

ELIMINAÇÃO DE VÍRUS DO COMPLEXO SOROSE DOS CITROS POR MICROENXERTIA ASSOCIADA A TERMOTERAPIA*

SÉRGIO A. CARVALHO, FRANCISCA A. SANTOS & MARCOS A. MACHADO

Centro de Citricultura Sylvio Moreira – IAC, Cx. Postal 04, CEP 13.490-970, Cordeirópolis, SP

(Aceito para publicação em 19/02/2002)

Autor para correspondência: Sérgio Alves Carvalho

CARVALHO, S.A., SANTOS, F.A. & MACHADO, M.A. Eliminação de vírus do complexo sorose de citros por microenxertia associada a termoterapia. *Fitopatologia Brasileira* 27:306-308. 2002.

RESUMO

A microenxertia de ápices caulinares tem sido utilizada com 100% de sucesso na eliminação do vírus da tristeza (*Citrus tristeza virus*) e dos viróides da exocorte (*Citrus exocortis viroid* - CEVd) e cachexia-xiloporose de materiais do Banco Ativo de Germoplasma de Citros do Centro de Citricultura Sylvio Moreira CCSM-IAC. Para o complexo da sorose, entretanto, esta técnica tem apresentado somente 60% de eficiência, indicando a necessidade de sua associação com termoterapia para garantir a eliminação viral. Para tanto, mudas originadas de borbulhas infetadas com sorose foram mantidas em câmara climática com 16 h de luz a 38 °C e 8 h no escuro a 32 °C e utilizadas para a obtenção dos ápices

caulinares empregados na microenxertia. Após o pegamento, o conjunto micro porta-enxerto e brotação foi sobre-enxertado em limoeiro (*Citrus limonia*) 'Cravo' com sete meses de idade e mantido em condições de casa de vegetação. Clones de laranjeiras doces (*Citrus sinensis*) 'Lima', 'Rubi', 'Piralima', 'Salustiana', 'João Nunes', 'Rosa' e 'Pêra Caire' tratados desta maneira, comprovaram eficiência de 100% de eliminação do complexo sorose, conforme indexação realizada empregando-se laranjeira 'Do Céu' como planta indicadora.

Palavras-chave adicionais: viroses, tratamento térmico, limpeza clonal.

ABSTRACT

Psorosis virus complex elimination from citrus by shoot-tip grafting associated to thermotherapy

Shoot-tip grafting has been 100% efficient in eliminating the *Citrus tristeza virus* (CTV), *Citrus exocortis viroid* (CEVd) and cachexia-xiloporosis viroid from varieties of the citrus germplasm bank at the Centro de Citricultura Sylvio Moreira CCSM-IAC. However, this technique has shown to be only 60% efficient in getting rid of the citrus psorosis virus complex, showing the necessity of association with thermotherapy to assure a complete virus-free condition. For this experiment, nursery trees were maintained in a climatic chamber at 38 °C in 16 h light and

32 °C 8 h darkness for 60 days, and the meristematic apices were used to shoot-tip graft. After the shooting of the meristematic part, this shoot tip graft was over grafted on seven-month old 'Rangpur' lime (*Citrus limonia*) seedlings, and developed under greenhouse conditions. Clones of sweet oranges (*Citrus sinensis*) 'Lima', 'Rubi', 'Piralima', 'Salustiana', 'João Nunes', 'Rosa' and 'Pêra Caire' treated this way had 100% success in psorosis virus elimination as shown by a biological index using 'Do Céu' sweet orange as the indicator plant.

Doenças do complexo sorose (sorose A, sorose B e mancha anelar dos citros, causada pelo *Citrus ringspot virus* (CtRSV) apresentam ampla distribuição entre variedades e espécies de citros. De etiologia viral, a sorose apresenta um período de até doze anos de incubação antes de expressar sintomas, que são caracterizados principalmente por fendilhamento e escamação de tronco e galhos de laranjeiras doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck], tangerineiras (*Citrus reticulata* Blanco) e pomeleiros (*Citrus paradisi* Macf) (Müller & Costa, 1993). A partir do uso de clones nucleares, a sorose A, única forma descrita em nossas condições, deixou de ser problemática para a citricultura, embora surtos eventuais possam ocorrer, principalmente associados ao uso de borbulhas originadas de clones velhos.

