

## **Identificação de Morte Súbita dos Citros Usando Espectroscopia de Fluorescência**



## **República Federativa do Brasil**

*Luiz Inácio Lula da Silva*  
Presidente

## **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA**

*Roberto Rodrigues*  
Ministro

## **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa**

### **Conselho de Administração**

*Luis Carlos Guedes Pinto*  
Presidente

*Silvio Crestana*  
Diretor-Presidente

*Alexandre Kalil Pires*  
*Ernesto Paterniani*  
*Hélio Tollini*  
*Cláudia Assunção dos Santos Viegas*  
Membros

### **Diretoria Executiva da Embrapa**

*Silvio Crestana*  
Diretor-Presidente

*José Geraldo Eugênio de França*  
*Kepler Euclides Filho*  
*Tatiana Deane de Abreu Sá*  
Diretores

### **Embrapa Instrumentação Agropecuária**

*Ladislau Martin Neto*  
Chefe Geral

*Carlos Manoel Pedro Vaz*  
Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

*Maria do Socorro Gonçalves de Souza Monzane*  
Chefe Adjunto de Administração

*Ricardo Yassushi Inamasu*  
Gerente da Área de Comunicação e Negócios



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

ISSN 1678-0434

Novembro, 2005

# ***Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 11***

## **Identificação de Morte Súbita dos Citros Usando Espectroscopia de Fluorescência**

Jean Carlos Corte Terencio  
Débora Marcondes Bastos Pereira Milori  
Ladislau Martin-Neto

São Carlos, SP  
2005

**Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:**

Embrapa Instrumentação Agropacuária  
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  
Secretária-Executiva: Valéria de Fátima Cardoso  
Membros: Dra. Débora Marcondes Bastos Pereira Milori,  
Dr. João de Mendonça Naime,  
Dr. Washington Luiz de Barros Melo  
Membro Suplente: Dr. Paulo Sérgio de Paula Herrmann Junior

Supervisor editorial: Dr. Victor Bertucci Neto  
Revisor de texto: Dr. Victor Bertucci Neto  
Normalização bibliográfica: Valéria de Fátima Cardoso  
Tratamento de ilustrações: Valentim Monzane  
Capa: Foto arquivo  
Editoração eletrônica: Valentim Monzane

**1ª edição**

1ª impressão (2005): 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).**

**CIP-Brasil. Catalogação-na-publicação.**

**Embrapa Instrumentação Agropecuária**

- 
- T316i Terencio, Jean Carlos Corte  
Identificação de Morte Súbita dos Citros Usando Espectroscopia de  
Fluorescência / Jean Carlos Corte Terencio, Débora Marcondes Bastos  
Pereira Milori, Ladislau Martin-Neto. -- São Carlos: Embrapa Instrumentação  
Agropecuária, 2005.  
11 p. (Embrapa Instrumentação Agropecuária. Boletim de Pesquisa e  
Desenvolvimento, ISSN 1678-0434; 11)
1. Citros Porta enxerto. 2. Fitopatologia. 3. Fluorescência. I. Milori,  
D. M. B. P. II. Martin-Neto, L. III. Título. IV. Série.

---

**CDD 21 ED 634.304**

© Embrapa 2005

# Sumário

Resumo .....	5
Abstract .....	6
Introdução .....	7
Material e Métodos .....	8
Resultados e Discussão .....	9
Conclusões .....	10
Referências Bibliográficas .....	10

# Identificação de Morte Súbita dos Citros Usando Espectroscopia de Fluorescência

---

Jean Carlos Corte Terencio<sup>1</sup>

Débora Marcondes Bastos Pereira Milori<sup>2</sup>

Ladislau Martin-Neto<sup>3</sup>

## Resumo

A morte súbita dos citros (MSC) já causou desde 1999 o definhamento e morte de mais de 1,5 milhão de árvores de laranja podendo atingir 85% dos pomares paulistas e mineiros. O agente causal da doença ainda permanece desconhecido. A forma de detecção atual da doença é feita através de inspeção visual da árvore, cujos sintomas às vezes se assemelham muito com outras doenças causando muita incerteza na produção de laudos de infestação da doença. Um amarelecimento que a doença causa na parte interna do porta enxerto é o critério mais forte para o diagnóstico final, entretanto o procedimento leva a uma grande lesão na planta que pode servir para a entrada de outras doenças em árvores ainda não infectadas. Este trabalho propõe identificar plantas contaminadas por Morte Súbita dos Citros utilizando a técnica de fluorescência visando aumentar a precisão na detecção da doenças. Esta metodologia também permite a detecção da doença precocemente possibilitando a tomada de decisões que possam minorar as perdas de produção para os citricultores.

palavras-Chave:

Citros; Porta-enxerto; Fitopatologia; Fluorescência

<sup>1</sup>MSc em Química Analítica, Universidade de São Paulo, e-mail: jean@cnpdia.embrapa.br

