

INDUÇÃO EXPERIMENTAL DE OBSTRUÇÕES TÍPICAS DE DECLÍNIO, EM CITROS, E SUA POSSÍVEL ASSOCIAÇÃO COM FATORES DO SOLO¹

MARIA JULIA G. BERETTA², MÔNICA FOGAÇA³ e WALKYRIA B.C. MORAES⁴

RESUMO - Mudanças cítricas sadias, com dois anos de idade, foram plantadas em vasos contendo solo e restos de raízes e radículas retirados da região que envolvia as raízes de laranjeira com acentuados sintomas de declínio, e de plantas sadias. Parte deste solo foi previamente esterilizado. Após um ano, as mudas plantadas em solo de pomar com declínio apresentaram acentuada clorose mesmo no tratamento em que foi esterilizado. Após dois anos, estas mesmas mudas mostraram baixa condutividade do fluxo de água na raiz e no tronco. Estudos histoquímicos em raízes e tronco mostraram a presença de obstruções amorfas nos vasos do xilema, semelhantes às encontradas em plantas com declínio, sendo em maior quantidade nas raízes do que no tronco, mesmo no tratamento com solo esterilizado. A presença de maior quantidade de obstruções amorfas nas raízes do que no tronco parece indicar que essas obstruções são inicialmente formadas nas raízes. Estes resultados sugerem a possível associação do solo com a indução de obstruções amorfas semelhantes às encontradas em plantas cítricas com declínio.

Termos para indexação: *Citrus sinensis*, declínio de plantas cítricas.

EXPERIMENTAL INDUCTION OF AMORPHOUS-LIKE PLUGS IN CITRUS AND THEIR POSSIBLE ASSOCIATION WITH SOIL FACTORS

ABSTRACT - Two year-old healthy citrus plants were transferred to pots containing soil collected from the vicinity of orange tree roots with decline symptoms and from those of healthy trees. Part of the soil was sterilized before using. After one year, the plants growing in soil from decline - affected trees showed leaf chlorosis even when growing on sterilized soil. After two years, these plants showed blockage of water uptake and translocation in the roots and trunk, while those growing on soil from non-affected trees were normal. Histochemical studies performed on samples obtained from roots and trunk of all plants growing in pots in the presence of sterilized or non-sterilized soil, collected from the vicinity of plants showing symptoms of decline presented higher proportion of amorphous-like plugs in the xylem vessels in the roots than in the trunk. The higher amount of amorphous-like plugs in the roots than in the trunk seems to show that the vessel starts plugging in the roots. These results suggest a possible association of the soil with plug-induction in decaying citrus plants.

Index terms: *Citrus sinensis*, blight.

INTRODUÇÃO

O declínio de plantas cítricas foi observado, há alguns anos no Brasil. Ocorre principalmente nos pomares tecnicamente bem conduzidos, nos quais recomendações para adubação, práticas culturais e cuidados fitossanitários têm sido seguidas (Rossetti et al. 1980).

A causa ou causas dessa anormalidade, cuja importância econômica vem crescendo, ainda é desconhecida. Os sintomas são normalmente observados em árvores de mais de cinco anos de idade, geralmente após a primeira produção. O primeiro sintoma visual é a falta de brotação, principalmente na primavera. As folhas tornam-se verde opaco, sem brilho, ocorre um murchamento de toda a copa ou iniciando de um lado da planta e se estendendo, pouco a pouco, a toda a copa; em estádios avançados ocorre um desfolhamento. Notam-se sintomas de deficiência nutricionais nas folhas, notadamente de zinco e magnésio. Os frutos são menores e a quantidade de suco é reduzida.

O sistema radicular, como um todo, parece normal. Em estádios muito avançados da doença,

¹ Aceito para publicação em 4 de abril de 1986. Parcialmente financiado pela EMBRAPA.

² Enga. - Agra., Bolsista do CNPq, Seção de Bioquímica Fitopatológica, Instituto Biológico de São Paulo, Caixa Postal 7119, CEP 01000 São Paulo, SP.

³ Estudante de Biologia, USP, Estagiária da Seção de Bioq. Fitop., Inst. Biológico de São Paulo.

⁴ Biologista, Ph.D., Seção de Bioq. Fitop., Inst. Biol. de São Paulo.

as raízes são atacadas por fungos secundários, o que parece não estar associado ao declínio. O peso específico das raízes secundárias é menor em plantas atacadas, quando comparado ao de plantas sadias; o número de radículas é também reduzido.

