

LUCIANO VILELA PAIVA

ALTERAÇÕES PROTEICAS E NUTRICIONAIS EM TECIDOS
DE PLANTAS AFETADAS PELO DECLÍNIO DOS CITROS

Bat. 206

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura de
Lavras, como parte das exigências do curso de Pós-
Graduação em Agronomia, área de concentração, Fitotecnia,
para obtenção do grau de "MESTRE".

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA DE LAVRAS
LAVRAS - MINAS GERAIS
1993

LUCIANO VIEIRA PAIVA

ALTERAÇÕES PROTICAS E NUTRICIONAIS EM TECIDOS
DE PLANTAS AFETADAS PELO DECLÍNIO DOS CITROS

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura de Lavras, como parte das exigências do curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração, Entomologia, para obtenção do grau de "MAGISTER".

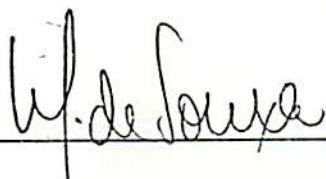
ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA DE LAVRAS

LAVRAS - MINAS GERAIS

1993

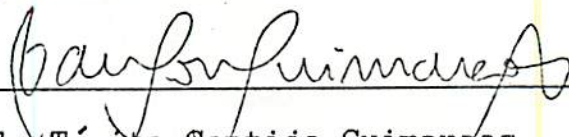
ALTERAÇÕES PROTÉICAS E NUTRICIONAIS
EM TECIDOS DE PLANTAS AFETADAS
PELO DECLÍNIO DOS CITROS

APROVADA: Lavras, 18 de fevereiro de 1993



Maurício de Souza (orientador)

Dr., Professor Titular da ESAL



Paulo Tácito Gontijo Guimaraes

Dr., Pesquisador da EPAMIG



Sérgio Alves de Carvalho

Ms., Pesquisador

Aos meus pais, Jainir Santos Paiva
e Clymar Vilela Paiva, por
acreditarem na educação

OFEREÇO

Aos meus irmãos Edilson, Marcos e Renato
que participaram ativamente da minha
formação.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura de Lavras-ESAL, pela oportunidade de realização do curso.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior-CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo-CNPMS, pelo apoio e facilidades proporcionadas na condução dos experimentos nas suas dependências.

Ao Dr. Maurício de Souza, a quem muito devo pela minha formação científica, pela amizade, orientação, apoio, estímulo e confiança demonstrada.

Ao meu irmão Edilson Paiva, pela orientação e valiosas sugestões apresentadas no decorrer da pesquisa.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação, pelo estímulo e cursos ministrados.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação, em especial Gabriel Dehon Sampaio Peçanha Resende, João Luiz Palma Menegucci, Sérgio Alves de Carvalho, Américo Iório Ciociola Junior, Roger Tadeu Moraes Penido, Rosilene Ferreira Souto e Cláudia Sales Marinho, pelo companherismo, convívio e amizade.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular do CNPMS-EMBRAPA, em especial a Miguel Reis, pela atenção e presteza no atendimento.

A minha sincera gratidão, para com todos que diretamente ou indiretamente colaboraram com a realização deste trabalho.

Enfim, a Deus por tudo!

BIOGRAFIA DO AUTOR.

LUCIANO VILELA PAIVA, filho de Jainir Santos Paiva e Clymar Vilela Paiva, nasceu em Lavras, Estado de Minas Gerais, em 29 de abril de 1967.

Em janeiro de 1985 ingressou na Escola Superior de Agricultura de Lavras, Estado de Minas Gerais, graduando-se em Engenharia Agrônômica em julho de 1990.

Em agosto de 1990 iniciou o Curso de Pós-Graduação em Agronomia a nível de Mestrado, área de concentração Fitotecnia, na Escola Superior de Agricultura de Lavras, Estado de Minas Gerais.

SUMÁRIO.

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. TESTE DE DIAGNÓSTICO DE ABSORÇÃO DE ÁGUA.....	11
2.2. OBSTRUÇÕES DOS VASOS LENHOSOS.....	12
2.3. ALTERAÇÕES MINERAIS NOS TECIDOS.....	12
2.4. ALTERAÇÕES PROTÉICAS.....	13
3. MATERIAL E METODOS	16
3.1. EXPERIMENTO Nº 1: ALTERAÇÕES PROTÉICAS.....	16
3.1.1. EXTRAÇÃO PROTÉICA.....	17
3.1.2. ELETROFORESE.....	18
3.1.3. PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS EXCLUSIVAS DE PLANTAS COM DECLÍNIO DOS CITROS.....	18
3.2. EXPERIMENTO Nº 2: ALTERAÇÕES NUTRICIONAIS.....	19
3.2.1. MÉTODOS.....	20
3.2.1.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	20
3.2.1.2. INSTALAÇÃO E EXECUÇÃO.....	21
3.2.1.3. AVALIAÇÕES.....	24
3.2.1.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	24

4. RESULTADOS.....	25
4.1. EXPERIMENTO N ^o 1 : ALTERAÇÕES PROTÉICAS.....	25
4.1.1. ESTABILIDADE DAS PROTEÍNAS.....	25
4.1.2. DIFERENCIAÇÃO PROTÉICA DE PLANTAS SADIAS E DOENTES.....	27
4.2. EXPERIMENTO N ^o 2 : ALTERAÇÕES NUTRICIONAIS.....	34
4.2.1. ANÁLISE QUALITATIVA DOS SINTOMAS.....	34
4.2.2. TESTE DE ABSORÇÃO DE ÁGUA.....	34
4.2.3. ANÁLISE DO SOLO.....	36
4.2.4. ANÁLISE DE TECIDO.....	36
4.2.4.1. MACRONUTRIENTES.....	36
4.2.4.2. MICRONUTRIENTES.....	40
5. DISCUSSÃO.....	43
5.1. EXPERIMENTO N ^o 1 : ALTERAÇÕES PROTÉICAS.....	43
5.2. EXPERIMENTO N ^o 2 : ALTERAÇÕES NUTRICIONAIS.....	47
6. CONCLUSÕES.....	54
7. RESUMO.....	55
8. SUMMARY.....	57
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
APÊNDICE.....	73

LISTA DE QUADROS.

Quadro

Página

- 1 Valores médios das notas referentes à avaliação qualitativa e os volumes médios de água absorvida pelo método de injeção de água com seringa no tronco de laranjeiras 'Valência' em diferentes estádios do declínio dos citros. ESAL, Lavras-MG. 1993..... 35
- 2 Teores médios dos componentes químicos das amostras de solo superficial coletadas sob laranjeiras 'Valência' sadias e em diferentes estádios do declínio dos citros. ESAL, Lavras-MG. 1993..... 37
- 3 Teores médios, em percentagem, dos nutrientes N, K, Ca, Mg e S na matéria seca da casca do tronco, do lenho do tronco, da casca da raiz, do lenho da raiz e da folha de laranjeiras 'Valência' sadias e com declínio dos citros. ESAL, Lavras-MG. 1993..... 38

- 4 Teores médios, em ppm, dos nutrientes B, Cu, Fe, Mn e Zn na matéria seca da casca do tronco, do lenho do tronco, da casca da raiz, do lenho da raiz e de folhas de laranjeiras 'Valência' sadias e com declínio dos citros. ESAL, Lavras-MG. 1993..... 41
- 5 Padrões para interpretação da fertilidade do solo dos componentes químicos P, K, Ca, Mg, Al e pH..... 52

LISTA DE FIGURAS.

Figuras	Página
1 Gel de poliacrilamida 12,5%, com proteínas extraídas dos vasos lenhosos de raízes de porta-enxertos limoeiro 'Cravo' (colunas 1-3) e de ramos da cultivar copa laranjeira 'Valência', com e sem sintomas de declínio dos citros (colunas 4 a 10), submetidas a eletroforese, após um ano de armazenagem.....	26
2 Gel de poliacrilamida 12,5%, com proteínas de plantas apresentando declínio dos citros, extraídas com o tampão TACM dos vasos lenhosos de ramos (colunas 1 a 6) e de raízes (colunas 7 a 10), não apresentando bandas protéicas distintas.....	28
3 Gel de poliacrilamida 12,5%, com proteínas dos vasos lenhosos de raízes de planta sadia (coluna 2) e doente (coluna 3) provenientes de Bebedouro e de planta sadia (coluna 4) e doente (coluna 5) provenientes de Alfenas; colunas 1 e 6 com marcadores de proteínas com pesos moleculares mostrados à direita.....	29

- 4 Gel de poliacrilamida 12,5%, com proteínas dos vasos lenhosos de raízes de três plantas sadias (colunas 2 a 4) e duas com declínio dos citros (colunas 5 e 6), cujos pesos moleculares ($\times 10^{-3}$) encontram-se à esquerda; colunas 1 e 7 com marcadores de proteínas com seus pesos moleculares mostrados à direita..... 30
- 5 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 com marcadores de proteínas com seus pesos moleculares mostrados à direita..... 32
- 6 Gel de poliacrilamida 12,5%, com proteínas não purificadas dos vasos lenhosos de raízes de uma planta sadia (coluna 2) e uma doente (coluna 3); colunas 4 e 5 com proteínas purificadas, exclusivas de plantas com declínio dos citros e com pesos moleculares mostrados à esquerda ($\times 10^{-3}$); colunas 1 e 6 com marcadores de proteínas com pesos moleculares mostrados à direita..... 33

1. INTRODUÇÃO

O declínio dos citros, uma anormalidade de causa ainda desconhecida, é uma das doenças que mais causa prejuízo à citricultura brasileira (PRATES et alii, 1984 e BERETTA., 1987). Constitui-se em motivo de crescente preocupação de produtores e de pesquisadores.

Esta doença foi detectada no Brasil pela primeira vez em 1970 no estado da Bahia, tendo atingido na década passada todos os estados produtores de citros (PAGUIO et alii, 1983).

Na Flórida, anomalia semelhante 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). No Brasil, apenas no estado de São Paulo, o declínio dos citros já foi responsável pela morte de mais de 10 milhões de árvores (PRATES, 1988).

Devido à gravidade destes problemas em vários países, muitos estudos têm sido feitos.

Apesar de pesquisas intensivas desde 1874, seus tratamentos ainda não foram possíveis, pelo desconhecimento da etiologia e devido ao fato de que as plantas somente mostram sintomas em estágio avançado destas anomalias, quando são irrecuperáveis (CHILDS, 1979 e ROSSETTI et alii, 1984).

Os sintomas 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 ao declínio dos citros.

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 (BRLANSKY & LEE, 1987 e LEE et alii, 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. Processo semelhante visando diminuir a expansão do "blight", têm sido feito por citricultores na Flórida, EUA, através do corte das plantas condenadas e aplicação simultânea de herbicida para matar as raízes (MARAIS, 1990).

O acúmulo de Zn no lenho e o teste de absorção de água através do uso da seringa, são os principais testes padrões de diagnóstico. Servem para distinguir às árvores

afetadas pelo "blight" ou declínio dos citros de outras doenças que também causam o definhamento das plantas cítricas (WUTSHER, 1989). Mas estes testes dão resultados positivos somente quando as plantas já apresentaram os sintomas.

Portanto, o desenvolvimento de um teste que possibilite o diagnóstico do declínio dos citros, antes do aparecimento dos sintomas visuais, é de grande interesse.

O objetivo principal do presente trabalho foi desenvolver um teste sensível de diagnose que permita a detecção precoce de plantas afetadas pelo declínio dos citros. O desenvolvimento deste teste foi baseado na hipótese que o declínio é causado por um microorganismo presente no sistema vascular da planta, o qual poderá ser detectado através de alterações protéicas, utilizando técnicas eletroforéticas e imunológicas.

O objetivo secundário foi de reavaliar a validade do teste de absorção de água com seringa e das alterações nutricionais. É importante ressaltar, que este é o terceiro estudo na linha de pesquisa relativo à detecção do declínio dos citros. Compreende por sua vez um aperfeiçoamento dos anteriores.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Os sintomas típicos do declínio dos citros são o aparecimento de um rápido murchamento parcial ou total da planta, seguido de queda das folhas e dessecamento dos ramos a partir das extremidades. A falta de novas brotações na primavera, permite detectar facilmente as plantas com declínio dos citros, no pomar (RODRIGUES et alii, 1979 e TAVARES, 1987). Quando as folhas já estão completamente desenvolvidas, mostram-se com um verde opaco, sem brilho e comumente exibem sintomas de deficiência de zinco e manganês (BERETTA & ROSSETTI, 1988b). Os frutos geralmente são menores e com menor quantidade de suco. No estágio mais avançado da doença, pode ocorrer uma brotação mais abundante na parte interna da copa e no porta-enxerto. As raízes primárias e secundárias das plantas afetadas pelo declínio dos citros mostram-se normais, exceto em estágio mais avançado, quando o número de radículas é reduzido (LIMA, 1985 e BERETTA & ROSSETTI, 1988b). O ataque no pomar é em reboleira (YOKOMI et alii, 1984 e BERETTA, 1988).

