

**Diagnóstico da Morte Súbita dos
Citros (MSC) Utilizando
Fluorescência das Folhas**



ISSN 1678-0434

Novembro, 2006

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Instrumentação Agropecuária
Ministério da Agricultura e do Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 15

Diagnóstico da Morte Súbita dos Citros (MSC) Utilizando Fluorescência das Folhas

Jean Carlos Corte Terencio
Débora Marcondes Bastos Pereira Milori
Lúcio André de Castro Jorge
Ladislau Martin Neto

Embrapa Instrumentação Agropecuária
São Carlos, SP
2006

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Instrumentação Agropecuária

Rua XV de Novembro, 1452

Caixa Postal 741

CEP 13560-970 - São Carlos-SP

Fone: (16) 3374 2477

Fax: (16) 3372 5958

www.cnpdia.embrapa.br

E-mail: sac@cnpdia.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Dr. Carlos Manoel Pedro Vaz

Membros: Dra. Débora Marcondes Bastos Pereira Milori,

Dr. João de Mendonça Naime,

Dr. Washington Luiz de Barros Melo

Valéria de Fátima Cardoso

Membro Suplente: Dr. Paulo Sérgio de Paula Herrmann Junior

Revisor editorial: Dr. Victor Bertucci Neto

Normalização bibliográfica: Valéria de Fátima Cardoso

Tratamento de ilustrações: Valentim Monzane

Foto da capa: Marcelo Eduardo Alves

Editoração eletrônica: Valentim Monzane

1ª edição

1ª impressão (2006): tiragem 300

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Instrumentação Agropecuária

T316d Terencio, Jean Carlos Corte

Diagnóstico da Morte Súbita dos Citros (MSC) Utilizando Fluorescência das Folhas / Jean Carlos Corte Terencio, Débora Marcondes Bastos Pereira Milori, Lúcio André de Castro Jorge, Ladislau Martin-Neto. - São Carlos: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2006.

16 p. - (Embrapa Instrumentação Agropecuária. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, ISSN 1678-0434; 15)

1. Fluorescência. 2. Morte súbita de citros. 3. doenças de citros. 4. Físico-química. I. Milori, Débora Marcondes Bastos Pereira Milori, II. Jorge, Lúcio André de Castro. III. Martin-Neto, IV. Título. V. Série.

CDD 21 ED 535.352

543.08584

© Embrapa 2006

Sumário

Resumo	7
Abstract	9
Introdução	11
Material e Método	12
Resultados e Discussão	13
Conclusão	15
Referências	15

Diagnóstico da Morte Súbita dos Citros (MSC) Utilizando Fluorescência das Folhas

Jean Carlos Corte Terencio¹
Débora Marcondes Bastos Pereira Milori²
Lúcio André de Castro Jorge³
Ladislau Martin Neto⁴

Resumo

Atualmente o diagnóstico da morte súbita dos citros (MSC) é realizado através de inspeção visual e da coleta do material do porta-enxerto o que confere ao método um elevado grau de subjetividade e imprecisão, além de demandar muito tempo e dinheiro para o levantamento de dados de infestação. Este trabalho estudou as mudanças nas propriedades físicas e químicas acarretadas pela MSC em folhas de laranjeira doces (*Citrus (L.) Osbeck*), e desenvolveu uma nova metodologia de diagnóstico da doença baseada em fluorescência. Para tanto, folhas e seus extratos foram analisados através das seguintes técnicas espectroscópicas: absorção de luz uv-visível, absorção de infravermelho com transformada de Fourier, fluorescência e fluorescência induzida por laser. Além do estudo utilizando técnicas espectroscópicas foram realizados estudos utilizando técnicas de imagem de fluorescência de folhas saudáveis e doentes. Foram coletadas amostras de folhas saudáveis, doentes com a MSC e doentes com o declínio dos citros (DC). A comparação entre estas doenças é primordial visto que no campo os sintomas são muito parecidos, confundindo muito o sistema de avaliação de contaminação. Foram observadas mudanças significativas nos espectros de emissão de fluorescência para os três tipos de amostras e baseados nestas diferenças foi definido um índice capaz de diagnosticar a MSC e o DC. A técnica de imagens de fluorescência também trouxe informações importantes permitindo diferenciar plantas saudáveis e doentes de uma forma muito rápida. A junção das técnicas de imagens com as espectroscópicas deu origem a uma nova metodologia de diagnóstico da MSC com potencial de ser muito mais rápida, precisa e não invasiva permitindo análises da folha *in natura*.

