

UM MARCADOR FLUORESCENTE EXTRAÍDO DE POMELEIROS (*Citrus paradisi* Macf.) E LARANJEIRAS (*C. sinensis* Osb.) AFETADOS PELA SOROSE TIPO-BAHIA¹

O. NICKEL²

Termos para indexação: Pomelo, laranja, doenças, cromatografia.

RESUMO - Um marcador bioquímico de plantas com sorose tBA (tipo Bahia) foi detectado por cromatografia de camada delgada de géis de sílica. A substância, fluorescente sob incidência de luz ultravioleta de onda curta, não foi observada em plantas saudias, microenxertadas ou portadoras de outras doenças de natureza viral como sorose A, concordiose, xiloporose, tristeza e o viróide da exocorte. Os resultados obtidos até o momento indicam que o pomeleiro 'Marsh Seedless' e a laranjeira 'Pera' afetados sintetizam essa substância, formando, no perfil cromatográfico, uma mancha azul intensamente fluorescente com Rf de 0,55. Dos tecidos submetidos ao estudo - folhas, casca de frutos, casca de troncos com lesões, casca de troncos saudios e radículas - os últimos deram os melhores resultados. Diante da inexistência de uma espécie indicadora para sorose tBA, esse marcador fluorescente converte-se no primeiro importante instrumento de identificação de plantas afetadas pela sorose tBA.

A FLUORESCENT MARKER EXTRACTED FROM GRAPEFRUIT (*Citrus paradisi* Macf.) AND ORANGE PLANTS (*Citrus sinensis* Osb.) AFFECTED BY BAHIA-TYPE PSOROSIS

Index terms: Grapefruit, orange, disease, chromatography.

SUMMARY - A biochemical marker has been found in plants affected by psorosis tBA (Bahia-type) by means of thin layer chromatography on silica gels. The substance is fluorescent under incident ultraviolet light; it has been observed neither in tissues of healthy, micrografted plants, nor in plants carrying other viral disease agents such as psorosis A, concordiosis, xyloporosis, tristeza or the exocortis viroid of citrus. Results obtained so far indicate that affected 'Marsh Seedless' grapefruit as well as 'Pera' sweet orange plants synthesize this substance, which produces a large, bright blue fluorescent spot in the chromatographic profile at Rf 0.55. Leaves, fruit rind, trunk bark, and rootlets were analysed; the last was best suited for extraction of the marker substance. Due to the lack of an indicator plant species for psorosis tBA this fluorescent marker becomes the first important tool for the identification of affected plants.

INTRODUÇÃO

A sorose tBA (tipo Bahia) é uma disfunção de pomelos, tangerinas e laranjas doces, de natureza etiológica ainda desconhecida, que guarda certa semelhança macro e microssintomática com a clássica sorose A. Em ambas doenças, observa-se a destruição do xilema e floema (NICKEL & COSTA, 1990). A sorose A foi descrita como sendo de natureza transmissível e provavelmente causada por vírus (FAWCETT, 1933). Entretanto, enquanto a sorose A é facilmente transmitida por enxertia de tecidos, diversas tentativas de transmitir a sorose tBA via borbulhas têm produzido resultados negativos, erráticos ou inconclusivos (NICKEL, 1989). Essa caracte-

rística da doença, assim como ausência de sintomas foliares em plantas afetadas por sorose tBA em campo ou experimentalmente inoculadas, são os parâmetros diferenciadores entre as duas doenças.

Devido às dificuldades de caracterizar a infeciosidade da sorose tBA e em face da necessidade de um instrumento de identificação de plantas afetadas, considerou-se o estudo de alterações metabólicas induzidas pela presença de um eventual agente viral (FELDMAN, 1969). FELDMAN & HANKS (1968) constataram teores de fenóis livres nas raízes de plantas com exocorte três vezes superiores às saudias; JARDENY *et alii* (1965) e MONSELISE & GOREN (1965) encontraram significativos aumentos de fenóis em plantas de

¹Trabalho executado com o apoio financeiro da Fundação Internacional para a Ciência - Estocolmo, Suécia.

²Pesquisador, Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura - EMBRAPA, Caixa Postal 007, 44380 - Cruz das Almas-BA, Bolsista do CNPq.

tangerina e laranjas doces, infectadas, respectivamente, com xiloporose e sorose A. SCHWARZ (1968) detectou metabólitos fenólicos no albedo de frutos, posteriormente sugeridos para a indexação de "greening" e da exocorte, por meio de cromatografia de camada delgada em géis de sílica.