Dois componentes virais de morfologia diferenciada

e com capa protéica, unidades de capsídeo de aproximadamente 48 KDa, têm sido associados a diferentes isolados de CtRSV e de sorose (Derrick *et al.*, 1988; Garcia *et al.*, 1994). Mais recentemente, considerando a similaridade entre partículas virais encontradas em diferentes fontes de sorose que causa forte descamação, estas foram descritas em um novo gênero *Ophiovirus*, como *Citrus psorosis virus* (CPsV) (Milne *et al.*, 1996). Entretanto, a etiologia da doença ainda não está bem determinada, não havendo em muitos casos correlação entre a detecção molecular ou sorológica do CPsV e a expressão da doença no campo e em plantas indicadoras (Martin *et al.*, 2001). Por esta razão, e pelo fato de não terem sido ainda completamente caracterizados os isolados em nossas condições, será adotado neste trabalho o termo genérico complexo sorose.

O melhor método de controle do complexo sorose é a prevenção, através do emprego de borbulhas sadias na

* Apoio: FAPESP, Fundag e CNPq

produção de mudas. A eliminação de patógenos sistêmicos pode ser realizada atualmente através da microenxertia de ápices caulinares, sem os inconvenientes da juvenalidade associada ao uso de clones nucelares. No Centro de Citricultura Sylvio Moreira do Instituto Agrônomo de Campinas (CCSM-IAC) a microenxertia de ápices caulinares tem sido utilizada isoladamente com alta eficiência na eliminação do vírus da tristeza (*Citrus tristeza virus*, CTV) família *Closteroviridae*, gênero *Closterovirus* e dos viróides da exocorte (*Citrus exocortis viroid*, CEVd) e cachexia/xiloporose. Entretanto, para os do complexo sorose, para o qual também é necessário a indexação no Programa de Registro de Plantas Matrizes do Estado de São Paulo, esta técnica tem apresentado cerca de 37% de falha (Carvalho *et al.*, 1998).

A termoterapia é uma maneira efetiva e ecológica de erradicar patógenos de material propagativo. Apesar de não ser efetiva na eliminação de CEVd e do viroide da cachexia/xiloporose, esta técnica apresenta importante uso na eliminação de sorose A, sorose B, gomose côncava, impietratura, cristacortis, infecção variegada, “huanglongbin” (“greening”), CTV, “taatterleaf” e “vein enation” (Roistacher, 1985).

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da microenxertia, associada à termoterapia, na eliminação total dos vírus do complexo da sorose em variedades de citros do CCSM-IAC.

Os trabalhos foram desenvolvidos no Laboratório de Biotecnologia do CCSM-IAC, em Cordeirópolis, SP. Foram avaliadas as variedades de laranja ‘Lima’, ‘Rubi’, ‘Piralima’, ‘Salustiana’, ‘João Nunes’, ‘Rosa’ e ‘Pêra Caire’, todas positivas para sorose, conforme resultados de testes biológicos.

A presença de vírus do complexo sorose no material trabalhado foi detectada por testes biológicos empregando-se plantas de limoeiro ‘Cravo’ (*Citrus limonia* Osbeck) com seis meses de idade. Foram enxertadas duas borbulhas das variedades em estudo e logo acima uma borbulha da indicadora laranja doce ‘Do Céu’, com quatro repetições,

empregando-se também controles positivos e negativos. As plantas foram mantidas em casa de vegetação com temperatura diurna de 28 °C e noturna de 16 °C. As leituras de sintomas nas folhas jovens foram realizadas duas vezes por semana, observando-se a ocorrência de manchas tipo “folha de carvalho” ou estrias cloróticas nos limbos foliares. Quando nenhum sintoma era observado até o amadurecimento das folhas, as plantas eram podadas para forçar a emissão de novas brotações, realizando-se pelo menos três outras leituras ou quantas necessárias para o aparecimento dos sintomas no controle positivo.

Para o tratamento térmico, plantas das variedades em estudo enxertadas sobre limoeiro ‘Cravo’ e cultivadas em vasos de 4,5 dm³ foram mantidas em câmara climática a 38 °C por 16 h de luz e 32 °C por 8 h de luz por período de 60 dias. Somente brotações emitidas nestas condições foram então retiradas para microenxertia.