O declínio apresenta as mesmas características do "blight" na Flórida, "declinamiento" na Argentina e "marchitamiento" no Uruguai, também de causas desconhecidas. Outras características do declínio são: acúmulo de sais de zinco no tronco das plantas afetadas (Smith 1974, Wutscher et al. 1977, Albrigo & Young 1981, Rossetti 1981b); baixo fluxo de água por sucção e fluxo de ar por pressão, através de segmentos de raiz (Rossetti 1981a); baixa condutividade de água no tronco, ramos e raízes (Cohen 1974, Rossetti 1981a, b); aparecimento de obstruções amorfas nos vasos do xilema, que são características do declínio (Cohen et al. 1983, Brlansky et al. 1985).

Progressos na pesquisa sobre o declínio são lentos porque a doença não se manifesta até a planta atingir cinco anos de idade. Rhoads (1936) concluiu que o "blight" na Flórida é uma doença não-parasitária e não é transmitida por enxertia. Smith (1974) e Wutscher et al. (1983) não obtiveram, também, resultados na transmissão de "blight", através de enxertia de borbulhas. No Brasil, o declínio também não foi transmitido pelos métodos usuais de enxertia por borbulha (Prates et al. 1984, Rossetti & Beretta 1985). Feldman & Hanks (1976) verificaram a redução no crescimento de raízes de plantas novas enxertadas com tecido de plantas afetadas por "blight" em limão 'Rugoso', porém essa redução do crescimento das raízes não foi considerada como típica de "blight". No Uruguai, Salibe et al. (1976) relataram menor crescimento das plantas e sintomas de deficiência de zinco em plantas novas enxertadas com borbulhas de plantas com "marchitamiento repentino", porém, características, como a condutividade de água e o acúmulo de zinco no tronco, não foram verificadas. Lima & Borducchi (1982), através de enxertia de borbulhas de plantas com declínio, obtiveram acúmulo de zinco em plantas novas, mas essas plantas não mostraram sintomas visuais de declínio. Transmissão do fator de acúmulo de zinco não foi confirmada em outros estudos (Wutscher et al. 1983).

Até 1983, não se tinha conhecimento da transmissão experimental de declínio e "blight" com a reprodução de todos os seus sintomas, conforme Smith & Reitz (1977). Tucker et al. (1984) apresentaram a primeira evidência de que o "blight" pode ser transmitido experimentalmente em plantas adultas.

No presente trabalho, efetuou-se ensaio visando verificar a possível influência do solo na transmissão do declínio.

MATERIAL E MÉTODOS

Três árvores de laranja 'Pera do Rio' (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), com doze anos de idade, enxertadas sobre limão 'Cravo' (*C. limonia* Osb.), com acentuados sintomas de declínio, confirmado pelos testes de injeção de água (Cohen 1974, Lee et al. 1984), foram arrancadas em junho de 1983, na região de Casa Branca, SP. O solo, juntamente com restos de raízes e radículas, retirado num raio de 30 cm ao redor do tronco das laranjeiras, à profundidade de 30-40 cm, foi trazido para casa de vegetação e colocado em vasos, para os quais foram transferidas quinze mudas sadias da mesma combinação, com dois anos de idade.

Como controle, foi utilizado solo obtido pelo mesmo processo e retirado da circunvizinhança de três laranjeiras da mesma combinação, consideradas sadias após a aplicação de testes para diagnóstico de declínio. Neste caso, o solo foi retirado próximo ao tronco, a 30-40 cm de profundidade, sem que as plantas fossem arrancadas. No solo retirado da circunvizinhança tanto de plantas sadias, como de plantas com declínio, foi feita uma divisão em dois lotes, sendo um deles submetido à esterilização a 100°C, durante doze horas. Em seguida, as amostras de solo provenientes dos diferentes tratamentos foram colocadas em vasos, para os quais foram transferidas quinze mudas de plantas sadias, da mesma combinação, com dois anos de idade.

Foram feitas análises químicas das amostras de solo, coletadas das covas de árvores sadias e com declínio, as quais não mostraram diferenças significativas entre os dois tratamentos.

Após um ano, foi feita uma avaliação do aspecto das plantas envasadas.

Após dois anos, três plantas de cada tratamento foram arrancadas e submetidas aos testes de fluxo de água nas raízes e no tronco (Rossetti et al. 1980, Rossetti 1981a) e à análise para determinação do acúmulo de zinco no tronco (Wutscher et al. 1977), tanto para as mudas plantadas em solo proveniente de covas de árvores com declínio, como para as plantadas em solo proveniente de covas de árvores sadias. Foram retiradas amostras do tecido do tronco em segmentos de 5 mm de diâmetro e 2 cm de profundidade, segundo Tucker et al. (1984), 10 cm acima

do ponto de enxertia, e amostras de raízes de 0,3 cm a 0,5 cm de diâmetro. Estas amostras mantidas em tampão de fosfato, 0,6M de pH 6,8 (Cohen et al. 1983), foram seccionadas em micrótomo de congelamento em cortes transversais. Os cortes histológicos foram examinados ao microscópio óptico e determinado o número de obstruções semelhantes às obstruções amorfas encontradas nos vasos do xilema de plantas com declínio (Cohen et al. 1983, Brlansky et al. 1985). Os resultados são expressos como percentagem destas obstruções.