O presente estudo foi iniciado baseado em evidências experimentais de que alterações do metabolismo fenólico em plantas afetadas por vírus são passíveis de exploração como instrumento diagnóstico. O objetivo era encontrar uma substância marcadora característica de tecidos afetados pela sorose tBA a ser usada como indexador. Os resultados aqui apresentados são preliminares; estudos envolvendo outras espécies e variedades encontram-se em execução.

MATERIAL E MÉTODOS

Folhas, casca de frutos, casca de troncos com lesões, casca de troncos sadios e radículas de pomeleiros 'Marsh Seedless' e de laranjeiras 'Pera' de cerca de dez anos de idade, fortemente afetados pela sorose tBA, foram estudados. Como controles positivos, foram utilizados limão 'Galego' portador de um isolado do vírus da Tristeza dos citros (CTV BA B5), coletado na região de Cruz das Almas-BA, por meio de plantas-armadilha; laranja 'Pera' com o isolado de Tristeza 1743-82, IAC; laranja 'do Céu' com sorose A; limão 'Galego' com concordiose ("sorose transmissível") da Província de Entre Rios, Argentina (infecção mista com CTV); laranja 'Parson Special' com xiloporose, e laranja 'Navelina' com exocorte (CEV). O pomeleiro 'Duncan' microenxertado e o limão 'Galego' produzido de sementes e indexado CTV-negativo com ELISA, foram usados como controles negativos.

O material foi lavado com água destilada, picado em tiras de 1 mm de largura e as amostras de 2 g foram submetidas à extração em aparelho de Soxhlet com 40 ml de etanol 95% a 90 V durante uma a quatro horas. Os extratos foram conservados a 4°C durante a execução do estudo.

As cromatoplasmas foram preparadas de acordo com o método de MAY (1965), ligeiramente alterado, com sílica 60 G

misturada com água destilada na proporção 1:2 (p:v) com espessura de 300 µm; a ativação das plantas foi feita a 40°C durante doze horas (à noite). Três microlitros de extrato/amostra foram submetidos a corridas em fase líquida de clorofórmio: metanol (97:3) durante tempo padrão de quinze minutos. Após a secagem, as bandas e manchas foram visualizadas com luz ultravioleta incidente de 254 nm, fotografadas (filme ASA 3000), circundadas com agulhas histológicas e mapeadas em papel celofane para arquivo. O Rf das manchas e bandas observadas foi calculado como a média das corridas realizadas com a mesma mistura de solventes, em um dia, com um único grupo de placas. A área das manchas foi medida com um medidor de área foliar.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi detectada em radículas de pomeleiros afetados pela sorose tBA (tipo Bahia) uma substância de cor azul-claro, intensamente fluorescente sob luz ultravioleta de onda curta incidente que, no perfil cromatográfico, forma manchas grandes e marcantes com Rf de 0,55. As mesmas estão ausentes em extratos de pomeleiros sadios e em tecidos infectados com o vírus da sorose A (Figura 1 e Tabela 1), principal parâmetro de comparação, pela semelhança de sintomas externos em troncos de plantas afetadas.

A mancha produzida pelo extrato de sorose A geralmente migra à frente daquela da sorose tBA, tem cor verde-claro e é menor que esta última (Tabela 1). Manchas semelhantes àquela de sorose tBA estão ausentes em tecidos com outras viroses, comuns em citros no continente, como a tristeza, xiloporose, concordiose ou o viróide da exocorte. Como se observa na Figura 1, todos esses agentes produzem uma mancha aparentemente típica do gênero *Citrus*, de cor violeta, de pouca intensidade, que migra próxima ao marcador de sorose tBA; a mesma classificação devem receber as manchas 2, 3 e 4 e 5 produzidas na parte inferior das placas nas amostras de radículas, sadias ou enfermas (Figura 1).