Na microenxertia, foi utilizada metodologia semelhante à desenvolvida por Murashige *et al.* (1972) e aperfeiçoada por Navarro *et al.* (1974). Como microporta-enxerto foram empregadas plântulas de citrange ‘Troyer’ (*Poncirus trifoliata* Raf. x *Citrus paradisi* Macf) germinadas no escuro em tubos de ensaio contendo sais de MS (Murashige & Skoog, 1962). Após o pegamento e desenvolvimento satisfatório do broto, o conjunto foi enxertado por garfagem de topo em limoeiro ‘Cravo’ com sete meses de idade. Uma mini-câmara úmida com saco plástico foi mantida até a completa adaptação e pegamento (Paiva & Carvalho, 1993).

Após aclimação e desenvolvimento adequado, as plantas recuperadas foram novamente indexadas para confirmação da eliminação da sorose utilizando a metodologia descrita anteriormente.

Os resultados dos testes de indexação em laranja ‘Do Céu’ (Tabela 1) indicaram a eficiência da associação dos dois métodos de limpeza na eliminação desta virose, tendo sido obtido 100% de plantas sadias. Estes resultados são de grande importância, uma vez que o Banco Ativo de Germoplasma de Citros do CCSM-IAC apresenta 16% de acessos infetados com os vírus do complexo sorose, e a

TABELA 1 - Resultados obtidos nos tratamentos com termoterapia* e microenxertia, para eliminação de vírus do complexo sorose dos citros em acessos de laranja doce (*Citrus sinensis*). Cordeirópolis, SP, 2000

Variedade	Acesso BAG	Indexação Sorose**	Microenxertia		Re-indexação Sorose**	Limpeza Sorose (%)
			Microenxertos pegos/feitos	Sucesso (%)		
‘João Nunes’	CV 109	+	3/16	18,75	-	100,00
‘Lima’	CV 09	+	3/31	9,68	-	100,00
‘Pêra Caire’	CV 157	+	3/34	8,82	-	100,00
‘Piralima’	CV 02	+	5/30	16,67	-	100,00
‘Rosa’	CV 95	+	5/20	25,00	-	100,00
‘Rubi’	CV 52	+	4/30	13,33	-	100,00
‘Salustiana’	CN 438	+	2/26	7,69	-	100,00
Média			3,1/26,7	14,28		100%

*A 38 °C por 16 h de luz e 32 °C por 8 h de luz por período de 60 dias

**Resultado positivo (+) ou negativo (-) para a presença dos vírus do complexo sorose, conforme teste realizado em indicadora laranja ‘Do Céu’.

aplicação de microenxertia isoladamente tem mostrado eficiência limitada a 63% dos trabalhos (Carvalho *et al.*, 1998)

O índice de recuperação de plantas no processo de microenxertia foi em torno de 14%. As perdas no processo estão relacionadas somente à fase *in vitro*, pois na aclimação, o processo de garfagem em plantas já estabelecidas em vasos, semelhante ao proposto por Paiva & Carvalho (1993), tem garantido índices de 100% de pagamento das plantas.

Além da influência da variedade, os baixos índices observados na recuperação das plantas microenxertadas estão provavelmente associados ao pequeno tamanho do meristema utilizado na operação (0,4 mm), o que tem garantido a alta eficiência na eliminação do CTV, CEVd e do viróide da cachexia-xiloporose (Carvalho *et al.*, 1998). Os resultados apresentados neste trabalho indicam, portanto que deve ser adotado como rotina o tratamento térmico para os materiais comprovadamente portadores de sorose e daqueles de procedência não determinada, principalmente em trabalhos de introdução de plantas. Isso reforça as afirmações de Roistacher (1985), de que a termoterapia, em associação com a microenxertia, deve ser utilizada, como estratégia para garantir maior segurança nos trabalhos de limpeza clonal

Em relação aos trabalhos de indexação e comprovação da eliminação do vírus, constatou-se grande variabilidade na expressão de sintomas, em função principalmente de variações de temperatura na casa de vegetação. Maior eficiência do processo, facilitando também a avaliação de novas técnicas de eliminação do vírus da sorose, deverão ser obtidos com o aperfeiçoamento de técnicas mais rápidas de detecção, como os baseados em testes moleculares (Garcia *et al.*, 1997, Costa *et al.*, 2001) e em sorologia (Garcia *et al.*, 1994, Djelouah *et al.*, 2000). Como nem todas as expressões do complexo sorose estão associadas ao CPsV (Martin *et al.*, 2001), as dificuldades na implementação destes testes para diagnósticos de rotina estão relacionadas à identificação precisa do componente dos diferentes tipos de sorose, à disponibilidade de antígenos para a produção dos anti-soros e à baixa concentração do vírus nos tecidos.