O experimento foi repetido com solo da região de Barretos, SP.

RESULTADOS

Sintomas visuais

Após um ano, observou-se intensa clorose foliar, redução do tamanho das folhas e do ângulo de abertura das mesmas e, redução do crescimento da, quinze plantas mantidas nos vasos com solo proveniente de covas de árvores com declínio, o que não se verificou com as plantas controle. Os mesmos sintomas foram observados nas plantas em vasos que continham solo esterilizado (Beretta et al. 1984).

Testes diagnósticos

a) Após dois anos, os testes de translocação de água, realizados nas plantas cultivadas em vasos nas dependências do laboratório, mostraram bloqueio do fluxo nas raízes, mas não no tronco.

b) Análise de zinco no tronco não mostrou diferenças entre as plantas mantidas em solo procedente de árvores sadias ou com declínio (Beretta et al. 1985).

c) As observações microscópicas dos tecidos das raízes e troncos das plantas cultivadas, durante dois anos, em solo procedente de covas de plantas doentes, evidenciaram a ocorrência de numerosas obstruções amorfas de cor amarela intensa, semelhantes às que ocorrem em maior quantidade em árvores afetadas por declínio. Essas obstruções amorfas são consideradas como características dessa doença (Brlansky et al. 1985). Deve-se salientar que tais obstruções não foram encontradas nas plantas envasadas em solo procedente de covas de árvores sadias (Tabela 1). O número de obstruções foi maior nas raízes do que no tronco e não houve diferença entre os tratamentos cujas plantas foram cultivadas em solo esterilizado ou não. No segundo experimento, realizado com solo de pomar da região de Barretos, SP, observou-se início dos mesmos sintomas já descritos no primeiro experimento, nas plantas envasadas em solo retirado de covas de árvores com declínio, mas não nos de plantas envasadas em solo de árvores sadias.

DISCUSSÃO

A presença de obstruções, semelhantes a obstruções amorfas encontradas em plantas com declínio e que são características da doença, em maior quantidade na raiz do que no tronco (Tabela 1) parece indicar que as mesmas são inicialmente formadas nas raízes. Essa diferença poderia ser uma consequência de algum desequilíbrio fisiológico

TABELA 1. Percentagem de obstruções amorfas encontradas nos vasos do xilema de raízes e tronco de plantas cítricas, plantadas em solo provenientes de pomar com declínio.

	Obstruções amorfas (%)			
	Solo de cova de planta doente		Solo de cova de planta sadia	
	Não autoclavado	Autoclavado	Não autoclavado	Autoclavado
Raiz	A 27.4 ^a	A 17.8 ^a	B O	B O
Tronco	A 3.6 ^b	A 4.3 ^b	B O	B O

Médias seguidas por letras minúsculas idênticas, numa coluna, não diferem significativamente ao nível de 5% de probabilidade.

Médias antecipadas por letras maiúsculas idênticas na horizontal não diferem significativamente ao nível de 5% de probabilidade.

da planta devido às condições do solo ou à ação direta ou indireta de metabolitos de microrganismos. A possibilidade da ação de microrganismos parece estar excluída pela constatação de obstruções também em plantas envasadas em solo esterilizado pelo calor.

Os resultados obtidos sugerem uma associação do solo com o amarelecimento de folhas e formação de obstruções semelhantes às do declínio em plantas mantidas em condições experimentais. Embora tais plantas não apresentem, por enquanto, os sintomas típicos do declínio, a presença das obstruções apenas naquelas envasadas com solo retirado da cova de árvores com declínio, poderia indicar alguma associação do solo com a doença. Todavia, somente estudos complementares e o acompanhamento do ensaio poderão melhor esclarecer a semelhança entre o declínio encontrado no campo e a anomalia apresentada pelas mudas em condições experimentais, principalmente com relação à natureza das obstruções amorfas encontradas. Uma possível reprodução dos sintomas do declínio pelas plantas envasadas seria bastante sugestiva para relacionar essa doença com o solo.

CONCLUSÕES

1. Foram induzidas experimentalmente obstruções xilomáticas, semelhantes às obstruções amorfas, encontradas no xilema de plantas com declínio.
2. Não houve diferença entre os tratamentos de solo esterilizado ou não, procedente de covas de plantas com declínio.
3. A presença de maior quantidade de obstruções nas raízes do que no tronco, parece indicar que as obstruções são inicialmente formadas nas raízes.