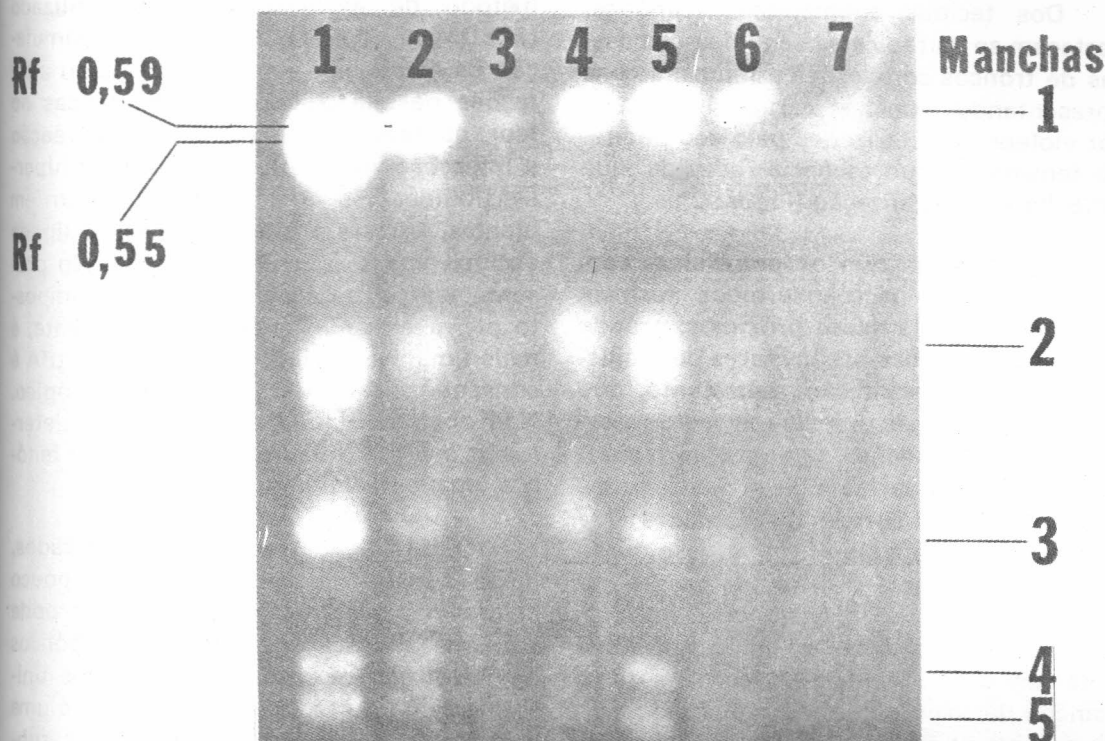


FIG. 1 - Perfil cromatográfico de extratos alcoólicos de radículas de *Citrus* spp. com sorose tBA (1 = pomelo 'Marsh Seedless') e outras doenças: 2 = laranja 'do Céu' com sorose A; 3 = pomelo microenxertado, sadio; 4 = laranja 'Navelina' com CEV; 5 = laranja 'Parson Special' com xiloporose; 6 = limão 'Galego' com concordiose; 7 = limão 'Galego' com CTV BA B5. Fotografia com UV de 254 nm, filme ASA 3000.

TABELA 1 - Valores de Rfs de tecidos com sorose A e sorose tBA, obtidos por cromatografia de camada delgada em géis de sílica de extratos alcoólicos de radículas.

Variedade/ espécie	Número de corridas	Rf médio	Variação*	Área da mancha (cm ²)
1. Pomelo 'Marsh Seedless' com sorose tBA	41	0.55	C.V.(%) 3.6 I.C.±0.01	1.12
2. Laranja 'do Céu' com sorose A	42	0.59	C.V.(%) 5.1 I.C.±0.01	0.81

*Nível de probabilidade de 5%.

Dos tecidos submetidos à análise, destacam-se as radículas seguidas das cascas de troncos com lesões e folhas, ambas apresentando manchas características, de cor violeta, caracterizadas pelo seu pequeno tamanho e fluorescência reduzida, que dificulta sua visualização (Figura 2).

Observou-se que os pomeleiros com sorose tBA e microenxertados formam manchas com Rfs muito próximos; grande número de corridas preliminares para ajuste dos solventes indicam, entretanto, que as médias do Rf de pomeleiros sadios mostram (nessas manchas de migração rápida) tendência a situar-se ligeiramente acima do pomelo com sorose tBA, embora esta diferença não seja significativa. Isso, todavia, não representa dificuldade para a utilização do marcador, visto que entre as manchas, as diferenças de cor, intensidade e tamanho são evidentes; geralmente, a mancha de migração rápida de tecidos sadios é quase invisível ou falta completamente.

O resultado obtido com os primeiros extratos de laranjeiras doces, variedade Pera, é similar ao dos pomeleiros; as amostras microenxertadas encontram-se livres de quaisquer manchas ou estas são apenas tênues. O tecido de radículas com sorose tBA de laranjeira 'Pera' produz o mesmo marcador fluorescente dos pomeleiros, também distinto em cor, tamanho e velocidade de migração das amostras com sorose A e Tristeza (Figura 3).

