloróticos em folhas, (B) Lesões necróticas escuras na área foliar, expandidas até a nervura central, (C) Sintomas de deformação com a curvatura lateral das folhas, (D) Lesões necróticas escuras no ramo da planta, (E) Sintomas de pequenas manchas necróticas marrons no fruto.

Editorial

Sustentabilidade na citricultura

A ideia sustentabilidade é comum entre os diversos interessados da cadeia de produção e consumo na citricultura. Dividida em várias faces, frequentemente discutimos a sustentabilidade do negócio, que diz respeito ao sucesso financeiro da atividade no mercado. Também, discutimos a sustentabilidade ambiental, que trata da manutenção da qualidade da água, do ar e da terra, e do uso eficiente desses recursos naturais, acrescentando nesse contexto, questões sobre preservação de ecossistemas, adubações, uso de defensivos, estratégias de controle biológico de pragas e doenças, práticas de manejo e pegada de carbono, por exemplo. Adicionalmente, a sustentabilidade social liga esses processos à qualidade de vida das pessoas, quer sejam trabalhadores ou consumidores, na forma de opinião pública do investimento até a segurança alimentar. Enfim, o conceito embutido na palavra sustentabilidade aparece complexo, que muito frequentemente é traduzido na rastreabilidade de processos e produtos. A citricultura é apoiada por experiências consolidadas para a apresentação de sua organização e, conseqüentemente, para a demonstração de atendimento à sustentabilidade para as suas partes interessadas. Isto tem se dado, então, com a inserção do setor em programas de certificação da produção, principalmente internacionais, que tiveram seu espelho na produção integrada de frutas (PIF) fomentada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Nesse contexto, o Centro de Citricultura tem apresentado importantes fóruns para prover a citricultura com ferramentas necessárias à sua participação nesses programas, dos quais se destacam a realização do Congresso Internacional de Citricultura, em Foz do Iguaçu, em 2016, cujo tema “Citricultura sustentável: o papel do conhecimento aplicado” e, mais recentemente, da Semana da Citricultura 2019, com uma conferência específica no Painel Economia e Mercado, no período de 3 a 6 de junho. Marque na sua agenda e participe desse processo.

Matéria de Capa

Posteriormente, alguns dos genes selecionados tiveram sua expressão avaliada *in vivo*, para análise de seus possíveis papéis na interação do fungo com seu hospedeiro. Após o desafio das plantas de tangor Murcott com o fungo, as folhas em diferentes estágios da infecção foram coletadas para a análise sintomática (Figura 2).

Além disso, uma análise através de microscopia foi possível verificar a formação do apressório de *A. alternata* após 12 horas da infecção em folhas de tangor Murcott, o que nos confirmou que esse é um método pelo qual o fungo utiliza para a infecção na planta hospedeira (Figura 3).

As análises permitiram a construção de um modelo de interação entre *A. alternata* e seus hospedeiros suscetíveis, onde a formação de apressório e a produção de metabólitos secundários e enzimas de degradação de parede, atuam em conjunto com a produção de toxina ACT, auxiliando a penetração do fungo nos tecidos da planta. Paralelamente, lidar eficientemente com estresses é outra resposta que o fungo apresenta para ter sucesso na colonização da planta. Dessa forma, tem-se um melhor entendimento sobre o fungo e alguns mecanismos empregados por ele para ter sucesso na infecção e colonização de seu hospedeiro, o que no futuro pode colaborar com estratégias de controle do patógeno.



Figura 2: Sintomas de mancha marrom da *alternaria* em tangor Murcott. Folhas de tangor Murcott foram inoculadas com uma suspensão de esporos e coletadas após 12 horas, 1, 2, 3, 5 e 7 dias após a infecção (dai).

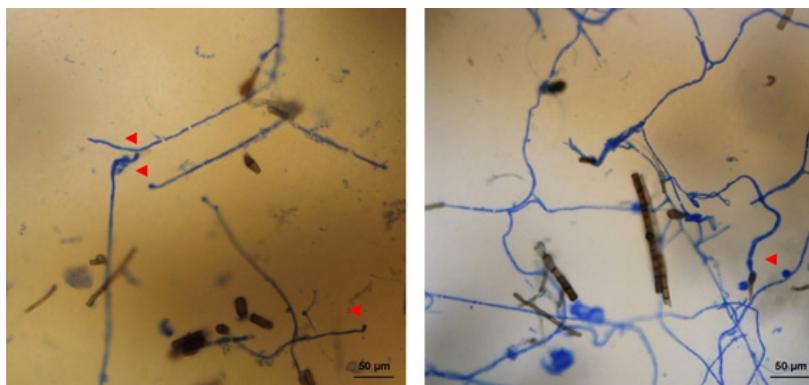


Figura 3: Microscopia da superfície adaxial da folha de tangor Murcott inoculadas com *A. alternata*. As setas vermelhas indicam os apressórios observados após 12 horas de inoculação, com o aparecimento dos primeiros sintomas necróticos.

