

NOTAS CIENTÍFICAS

IDENTIFICAÇÃO E ISOLAMENTO DE PROTEÍNAS EXCLUSIVAS DE PLANTAS COM DECLÍNIO DOS CITROS¹

LUCIANO VILELA PAIVA², MAURÍCIO DE SOUZA³,
MAURÍCIO ANTÔNIO LOPES e EDILSON PAIVA⁴

RESUMO - O teste do acúmulo de Zn no lenho e o de absorção de água por meio de uma seringa são os testes-padrões mais utilizados para distinguir as árvores afetadas pelo declínio-dos-citros, de árvores afetadas por outras anomalias que também causam o definhamento das plantas cítricas. Tais testes, entretanto, dão resultados positivos somente nos estádios avançados da doença. O objetivo deste trabalho foi identificar proteínas exclusivas do declínio-dos-citros. As plantas analisadas foram laranjeiras 'Valência' enxertadas no limoeiro 'Cravo', com e sem sintomas visíveis. Por eletroforese foram caracterizadas e isoladas duas proteínas (26 e 23 KD) presentes somente em plantas com declínio-dos-citros, e, pela primeira vez, no Brasil, relacionadas à anomalia.

IDENTIFICATION AND ISOLATION OF PROTEINS FOUND ONLY IN PLANTS WITH CITRUS DECLINE

ABSTRACT - Measurement of Zn accumulation in the trunk wood and the water syringe absorption test are the standard tests for diagnosis commonly used to distinguish the trees affected by "citrus decline" from other anomalies that also cause degeneration of citrus plants. However, these tests only give positive results in advanced stages of the disease. The objective of this work was to identify proteins present only in plants with "citrus decline". The plants used were 'Valência' orange trees with the 'Rangpur lime' as rootstock with and without visual symptoms. Two proteins were characterized and isolated (26 and 23 KD) through electrophoresis, which were found only in plants with "citrus decline". For the first time in Brazil these proteins were linked to "citrus decline".

O declínio-dos-citros, anormalidade de causa ainda desconhecida, é uma das doenças que mais causa prejuízos à citricultura brasileira (Beretta, 1987), constituindo-se em motivo de crescente preocupação para produtores e pesquisadores. No Brasil, só no Estado de São Paulo o declínio-dos-citros

¹ Aceito para publicação em 3 de dezembro de 1996.

² Eng. Agr., Doutorando em Agronomia/Fitotecnia, Univ. Fed. de Lavras (UFLA), Caixa Postal 37, CEP 37200-000 Lavras, MG.

³ Eng. Agr., Dr., Prof. Titular, Dep. de Agric., UFLA.

⁴ Eng. Agr., Ph.D, Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo (CNPMS), Caixa Postal 151, CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG.

já causou a morte de mais de 10 milhões de árvores (Prates, 1988). Na Flórida, anomalia de sintomas idênticos conhecida como *blight*, causa a morte de mais de meio milhão de plantas produtivas por ano, acarretando um prejuízo, para a indústria de citros, de, aproximadamente, 60 milhões de dólares (Marais, 1990).

Os sintomas externos do declínio-dos-citros são, em geral, observados em pomares após cinco anos de idade (Marais, 1990). No entanto, isto não significa que somente plantas com mais de cinco anos sejam suscetíveis a esta anomalia.

O teste do acúmulo de Zn no lenho e o de absorção de água por meio de uma seringa são os principais testes-padrões de diagnóstico. Servem para distinguir as árvores afetadas pelo *blight* ou pelo declínio-dos-citros de outras causas que também provocam o definhamento das plantas cítricas (Wutscher, 1989). Entretanto, estes testes dão resultados positivos somente quando as plantas já apresentaram os sintomas externos, normalmente após cinco anos de idade, não permitindo o diagnóstico de plantas no estágio incipiente da doença.