Sempre que tecidos vegetais são submetidos a uma extração aquosa ou com solventes orgânicos e processados por cromatografia de papel ou sílica, pode-se observar várias bandas fluorescentes. A descoberta do marcador 1G, utilizado para detectar infecções latentes de "greening" em viveiros, baseou-se neste princípio (SCHWARZ, 1968); o marcador, um glicosídeo fenólico (FELDMAN & HANKS, 1968), permitiu a comparação do 1G com marcadores fluorescentes de doenças viróticas similares.

A substância fluorescente isolada no presente estudo, não tendo sido ainda identificada, não permite comparações; é muito provável, entretanto, tratar-se de um composto fenólico, considerando-se o

método de extração alcoólica utilizado (FELDMAN & HANKS, 1965). A acumulação de compostos fenólicos totais ou alterações na sua composição (mudanças no teor de fenóis individuais) como reação a infecções virais ou em reações de hipersensibilidade, é uma resposta comum em plantas, embora a mesma não esteja ligada exclusivamente a infecções virais. No presente estudo, a descoberta de um composto provavelmente fenólico, fluorescente, é mais uma evidência de que a sorose tBA é consequência de um processo patológico. Não obstante, ainda não é possível determinar a causa do aumento da síntese fenólica em plantas afetadas.

O fato de os tecidos mais afetados, como a casca com lesões, serem pouco adequados à extração do marcador pode ser uma indicação de que os metabólicos da desordem não estão distribuídos uniformemente no tecido afetado. Essa é uma informação relevante para trabalhos subsequentes. Resta, também, avaliar se o marcador se adequa à identificação precoce da disfunção, i. é, antes do aparecimento de sintomas da sorose tBA.

CONCLUSÕES

A descoberta de um composto provavelmente fenólico, fluorescente, é mais uma evidência experimental de que a Sorose tBA é consequência de um processo patológico; porém ainda não é possível determinar a causa do aumento da síntese fenólica em plantas afetadas.

Este composto fenólico fluorescente poderá ser utilizado para identificar plantas afetadas com Sorose tBA mesmo na ausência de sintomas visuais.

AGRADECIMENTOS

O autor agradece ao Prof. Miguel Fascio, do Instituto de Química Orgânica da Universidade Federal da Bahia, Salvador-BA, pela introdução que lhe deu em técnicas de cromatografia de camada delgada, ao pesquisador Hermes Peixoto Santos Filho, M.Sc., pelo fornecimento das testemunhas microenxertadas, a

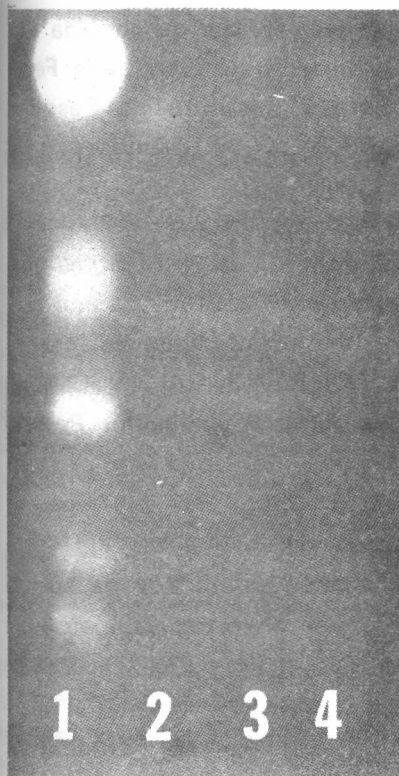


FIG. 2 - Perfil cromatográfico de extratos alcoólicos de vários tecidos de pomeleiros 'Marsh Seedless', 1 = radículas; 2 = casca com lesões e 4 = folhas, todas com sorose tBA; 3 = radículas de pomeleiro microenxertado (testemunha negativa). Fotografia como na Figura 1.