Internamente, o declínio dos citros e o "blight" se caracterizam pelo acúmulo no tronco, acima da região de enxertia, de sais de zinco e fenólicos solúveis em água (WUTSCHER et alii, 1977; ALBRIGO & YOUNG, 1979; ROSSETTI et alii, 1980 e ROSSETTI, 1984); pela baixa absorção de água no tronco, ramo e raízes (COHEN, 1974 ; ROSSETTI et alii, 1980 e LEE et alii, 1984) e pela presença de obstruções amorfas nos vasos do xilema (BRLANSKY et alii, 1985). Os tecidos internos das plantas com declínio dos citros têm sempre um pH mais elevado do que as plantas sadias (ROSSETTI & BERETTA, 1984).

Devido a semelhança dos sintomas, o declínio dos citros tem sido relacionado as anomalias denominadas de "Blight", "Sandhill decline" e "Young tree decline" (COHEN, 1974), que ocorrem no estado norte americano da Florida desde 1874 (SMITH, 1974); "Decline", na Africa do Sul (MARAIS, 1988); "Sudden decline", na Venezuela (OCHOA et alii, 1988); "Marchitamiento repentino", no Uruguai (WUTSCHER et alii, 1980) e de " Declinamiento" ou "Fruta Bolita", na Argentina (MARMELICZ, 1988).

Atualmente existem duas correntes de pesquisadores que trabalham com o declínio dos citros. Uma corrente defende ser a causa um distúrbio fisiológico e a outra defende a hipótese da causa ser patológica.

Vários trabalhos têm sido feitos no sentido de confirmar os aspectos fisiológicos como causadores do declínio dos citros.

Em estudos para avaliar o estado nutricional das laranjeiras 'Valência' com e sem declínio dos citros, verificou-se que os teores de zinco na matéria seca da casca e do tronco, apresentaram-se mais altos nas plantas doentes quando comparadas às plantas sadias (ALERIGO & YOUNG, 1981).

Outro estudo com laranjeira 'Valência', realizado em Minas Gerais, observou-se que os teores de N, K, Mg e Mn na matéria seca foliar foram maiores nas plantas sadias do que naquelas com declínio dos citros (TAVARES, 1987).

Em um levantamento nutricional realizado nos estados da Bahia e São Paulo, foram analisados macro e micronutrientes, na matéria seca foliar. Destes, o N, o P e o K apresentaram teores mais altos nas plantas sadias do que nas doentes, ocorrendo o contrário com Ca, B, Cu e Mn (COELHO et alii, 1983).

Já em outro trabalho de nutrição mineral, foram comparadas plantas sadias com plantas em diferentes estádios do declínio dos citros: Estádio I- plantas com folhas de coloração verde fosco; Est. II- desfolhamento parcial; Est. III- desfolhamento e seca dos ramos ponteiros; Est. IV- desfolhamento abundante. Observou-se que a medida que a doença evolui, aumentaram os teores de N, Mg e B na matéria seca da casca do tronco, os teores de N, Ca, B e Cu na matéria seca do lenho, e os teores de S e B nas folhas, e que decresceram os teores de B e Fe determinados nas amostras de frutos (GIROTO, 1990).

Em trabalhos nos Estados Unidos, comparou-se laranjeiras 'Valência' propagadas a partir de plantas com e sem "blight". Após 12 anos foi impossível distinguir visualmente as plantas e não foram observadas diferenças no tamanho, nas concentrações de Zn no lenho (3 ppm) e na casca (30 e 27 ppm) e de fenólicos solúveis no lenho (3,9 mg/g) (WUTSCHER et alii, 1983).

O tipo de solo e seu preparo, segundo WUTSCHER (1988), influencia a incidência do declínio dos citros, enquanto que FISHER et al. (1984), concluíram que o declínio dos citros não está associado com condições específicas do solo.

Trabalhos em fertilidade do solo realizados em São Paulo (TRANI et alii, 1986) não encontraram relação entre a ocorrência do declínio dos citros e as quantidades de calcário, macro e micronutrientes e matéria orgânica aplicadas.

Deficiências de hormônios reguladores de crescimento endógenos, também têm sido relacionadas com o declínio dos citros, e são apontadas por CASTRO et al. (1992), como uma possibilidade na recuperação de plantas com declínio dos citros, pela aplicação repetida destes reguladores vegetais.

Pelas observações feitas, sabe-se que o declínio dos citros afeta em diferentes graus os principais porta-enxertos e cultivares de copa utilizados comercialmente (BERETTA & ROSSETTI, 1988b).

Levantamentos realizados no estado de São Paulo, indicaram que em porta-enxertos de laranja 'Caipira', tangerineira 'Cleópatra', tangerineira 'Sunki' e tangelo 'Orlando', as plantas não manifestaram sintomas de declínio dos citros e foram consideradas como tolerantes ao mesmo (MULLER et alii, 1982; BERETTA et alii, 1988 e ROSSETTI & BERETTA, 1985). Já na Flórida, a tangerineira Cleópatra é bastante afetada pelo "blight", especialmente quando as árvores são velhas (BERETTA, 1988). O porta-enxerto limoeiro 'Cravo', no qual praticamente toda a citricultura nacional se alicerça, é altamente susceptível ao declínio dos citros (BERETTA & LEFEVRE, 1986; PRATES, 1988 e BERETTA & ROSSETTI, 1990), enquanto que a variedade copa mais afetada é a laranjeira 'Valência' (GUIRADO et alii, 1984 e GIROTO, 1990).

Investigações também, sobre o possível envolvimento de um agente causal para o declínio dos citros têm sido realizados.

Estudos epidemiológicos têm indicado que plantas adjacentes a plantas afetadas, tornam-se mais susceptíveis à doença do que as plantas localizadas a grandes distâncias (YOKOMI et alii, 1984) e que o aumento do número de plantas com declínio dos citros ocorre segundo uma função exponencial do tempo (PRATES et alii, 1987), caracterizando uma doença policíclica.

O declínio dos citros tem muitas características comuns com doenças causadas por raças da Xylella fastidiosa,

bactéria gram negativa limitada ao xilema, como as doenças "Pierce" da videira e "Phony" do pessegueiro (HOPKINS, 1982).

Plantas com menos de 2 anos infectadas com Xylella fastidiosa, desenvolveram alguns sintomas de declínio dos citros (HOPKINS, 1988). No campo, entretanto, árvores novas com menos de 5 anos, não são susceptíveis (SMITH & REITZ, 1977).

Testes tipo ELISA, conseguiram detectar a mesma bactéria no extrato de raízes e ramos de plantas doentes, obtido através de um sistema de vácuo (HOPKINS et alii, 1989).

Com base na microscopia eletrônica de raízes de plantas afetadas, em experimentos de quimioterapia e através da transmissão da doença bacteriana "Pierce" de plantas com declínio dos citros para a videira, sugere-se que esta bactéria ou outras bactérias que estão limitadas ao xilema, sejam o agente causal do declínio dos citros (TIMMER, 1989).

Microorganismos envolvendo várias espécies de nematóides, fungos (ROSSETTI & BERETTA, 1988), micoplasmas e vírus (MARAIS, 1990) foram examinados. O postulado de Koch não se aplicou a nenhum desses microorganismos, que foram excluídos como possíveis agentes causais.

Apesar da causa do declínio dos citros ser ainda desconhecida, existem hipóteses que sugerem a provável participação de vetores na transmissão da doença (BERETTA & LEFEVRE, 1986).

Insetos como cigarrinhas (BERETTA & ROSSETTI, 1988a) comumente presentes em áreas infestadas pelo declínio dos

citros, e afídios como Toxoptera citricidus e Aphis citricola (AGOSTINI, 1988) foram estudados como possíveis transmissores do declínio, porém os resultados obtidos foram negativos.

A transmissão do "blight" através da enxertia de raízes, indica que um agente infeccioso está associado à doença (TUCKER et alii, 1984 e LEE et alii, 1988). Contrário a estes resultados, as tentativas realizadas na transmissão do declínio dos citros através da enxertia de partes aéreas não tiveram êxito (WUTSCHER et alii, 1983). É possível que o agente causal do declínio dos citros esteja limitado às raízes ou se encontre nestas em maior concentração do que nas partes aéreas.

Visto que a causa do declínio dos citros ainda permanece desconhecida, não há medidas de prevenção disponíveis para a doença.

Várias tentativas de recuperação das plantas afetadas foram realizadas. Na Flórida, as plantas afetadas não responderam aos tratamentos de injeção no tronco e à aplicação nas raízes, do antibiótico tetraciclina (TIMMER et alii, 1981). No Brasil, injeção em troncos de plantas afetadas por declínio dos citros com solução diluída de ácido cítrico, baixou ligeiramente o pH do lenho, mas não recuperou as plantas (ROSSETTI & BERETTA, 1984).

Outros tratamentos, como afrancamento com poda drástica da copa (BERETTA & ROSSETTI, 1988b); a sub-enxertia (ROSSETTI et alii, 1984); o uso de reguladores de crescimento

(PRATES et alii, 1983); a aplicação de escória, produto rico em silício, cálcio e magnésio (BERETTA & ROSSETTI, 1988) e dos pesticidas Aldicarb e Carbofuram (citado por MULLER et alii, 1982), também não tiveram êxito na recuperação total das plantas.

Trabalhos realizados, mostraram que os sintomas do declínio dos citros são irreversíveis na natureza (GUIRADO et alii, 1984 e BERETTA et alii, 1987).

Sintomas visuais semelhantes ao declínio dos citros podem ser induzidos por outras causas, como o dano causado por déficit hídrico, "foot rot", "Rio grande gummosis", nematóides, o viróide da exocorte e os vírus da tristeza e da xiloporose, dificultando a sua identificação (COHEN, 1974 e LEE et alii, 1984).

Além dos sintomas visuais, alguns testes foram estabelecidos, para distinguir-se árvores afetadas por declínio dos citros de outras anomalias que também causam o definhamento das plantas cítricas. Os principais testes são o teste de diagnóstico de absorção de água, as obstruções dos vasos lenhosos, as alterações minerais nos tecidos e as alterações protéicas.

2.1. Teste de diagnóstico de absorção de água

O método de injeção por gravidade para medir a absorção de água em troncos de árvores, foi desenvolvido por

COHEN (1974). Este método foi simplificado e melhorado posteriormente através do uso de seringa (GUIRADO et alii, 1984 e LEE et alii, 1984). As plantas com declínio dos citros apresentam reduzida ou nula absorção de água no tronco, ramos e raízes. Elas absorvem menos do que 50 ml/24hs pelo método de injeção de água por gravidade e menos do que 0,3 ml/seg. através do método de injeção de água pela seringa (LEE et alii, 1984).

2.2. Obstruções dos vasos lenhosos

Plantas com declínio dos citros possuem obstruções amorfas e filamentosas nos vasos do xilema, que causam uma redução na translocação hídrica nos seus tecidos. As obstruções amorfas têm sido encontradas somente em árvores depauperadas devido ao declínio, enquanto que as filamentosas estão presentes em árvores cítricas afetadas por outras doenças, e também em árvores sadias, porém em menor número (BERETTA, 1988).

2.3. Alterações minerais nos tecidos

O acúmulo de zinco no lenho é também um dos testes padrões utilizados para diagnosticar o declínio dos citros, distinguindo-o de outras doenças (WUTSCHER et alii, 1977). O motivo deste acúmulo com o desenvolvimento da doença é ainda desconhecido. Plantas consideradas afetadas pelo declínio dos citros possuem mais de 3,0 ug de Zn/g de lenho

(LEE et alii, 1984). O acúmulo de zinco, ocorre antes da formação das obstruções nos vasos e do desenvolvimento dos sintomas nas folhas, sendo considerado portanto, como um dos primeiros sinais para que uma planta esteja infectada (MARAIS, 1990).

A desvantagem da utilização destes testes padrões estabelecidos para a confirmação de ocorrência do declínio dos citros, é que eles são empregados somente para plantas com sintomas já visíveis.

2.4. Alterações protéicas.

O estudo de macromoléculas, principalmente as proteínas, têm sido empregado com sucesso na caracterização, purificação e diagnose de microorganismos através de técnicas de biologia molecular como eletroforese, imunodifusão e imunoeletroforese (OUCHTERLONY & NILSSON, 1967 e NOWOTNY, 1979).

Técnicas eletroforéticas em géis de acrilamida e amido permitem a separação de proteínas através de seu peso molecular ou carga elétrica, produzindo padrões proteicos que podem ser visualizados e utilizados como verdadeiras impressões digitais (PAIVA et alii, 1991). Como as proteínas são produto direto do código genético, pequenas diferenças entre padrões proteicos servem para separar raças fisiológicas de microorganismos baseando-se em pequenas diferenças em suas macromoléculas.

Anticorpos produzidos contra proteínas específicas servem como poderosas sondas biológicas para testes imunológicos de caracterização e de diagnose como "Enzyme Linked Immunsorbent Assay" (ELISA) e imunoeletroforese (reação anticorpo X antígeno em uma matriz gelatinosa) que permitem detectar, quantificar e visualizar pequenas diferenças entre moléculas (CLARK & ADAMS, 1977 e NOWOTNY, 1979), possibilitando um diagnóstico precoce de doenças.