Como é muito provável que o *blight* e o declínio-dos-citros sejam causados por um agente infeccioso, visto que podem ser transmitidos através da enxertia de raízes (Lee et al., 1988), os seus diagnósticos precoces poderão monitorar a erradicação de plantas infectadas no pomar, diminuindo a quantidade de inóculo na área, e, conseqüentemente, reduzindo o risco de disseminação.

O objetivo do presente trabalho foi de identificar proteínas presentes somente em plantas com declínio-dos-citros.

O estudo foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo-CNPMS/Embrapa, em Sete Lagoas, MG.

Os tecidos de ramos e raízes dos citros utilizados foram obtidos de pomares comerciais, situados nos municípios de Bebedouro, SP, e de Alfenas, MG. As amostras de ramos foram coletadas de laranjeiras *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, cv. Valência, e as raízes de seus porta-enxertos *Citrus limonia* (L.) Osbeck, cv. Cravo, que tinham aproximadamente 15 anos de idade. Para distinguir plantas sadias das afetadas pelo declínio-dos-citros, utilizou-se o método de injeção de água com seringa no tronco, sob pressão (Lee et al., 1984). Coletaram-se amostras de ramos e raízes com 1 a 2 cm de diâmetro de 15 plantas sadias, e 15 plantas com declínio.

As extrações foram realizadas com o tampão de extração de proteínas PBS (0,8% NaCl; 0,02% KH_2PO_4 ; 0,29% $\text{NaHPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; 0,02% KCl), pH 7,4, acrescido de 1% do agente redutor beta-mercaptoetanol. Em um quitasato adaptado, e por meio de uma bomba de vácuo (15 cm Hg), foram passados 400 μL do tampão PBS nos vasos lenhosos de cada amostra. Para minimizar uma possível degradação das proteínas, a extração foi feita com o quitasato mantido em contato com gelo moído, e após a extração o extrato foi congelado a -20°C , e liofilizado.

A eletroforese foi feita em géis desnaturantes de poliacrilamida e sódio-dodecil-sulfato (SDS-PAGE), com 6% e 12,5% de acrilamida no gel de

concentração e separação, respectivamente, e com 1,5 mm de espessura, em sistema descontínuo (Laemmli, 1970), com o tampão de corrida 0,192 M Glicina + 0,025 M Tris + 0,1% SDS. Os géis foram submetidos a carga elétrica de 12 mA durante a corrida no gel de concentração, e, em seguida, de 24 mA no gel de separação. O período total de corrida foi de, aproximadamente, quatro horas. A coloração dos géis foi feita com o corante contendo 0,5% Comassie Blue R-250 + 50% etanol + 10% ácido acético, e a descoloração, com uma solução contendo 10% ácido acético + 5% etanol.

O isolamento das proteínas acumuladas exclusivamente em plantas doentes foi feita conforme o protocolo descrito pela IBI (International Biotechnologies, 1986/87), utilizando-se o eletroeluidor modelo Unidirectional Electroelutor Analytical (UEA). O material submetido a eletroeluição consistiu de regiões do gel que continham as proteínas de interesse. A eletroeluição unidirecional se deu em tampão de corrida através de corrente de 125 Volts. As proteínas precipitadas em tampão de alta salinidade (0,075 M NH_4OAc + 0,01% de Azul de Bromofenol) foram coletadas após uma corrida por 35 min e em seguida após uma corrida por 45 min. O material recuperado foi dializado em tampão PBS (pH 7,4) durante uma noite e centrifugado a 6.700 g/15 min. O sedimento contendo as proteínas foi ressuspensão em 125 μL de tampão PBS (pH 7,4) e armazenado a -20°C .

A diferenciação entre plantas sadias e com declínio-dos-citros pelos seus perfis protéicos pode ser observada na Fig. 1.