Reunião anual do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento

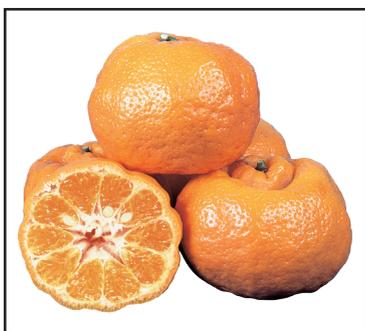
No dia 29 de março foi realizada a Reunião Anual do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento (NPD) do Centro de Citricultura Sylvio Moreira, no Hotel Carlton Plaza, Limeira, SP. Como parte das estratégias do Núcleo, anualmente há o estabelecimento de metas que são avaliadas ao final de fevereiro e os resultados apresentados na reunião anual. São avaliados diversos parâmetros relacionados à pesquisa, como publicação de artigos científicos, publicação de livros ou capítulos, resumos e textos de divulgação, submissão de projetos de P&D e de bolsa, orientações, participação em eventos atividades tecnológicas e de transferência de tecnologia. As metas são estabelecidas dentro dos Programas de Biotecnologia, Fisiologia, Fitossanidade e Melhoramento, atualmente coordenados respectivamente pelos pesquisadores Alessandra Alves de Souza, Rodrigo Marcelli Boaretto, Valdenice Moreira Novelli e Rodrigo Rocha Latado. De posse dos resultados os coordenadores podem identificar nos indicadores de desempenho, os pontos altos, valorizando-os, e baixos, trabalhando-os dentro do seu programa. Além disso, os coordenadores podem identificar as metas não alcançadas dentro de cada grupo, trabalhar as possíveis causas, tentando superá-las no ano seguinte. Com isto, espera-se que todos os envolvidos no NPD busquem cada vez mais melhorar o desempenho individual e de equipe para que se alcance a missão do Centro de Citricultura.

Na reunião foram também discutidos temas relevantes para a atuação do Centro de Citricultura, com especialistas convidados. Neste ano o Diretor Geral da Sucorrico Citrus Industrial e Agrícola Ltda., Ricardo Franzine Krauss, falou sobre o tema “Tecnologia e investimento na citricultura” e a Gerente Adjunta de Comunicação da Fapesp, Claudia Izique, apresentou o tema “Comunicação como ferramenta de pesquisa e desenvolvimento”, propiciando discussões em alto nível. A reunião contou ainda com a presença do novo Diretor Geral do Instituto Agrônomo, Marcos Antonio Machado, que frequentemente participa desse evento.



Citricultura Nota 10: Tangerina Ponkan IAC

A tangerina Ponkan (*Citrus reticulata* Blanco) tem provável origem na Índia e em função de suas boas qualidades espalhou-se rapidamente através do mundo, sendo que no Brasil é a mais popular variedade dentre as tangerinas. Suas características de facilidade de descasque e sabor suave que agrada a maioria dos consumidores de frutas frescas foram as causas desse sucesso. Suas árvores são de porte médio, com boa produção de frutos, que atingem em média 250 kg por planta. Os frutos são de maturação meia-estação, com peso médio de 150 g, 10 sementes, casca e polpa de cor alaranjada, 42% de suco, sólidos solúveis totais de 10,2 °Brix, acidez 0,65% e *ratio* 15,5. A variedade é suscetível a mancha marrom de alternaria, doença



específica das tangerinas e uma das mais importantes nos pomares do Estado de SP. Dentre os diversos clones presentes no BAG Citros IAC, o IAC 172 foi selecionado pelos melhoristas, microenxertado e pré-imunizado para utilização em pomares comerciais. Em função destas características este material foi incluído no Programa Citricultura Nota 10 do Centro de Citricultura Sylvio Moreira, estando registrada junto ao RNC com o nome de tangerina Ponkan IAC.