Recentemente pesquisadores da Flórida, identificaram sete proteínas presentes no extrato do xilema de raízes de plantas doentes, que foram associadas com o "blight". Tais proteínas não estão presentes nos extratos de raízes de plantas saudáveis, ou estão nestas em menor concentração (DERRICK et alii, 1990). Nenhuma destas macromoléculas foram encontradas em plantas afetadas por outras doenças (O'REILLY, 1990), sendo portanto exclusivas de plantas com declínio.

Em plantas jovens, que foram enxertadas com raízes de plantas afetadas pelo "blight", observou-se a presença de proteínas específicas para a doença, o que sugere que elas também podem ser infectadas.

Estas proteínas exclusivas de plantas com "blight", presentes no extrato do xilema de raízes de plantas doentes, têm sido utilizadas com sucesso no diagnóstico de plantas pré-sintomáticas (DERRICK et alii, 1991)

Proteínas isoladas do extrato de folhas de plantas doentes, também permitiram o diagnóstico de laranjeiras

como sendo sadias ou doentes, em três regiões diferentes da Flórida, através do sistema "western blot" (BAUSHER & SWEENEY, 1991).

O sistema "western blot", diagnosticou plantas com "blight" antes do desenvolvimento do acúmulo de Zn no lenho e do estresse de água, mostrando-se ser até o momento, o teste mais precoce e preciso para o diagnóstico do "blight".

3. MATERIAL E MÉTODOS.

3.1. Experimento no 1: Alterações protéicas

As técnicas eletroforéticas foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular, do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo (CNPMS-EMBRAPA).

Os materiais de ramos e raízes de citros utilizados foram obtidos de pomares comerciais, situados nos municípios de Bebedouro, estado de São Paulo e de Alfenas, estado de Minas Gerais. As amostras de raízes e ramos foram coletadas de laranjeiras [*Citrus sinensis* (L) Osbeck cv. Valência], enxertadas no limoeiro (*Citrus limonia* Osbeck cv. Cravo).

Para distinguir plantas sadias e afetadas pelo declínio dos citros, utilizou-se do método de injeção de água com seringa no tronco sob pressão (LEE et alii, 1984).

Coletou-se amostras com 1 a 2 cm de diâmetro de plantas sadias e com declínio, que foram parafinadas nas

extremidades, embaladas em papel umidecido e colocadas em caixa de isopor para transporte. No laboratório manteve-se as amostras na geladeira, até a extração das proteínas, que se deu no máximo até três dias após a colheita.

3.1.1. Extração protéica

Para a extração das proteínas, as amostras de raízes e ramos foram cortadas com aproximadamente 10 cm de comprimento e a casca de suas extremidades removidas. As extrações se deram com o tampão de extração de proteínas PBS, pH 7,4 (0,8% NaCl; 0,02% KH_2PO_4 ; 0,29% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; 0,02% KCl), acrescido de 1% betamercaptoetanol^(a). Em um quitasaco adaptado e através de uma bomba de vácuo, passou-se 400 ul do tampão PBS, nos vasos lenhosos de cada amostra.

Para minimizar uma possível degradação das proteínas a extração foi feita com o quitasaco mantido dentro de gelo moído e após a extração, o extrato foi congelado a -20°C e liofilizado.

(a) Conforme metodologia utilizada no laboratório da EMBRAPA-CNPMS, para extrações protéicas.

3.1.2. Eletroforese

A eletroforese foi feita em géis de sódio dodecil sulfato-poliacrilamida gel (SDS-PAGE), com 12,5% de acrilamida e com 1,5 mm de espessura, em sistema descontínuo (LAMMELI, 1970). As géis foram submetidas a aplicação de carga elétrica de 12 mA durante a sobre-gel e em seguida a 24 mA até o final da gel.

A visualização dos padrões protéicos nas géis foi obtida através da coloração das mesmas com o corante "Coomassie Blue R-250".

Os pesos moleculares foram estimados pela comparação com padrões proteicos de proteínas de pesos moleculares conhecidos: Bovino albumina (66 KD), Ovoalbumina (45 KD), Gliceraldeído 3-fosfato dehidrogenase (36 KD), Anidrase carbônica (29 KD), Tripsinogênio (24 KD), Inibidor de Tripsina da soja (20,1 KD) e a Lactalbumina (14,2 KD).

3.1.3. Purificação das proteínas exclusivas de plantas com declínio dos citros.

A purificação das proteínas exclusivas da doença foi feita conforme o protocolo descrito pela IBI (International Biotechnologies, 1986/87), para o modelo Unidirecional Electroeluter Analytical (UEA). A eletroeluição

unidirecional se deu em tampão 0,025 M Tris + 0,192 M glicina + 0,1% SDS, para tampão de alta salinidade (5,8 g NH_4OAc + 0,01% de Azul de Bromofenol), a 125 Volts por 35' e 45'. O material recuperado foi dializado em tampão PBS (pH 7,4) durante uma noite e centrifugado a 10.000 rpm/15'. O pelete contendo as proteínas foi ressuspenso em 125 ul de PBS (pH 7,4) e armazenado a -20°C .

3.2 Experimento nº 2: Alterações nutricionais

O experimento foi conduzido em um pomar comercial no município de Bebedouro, estado de São Paulo. Bebedouro está situada a uma altitude de 600 m em relação ao nível do mar, com pluviosidade média de 1500 mm anuais.

As plantas utilizadas foram laranjeiras [Citrus sinensis (L.) Osbeck cv. Valência], enxertadas no limoeiro (Citrus limonia Osbeck cv. Cravo).

As árvores tinham aproximadamente 15 a 16 anos de idade, encontravam-se em um talhão de 24,74 hectares com 5500 plantas, espaçadas a 9x5 metros e com índice de declínio dos citros em torno de 20 a 30%.

O solo do pomar é um Podzólico Vermelho Amarelo Latossolizado.

3.2.1. Métodos

3.2.1.1. Delineamento experimental

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado em esquema de parcela subdividida, com 6 repetições, onde os estádios do declínio dos citros constituíram os níveis do fator de parcela e os locais de amostragem os de subparcela. A parcela experimental foi constituída de uma única planta. Os tratamentos foram as combinações de 4 estádios do declínio dos citros (plantas sadias, plantas no início, no meio e no final da doença) com 5 tipos de amostragem de tecidos da planta (casca do tronco, lenho do tronco, casca da raiz, lenho da raiz e folha), totalizando 20 tratamentos.

A caracterização dos estádios do declínio dos citros através da diagnose visual, foi realizada segundo metodologia similar à descrita por TAVARES, (1987):

Estádio 0 (sadia): testemunha;

Estádio I (início do declínio dos citros):
plantas isentas de brotações novas e folhas com coloração verde fosco;

Estádio II (médio do declínio dos citros):
plantas isentas de brotações novas, folhas com coloração verde fosco, desfolhamento e seca dos ramos ponteiros;

Estádio III (final do declínio dos citros):
plantas isentas de brotações novas, exceto no interior das

pernadas, folhas com coloração verde fosco, desfolhamento abundante, seca severa dos galhos na copa da planta.

A caracterização das amostras de tecidos da planta foi realizada de acordo com a metodologia citada por ALBRIGO & YOUNG, (1979) e EMBLETON et alii, (1973), excetuando-se para a amostragem de raízes onde não se encontrou nenhuma citação.

Amostra I: semi-anel do tronco com cerca de 15 cm de comprimento, 10 cm de largura, acima da região de enxertia e livre de qualquer dano.

Amostra II: porções do lenho com aproximadamente 12 cm de comprimento, 3 a 7 cm de largura e cerca de 3 cm de espessura, acima da região da enxertia.

Amostra III: semi-anel da raiz, com cerca de 10 cm de comprimento, 2 cm de largura, isento de qualquer tipo de dano.

Amostra IV: porções do lenho de raiz, com aproximadamente 3 cm de comprimento e 2 cm de largura, localizada a mais ou menos 10 cm de profundidade.

Amostra V: quarenta folhas de tamanho normal, pecioladas, com 4 a 7 meses de idade e isentas de danos.

3.2.1.2. Instalação e execução

Primeiramente, as plantas foram selecionadas através de diagnose visual e submetidas à avaliação qualitativa

dos estádios do declínio dos citros por cinco juizes devidamente treinados para este fim, que atribuíram pontuações de zero a seis, de acordo com a caracterização previamente estabelecida para cada estádio.

As plantas selecionadas para o estudo encontravam-se aparentemente isentas de outros problemas fitossanitários.

O critério de diagnóstico para distinguir plantas sadias e afetadas pelo declínio dos citros, foi o mesmo utilizado por LEE et al. (1984), pelo método de injeção de água com seringa no tronco sob pressão, fundamentado em uma característica distinta do declínio dos citros que é a presença de obstruções amorfas nos vasos do xilema (COHEN, 1974).

A coleta das amostras de tecidos das plantas foi realizada em uma única operação em março de 1991.

A amostragem da casca do caule foi efetuada retirando da laranjeira, a uma altura de 10 a 15 cm acima da região do conectivo, um semi-anel com cerca de 10 cm de largura. A metodologia utilizada foi a mesma descrita por ALBRIGO & YOUNG (1979).

A amostragem do lenho do caule foi realizada à mesma altura de amostragem para casca, ou seja, 10 a 15 cm acima do conectivo. Para tanto utilizou-se um macete e um formão que colocado na posição inclinada em relação ao tronco permitiu a obtenção das amostras. A metodologia utilizada baseou-se no critério de amostragem usado por WUTSCHER et al. (1977).

As raízes foram obtidas a partir de escarificações, localizando-se raízes a mais ou menos 10 cm de profundidade, a uma distância de 50 cm do tronco. Cada repetição foi constituída por 4 pontos de amostragem localizados cada um em um quadrante diferente.

A amostragem de casca de raiz foi efetuada, retirando um semi-anel com cerca de 2 cm de largura, compreendendo metade da circunferência da raiz.

As raízes das quais foram retiradas amostras de casca, foram as mesmas utilizadas para amostragem do lenho. As amostras foram obtidas, utilizando-se um macete e um formão. A literatura existente não faz referência a uma metodologia para amostragem de raízes para determinação de nutrientes.

As amostras foliares foram constituídas de 40 folhas/planta, de tamanho normal, com pecíolo, isentas de danos causados por pragas e doenças, retiradas da parte mediana de ramos terminais sem fruto, a aproximadamente 1,50 m de altura, em toda a circunferência da copa. Estas folhas foram do surto primaveril e tinham aproximadamente 7 meses de idade, conforme metodologia sugerida por EMBLETON et al. (1973).

As amostras simples do solo superficial foram retiradas a profundidade de 0 a 20 cm em quatro pontos situados no limite da projeção ortogonal da copa de cada planta. Estas amostras foram homogeneizadas para formar uma amostra composta, representativa de cada parcela.

3.2.1.3. Avaliações

As análises de tecidos da matéria seca de casca, lenho e folha, foram realizadas no Laboratório de Análises de Tecidos do Departamento de Solos da ESAL. As amostras foram secas em estufa a 60°C até atingirem peso constante; posteriormente foram moídas em moinho do tipo Willey e submetidas à determinação do N pelo método Kjeldall; do P por colorimetria com molibdato e vanadato de amônio; K por fotometria de chama; Ca, Mg, Cu, Fe, Mn e Zn por espectrofotometria de absorção atômica; B por colorimetria com curcumina e do S pelo método turbidimétrico, de acordo com a metodologia descrita por SARRUGE & HAAG, (1974).

Para a avaliação dos solos, foram determinados os teores de P, K, Ca, Mg e Al, bem como a reação (pH), segundo os métodos analíticos descritos por VETTORI, (1969).

3.2.1.4. Análise estatística

Os dados experimentais foram submetidos à análise estatística baseada em modelos apropriados para o delineamento inteiramente casualizado.

Todos os dados foram submetidos à análise de variância, utilizando-se níveis de significância de 1% e 5% para o teste F.

4- RESULTADOS

4.1. Experimento nº 1- Alterações protéicas

4.1.1. Estabilidade das proteínas

A cultivar fornecedora das raízes foi o limoeiro 'Cravo', enquanto que a dos ramos foi a laranjeira 'Valência'.

As proteínas presentes nos extratos obtidos dos vasos lenhosos dos ramos e raízes de plantas saudias e com declínio dos citros, após um ano de armazenagem, não apresentaram degradação protéica. Como pode-se observar na Figura 1, houve formação de bandas protéicas bem distintas em cada extrato submetido à eletroforese.

É importante ressaltar que estes extratos foram obtidos com o tampão de extração de proteínas PBS na presença de gelo moído e mantidos a -20°C , após a liofilização.