Palavras-Chave: Fluorescência, morte súbita dos citros, espectroscopia, doenças em citros

¹Químico, MSc., Embrapa Instrumentação Agropecuária - IQSC/USP, C. P. 741, CEP 13560-970, São Carlos, SP,

²Física, Dra., Embrapa Instrumentação Agropecuária, C. P. 741, CEP 13560-970, São Carlos, SP,

e-mail: debora@cnpdia.embrapa.br

³Eng. Eletricista, MSc., Embrapa Instrumentação Agropecuária, C. P. 741, CEP 13560-970, São Carlos, SP,

e-mail: lucio@cnpdia.embrapa.br

⁴Físico, Dr., Embrapa Instrumentação Agropecuária, C. P. 741, CEP 13560-970, São Carlos, SP,

e-mail: martin@cnpdia.embrapa.br

Diagnostic of Sudden Death of the Citrus (SDC) Using Leaves Fluorescence

Jean Carlos Corte Terencio
Débora Marcondes Bastos Pereira Milori
Lúcio André de Castro Jorge
Ladislau Martin Neto

Abstract

Nowadays the diagnostic of sudden death of the citrus (SDC) is made through visual observation and collection of rootstocks material. This methodology is subjective, involves accurateness, is expensive and causes delays to obtain infestation data. The present work studied changes in physical and chemical properties caused by SDC in leaves of sweet orange (*Citrus (L.) Osbeck*), and develop a new diagnosis methodology for such illness using fluorescence. Thus, leaves and their extracts were analyzed through the following spectroscopic techniques: uv-visible spectroscopy, Fourier transform Infrared spectroscopy (FTIR), fluorescence and laser-induced fluorescence spectroscopy. In addition to using spectroscopic techniques in this work a study of fluorescence image was carried out. Healthy and sick materials with SDC and citrus Declinio (CD) were collected. The comparison between SDC and CD is important because both diseases present very similar symptoms in the field. Significant changes were observed through fluorescence emission spectroscopy for three kinds of samples. Based on these differences an index to diagnose the SDC and CD was defined. Image technique also brought important information to differentiate health and sick plants in a very quick manner. By joining image and spectroscopic techniques, it generated a new methodology for the diagnosis of SDC. This new technique presents substantial potential to be applied in field and allows quick and accurate analysis, besides enabling to value the plant *in natura* in a non invasive way.

Keywords: Fluorescence, sudden death of the citrus, espectroscopy, citrus sick

Introdução

A Morte Súbita dos Citros foi descrita pelos técnicos do Fundecitrus em 2001, de causa ainda desconhecida pela comunidade científica, a doença afeta os pomares de laranjeiras doces [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] 'Valência', 'Hamlin', 'Natal', 'Westin' e 'Pera' e tangerineiras (*C. reticulata* Blanco) 'Cravo' e 'Ponkan' enxertadas sobre limoeiro 'Cravo' (*C. limonia* Osbeck). Bassanezzi et al. (2003) descreve o início da doença, como sendo relatada em três municípios do Estado de Minas Gerais e quatro do Estado de São Paulo (GIMENES-FERNANDES e BASSANEZI, 2001). Está associada à combinação laranjeira doce sobre limoeiro 'Cravo', uma vez que combinações de laranjeiras doces sobre porta-enxertos de tangerineiras 'Cleópatra' (*C. reshni* Hort. ex Tan.) e 'Sunki' (*C. sunki* Hort. ex Tanaka), *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. e citrumelo 'Swingle' [*P. trifoliata* (L.) Raf. X *C. paradisi* Macf.] são resistentes aos sintomas da doença como descreve Gimenes-Fernandes et al. (2002).

Os primeiros sintomas se apresentam como perda de brilho das folhas, poucas brotações, ausência de brotações internas e desfolha parcial. O sistema radicular apresenta grande quantidade de raízes podres e mortas, com poucas radículas. O sintoma característico da doença é o amarelecimento podendo, em alguns casos, ficar alaranjado nos tecidos internos da casca do porta-enxerto abaixo da região da enxertia, contrastando com a coloração creme dos tecidos da casca da copa.