Os resultados indicam três bandas protéicas de pesos moleculares de, aproximadamente, 43, 31 e 21,5 kD, presentes nos extratos dos vasos lenhosos de raízes de plantas sadias (colunas 2 a 4) e cinco bandas protéicas de 43, 31, 26, 23 e 21,5 kD no extrato de plantas com declínio-dos-citros (colunas 5 e 6). As proteínas de peso molecular de 26 e 23 kD foram observadas somente em plantas doentes.

Estes resultados diferem dos obtidos por Derrick et al. (1990), os quais, trabalhando com *blight*, identificaram sete proteínas no extrato de plantas doentes (43, 35, 31, 26, 23, 18 e 15 kD) e três proteínas no extrato de plantas sadias (43, 31 e 26 kD). As quatro proteínas a mais associadas ao *blight* e que não foram observadas nas plantas com declínio-dos-citros possuem pesos moleculares de 35, 23, 18 e 15 kD. Segundo os mesmos autores, as concentrações das proteínas 18 e 15 kD são bastante variáveis. A banda que se encontra nas colunas 5 e 6 (Fig. 1), próxima à lactalbumina (14,2 kD), corresponde possivelmente a proteína de 15 kD, presente nos extratos de plantas com *blight*.

Uma melhor separação e detecção das proteínas de baixo peso molecular poderia ser obtida utilizando maior concentração de acrilamida no gel de separação. Observa-se que entre as proteínas exclusivas de plantas com declínio-dos-citros (26 e 23 kD) que não aparecem em tecidos sadios, somente a proteína 23 kD é considerada uma das exclusivas do *blight* (proteínas de 35, 23, 18 e 15 kD). Uma possível razão para esta diferença poderia estar relacionada às variações genotípicas entre as espécies dos porta-enxertos investigados. No presente estudo, foram utilizadas raízes do

limoeiro 'Cravo', enquanto no caso do *blight* (Derrick et al., 1990), as proteínas foram extraídas do limoeiro 'Rugoso'.

As proteínas 26 e 23 kD foram identificadas em todas as amostras analisadas de raízes de plantas com sintomas visuais do declínio-dos-citros, independentemente do local amostrado, e em sete amostras de raízes de plantas consideradas, a princípio, como saudáveis. Este resultado indica que estas plantas consideradas como saudáveis poderiam estar no início do desenvolvimento da doença, embora não apresentassem os sintomas externos característicos e redução na absorção e transporte de água nos vasos condutores, ou seja, a presença destas proteínas pode ser considerada como um dos primeiros indícios da presença da doença.

Tentativas de diferenciar plantas saudáveis e doentes através das proteínas presentes nos vasos lenhosos de ramos não tiveram êxito, como é mostrado na Fig. 2. Observa-se que não há presença de proteínas específicas do declínio-dos-citros no extrato de caule de plantas doentes, dados que confirmam, em parte, os obtidos por Derrick et al. (1990), que algumas vezes não detectaram proteínas específicas do *blight* em amostras do caule. A falha na detecção destas macromoléculas dá a idéia de que, se o declínio dos citros e o *blight* forem causados por um patógeno, ele se encontra em concentração extremamente baixa no caule e em maior concentração nas raízes.

Perfis protéicos das amostras de raízes de plantas saudáveis e doentes, provenientes dos municípios de Bebedouro, SP e Alfenas, MG mostram que não há diferença entre as plantas saudáveis e com declínio-dos-citros dos dois locais quando comparadas entre si. O definhamento das plantas cítricas nos dois locais se deve, provavelmente, à mesma anomalia, e sua expressão em relação às proteínas não é influenciada pelos fatores ambientais.

As proteínas de 26 e 23 kD, presentes nos extratos dos vasos lenhosos de raízes, e que são exclusivas de plantas com declínio-dos-citros, foram, pos-



FIG. 1. Gel de poliacrilamida 12,5%, com proteínas dos vasos lenhosos de raízes de três plantas saudáveis (colunas 2 a 4), e duas com declínio dos citros (colunas 5 e 6), cujos pesos moleculares encontram-se à esquerda; colunas 1 e 7 contêm os marcadores moleculares à direita.