Plantas dos diferentes clones de laranja, livres do vírus da sorose e outros patógenos e pré-imunizados contra estirpes fortes do CTV, estão sendo mantidas em condições protegidas de vetores de vírus e caracterizadas morfológicamente, confirmando a manutenção da fidelidade varietal para utilização nos programas de matrizes e certificação de mudas de citros do Estado de São Paulo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CARVALHO, S.A., MACHADO, M.A. BAPTISTA, C.R. & MÜLLER, G.W. Shoot-tip grafting and CTV cross protection

of the "Centro de Citricultura – IAC" citrus germoplasm collection. Programme & Abstracts, 14, Conference of the International Organization of Citrus Virologists. Campinas, SP. 1998. p.112.

DERRICK, K.S., BRLANSKY, R.H., GRAÇA, B.J.V., LEE, R.F., TIMMER, L.W. & NGUYEN, T.K. Partial characterization of a virus associated with citrus ringspot. *Phytopathology* 78:1298-1301. 1988.

DJELOUAH, K., POTREE, O., BOSCIA, D., D'ONGLHIA, A.M., SAVINO, V. Production of monoclonal antibodies to Citrus psorosis virus. Proceedings, 14, Conference of the International Organization of Citrus Virologists., Riverside, CA. 2000. pp. 152-158.

GARCIA, M.L., DAL BO, E., GRAU, O. & MILNE, R.G. The closely related citrus ringspot and citrus psorosis viruses have particles of novel filamentous morphology. *Journal of Genetic Virology* 75:3585-3590. 1994.

GARCIA, M.L., DE LA TORRE, M.E., DAL BO, E., DJELOUAH, K., ROUAG, N., LUISONI, E., MILNE, R.G. & GRAU, O. Detection of citrus psorosis-ringspot virus using RT-PCR and DAS-ELISA. *Plant Pathology* 46:830-836. 1997.

MARTIN, S., MILNE, R.G., ALIOTO, D., GUERRI, J. & MORENO, P. Psorosis-like symptoms induced by causes other than citrus psorosis virus. Programme & Abstracts, 15, Conference of the International Organization of Citrus Virologists. Paphos, CY. 2001. p. 83.

MILNE, R.G., DJELOUAH, K., GARCIA, M.L., DAL BO, E. & GRAU, O. Structure of citrus-ringspot psorosis-associated virus particles: implications for diagnosis and taxonomy. Proceedings, 13, Conference of the International Organization of Citrus Virologists. Riverside, CA. 1996. pp. 189-197.

MÜLLER, G.W. & COSTA, A.S. Doenças causadas por vírus, viróides e similares em citros. In: Rossetti, V., Müller, G.W. & Costa, A.S. (Eds). Doenças dos citros causadas por algas, bactérias, fungos e vírus. Campinas, Fundação Cargill, 1993. V.2, pp. 55-84.

MURASHIGE, T & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497. 1962.

MURASHIGE, T., BITTERS, W.P., RANGAN, T.S., NAUER, E.M., ROISTACHER, C.N. & HOLLIDAY, P.B.O. A technique of shoot apex grafting and its utilization towards recovering virus-free citrus clones. *Hort Science* 7:118-119. 1972.

NAVARRO, L., ROISTACHER, C.N. & MURASHIGE, T. Improvement of shoot-tip grafting *in vitro* for virus-free citrus. *Journal of the American Society of Horticultural Science* 100:471-479. 1974.

PAIVA, L.V. & CARVALHO, S.A. de. Alternativa para promoção de crescimento *in vivo* de microenxertos de citros. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 28:1095-1089. 1993.

ROISTACHER, C.N. A historical review of the major graft-transmissible diseases of citrus. FAO/Regional Office for the Near East, Riverside, 1985.