Estes tecidos amarelados correspondem, na maior parte, aos vasos do floema que se encontram obstruídos e degenerados como descrevem Gimenes-Fernandes e Bassanezi (2001). Todo este quadro sintomatológico pode ocorrer rapidamente, de um a mais de doze meses, dependendo da época do ano e da condição de produção da planta (BASSANEZI et al., 2003). Até o momento, nenhuma planta com menos de 22 meses, em pomares na região com maiores incidências da doença, apresentou sintomas. Segundo a empresa Alellyx Applied Genomics, a MSC deva ser causada por uma associação de um vírus da família Tymoviridae, chamado de citrus sudden death-associated virus com CSDav, transmitido pelo pulgão preto dos citros *Toxoptera citricida* (MACCHERONI et al; 2005).

Como os primeiros sintomas afetam as folhas, tornou-se necessário pesquisas a cerca das modificações químicas provocadas nos pigmentos fotossintéticos dos tecidos foliares. Para isto, a fluorescência dos pigmentos fotossintéticos foram analisadas usando a fluorescência.

A fluorescência dos pigmentos fotossintéticos como os clorofilados é uma técnica caracterizada, analogamente, por medidas rápidas e com grande precisão (DeELL et al., 1998), que vem sendo usada como indicador do stress ambiental de vários grupos de plantas, além de ser um método não-destrutivo de reações fotossintéticas *in natura* (GRAY et al., 1997) . A fluorescência da

clorofila é originada através da excitação, com uma fonte de luz, da clorofila a e b presentes nos cloroplastos associadas com o Fotossistema-II, refletindo as reações fotossintéticas primárias nas membranas tilacoideais (PAPARGEORGIOU, 1975; SCHREIBER and BILGER, 1987).

Este trabalho teve como objetivo identificar, nas folhas *in situ*, a Morte Súbita dos Citros tendo como parâmetros plantas saudias e com Declínio dos Citros, usando a técnica de espectroscopia por fluorescência.

Material e Métodos

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Óptica e Lasers pertencente a Embrapa - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, localizada no município de São Carlos SP, durante o período de agosto de 2004 a outubro de 2005.

O procedimento experimental baseou-se, inicialmente, na retirada das folhas, sendo retirada uma folha de cada extremidade da planta, de laranjeiras doce tanto nas variedades Pêra-Rio quanto na Valência enxertadas sobre limão 'cravo' [Citrus limonia (L.) Osbeck] plantadas há 14 anos e 19 anos respectivamente, tanto em período chuvoso quanto em período de seca. Estas amostras foram enviadas pelo Fundecitrus Fundo de Defesa da Citricultura e divididas em saudias, com morte súbita dos citros e com declínio dos citros.

As plantas de laranjeiras doces apresentavam medidas semelhantes quanto a variedade da copa/cavalo, tamanho da copa, diâmetro do caule e idade. Foram analisadas 71 amostras de folhas entre saudáveis, doentes com Morte Súbita dos Citros e com Declínio dos Citros certificadas pelos técnicos da Fundecitrus.

Para os experimentos utilizando a espectroscopia de fluorescência foram retiradas lâminas da parte central das folhas um equipamento Shimadzu, modelo RF-5301PC pertencente à Embrapa Instrumentação Agropecuária.

Inicialmente o material foi caracterizado através de seus espectros de emissão e excitação. Todas as medidas foram realizadas com fendas de excitação e emissão de 5 nm, velocidade de varredura média e sem a utilização de filtros. Através das diferenças espectrais observadas por esta caracterização foi gerado um índice de identificação para material saudável, com morte súbita e com declínio.

Os experimentos com imagens de fluorescência foram realizados utilizando um laser de argônio em 458 nm, uma câmera de 1 megapixel e um filtro óptico para eliminar a excitação do laser.