<sup>2</sup>Física, Dra., Embrapa Instrumentação Agropecuária, Caixa Postal 741, CEP 13560-970, São Carlos-SP, e-mail: debora@cnpdia.embrapa.br

<sup>3</sup>Físico, Dr., Embrapa Instrumentação Agropecuária, Caixa Postal 741, CEP 13560-970, São Carlos-SP, e-mail: martin@cnpdia.embrapa.br

# Diagnosis of Citrus Sudden Death Using Fluorescence Spectroscopy

---

Jean Carlos Corte Terencio  
Débora Marcondes Bastos Pereira Milori  
Ladislau Martin-Neto

## Abstract

The sudden death of citrus (SDC) disease caused since 1999 the consumption and death of more than 1,5 million of orange trees in Brazil, being able to reach 85% of the São Paulo and Minas Gerais orchards. The causal agent of disease is still unknown. The current manner of disease detection is made through visual inspection of the orange trees, whose symptoms are very similar to others diseases, causing uncertainty in the production of infestation awards. A yellowish in the internal part of stem, typical of disease, is the strongest criterion for the final diagnosis, however leads to a great injury in the plant that can serve for the entrance of other diseases in trees still not infected. This work intends to identify contaminated plants by Sudden Death of Citrus using the fluorescence spectroscopy technique. The goal is to increase the precision in the diagnosis. This methodology also allows the precocious detention of the disease making possible a quick taking of decisions, diminishing losses for the citrus producers.

Key-words:

Citrus; Rootstock; Phytopathology; Fluorescence.

## Introdução

Assistimos ao final do último século a descoberta de uma doença denominada de MSC que 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). Bassanezi et al. (2003) descreve o prelúdio 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).

A MSC 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).

Inicialmente, a copa da planta afetada apresenta 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 radicelas. O sintoma característico da doença é o amarelecimento do tecido interno da casca do porta-enxerto abaixo da região da enxertia podendo, em alguns casos, ficar alaranjado, contrastando com a coloração creme dos tecidos da casca da copa.

Este tecido amarelado corresponde, 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., 2002). Até o momento, nenhuma planta com menos de 22 meses, em pomares na região com maiores incidências da doença, apresentou sintomas.

Até o momento, nenhum patógeno foi confirmado como agente biótico da MSC, mas a hipótese mais provável é, segundo a Alellyx Applied Genomics (2005), que a MSC seja 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), de maneira semelhante à tristeza dos citros na sua forma de declínio rápido, quando a laranjeira doce é enxertada sobre laranjeira 'Azeda' (*C. aurantium* L.).

A forma de detecção atual da doença é feita através de inspeção visual da árvore, cujos sintomas às vezes se assemelham muito com os de outras doenças, como por exemplo o Declínio dos Citros, causando muita incerteza na

produção de laudos de infestação. O amarelecimento da parte interna do porta enxerto é o critério mais forte para o diagnóstico final, entretanto leva a uma grande lesão na planta que pode servir para a entrada de outras doenças em árvores ainda não infectadas.

Este trabalho propõe identificar plantas contaminadas pela MSC utilizando a técnica de espectroscopia de fluorescência visando aumentar a precisão na detecção da doenças e diminuir lesão na planta. A idéia básica do método é que a doença leva a alterações químicas no tecido do porta-enxerto, e consequentemente deve levar a alterações da emissão de fluorescência do material. Portanto, a metodologia deve permitir a detecção da doença precocemente, antes de sintomas externos da planta, possibilitando a tomada de decisões rápidas que possam minorar as perdas de produção para os citricultores.

## **Material e Métodos**

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Óptica e Lasers pertencente a Embrapa Instrumentação 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 de pedaços do porta-enxerto 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. Estas amostras foram enviadas pelo Fundecitrus - Fundo de Defesa da Citricultura e divididas em sadias, 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 166 amostras de porta-enxertos entre saudáveis, doentes com Morte Súbita dos Citros e com Declínio dos Citros certificadas pelos técnicos da Fundecitrus.

Foram retiradas lâminas do material interno dos porta-enxertos para as análises de espectroscopia de fluorescência em 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.

## 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 referência a banda com máximo em 822 nm, observou-se que os materiais doentes e saudáveis apresentavam níveis de emissão em 629 nm bastante diferenciados. Baseados nesta observação foi proposto um índice que é a razão entre as intensidades de emissão em 629 nm e 822 nm.

$$I_c = \frac{\text{Intensidade de fluorescência em } 629 \text{ nm}}{\text{Intensidade de fluorescência em } 822 \text{ nm}} \quad (1)$$

Para os 166 porta-enxertos analisados, valores de  $I_c$  acima de 6,4 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 87%. Este resultado pode ser visualizado na Fig. 2.