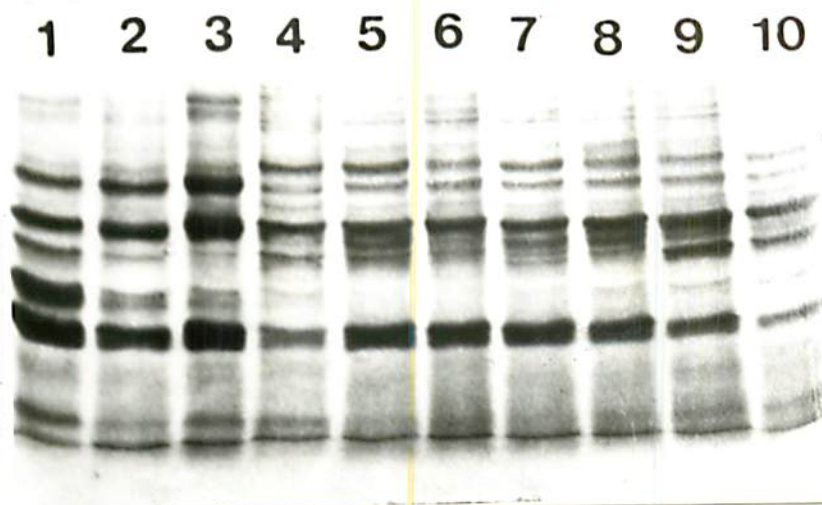


Figura 1- Gel de poliacrilamida 12,5%, com proteínas extraídas dos vasos lenhosos de raízes de porta-enxertos limoeiro 'Cravo' (colunas 1 a 3) e de ramos da cultivar copa laranjeira 'Valência', com e sem sintomas de declínio dos citros (colunas 4 a 10), submetidas a eletroforese, após um ano de armazenagem.

As proteínas presentes em plantas com declínio dos citros quando extraídas com o tampão TACM (DERRICK et alii, 1990), não mostraram-se estáveis. Como se verifica na Figura 2, não houve formação de bandas protéicas distintas nos extratos submetidos a eletroforese após armazenagem, utilizando-se esta metodologia para extração.

4.1.2. Diferenciação protéica de plantas sadias e doentes

Os perfis protéicos das amostras de raízes de plantas sadias e doentes, provenientes dos municípios de Bebedouro (SP) e Alfenas (MG) encontram-se na Figura 3. Verifica-se que não há diferença entre as bandas protéicas nos extratos das plantas sadias (colunas 2 a 4) dos dois locais, como também entre as plantas com declínio dos citros (colunas 3 e 5), quando comparadas entre si.

A diferenciação entre plantas sadias e com declínio dos citros através dos seus perfis proteicos, se observa na Figura 4. Pode-se visualizar três bandas protéicas bem características, presentes nos extratos dos vasos lenhosos de raízes de três plantas sadias (coluna 2 a 4) e cinco bandas protéicas no extrato de duas plantas com declínio dos citros (colunas 5 a 6). Estas bandas, visualizadas de cima para baixo, quando comparadas com os marcadores de pesos moleculares (colunas 1 e 7), apresentam pesos moleculares de aproximadamente



Figura 2- Gel de poliacrilamida 12,5%, com proteínas de plantas apresentando declínio dos citros extraídas com o tampão TACM dos vasos lenhosos de ramos (colunas 1 a 6) e de raízes (colunas 7 a 10), não apresentando bandas protéicas distintas.

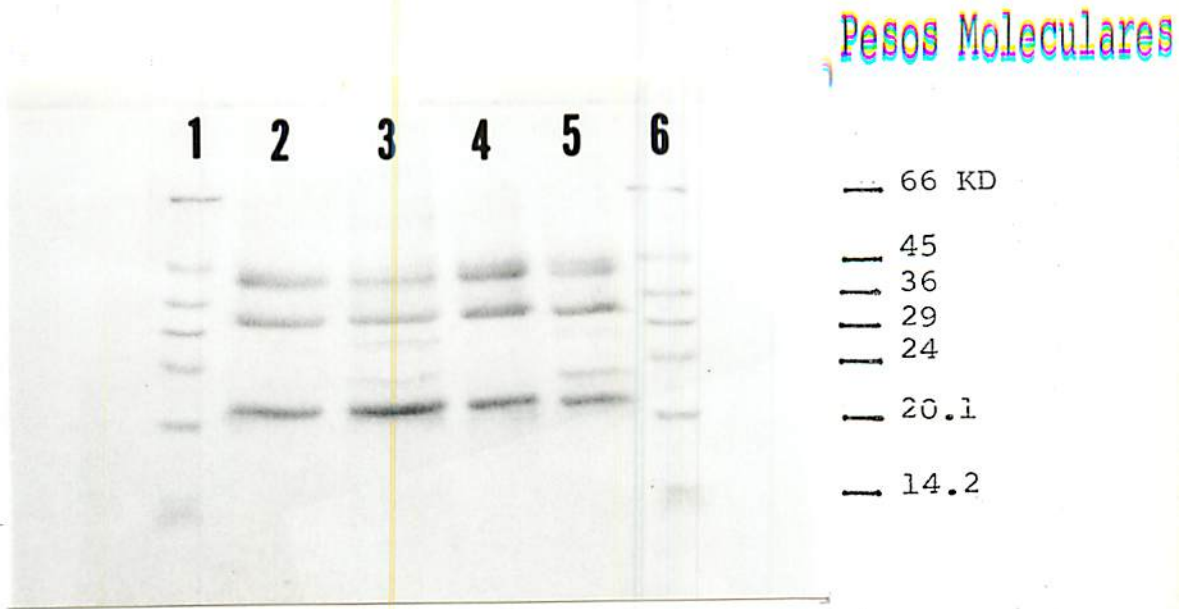


Figura 3- Gel de poliacrilamida 12,5%, com proteínas dos vasos lenhosos de raízes de planta sadia (coluna 2) e doente (coluna 3) provenientes de Bebedouro e de planta sadia (coluna 4) e doente (coluna 5) provenientes de Alfenas; colunas 1 e 6 com marcadores de proteínas com seus pesos moleculares mostrados à direita.

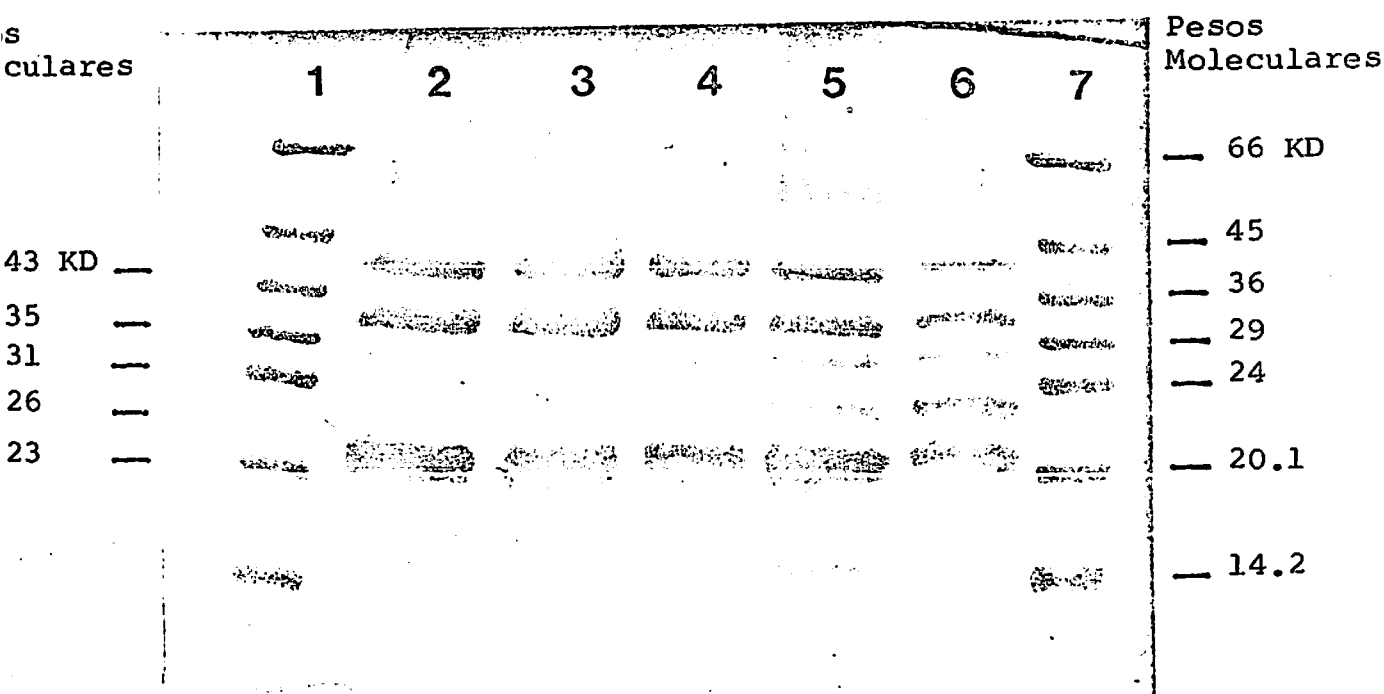


Figura 4- Gel de poliacrilamida 12,5%, com proteínas dos vasos lenhosos de raízes de três plantas saudáveis (colunas 2 a 4) e duas com declínio dos citros (colunas 5 e 6), cujos pesos moleculares ($\times 10^{-3}$) encontram-se à esquerda; colunas 1 e 7 com marcadores de proteínas com seus pesos moleculares mostrados à direita.

43, 35, 31, 26 e 23 KD respectivamente. As proteínas 43, 35 e 23 KD estão presentes tanto no extrato de plantas saudias, como no de plantas com declínio dos citros, enquanto que as proteínas 31 e 26 KD encontram-se somente no extrato de plantas doentes. Estas proteínas são consideradas exclusivas de plantas com declínio dos citros. Contrário a estes resultados, as tentativas realizadas para se diferenciar plantas saudias de doentes, através das proteínas presentes nos vasos lenhosos de ramos, não tiveram êxito, como é mostrado na Figura 5. Observa-se que não há presença, bem característica, de proteínas específicas do declínio dos citros nos extratos de caule das plantas doentes.

As proteínas 31 e 26 KD, presentes nos extratos de raízes e que são exclusivas de plantas com declínio dos citros, foram posteriormente purificadas e podem ser visualizadas na Figura 6 (colunas 4 e 5).

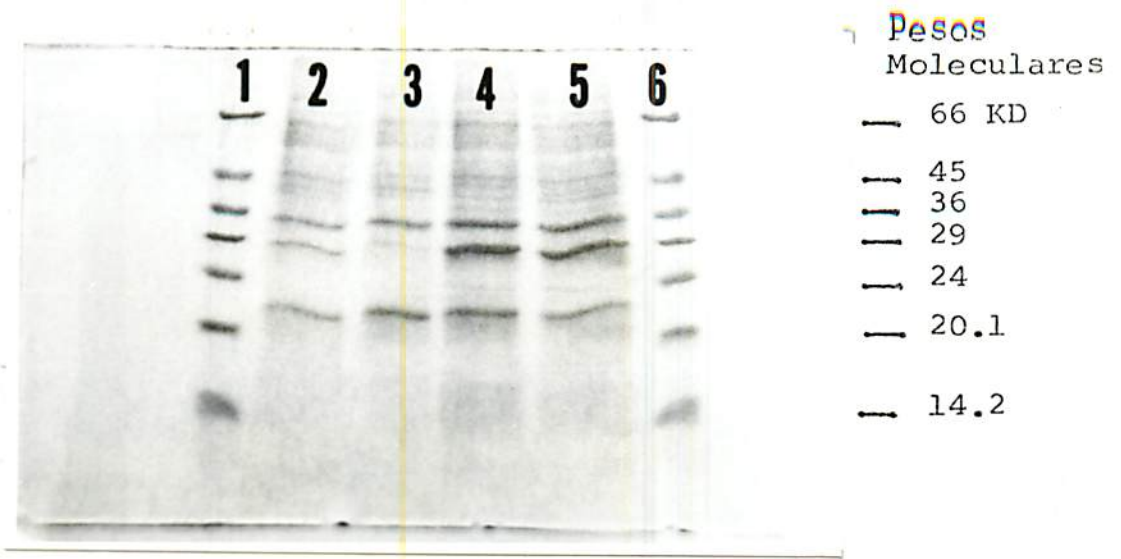


Figura 5- Gel de poliacrilamida 12,5%, com proteínas dos vasos lenhosos de ramos de duas plantas saudáveis (colunas 2 e 3) e duas com declínio dos citros (colunas 4 e 5); colunas 1 e 6 com marcadores de proteínas com seus pesos moleculares mostrados à direita.