Resultados e Discussão

Após um minucioso estudo das características dos espectros de emissão e excitação dos porta-enxertos, observou-se que a excitação em 576 nm fornecia espectros de emissão onde eram visualizadas as maiores diferenças espectrais entre os materiais saudáveis e doentes, como mostra a Fig. 1. Tomando como parâmetro a emissão em 734 nm observou-se que os materiais doentes e saudáveis apresentavam níveis de emissão em 687 nm e 734 nm bastante diferenciados. Baseados nesta observação, foi proposto um índice que é a razão entre as intensidades de emissão em 687 nm e 734 nm.

$$I_c = \frac{\text{Intensidade de fluorescência em } 734\text{nm}}{\text{Intensidade de fluorescência em } 687\text{nm}} \quad (1)$$

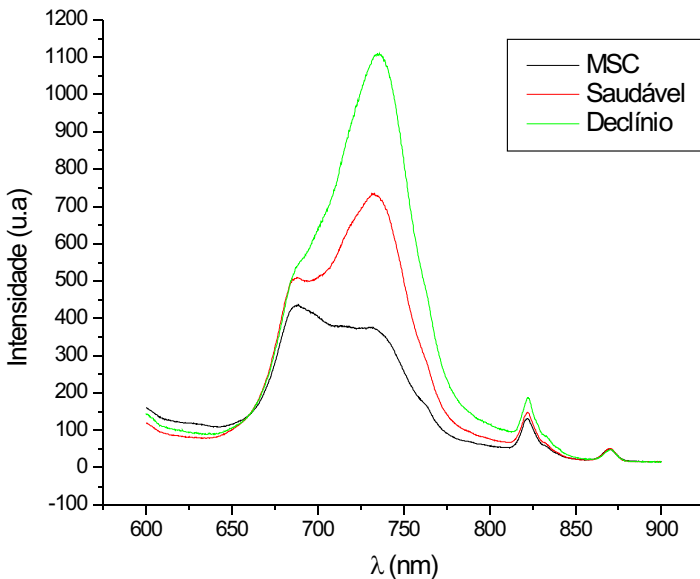


Fig. 1. Espectro de Emissão de Fluorescência com Excitação em 576 nm típicos de amostras com morte súbita dos citros, sadias e declínio dos citros.

Para os 71 porta-enxertos analisados, valores de I_c acima de 1,25 correspondiam a plantas com MSC. Os porta-enxerto saudáveis e com declínio apresentavam sempre valores inferiores, mas através desta metodologia não foi possível diferenciar com muita precisão árvores saudáveis e árvores com declínio. Quanto a diferenciação entre árvores com MSC e saudáveis a precisão foi de aproximadamente 83%. Este resultado pode ser visualizado na Fig. 2.

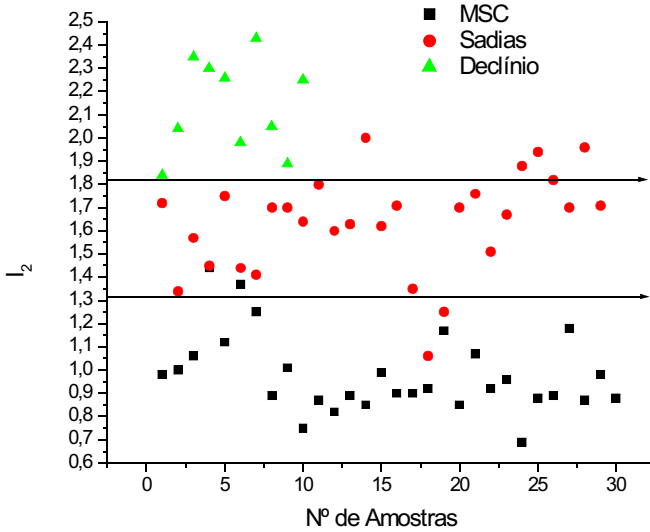
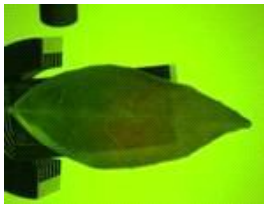


Fig. 2. Identificação de materiais saudáveis e doentes através de I_c .

Na Fig. 3 temos as imagens de fluorescência de folhas de citros saudáveis e doentes com MSC e Declínio dos Citros. Como se pode observar a redução de teores de clorofila na folha leva a uma mudança no padrão da emissão de fluorescência. Este método pode ser utilizado como um diagnóstico prévio da saúde do pomar.