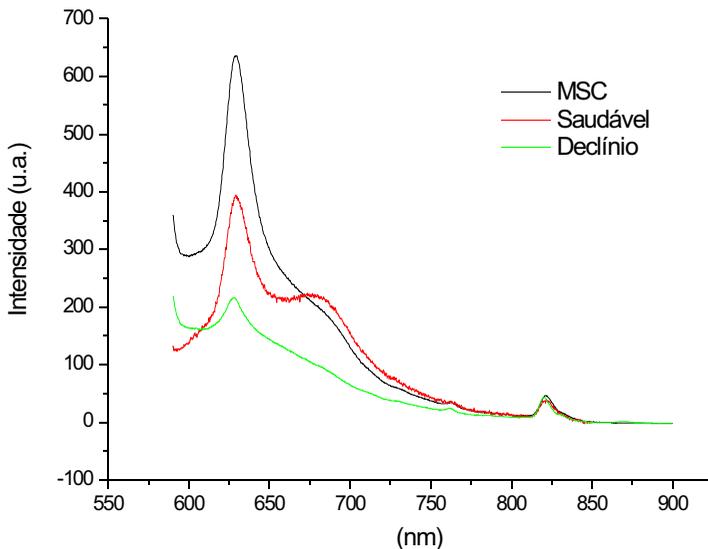


Fig. 1. Espectro de Emissão de Fluorescência com Excitação em 576 nm típicos de amostras com morte súbita dos citros, sadias e declínio dos citros.

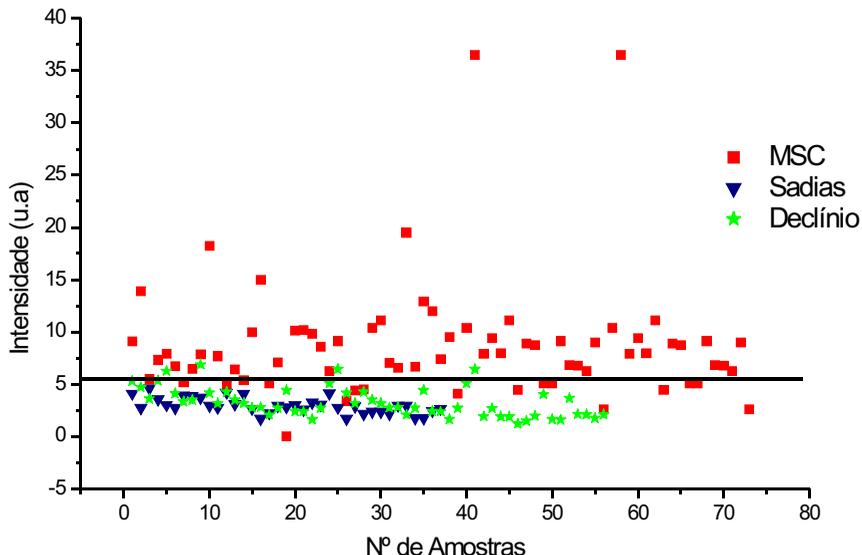


Fig. 2. Identificação de materiais saudáveis e doentes através de  $I_c$ .

## Conclusão

A metodologia desenvolvida por este trabalho deve auxiliar na inspeção visual, realizada pelos técnicos do Fundecitrus, dando-lhes maior precisão no diagnóstico e diminuição da lesão na árvore, pois para sonda de análise pode ser utilizado fibras ópticas. Considerando como referência a inspeção visual o método forneceu uma porcentagem de acerto bastante elevada, em torno de 90%. Este valor pode ser ainda maior considerando que plantas em estágio precoce da doença, que a inspeção visual não consegue avaliar, podem ter gerado erro na referência. O desafio agora é montar um sistema de fluorescência portátil que se adeque a metodologia desenvolvida e sirva para a realização de avaliações em campo.

## Referências Bibliográficas

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*, St. Paul., v. 93, n. 4, p. 502-512, 2003.

BASSANEZI, R. B.; YAMAMOTO, P. T.; GIMENES-FERNANDES, N. Progresso dos sintomas da 'morte súbita' em pomares de laranjeiras 'Valencia e Pêra. *Summa Phytopathologica*, Jaguariúna, v. 28, p. 23, 2002. Resumo.

DERRICK, K.S.; BERETTA, M. J.; BARTHE, G. A. et al. Identification of strains of Citrus tristeza virus by subtraction hybridization. **Plant Disease; An International Journal of Applied Plant Pathology**, St. Paul., 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 Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 28, p. 72, 2001. Resumo.

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 Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 28, p. 72, 2002. Resumo.

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. **Journal of Virology**, Washington, DC, v. 79, n. 5, p. 3028-3037, 2005.

ROMAN, M.P.; CAMBRA, M.; JUAREZ, J. et al. Sudden death of citrus in Brazil: A graft-transmissible bud union disease. **Plant Disease; An International Journal of Applied Plant Pathology**, St. Paul., v. 88, n. 5, p. 453-467, 2004.