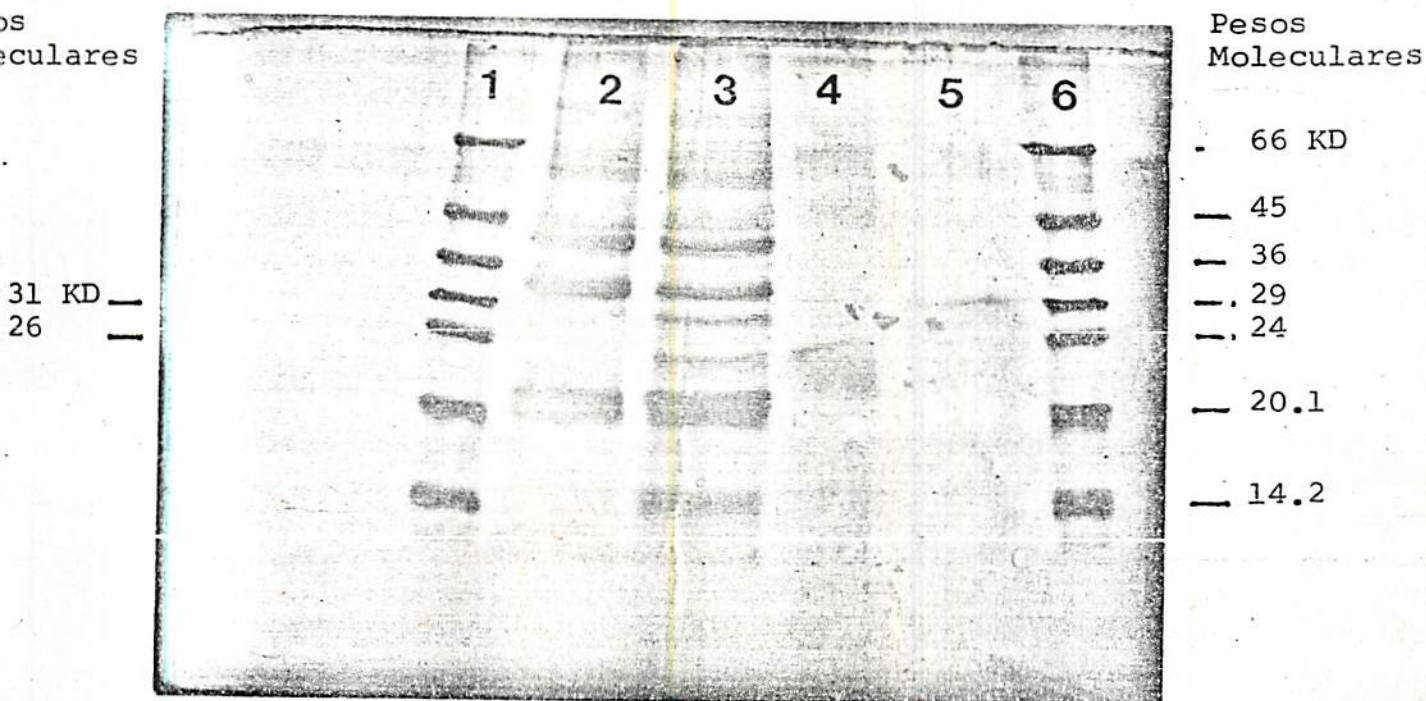


Figura 6- Gel de poliacrilamida 12,5%, com proteínas não purificadas dos vasos lenhosos de raízes de uma planta sadia (coluna 2) e uma doente (coluna 3); colunas 4 e 5 com proteínas purificadas, exclusivas de plantas com declínio dos citros e com pesos moleculares mostrados à esquerda ($\times 10^{-3}$); colunas 1 e 6 com marcadores de proteínas com seus pesos moleculares mostrados à direita.

4.2. Experimento nº 2 - Alterações nutricionais

4.2.1. Análise qualitativa dos sintomas

A avaliação qualitativa dos sintomas nos diferentes estádios do declínio dos citros em laranjeiras 'Valência', feita por cinco juizes é apresentada no Quadro 1.

A avaliação mostrou-se eficiente, caracterizando efeito significativo entre os tratamentos.

As médias dos tratamentos quando comparadas entre si, apresentaram valores menores para plantas sadias, aumentando a medida que a doença evolui.

4.2.2. Teste de absorção de água

Para o teste, as plantas foram submetidas a absorção de água através de uma seringa. Plantas que absorveram menos de 10 ml de água durante 20", foram consideradas doentes.

Os volumes de água absorvidos pelas plantas nos diferentes estádios do declínio dos citros, são mostrados no Quadro 1. Houve diferenças significativas entre as plantas sadias e as com declínio dos citros.

QUADRO 1- Valores médios das notas referentes à avaliação qualitativa e os volumes médios de água absorvida pelo método de injeção de água com seringa no tronco de laranjeiras 'Valência' em diferentes estádios do declínio dos citros. ESAL, Lavras-MG. 1993.

Estádio	Notas médias	Volumes médios de água absorvida (ml)
SADIA	0,00 a	10,00 a
Est. I	0,73 b	3,31 b
Est. II	3,14 c	0,40 c
Est. III	4,69 d	0,22 c

As médias seguidas de letra diferente na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Quando as médias foram comparadas entre si, observou-se que a absorção foi total nas plantas sadias, seguidas pelas plantas no estágio inicial (Est. I) com absorção intermediária e pelos demais estádios (Est. II e Est. III), nos quais praticamente a absorção foi nula.

O teste não detectou diferença entre as plantas nos estádios médio (Est. II) e final (Est. III) da doença.

4.2.3. Análise do Solo

Os teores médios dos componentes químicos das amostras de solos coletadas sob laranjeiras 'Valência' sadias e em diferentes estádios do declínio dos citros, estão apresentados no Quadro 2.

Para o nutriente P, houve efeito altamente significativo entre os estádios, sendo o maior teor determinado nos solos sob plantas no estágio final da doença (Est. III). Houve uma tendência do teor ser menor sob plantas sadias.

Para K, Ca, Mg, Al e pH não houve diferenças significativas entre os seus teores nas amostras de solos sob plantas sadias e sob plantas nos diferentes estádios da doença, embora haja uma tendência dos teores de K, Ca e Mg serem maiores com o avanço da doença.

4.2.4. Análise de tecido

4.2.4.1. Macronutrientes

Os resultados referentes aos teores de N, K, Ca, Mg e S, presentes na matéria seca de plantas sadias e com declínio dos citros, nos diferentes locais amostrados, encontram-se no Quadro 3.

QUADRO 2 - Teores médios dos componentes químicos das amostras de solo superficial coletadas sob laranjeiras 'Valência' sadias e em diferentes estádios do declínio dos citros. ESAL, Lavras-MG. 1993.

Tratamento	P (ppm)	K (ppm)	Ca (mE/100cc)	Mg (mE/100cc)	Al (mE/100cc)	pH (mE/100cc)
Sadia	12,000 b	71,000 a	1,483 a	0,750 a	0,133 a	5,833 a
Est.I	14,000 b	83,666 a	1,583 a	0,783 a	0,166 a	5,949 a
Est.II	13,666 b	84,666 a	1,650 a	0,900 a	0,116 a	5,866 a
Est.III	20,500 a	84,666 a	1,750 a	0,900 a	0,133 a	6,016 a

As médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste Tukey à 5% de probabilidade.

O teor médio, em percentagem, do nutriente P, nos estádios sadia, início, médio e final da doença foi de 0,101; 0,078; 0,075 e 0,089, respectivamente. Não verificou-se variações entre os diferentes estádios. Já o teor médio, em percentagem, do nutriente P, na matéria seca da casca do tronco, do lenho do tronco, da casca da raiz, do lenho da raiz e da folha foi de 0,060; 0,058; 0,100; 0,050 e 0,163 respectivamente. O maior teor foi encontrado na folha, não havendo diferença para os demais locais amostrados.

Para os teores de N, K, Mg e S determinados na casca do tronco, os valores médios mostraram diferenças

QUADRO 3- Teores médios, em percentagem, dos nutrientes N, K, Ca, Mg e S na matéria seca da casca do tronco, do lenho do tronco, da casca da raiz, do lenho da raiz e da folha de laranjeiras 'Valência' sadias e com declínio dos citros. ESAL, Lavras-MG. 1993.

NUTRIENTE	ESTADIO	Locais de amostragem				
		CASCA/ TRONCO	LENHO/ TRONCO	CASCA/ RAIZ	LENHO/ RAIZ	FOLHA
N (%)	SADIA	1,433 c	0,533 b	1,921 b	0,640 a	2,890 a
	Est.I	1,610 bc	0,533 b	2,340 a	0,613 a	2,851 a
	Est.II	1,720 b	0,636 ab	2,506 a	0,603 a	2,695 a
	Est.III	2,023 a	0,806 a	2,590 a	0,510 a	2,673 a
K (%)	SADIA	0,433 b	0,265 a	0,755 b	0,191 a	1,876 a
	Est.I	0,536 ab	0,271 a	1,141 a	0,250 a	1,235 b
	Est.II	0,651 ab	0,285 a	1,260 a	0,306 a	0,980 b
	Est.III	0,776 a	0,331 a	1,115 a	0,271 a	1,093 b
Ca (%)	SADIA	5,220 a	0,801 a	5,205 a	0,513 a	2,976 a
	Est.I	5,228 a	0,741 a	4,103 b	0,400 a	3,075 a
	Est.II	5,303 a	0,903 a	5,030 a	0,391 a	3,238 a
	Est.III	5,656 a	0,883 a	4,076 b	0,275 a	3,666 a
Mg (%)	SADIA	0,161 b	0,100 a	0,145 ab	0,088 a	0,480 a
	Est.I	0,206 ab	0,096 a	0,168 a	0,073 a	0,485 a
	Est.II	0,206 ab	0,098 a	0,150 ab	0,066 a	0,436 a
	Est.III	0,250 a	0,103 a	0,105 b	0,040 a	0,433 a
S (%)	SADIA	0,105 b	0,030 a	0,245 b	0,051 a	0,321 b
	Est.I	0,108 b	0,030 a	0,231 b	0,041 a	0,330 b
	Est.II	0,116 b	0,033 a	0,283 a	0,053 a	0,320 b
	Est.III	0,146 a	0,040 a	0,291 a	0,043 a	0,386 a

As médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

significativas, ocorrendo para estes nutrientes um aumento dos seus teores a medida que a doença evolui.

Na matéria seca do lenho do tronco, apenas o N diferiu significativamente nos diferentes estádios. Observou-se um aumento do seu teor com o avanço da doença.

Na casca da raiz foram encontradas diferenças significativas para as médias dos teores de N, K, Ca, Mg e S. Para o N, houve aumento dos teores com o aumento da doença. No caso do K os maiores teores foram encontrados nas plantas com declínio dos citros (Est. I, Est. II e Est. III) e o menor nas plantas sadias. Para o Ca, os maiores teores foram determinados nas plantas sadias e no estágio médio da doença (Est. II) e os menores nos estádios inicial (Est. I) e final (Est. III). Para o Mg, as maiores médias foram verificadas no estágio inicial (Est. I), seguidas pelos estádios sadia e médio (Est. II) com valores intermediários e pelo estágio final (Est. III) com os menores valores. Para o S, as plantas nos estádios médios (Est. II) e final (Est. III) do declínio dos citros, apresentaram os maiores teores e as plantas sadias e no estágio inicial (Est. I) os menores teores.

Na matéria seca do lenho da raiz não foram observadas diferenças entre as médias dos vários estádios para os macronutrientes, embora tenha havido uma tendência para os teores de N, Ca e Mg diminuírem com o avanço da doença.

Em relação às amostras foliares, verificou-se diferenças significativas entre as médias dos diferentes estádios, para os teores de K e S. No caso do K, o maior teor foi obtido nas plantas sadias, seguido pelas plantas com declínio dos citros, não se observando diferenças entre os estádios. Os teores médios de S foram maiores para plantas no final da doença (Est. III) e menores para os demais estádios (Sadia, Est. I e Est. II), onde não foram observadas diferenças.

4.2.4.2. Micronutrientes

Os resultados da análise dos teores dos micronutrientes, presentes na matéria seca dos cinco locais de amostragem, nos diferentes estádios do declínio dos citros, encontram-se no Quadro 4.

Na casca do tronco, para os teores de Cu, Fe e Zn, os valores médios mostraram diferenças significativas, sendo que para os nutrientes Cu e Zn, os teores aumentaram com o avanço da doença. No caso do Fe o maior teor foi determinado nas plantas no estágio final (Est. III) da doença, seguido pelos estádios inicial (Est. I) e médio (Est. II) com teores intermediários e finalmente nas plantas sadias com os menores teores.

Para a matéria seca do lenho do tronco, não houve diferenças significativas entre os diferentes estádios para os micronutrientes, embora tenha havido uma tendência para

QUADRO 4- Teores médios, em ppm, dos nutrientes B, Cu, Fe, Mn e Zn na matéria seca da casca do tronco, do lenho do tronco, da casca da raiz, do lenho da raiz e de folhas de laranjeiras 'Valência' sadias e com declínio dos citros. ESAL, Lavras-MG. 1993.

Nutriente	Estadio	Locais de amostragem				
		Casca/ tronco	Lenho/ tronco	Casca/ raiz	Lenho/ raiz	Folha
B (ppm)	SADIA	29,596 a	12,245 a	36,956 a	9,291 a	44,471 b
	Est.I	28,308 a	11,618 a	29,178 ab	6,730 a	52,040 ab
	Est.II	34,131 a	12,331 a	27,225 b	10,430 a	57,899 a
	Est.III	25,895 a	12,836 a	36,398 ab	10,571 a	51,193 ab
Cu (ppm)	SADIA	34,748 c	11,390 a	15,593 a	11,103 a	28,228 b
	Est.I	39,201 bc	8,803 a	12,790 a	7,438 a	27,511 b
	Est.II	50,686 ab	8,943 a	15,233 a	9,270 a	46,133 a
	Est.III	63,593 a	10,310 a	24,253 a	8,265 a	52,414 a
Fe (ppm)	SADIA	121,403 b	100,791 a	363,885 a	84,081 a	133,436 a
	Est.I	169,773 ab	92,526 a	322,211 a	79,231 a	145,125 a
	Est.II	156,301 ab	90,694 a	206,185 b	92,778 a	148,208 a
	Est.III	185,738 a	80,824 a	327,924 a	65,471 a	184,148 a
Mn (ppm)	SADIA	23,900 a	5,820 a	33,093 a	4,921 a	89,193 b
	Est.I	19,180 a	6,108 a	19,186 a	4,813 a	95,883 b
	Est.II	21,470 a	6,323 a	17,425 a	5,711 a	131,029 a
	Est.III	23,900 a	7,405 a	25,763 a	5,710 a	146,361 a
Zn (ppm)	SADIA	67,983 d	7,433 a	29,970 c	6,806 a	37,045 b
	Est.I	87,404 c	12,958 a	44,976 bc	5,961 a	42,058 ab
	Est.II	105,911 b	16,075 a	60,074 ab	7,528 a	52,621 ab
	Est.III	122,495 a	12,148 a	75,893 a	7,961 a	54,814 a

As médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

os teores de Fe diminuírem e os de Mn aumentarem com a evolução da doença.