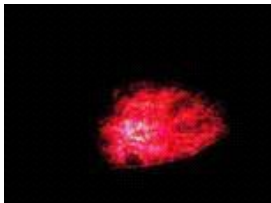
Folha sadia



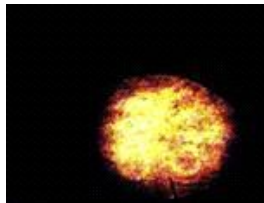
Folha c/ MSC



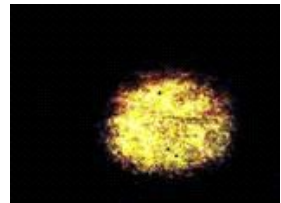
Folhas c/ declínio dos citros



Fluorescência da Folha sadia



Fluorescência da Folha c/ MSC



Fluorescência da Folhas c/ declínio dos citros

Fig. 3 Imagens convencionais e de fluorescência de folhas de citros.

Conclusão

A união das técnicas de espectroscopia e imagens de fluorescência representa uma ferramenta contemporânea na detecção de doenças em citros, e deve auxiliar na inspeção visual, realizada pelos técnicos do Fundecitrus, dando-lhes maior precisão no diagnóstico, maior rapidez no levantamento de mapas de infestação e, com a vantagem de fazer o diagnóstico sem provocar lesões nas árvores analisadas.

Referências

- BASSANEZI, R. B.; BERGAMIN, A.; AMORIM, L. et al. Spatial and temporal analyses of citrus sudden death as a tool to generate hypotheses concerning its etiology. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 93, n. 4, p. 502-512, 2003.
- DeELL, J. R.; PRANGE, R. K.; MURR, D. P. Chlorophyll fluorescence techniques to detect atmospheric stresses in stored apples. **Acta Hort.**, The Hague, v. 464, p. 127-131, 1998.
- DERRICK, K. S.; BERETTA, M. J.; BARTHE, G. A. et al. Identification of strains of Citrus tristeza virus by subtraction hybridization. **Plant Dis.**, [S. l.], v. 87, n. 11, p. 1355-1359, 2003.
- GIMENES-FERNANDES, N.; BASSANEZI, R. B. Doença de causa desconhecida afeta pomares cítricos no norte de São Paulo e sul do Triângulo Mineiro. **Summa phypathologica**, v. 28, p. 72, 2001.
- GIMENES-FERNANDES, N.; BASSANEZI, R. B.; YAMAMOTO, P. T.; AYRES, A. J. Árvores de limoeiro 'Cravo' não mostram sintomas de 'morte súbita' em área afetada. **Summa phypathologica**, v. 28, p. 72, 2002.
- GRAY, G. R.; CHAUVIN, F. S.; HUNER, N. P. A. Cold acclimation and freezing tolerance. A complex interaction of light and temperature. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 114, p. 467-474, 1997.
- MACCHERONI, W.; ALEGRIA, M.C.; GREGGIO, C.C. et al. Identification and genomic characterization of a new virus (Tymoviridae family) associated with citrus sudden death disease. **J. Virol.** Washington, v. 79, n. 5, p. 3028-3037, 2005.
- PAPARGEORGIOU, G. Chlorophyll fluorescence: an intrinsic probe of photosynthesis. In: GOVINDJEE (Ed.). **Bioenergetics of Photosynthesis**. New York: Academic Press, 1975. p. 319-371.

ROMAN, M. P.; CAMBRA, M.; JUAREZ, J. et al. Sudden death of citrus in Brazil: A graft-transmissible bud union disease. **Plant Dis.**, [S. l.], v. 88, n. 5, p. 453-467, 2004.

SCHREIBER, U.; BILGER, W. Rapid assessment of stress effects on plant leaves by chlorophyll fluorescence measurements. In: TENHUNEN, J. D.; CATARINO, F. M.; LANGE, O. L.; OECHEL, W. C. (Ed.). **Plant Response to Stress-Functional Analysis in Mediterranean Ecosystems**. Berlin: Springer-Verlag, 1987. p. 27-57. (NATO Advanced Science Institute Series).