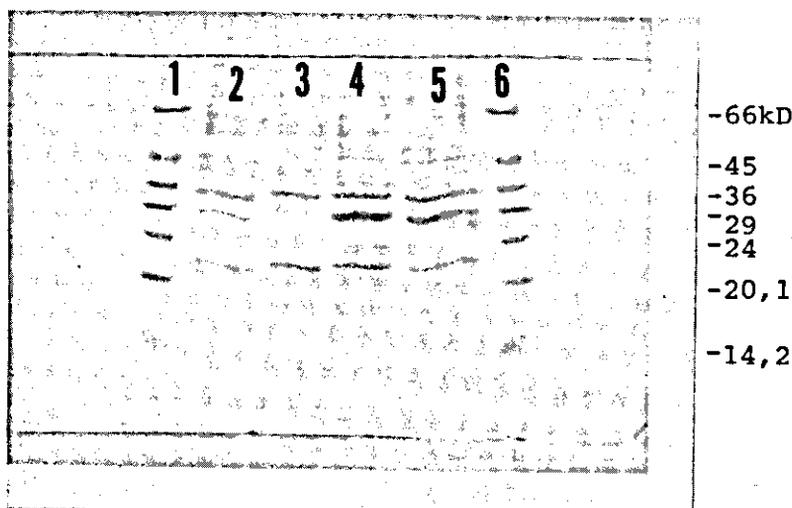


FIG. 2. Gel de poliacrilamida 12,5%, com proteínas dos vasos lenhosos de ramos de duas plantas sadias (colunas 2 e 3) e duas com declínio dos citros (colunas 4 e 5). Colunas 1 e 6 contêm marcadores moleculares à direita.

teriormente, isoladas, e estão sendo utilizadas na produção de anticorpos específicos que poderão permitir, por meio de técnicas imunológicas, fazer a diagnose precoce e precisa da anomalia.

REFERÊNCIAS

- BERETTA, M.J.G. Declínio de plantas cítricas : pesquisas recentes. *Laranja*, Cordeirópolis, v.1, n.8, p.83-93, 1987.
- DERRICK, K.S.; LEE, R.F.; BRLANSKY, R.H.; TIMMER, L.W.; HEWITT, G.G.; BARTHE, G.A. Proteins associated with citrus blight. *Plant Disease*, St. Paul, v.74, p.168-170, 1990.
- INTERNATIONAL BIOTECHNOLOGIES. Unidirectional electroclutor analytical. In: INTERNATIONAL BIOTECHNOLOGIES. *Life on the edge*. Connecticut, 1986/87. v.2, p.41-42.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, London, v.227, p.680-685, 1970.
- LEE, R.F.; BRLANSKY, R.H.; TIMMER, L.W.; TUCKER, D.P.H.; DERRICK, K.S.; GRAHM, J.H. Current status of experimental transmission of citrus blight. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF CITRUS CANCER, DECLINE/BLIGHT AND SIMILAR DISEASE, 1987, São Paulo. *Proceedings...* Campinas: Fund. Cargill, 1988. p.262-263.
- LEE, R.F.; MARAIS, L.J.; TIMMER, L.W.; GRAHAM, J.H. Syringe injection of water into the trunk; a rapid diagnostic test for citrus blight. *Plant Disease*, St. Paul, v.68, p.511-513, June 1984.
- MARAIS, L.J. Citrus blight: world research review. *Citrograph*, Los Angeles, v.75, p.119-124, Mar. 1990.

PRATES, H.S. Declínio-de-citros no Estado de São Paulo. **Laranja**, Cordeirópolis, v.1, p.201-207, 1988.

WUTSCHER, H.K. Long-term patterns of water uptake in syringe injection and wood zinc levels of blight-affected orange trees. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, v.102, p.24-27, 1989.