Na casca da raiz foram encontradas diferenças significativas para as médias dos teores de B, Fe e Zn. Em relação ao B, o maior teor foi determinado nas plantas sadias, os teores intermediários nos estádios inicial (Est. I) e final (Est. III) da doença e os menores no estágio médio (Est. II). Para o Fe, os maiores teores foram observados nos estádios sadia, início (Est. I) e final (Est. III) e os menores no estágio médio (Est. II). Já para o Zn ocorreu um aumento dos teores com o avanço da doença.

Em relação ao local de amostragem, lenho da raiz, não observou-se diferenças significativas entre os diferentes estádios do declínio dos citros para os micronutrientes.

Na folha, houve diferenças entre as médias para os nutrientes B, Cu, Mn e Zn, sendo que para o Mn e o Zn os teores aumentaram com a evolução da doença. Para o B os maiores teores foram determinados no estágio médio (Est. II) da doença, os intermediários nos estádios inicial (Est. I) e final (Est. III) e os menores nas plantas sadias. No caso do Cu, as plantas nos estádios final (Est. III) e médio (Est. II) apresentaram os maiores teores e as dos estádios sadia e início (Est. I.) os menores.

5- DISCUSSÃO

5.1 Experimento nº 1- Alterações protéicas

A instabilidade das proteínas do declínio dos citros, quando se utilizou o tampão de extração de proteína TACM, provavelmente se deve ao fato de que este tampão, contém baixa concentração (0,5%) do agente antioxidante, betamercaptoetanol. Por outro lado, a presença desta substância na concentração de 3%, no tampão PBS parece estar relacionada com a estabilidade das proteínas. Esta estabilidade foi comprovada pela formação das bandas distintas após a eletroforese.

O tempo de armazenagem não pareceu influenciar na qualidade da proteína extraída; porém, o tempo máximo que o material pode ficar armazenado não foi determinado.

Os perfis proteicos foram os mesmos, tanto para os materiais provenientes de Bebedouro (SP) como para os de Alfenas (MG). Este fato comprova que o definhamento das plantas cítricas nos dois locais amostrados, é devido a mesma anomalia e que sua

expressão em relação as proteínas não é influenciada pelos efeitos ambientais.

As proteínas 43, 35, 31, 26 e 23 KD encontradas nos extratos obtidos de plantas com declínio dos citros foram relacionadas com a ocorrência da doença. Estes resultados estão coerentes com aqueles obtidos por DERRICK et al. (1990), os quais trabalhando com "blight", identificaram sete proteínas que foram associadas a esta anomalia. As duas proteínas diferentes possuem peso molecular de 18 e 15 KD. A banda 18 KD não é considerada uma proteína bem característica do "blight" porque, segundo os mesmos autores, esta macromolécula nem sempre aparece no extrato de plantas doentes. A banda 15 KD, presente nos extratos de plantas com "blight", possivelmente é a mesma que se encontra no limite de resolução da gel 12,5% (colunas 5 e 6) da Figura 4. Esta proteína poderia ser melhor visualizada numa gel com malhas menores, como a de 18% (DERRICK et alii, 1990).

A purificação das proteínas exclusivas do declínio dos citros, feita pelo protocolo descrito pela IBI, mostrou-se eficiente, como pode ser observado na Figura 6, (colunas 4 e 5).

Embora às proteínas do "blight" e do declínio sejam semelhantes (possuem mesmo peso molecular), as proteínas que são consideradas exclusivas do "blight" (35, 23 e 15 KD), ou seja, não aparecem em tecidos sadios, não são as mesmas exclusivas do declínio dos citros (31 e 26 KD). Uma possível

explicação para esta diferença, seria em relação a variações genotípicas entre as espécies dos porta-enxertos investigados. No caso do "blight" (DERRICK et alii, 1990), as proteínas foram extraídas de raízes do limoeiro 'Rugoso', enquanto que no presente estudo, utilizou-se raízes do limoeiro 'Cravo'.

As macromoléculas 35, 23 e 15 KD, presentes somente nos extratos obtidos de plantas com o "blight", são consideradas exclusivas da doença, segundo O'REILLY, (1990), visto que elas não se encontram em plantas afetadas por outras anomalias.

As mesmas proteínas são encontradas em plantas jovens, que foram enxertadas com raízes de plantas doentes (DERRICK et alii, 1991). Na opinião do autor, este resultado evidencia que plantas jovens também podem estar infectadas, apesar dos sintomas visuais serem somente observados em pomares com cinco anos de idade ou mais (MARAIS, 1990).

Portanto, as proteínas presentes nos vasos lenhosos de raízes de plantas doentes podem ser consideradas como o primeiro sinal que uma planta esteja infectada.

Os resultados negativos no diagnóstico de proteínas exclusivas de plantas com declínio dos citros nos extratos de caule de plantas doentes, concordam com os obtidos por DERRICK et alii, (1990), que algumas vezes não detectaram proteínas específicas do "blight" em amostras do caule e em duas amostras de raízes de plantas com sintomas visíveis.

A falha na detecção destas macromoléculas, suporta a idéia de que, se a doença "blight" for causada por um patógeno, ele está distribuído desigualmente em plantas afetadas e se encontra em concentração extremamente baixa.

Através das proteínas exclusivas de planta com "blight", produziu-se anticorpos que foram utilizados por DERRICK et alii, (1991) no sistema "western blot" para se fazer o diagnóstico precoce de plantas com "blight". O mesmo sistema também mostrou-se eficiente no diagnóstico, quando se utilizou anticorpos contra proteínas isoladas no extrato de folhas de plantas doentes (BAUSHER & SWEENEY, 1991).

O sistema "western blot" têm diagnosticado plantas com "blight", antes do acúmulo de Zn no lenho e da diminuição na absorção de água nos vasos lenhosos, sendo considerado como o teste mais precoce e preciso para a doença. Uma outra vantagem deste sistema sobre os métodos correntemente empregados na diagnose, é que árvores de qualquer idade, podem ser amostradas.

Com os resultados deste trabalho, ou seja, identificação e purificação das proteínas exclusivas de plantas com declínio dos citros, sugere-se, numa etapa seguinte, a produção de anticorpos específicos contra estas macromoléculas. Estes anticorpos produzidos, poderão ser utilizados num sistema semelhante ao descrito para o "blight", ou em técnicas tipo ELISA, para se fazer o diagnóstico precoce da doença.

5.2. Experimento no 2 - Alterações nutricionais

Os resultados obtidos no presente trabalho, quanto a avaliação qualitativa dos sintomas da doença, coincidem com os obtidos por TAVARES (1987) e GIROTO (1990), que também verificaram diferenças entre todos os estádios, o que permite caracterizar a evolução do declínio dos citros através de notas.

Quanto ao teste de absorção de água, LEE et al. (1984), BRLANSKY et al. (1985) e GIROTO (1990), verificaram um decréscimo na velocidade de sua absorção pelo tronco nas plantas doentes. No presente estudo, os resultados estão coerentes com os obtidos por tais autores. Por outro lado, estes resultados diferem daqueles obtidos por TAVARES (1987), que não verificou diferença de absorção entre os estádios, apesar do mesmo autor observar uma tendência da velocidade de absorção de água ser menor a medida que a doença evolui.

A absorção reduzida ou quase nula de água pelo tronco das plantas com declínio dos citros é devida ao fato de que, estas plantas possuem obstruções amorfas e filamentosas nos vasos do xilema, que causam uma redução na translocação hídrica nos seus tecidos (BERETTA, 1988).

Com relação ao efeito do P no solo, WUTSCHER, (1986), observou que o seu teor é maior nos solos sob plantas saudas. No presente caso, o maior valor do P foi encontrado, nas amostras de solo superficial, retiradas sob plantas com estágio

mais adiantado da doença.

Como a adubação do pomar é mecanizada e a ocorrência do declínio dos citros é ao acaso, poderia-se esperar a não ocorrência de diferenças entre os componentes químicos das amostras de solos coletados sob plantas sadias e doentes. Entretanto, a presença de um maior teor de P nos solos sob plantas no estágio final do declínio dos citros, pode ser explicado pela reduzida absorção de nutrientes, devido ao baixo volume de raízes apresentado por estas plantas e pela pequena mobilidade deste nutriente no solo.

Esta menor superfície de absorção radicular das plantas no estágio final da doença, corrobora com as observações feitas por LIMA (1985) e BERETTA & ROSSETTI (1988), os quais verificaram que, as raízes primárias e secundárias das plantas afetadas pelo declínio dos citros, mostram-se normais, exceto em estágio mais avançado da doença, quando o número de radículas é reduzido.

Apesar de não se conhecer a causa do declínio dos citros, sabe-se que a manifestação da doença, resulta em sério distúrbio nutricional ou alteração no metabolismo de vários nutrientes.

Resultados descritos por alguns autores (WUTSCHER & HARDESTY, 1979; ALBRIGO et alii, 1986 e GIROTO, 1990), demonstram que os teores de N presentes na matéria seca da casca do tronco são maiores nas plantas com declínio dos citros. Resultado semelhante foi obtido neste trabalho.

Este acúmulo de N é explicado por um aumento na concentração de aminoácidos, em resposta ao "stress" causado pelo declínio dos citros (ALBRIGO et alii, 1986).

Os teores de Cu e Mn, também foram descritos por GIROTO (1990), como sendo mais altos nas plantas doentes. Resultado semelhante quanto ao Cu obteve-se neste trabalho. Já para o nutriente Mn, neste estudo não se verificou diferenças entre plantas sadias e com declínio dos citros.

Os maiores teores de Zn nas plantas doentes está coerente com os resultados obtidos por ALBRIGO et al. (1986). Esses autores citam o acúmulo de Zn na matéria seca da casca como o primeiro sintoma do declínio dos citros e comentam que a concentração elevada de Zn na casca é seguida por uma elevada concentração do mesmo no lenho.

O teor de Zn na casca do tronco, se mostrou eficiente em representar a evolução do declínio dos citros, correlacionando-se positivamente com o aumento da doença.

No presente estudo, os valores maiores do K, S, Cu e Fe nas plantas doentes, foram decorrentes do reduzido metabolismo destas plantas e da baixa redistribuição dos nutrientes nos seus tecidos.

Quanto aos teores dos nutrientes serem maiores nas plantas sadias ou nas doentes, no local lenho do tronco, nota-se que não há um consenso na literatura.

WILLIAMS & ALBRIGO (1984), observaram que no lenho do tronco, os teores de N, Mn e Zn foram maiores nas plantas

doentes e de B nas plantas sadias. Já no trabalho de GIROTO (1990), os maiores teores nas plantas doentes foram dos nutrientes Cu e Zn, enquanto que no trabalho de WUSTCHER & HARDESTY (1979), o N foi o único que apresentou diferença significativa, sendo o seu maior teor determinado nas plantas com declínio dos citros.

Neste trabalho, no local lenho do tronco, apenas o N apresentou diferença significativa, sendo o seu maior teor também encontrado nas plantas doentes.

Quanto aos locais de amostragem, casca da raiz e lenho da raiz, não há referência bibliográfica que mostre qualquer relação entre os teores dos macro e micronutrientes e a ocorrência do declínio dos citros.

Na casca da raiz, os maiores valores de N, K, S, e Zn nas plantas com declínio dos citros, provavelmente ocorreram devido também ao reduzido metabolismo e a baixa redistribuição de nutrientes apresentadas por estas plantas.

Para os nutrientes Ca, Mg, B e Fe, não houve aumentos bem característicos de seus teores nos diferentes estádios do declínio dos citros, neste local amostrado.

No lenho da raiz, nenhum nutriente apresentou diferença significativa.

Os teores de K na matéria seca foliar foram maiores nas plantas sadias do que nas com declínio dos citros, resultado que coincide com os obtidos por WUSTCHER & HARDESTY (1979), COELHO et al. (1983) e TAVARES (1987), enquanto em

outros trabalhos não foram detectadas diferenças (ALBRIGO et alii, 1986 e GIROTO, 1990).

Os teores de K no solo foram considerados médios para plantas sadias e altos para plantas com declínio dos citros, quando comparados ao padrão (QUADRO 5). Já que existe uma relação direta entre o teor do nutriente no solo e na matéria seca foliar (SOUZA, 1976), era de se esperar que nas plantas com declínio dos citros houvesse um maior teor deste nutriente. Porém, o que se observou foi um maior teor de K nas folhas de plantas sadias em relação às plantas doentes.