Pesquisa

Purificação da toxina killer de levedura para o controle de doenças

O setor citrícola enfrenta vários problemas com doenças que ocorrem na pós-colheita como o bolor verde e a podridão azeda, causados por *Penicillium digitatum* e *Geotrichum citri-aurantii* respectivamente. O surgimento de linhagens de *P. digitatum* resistentes aos princípios ativos comumente utilizados durante o beneficiamento dos frutos e a falta de produtos registrados no Brasil para o controle da podridão azeda levam produtores e pesquisadores à busca de métodos alternativos de controle como o uso de leveduras, sendo o fator *killer* um dos possíveis mecanismos de ação desses antagonistas. Estudos realizados no Laboratório de Fitopatologia e Controle Biológico do Centro de Citricultura Sylvio Moreira identificaram a produção de toxina *killer* produzida por um isolado da levedura *Aureobasidium pullulans* contra células sensíveis de *Saccharomyces cerevisiae*. Diante dessa informação, novos estudos foram realizados com o objetivo de purificar a toxina *killer* produzida pela levedura e testá-la no controle dos fitopatógenos *P. digitatum* e *G. citri-aurantii*. Inicialmente, foram testados diferentes métodos de precipitação proteica; posteriormente, foi determinada a atividade proteolítica e a presença das proteínas β -1,3 glucanase e quitinase, que agem sobre receptores da parede celular. A purificação da toxina foi realizada por cromatografia de exclusão molecular em coluna de gel Sephadex G-75 em tampão formado de amônio 0,05M, pH 6,0 e cromatografia em coluna de Cellulose (Medium Fibers) em tampão citrato 0,01M, pH 4,6. Posteriormente, a purificação foi confirmada por eletroforese em gel de poliacrilamida e realizada a detecção de atividade *killer* em meio sólido YEPD-azul de metileno tamponado com citrato-fosfato (0,1 M pH 4,6). A identificação da toxina foi realizada por meio de espectrometria de massas (LC-MSE). Pelos resultados obtidos foi verificado que o melhor método de precipitação proteica foi etanol na proporção 2:1 (v/v etanol/sobrenadante). No estudo sobre o extrato bruto proteico da levedura foi possível observar a presença de enzimas com atividade proteolítica, atividade β -1,3-glucanase e quitinase. Durante o processo de purificação foi possível observar que a toxina *killer* produzida pelo isolado de *A. pullulans* é uma proteína de baixa massa molecular pertencente à família das ubiquitinas, que apresenta atividade *killer* contra os fitopatógenos causadores do bolor verde e da podridão azeda dos citros.

Katia Cristina Kupper e Flávia Lino Polletini



14º Dia de Campo de Tangerina 22º Dia da Tangerina

16 de maio de 2019

Socorro, SP

Programação

- 13:00 Inscrições e Abertura
- 13:30 Tangerinas: mercados e perspectivas, Fernanda Geraldini Palmieri, CEPEA/Esalq/USP
- 14:00 Monitoramento de Pragas de Citros, Lilian Silveira Pereira/PROMIP
- 14:30 Manejo do pomar visando qualidade de fruta, Antonio Carlos Simoneti, Simonetti Citrus/ABCM
- 15:00 Coffe Break
- 15:30 Dinâmica com variedades de tangerinas
- 16:30 Encerramento

Local: Espaço do Produtor Rural Engº Agrº
Joaquim Gilberto Vieira
Praça Rachid José Maluf, Socorro-SP
Informações: eventos@ccsm.br



Expediente

Informativo Centro de Citricultura

Conselho Editorial

Dirceu Mattos Jr.
José Dagoberto De Negri
Vivian Michelle dos Santos

Colaboração

Carolina Munari Rodrigues
Flávia Lino Pollettini
Katia Cristina Kupper
Marco Aurélio Takita
Mariana Massoco Tarallo
Marinês Bastianel

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

Mala Direta Básica

CNPJ-61705380/0001-54 -DR/SP/1
Fundação de Apoio
à Pesquisa Agrícola



Programe-se!

41ª Semana da Citricultura 45ª Expocitros 50º Dia do Citricultor

3 a 6 de junho de 2019
Cordeirópolis, SP

O Centro de Citricultura Sylvio Moreira promove o maior evento técnico-científico da citricultura brasileira, a Semana da Citricultura. Local para a apresentação de novas tecnologias e inovações na busca da sustentabilidade, além de, oportunidade ímpar para o contato com os principais especialistas ligados ao setor.

Juntamente, ocorre a Expocitros, considerada maior feira de *marketing* citrícola da América Latina que reúne grupo seleto de empresas dedicadas ao agronegócio dos citros.

A CITRICULTURA É O NOSSO NEGÓCIO



Secretaria de Agricultura e Abastecimento