REFERÊNCIAS

- ALBRIGO, L.G. & YOUNG, R.H. Phloem zinc accumulation in citrus trees affected with blight. *HortScience*, 16:158-60, 1981.
- BERETTA, M.J.G.; MORAES, W.B.C.; BARROS, A.C.; JACON, J.R. Clorose foliar de mudas de citros envasadas, em presença de terra de pomar com declínio. *Fitopatol. bras.*, 9:425, 1984.
- BERETTA, M.J.G.; MORAES, W.B.C.; BRLANSKY, R.H.; LEE, R.F.; TIMMER, L.W. Clorose foliar de mudas de citros envasadas, em presença de terra de pomar com declínio - II. *Fitopatol. bras.*, 10:332, 1985.
- BRLANSKY, R.H.; LEE, R.F.; COLLINS, M.H. Structural comparison of xylem occlusions in the trunk of citrus trees with blight and other decline diseases. *Phytopathology*, 75:145-50, 1985.
- COHEN, M. Diagnosis of young tree decline, blight and sandhill decline of citrus by measurements of water uptake using gravity injection. *Plant Dis. Rep.*, 58: 801-5, 1974.
- COHEN, M.; PELOSI, R.R.; BRLANSKY, R.H. Nature and location of xylem blockage structures in trees with blight. *Phytopathology*, 73:1125-30, 1983.
- FELDMAN, A.W. & HANKS, R.W. Root reduction in rough lemon seedlings graft inoculated from young tree decline and sandhill decline-affected donors. *Plant Dis. Rep.*, 60:887-91, 1976.
- LEE, R.F.; MARAIS, L.J.; TIMMER, L.W.; GRAHAN, J.H. Syringe injection of water into the trunk; a rapid diagnostic test for citrus blight. *Plant Dis.*, 68: 511-3, 1984.
- LIMA, J.E.O. & BORDUCCHI, A.S. Observation on citrus blight in S. Paulo, Brazil. *Proc. Fla. State Hortic. Soc.*, 95:72-5, 1982.
- PRATES, H.S.; GUIRADO, N.; MULLER, G.W. Declínio dos citros no Estado de São Paulo. *Laranja*, 5(3/4), 1984.
- RHOADS, A.S. Blight - a nonparasitic disease of citrus trees. *Fla. Agric. Exp. Stn. Bull.*, 296, 1936.
- ROSSETTI, V. Decline of citrus trees; research carried out by the Instituto Biológico from 1978 to 1981. São Paulo, Secr. Agric. Abastecimento Estado São Paulo, 1981a. 8p.
- ROSSETTI, V. Decline of citrus trees in Brasil; a review. In: INTERNATIONAL SOCIETY OF CITRICULTURE. *Proceedings. s.l.*, 1981b. v.1, p.478-80.
- ROSSETTI, V. & BERETTA, M.J. Boletim do declínio de plantas cítricas; pesquisas realizadas pelo Instituto Biológico - III parte: 1984-1985. São Paulo, Secr. Agric. Abastecimento Estado São Paulo, 1985. 28p.
- ROSSETTI, V.; WUTSCHER, H.K.; CHILDS, J.F.; RODRIGUEZ, O.; MOREIRA, C.S.; MULLER, G.W.; PRATES, H.S.; DENEGRÍ, J.D.; GREVE, A. Decline of citrus trees in the state of S. Paulo, Brazil. In: CALAVAN, E.C.; GARNSEY, S.M.; TIMMER, L.W. *Proceedings of the Eighth Conference of the International Organization of Citrus Virologists*. Riverside, IOCV, 1980. p.251-8.
- SALIBE, A.A.; TUCCI, J.C.; GIRARDIN, P.B.; CAMPGLIA, H.G. "Marchinamiento repentino" an infection disease of citrus trees. In: CALAVAN, E.C. *Proceedings of the Seventh Conference of the International Organization of Citrus Virologists*. Riverside, IOCV, 1976. p.152-6.

- SMITH, P.H. History of citrus blight in Florida. *Citrus Ind.*, 55(9):13-4; 16; 18-9, 1974; 55(10):9-10; 13-4, 1974; 55(11):12-3, 1974.
- SMITH, P.F. & REITZ, H.J. A review of the nature and history of citrus blight in Florida. In: INTERNATIONAL SOCIETY OF CITRICULTURE. *Proceedings*. s.l., 1977. v.3, p.881-4.
- TUCKER, D.P.H.; LEE, R.F.; TIMMER, L.W.; ALBRIGO, L.G.; BRLANSKY, R.H. Experimental transmission of citrus blight. *Plant Dis.*, 68:979-80, 1984.
- WUTSCHER, H.K.; COHEN, M.; YOUNG, R.H. Zinc and water soluble phenolic levels in the wood for diagnostic of citrus blight. *Plant Dis. Rep.*, 61:572-6, 1977.
- WUTSCHER, H.K.; YOUTSEY, C.O.; SMITH, P.F.; COHEN, M. Negative results in citrus blight transmission tests. *Proc. Fla. State Hortic. Soc.*, 96:48-50, 1983.