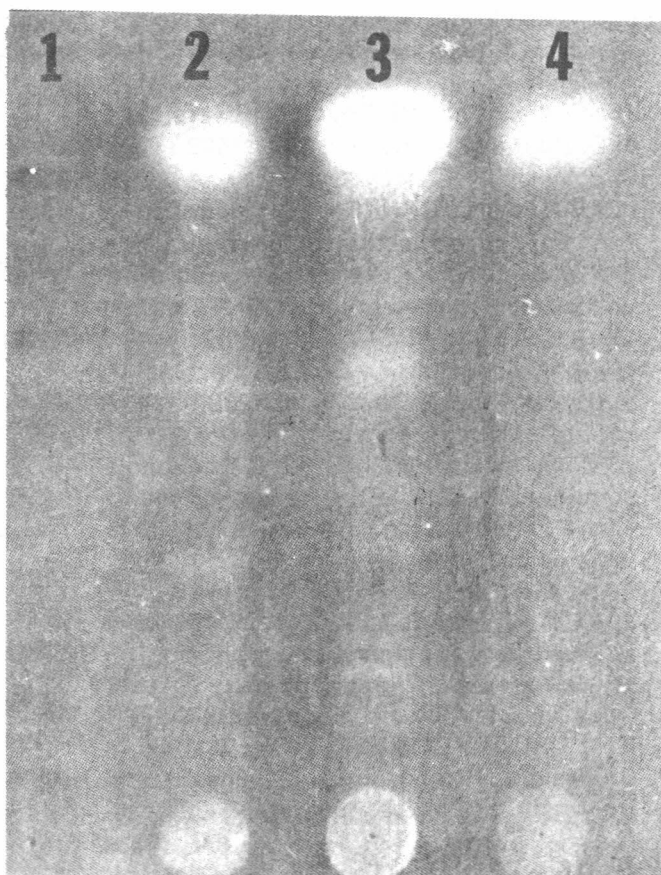


FIG. 3 - Perfil cromatográfico de extratos alcoólicos de radículas de laranjeiras 'Pera' (1, microenxertada; 2, com sorose tBA; 4, com vírus da Tristeza dos citros CTV 1743-82) e 3, laranjeira 'do Céu' com sorose A. Fotografia como na Figura 1.

Elidian Carvalho, pela ajuda na condução das análises e ao pesquisador Ranulfo C. Caldas, M.Sc., pelo cálculo dos índices de variação dos Rfs.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- FAWCETT, H.S. New symptoms of psorosis, indicating a virus disease of citrus (abstr.). *Phytopathology*, v.23, p.930, 1933.
- FELDMAN, A.W. Chemical changes induced in citrus plants by viruses. In: **INTERNATIONAL CITRUS SYMPOSIUM, 1**, Riverside. **Proceedings...** Riverside: H.D. Chapman, 1969. v.3, 1495-1503.
- FELDMAN, A.W.; HANKS, R.W. Identification and quantification of phenolics in the leaves and roots of healthy and ex-cortis-infected citrus. In: **CONF. INT. ORGAN. CITRUS VIROL., 4**, 1968, Gainesville. **Proceedings...** Gainesville: University of Florida, 1968. p.292-299.
- FELDMAN, A.W.; HANKS, R.W. Phenolic compounds in roots and leaves of four citrus cultivars. **Nature**, v.5000, p.985-986, 1965.
- JARDENY, A.; MONSELISE, S.P.; CHORIN, M. Some morphological and physiological features of Clementine mandarine trees affected by cachexia. In: **CONF. INT. ORGAN. CITRUS VIROL., 3**, 1965, Gainesville. **Proceedings...** Gainesville: University of Florida, 1965. p.291-294.
- MAY, A.R. **Cromatografia de camada delgada**. Curitiba-PR: Universidade Federal do Paraná. Instituto de Pesquisa Química, 1965. p.1-52. (Monografia Didática, 9).
- MONSELISE, S.P.; GOREN, R. Some physiological properties of leaves and bark of psorosis-infected Valencia orange trees. In: **CONF. INT. ORGAN. CITRUS VIROL., 3**, 1965, Gainesville. **Proceedings...** Gainesville: University of Florida, 1965. p.295-298.
- NICKEL, O. Transmissibilidade da sorose tipo Bahia por enxertia. **Fitopatologia Brasileira**, v.14, n.3/4, p.272-275, 1989.
- NICKEL, O.; COSTA, N. Pathological changes in the wood of grapefruit and sweet orange plants affected by Bahia-type psorosis. In: **CONF. INT. ORGAN. CITRUS VIROL., 11**, 1990, Gainesville. **Proceedings...** University of Florida, 1990. (no prelo).
- SCHWARZ, R.E. Thin layer chromatographical studies on phenolic markers of the greening virus in various citrus species. **S. Afr. J. Agric. Sci.**, v.11, p.797-802, 1968.