Para o S, o teor na matéria seca foliar das plantas com declínio dos citros foi maior do que nas plantas sadias, resultado também obtido por GIROTO (1990). Em outros trabalhos não foram encontradas diferenças entre plantas sadias e doentes (COELHO et alii, 1983 e TAVARES, 1987).

Os teores de B na matéria seca foliar foram mais elevados nas plantas doentes, comparados às sadias. Estes resultados concordam com aqueles obtidos por COELHO et al. (1983), WUTSCHER (1986), GIROTO (1990) e diferem daqueles obtidos por TAVARES (1987), que não observou diferenças.

Para o Cu, o maior teor foi encontrado na matéria seca foliar das plantas doentes, resultado que coincide com os obtidos por COELHO et al. (1983) e difere dos obtidos por WUTSCHER & HARDESTY (1979), TAVARES (1987) e GIROTO (1990) que não observaram diferenças entre as plantas.

QUADRO 5 - Padrões para interpretação de fertilidade do solo dos componentes químicos P, K, Ca, Mg, Al e pH.

Nutrientes	Unidades	Classificação		
		Baixo	Medio	Alto
P disponível: solo textura media	ppm	0-10	11-20	>20
K disponível	ppm	0-45	46-80	>80
Ca trocável	meq/100cm ³	0-1,5	1,6-4,0	>4,0
Mg trocável	meq/100cm ³	0-0,5	0,6-1,0	>1,0
Al trocável	meq/100cm ³	0-0,3	0,4-1,0	>1,0
pH em água	Acidez media 5-5,9	Acidez fraca 6-6,9	Neutro 7,0	Alcal. fraca 7,1-7,8

FONTE: COMISSÃO DE FERTILIDADE DO SOLO DO ESTADO DE MINAS GERAIS (1989)

Os teores de Mn, na matéria seca foliar também foram mais elevados nas plantas doentes, resultado que coincide com os obtidos por COELHO et alii, (1983), enquanto em outros trabalhos, não foram detectadas diferenças, ALBRIGO et alii, (1986), WUTSCHER & HARDESTY, (1979). Por outro lado, TAVARES, (1987) e GIROTO, (1990), obtiveram resultados inversos.

Os teores de Zn, na matéria seca foliar estiveram maiores nas plantas doentes quando comparadas com as sadias, concordando com os resultados observados por COELHO et al. (1983). WUTSCHER & HARDESTY (1979), ALBRIGO et al. (1986), TAVARES (1987) e GIROTO (1990), não verificaram diferenças entre os dois tipos de plantas.

Como um dos sintomas visuais do declínio dos citros é a deficiência de manganês e zinco nas folhas (BERETTA & ROSSETTI, 1988), era de se esperar que as plantas doentes apresentassem, na matéria seca foliar, menores teores destes nutrientes, porém o que se observou foi o contrário.

6- CONCLUSÕES:

A avaliação qualitativa dos sintomas do declínio dos citros, permite caracterizar a evolução da doença, através de notas.

O teste de injeção de água com seringa no tronco foi eficiente no diagnóstico de plantas com declínio dos citros, porém não diferenciou os dois últimos estádios da doença.

Plantas cítricas sobre o porta-enxerto limoeiro 'Cravo' que apresentarem as proteínas de 26 e 31 KD, serão diagnosticadas como portadoras do declínio dos citros.

Os perfis protéicos foram os mesmos nos dois locais amostrados, mostrando não haver influência dos efeitos ambientais na expressão das seis proteínas associadas ao declínio dos citros.

Com relação às alterações nutricionais, o teor de Zn na casca do tronco, deve ser o parâmetro utilizado para se fazer o diagnóstico dos diferentes estádios do declínio dos citros.

7- RESUMO.

Os sintomas visuais do declínio dos citros, são em geral observados em pomares após cinco anos de idade. O acúmulo de Zn no lenho e o teste de absorção de água através do uso da seringa, são os testes padrões de diagnóstico mais utilizados para distinguir as árvores afetadas pelo declínio dos citros de outras anomalias que também causam o definhamento das plantas cítricas. Tais testes entretanto, dão resultados positivos somente quando as plantas já apresentaram os sintomas. Os objetivos deste trabalho foram: 1^o - desenvolver um teste sensível de diagnose que permita a detecção precoce de plantas com declínio dos citros, através de técnicas eletroforéticas e, 2^o - reavaliar o teste de absorção de água com seringa e as alterações nutricionais na matéria seca. As plantas utilizadas foram laranjeiras 'Valência' sobre o limoeiro 'Cravo'. No segundo experimento, foi utilizado delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema de parcela subdividida, com 6 repetições, onde os 4 estádios do declínio dos citros

(plantas sadias, em início, médio e em final da doença) constituíram os níveis do fator parcela; e as 5 amostras de tecidos de planta (casca do tronco, lenho do tronco, casca da raiz, lenho da raiz e folha) os de subparcela, totalizando 20 tratamentos. Avaliou-se o teor de nutrientes de cada amostra. Obteve-se sucesso, através de técnicas eletroforéticas, na caracterização e purificação de duas proteínas (26 e 31 KD) exclusivas de plantas com declínio dos citros. Observou-se através das alterações nutricionais, que o acúmulo de Zn na casca do tronco, foi o parâmetro que melhor representou a evolução do declínio dos citros.

8. SUMMARY.

PROTEIC AND NUTRITIONAL ALTERATIONS IN TISSUES OF PLANTS AFFECTED BY CITRUS DECLINE

The citrus decline visual symptoms are, in general, observed in groves older than five years. The Zn accumulation in the trunk wood and the water absorption test, done with a syringe are the standard tests of diagnosis mostly used to distinguish the trees affected by citrus decline from other anomalies that also cause the degeneration of citrus plants. However, these tests give only positive results when the plants have already presented the symptoms. The objectives of this work were, first: to develop a diagnostically sensitive test that permits early detection in plants with citrus decline, through electrophoresis techniques; second: to reevaluate the water absorption test with syringe and the nutritional alterations in the dry matter. The plants used were 'Valencia' orange trees with the Rangpur lime as rootstock. In the second experiment,

entirely casual experiment delineation with scheme of split plot was used, with six repetitions, where the 4 stages of citrus decline (healthy, plants at the beginning, middle and final stages of the disease) constituted the level of plot; and the 5 samples of plant tissue (bark, trunk wood, root skin, root wood and leaf) the level of split plot, totalling 20 treatments. The nutrient contents of each sample was evaluated. It was successful, through techniques in electrophoresis, characterization and purification of two proteins (26 and 31 KD) founded exclusively in plants with citrus decline. It was observed, through nutritional alterations, that Zn accumulation in the bark was the parameter with best represented the evolution of the citrus decline.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. AGOSTINI, J. P. Declinamento in Argentina: transmission, etiology and biochemistry. Abstr. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF CITRUS CANKER, DECLINIO/BLIGHT AND SIMILAR DISEASE, São Paulo, 1987. Proceedings... Campinas, Fundação Cargill, 1988. p.313-28.
2. ALBERICO, L. G. & YOUNG, R. H. Citrus tree decline complex and diagnostic identification of blight. Proceedings of the Florida State Horticultural Society, Florida, 92(1):61-3, June 1979.
3. _____, _____. Phloem zinc accumulation in citrus trees affected with blight. HortScience, Alexandria, 16(2):158-60, Apr. 1981.
4. _____ ; SYVERTSEN, J. P. & YOUNG, R. H. Stress symptoms of citrus trees in successive stages of decline due to blight. Journal of the American Society for Horticultural Science, Alexandria, 111(3):426-9, Mar. 1986.

5. BAUSHER, M. G.; SWEENEY, M. J. Field detection of citrus blight using immunological techniques. Plant Disease, St. Paul, 75(5):447-50, 1991.
6. BERETTA, M. J. G. Declínio de plantas cítricas. Jornal do Fundencitrus, p.4 e 5, set. 1988.
7. _____ . Declínio de plantas cítricas - pesquisas recentes. Laranja, Cordeirópolis, 1(8):83-93, 1987.
8. _____ ; COCITO, P.; J. MENECHINO JR.; BARROS, A. C.; JACON, J. R.; ROSSETTI, V. & WUSTCHER, H. Novas tentativas de recuperação de plantas cítricas afetadas pelo declínio. Fitopatologia Brasileira, Brasília, 12:184, jun. 1987.
9. _____ ; LEFEVRE, A. F. V. Declínio: resistência de variedades e pesquisas recentes. Laranja, Cordeirópolis, 1(7):71-96, 1986.
10. _____ ; ROSSETTI, V. Declínio: transmission, etiology, citology and recovery. Abstr. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF CITRUS CANKER, DECLINIO/BLIGHT AND SIMILAR DISEASE, São Paulo, 1987. Proceedings... Campinas, Fundação Cargill, 1988a. p.338-48.
11. _____ ; _____ . Declínio de plantas cítricas. In: SIMPOSIO DE CITRICULTURA, 3, Jaboticabal, 1988. Anais... Jaboticabal, 1988b. p.137-48.

12. BERETTA, M. J. G. & ROSSETTI, V. Declínio dos citros - uma doença transmissível. In: SEMINARIO INTERNACIONAL SOBRE PORTA-ENXERTOS DE CITROS, 1990. p.211-21.
13. _____ ; _____ ; POMPEU, J. Jr. & SOBRINHO, J. T. Comportamento de porta-enxertos em relação ao declínio das cítricas no Estado de São Paulo. Laranja, Cordeirópolis, 2(9):311-25, 1988.
14. BRLANSKY, R. H. & LEE, R. F. Pesquisa sobre o blight dos citros na Florida. Laranja, Cordeirópolis, 1(8):97-9, 1987.
15. _____ ; _____ & COLLINS, M. H. Structural comparison of xylem occlusions in the trunks of citrus trees with blight and other decline diseases. Phytopathology, St.Paul, 75(2):145-50, Feb. 1985.
16. CASTRO, P. R. C.; BERNARDES, A. S. & PRATES, H. S. Remissão do declínio dos citros, uma desordem fisiológica, com reguladores vegetais. In: SEMINARIO INTERNACIONAL DE CITROS, 2, Bebedouro, 1992. Resumos... Bebedouro, 1992. p.49-50.
17. CHILDS, J. F. L. Florida citrus blight. Part. II. Occurrence of citrus blight outside Florida. Plant Disease Reporter, Washington, 63(7):565-9, July 1979.

18. CLARK, M. F. & AN ADAMS. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. Journal of General Virology, Essex, 34:475-83, 1977.
19. COELHO, Y. S.; PAGUIO, O. de La. R. & HIROCE, R. Situação nutricional de plantas cítricas afetadas pelo declínio nos Estados da Bahia e São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 7, Florianópolis, 1983. Anais... Florianópolis, Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1983. v.1, p.416-23.
20. COHEN, M. Diagnosis of young tree decline, blight and sandhill of citrus by measurements of water uptake gravity infection. Plant Disease Reporter, Washington, 58:801-5, 1974.
21. COMISSAO DE FERTILIDADE DO SOLO DO ESTADO DE MINAS GERAIS. Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais; 4a aproximação. Lavras, 1989. 176p.
22. 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, 74:168-70, 1990.

23. DERRICK, K. S.; LEE, R. F.; BRLANSKY, R. H.; TIMMER, L. W.; HEWITT, G. G. & BARTHE, G. A. Proteins and filamentous structures associated with citrus blight. In: INTERNATIONAL ORGANIZATION CITRUS VIROLOGISTS, 11, Riverside, 1991. Proceedings... Riverside, IOCV, 1991. p.265-8.
24. EMBLETON, T.W.; JONES, W. W.; LABANAUSKAS, C.K. & REUTHER, W. Leaf analysis as a diagnostic tool and guide to fertilization. In: REUTHER, W. The citrus industry, Riverside, University of California, 1973. v.3, Cap.6, p.183-210.
25. FISHER, H. V.; TIMMER, L. W. & MULLER, G. W. Comparison of "declinamiento", "blight", "declinio", and marchitamiento repentino" by use of uniform examination methods. In: CONFERENE ORGANIZATION CITRUS VIROLOGIST, 9, Argentina, 1983. Proceedings... Riverside, University of California, p.279-28, 1984.
26. GIROTO, E. J. Correlações de nutrientes em tecidos de laranjeiras (Citrus sinensis (L.) Osbeck cv. Valência) e o declínio dos citros. Lavras, ESAL, 1990. 77p. (Tese de MS).
27. GUIRADO, N.; LIMA, J. E. O.; PRATES, H. S. & MULLER, G. W. Comparação entre testes de diagnósticos de absorção de água para o declínio dos citros. Fitopatologia Brasileira, Brasília, 9(2):430, 1984.

28. HOPKINS, D. L. Relation of Pierce's disease bacterium to a wilt-type disease in a citrus in the greenhouse. Phytopathology, St.Paul, 72:1090-2, 1982.
29. _____. Production of diagnostic symptoms of blight in citrus inoculated with *Xylella fastidiosa*. Plant Disease, St.Paul, 72:432-5, 1988.
30. _____ ; THOMPSON, C. M.; BISTLINE, F. W. & RUSSO, L. W. Relationship between xylem-limited bacteria and citrus blight. Proceedings Florida State Horticultural Society, Florida, 102:21-3, 1989.
31. INTERNATIONAL BIOTECHNOLOGIES. Unidirectional eletroelutor analytical. In:____. Life on the edge. s.l., 1986/87. p.41-2.
32. LAMMELI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, London, 227:680-5, 1970.
33. LEE, R. F.; BRLANSKY, R. H.; TIMMER, L. W.; TUCKER, D. P. H.; DERRICK, K.S. & GRAHM, J.H. Current status of experimental transmittion of citrus blight. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF CITRUS CANCKER, DECLINIO/BLIGHT AND SIMILAR DISEASE, São Paulo, 1987. Proceedings... Campinas, Fundação Cargill, 1988. p.262-3.

34. 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 Disease, St. Paul, 68(6):511-3, June 1984.
35. LIMA, J. E. O. Declínio dos citros. Laranja, Cordeirópolis, 1(6):81-7, 1985.
36. MARAIS, L. J. Characteristics of citrus blight in South Africa. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF CITRUS CANCKER, DECLINIO/BLIGHT AND SIMILAR DISEASE, São Paulo, 1987. Proceedings... Campinas, Fundação Cargill, 1988. p.285-2.
37. _____ Citrus blight: world research review. Citrograph, Los Angeles, 75(5):119-24, Mar. 1990.
38. MARMELICZ, L. A. Declinamiento in Argentina: General characteristics. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF CITRUS CANCKER, DECLINIO/BLIGHT AND SIMILAR DISEASE, São Paulo, 1987. Proceedings... Campinas, Fundação Cargill, 1988. p.245-61.
39. MULLER, G. W.; PRATES, H. S. & COSTA, A. S. Declínio dos citros em São Paulo: Ensaio exploratórios visando a recuperação de plantas afetadas. Fitopatologia Brasileira, Brasília, 7:571, 1982.

40. NOWOTNY, A. Crossed immunoelectrophoresis. In:____ Basic Exercises in immunochemistry; A Laboratory Manual. 2. ed. New York, Springer - Verlag, 1979. p. 240-3.
41. OCHOA, F.; VEGAS, A.; SANABRIA DE ALBARRACIN, N.; MENDT, R.; BARERRA, J.; LEE, R. & BRLANSKY, R. A diagnosis of sudden decline in citrus trees in Venezuela. In:INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF CITRUS CANKER, DECLINIO/BLIGHT AND SIMILAR DISEASE. São Paulo, 1987. Proceedings... Campinas, Fundação Cargill, 1988. p.304-12.
42. O'REILLY, S. IFAS scientists develop method to predict blight. The Citrus Industry, Bartow, 71(5):60, May. 1990.
43. OUCHTERLONY, O. & NILSSON, L. A. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. In: WEIR, D. M., ed. Handbook of Experimental Immunology. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1967. v.19, p.1-19,34.
44. PAGUIO, O. R.; COELHO, Y.S. & SANTOS FILHO, H. P. O declínio dos citros na Bahia. Fitopatologia Brasileira, Brasília, 8(2):189-93, fev. 1983.
45. PAIVA, E.; KRIZ, A. L.; PEIXOTO, M. I. V.D.; WALLACE, J. C. & LARKINS, B.A. Quantitation and Distribution of t-Zein in the Endosperm of Maize kernels. Cereal Chemistry, St.Paul, 68(3):276-9, 1991.

46. PRATES, H. S. Declínio de citros no Estado de São Paulo. Laranja, Cordeirópolis, 1(9):201-7, 1988.
47. _____ ; CASTRO, P. R. C.; SOUZA, W.; DIONISIO, A. & APEZZATO, B. Ação de reguladores vegetais no declínio dos citros. Summa Phytopathologica, Piracicaba, 9:220-9, 1983.
48. _____ ; GUIRADO, N. & MULLER, G. W. Declínio dos citros no Estado de São Paulo. Laranja, Cordeirópolis, 5:195-222, 1984.
49. _____ ; SALIBE, A. A. & TUBELIS, A. Análise espacial e temporal do declínio em pomares cítricos no estado de São Paulo. Laranja, Cordeirópolis, 1:95-6, 1987.
50. RODRIGUEZ, O.; ROSSETTI, C.; MULLER, G. W.; MOREIRA, C. S.; PRATES, H.S.; DE NEGRI, J.D. & GREVE, A. Declínio de plantas cítricas em São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 5, Pelotas, 1979. Anais... Pelotas, Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1979. v.3, p.927-32.
51. ROSSETTI, V. Declínio e "blight": pesquisas. Laranja, Cordeirópolis, (5):225-35, 1984.
52. _____ & BERETTA, M. J. G. Declínio of citrus trees in Brazil. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF CITRUS CANKER, DECLINIO/BLIGHT AND SIMILAR DISEASE, São Paulo, 1987. Proceedings... Campinas, Fundação Cargill, 1988. p.262-73.

53. ROSSETTI, V. & BERETTA, M. J. G. Estudo do pH de tecidos de plantas cítricas afetadas pelo declínio. Fitopatologia Brasileira, Brasília, 2(253):434, 1984.
54. _____ & _____. Pesquisas recentes sobre declínio de plantas cítricas. Laranja, Cordeirópolis, (6):89-111, 1985.
55. _____ ; KRAUSEMANN, J. & FEICHTENBERGER, E. Attempts to induce recovery of citrus trees affected by declínio. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 9, Argentina, 1983. Proceedings... Riverside University of California, 1984. p.322-6.
56. _____ ; WUTSCHER, H. K.; CHILDS, J. F.; RODRIGUEZ, O.; MOREIRA, C.S.; MULLER, G.W.; PRATES, H.S.; NEGRI, I.C. & GREVE, A. Decline of citrus trees in the State of São Paulo, Brazil. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 8, Austrália, 1979. Proceedings... Riverside, International Organization of Citrus Virologists, 1980. p.251-9.
57. SARRUGE, J. R. & HAAG, H. P. Análises químicas de plantas. Piracicaba, ESALQ, 1974. 56p.
58. SMITH, P. F. History of citrus blight in Florida. Citrus Industry, Bartow, 55(9):13,14,16,18,19; (10):9,10,13,14; (11):12,13. 1974.

59. SMITH, H. K. & REITZ, H.K. A review of the nature and history of citrus blight in Florida. Proceedings International Society Citriculture, Orlando, 3:881-884, 1977.
60. SOUZA, M. de. Efeito do P, K, e Ca no crescimento da laranjeira 'Pera Rio' (Citrus sinensis L. Osbeck) em Latossolo Vermelho-Escuro fase cerrado. Piracicaba, ESALQ, 1976. 132p. (Tese de Doutorado).
61. TAVARES, E. D. Avaliação do estado nutricional da laranjeira (Citrus sinensis (L.) OSBEK)cv. Valencia com o Declínio dos Citros. Lavras, ESAL, 1987. 64p. (Tese MS).
62. TIMMER, L. W. Blight. In: Compendium of citrus diseases, St. Paul, p.66-67, 1989.
63. _____ . ; LEE, R. F.; YOUNG, R. H.; ALBRIGO, L. G.; SYVERTSEN, J.P. & TUCKER, D.P.H. Distribution and resistance of tetracycline applied by high-pressure trunk-injection and soil drench to blight affected citrus trees. Phytopathology, St.Paul, 71:261, 1981.
64. TRANI, P. E.; PRATES, H. S.; HIROCE, R. & GUIRADO, N. Relação declínio, calagem e adubação em citros no Estado de São Paulo. Summa Phytopatologica, Piracicaba, 12(12):27, jan. 1986.

65. TUCKER, D. P. H.; LEE, R. F.; TIMMER, L. W.; ALBRIGO, L. G. & BRLANSKY, R.H. Experimental transmission of citrus blight. Plant Disease, St.Paul, 68:979-80, 1984.
66. VETTORI, L. Métodos de análise do solo. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura/ Equipe de Pedalogia e Fertilidade do Solo, 1969. 24p. (Boletim técnico, 7).
67. WILLIAMS, G. L. & ALBRIGO, L. G. Some inorganic element changes in trunk floem of healthy and blight-affected citrus trees. Journal of American Society for Horticultural Science, Alexandria, 109(3):437-40, May 1984.
68. WUTSCHER, H. K. Citrus blight: A horticultural perspective. Abstr. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF CITRUS CANCKER, DECLINIO/BLIGHT AND SIMILAR DISEASE, São Paulo, 1987. Proceedings... Campinas, Fundação Cargill, 1988. p.395-405.
69. _____ . Comparison of soil leaf and feeder root nutrient levels in the citrus blight-free and citrus blight-affected areas of a 'Hamlin' orange grove. Proceedings of the Florida State Horticulture Society, Flórida, 99:74-7, 1986.

70. 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 Horticulture Society, Florida, 102:24-7, 1989.
71. _____ ; COHEN, H. & YOUNG, R. H. Zinc and water soluble phenolic levels in the wood for diagnosis of citrus blight. Plant Disease Reporter, Washington, 61 (7):572-6, July 1977.
72. _____ & HARDESTY, C. A. Concentrations of 14 elements in tissue of blight affected and healthy 'Valência' orange trees. Journal of American Society for Horticultural Science, Mont Vermont, 104(1):9-11, Jan. 1979.
73. _____ ; SCHWARZ, H. E.; CAPAGLIA, H. G.; MOREIRA, C. S. & ROSSETTI, V. Blightlike citrus tree decline in South America and South Africa. HortScience, Alexandria, 15:588-90, 1980.
74. _____ ; YOUTSEY, C. O.; SMITH, P. F. & COHEN, M. Negative results in citrus blight transmission tests. Proceedings of the Florida State Horticulture Society, Florida, 6:48-50, 1983.

75. YOKOMI, R. K.; GARNSEY, S. M.; YOUNG, R. H. & GRIMM, G. R.
Spatial and temporal analysis of blight incidence in a
Valencia grove on rough lemon rootstock in Central
Florida. In: INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS
VIROLOGISTS, 9, Riverside, 1984. Proceedings... Riverside,
IOCV, 1984. p.260-9.

APÊNDICE.

A seguir, estão apresentados os QUADROS de resumo das análises de variâncias e coeficientes de variação dos componentes químicos das amostras de solos e dos teores de macro e micronutrientes de plantas sadias e com declínio dos citros.

QUADRO 1A - Resumo das análises de variâncias e coeficientes de variação dos componentes químicos das amostras de solo coletadas sob laranjeiras 'Valência' sadias e em diferentes estádios do declínio dos citros. ESAL, Lavras-MG. 1993.

FV	G.L.	Quadrados Medios					
		P	K	Ca	Mg	Al	pH
Estadio	3	84,041**	268,000	0,075	0,036	0,0005	0,041
Erro	20	14,241	344,500	0,073	0,042	0,002	0,040
CV (%)		25,089	22,914	16,751	24,641	37,238	3,409

*, ** valores significativos pelo teste F ao nível de 5% e 1% de probabilidade, respectivamente.

QUADRO 1B - Resumo das análises de variâncias e coeficientes de variação para os teores de N, P, K, Ca, Mg e S, determinados nas amostras de tecidos de plantas sadias e em diferentes estádios do declínio dos citros. ESAL, Lavras-MG, 1993.

FV	G.L.	QM e Significância					
		N	P	K	Ca	Mg	S
Estadio	3	0,324**	0,001	0,005	0,460	0,002	0,006**
Ea	20	0,050	0,002	0,035	0,314	0,001	0,0006
Parcela	23	-	-	-	-	-	-
Local	4	23,430**	0,022**	5,210**	118,966**	0,587**	0,439**
L x E	12	0,191**	0,002	0,348**	0,722**	0,004**	0,001**
Eb	80	0,026	0,002	0,040	0,228	0,001	0,0003
CVa (%)	-	6,222	2,798	12,020	8,666	9,986	6,446
CVb (%)	-	10,023	6,007	28,744	16,495	16,975	11,164

*, ** significativos aos níveis de 5% e 1% de probabilidade respectivamente, pelo teste F.

QUADRO 1C - Resumo das análises de variâncias e coeficientes de variação para os teores de B, Cu, Fe, Mn e Zn, determinados nas amostras de tecidos de plantas sadias e em diferentes estádios do declínio dos citros. ESAL, Lavras-MG. 1993.

FV	G.L.	QM e Significância				
		B	Cu	Fe	Mn	Zn
Estadio	3	43,781	1020,742**	5052,371**	1068,569**	3572,648**
Ea	20	39,496	110,919	960,030	271,492	196,840
Parcela	23	-	-	-	-	-
Local	4	6980,124**	7303,985**	192810,805**	51192,966**	30924,476**
L x E	12	94,417**	277,496**	7903,792**	957,506**	648,750**
Eb	80	38,898	92,793	1471,627	241,128	89,487
CVa (%)		10,422	19,386	8,796	21,465	14,623
CVb (%)		23,127	39,649	24,351	45,234	22,047

*, ** significativos aos níveis de 5% e 1% de probabilidade respectivamente, pelo teste F.