

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

MARA DE MENEZES DE ASSIS GOMES

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

**RELAÇÕES HÍDRICAS, TROCAS GASOSAS E
CONTEÚDO DE ÁCIDO ABCSÍCIO E
ÁCIDO 3-INDOL ACÉTICO EM LARANJEIRAS
'PÊRA' COM CLOROSE VARIEGADA DOS CITROS**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo (a) candidato (a)
Mara de Menezes de Assis Gomes
Assis Gomes
e aprovada pela Comissão Julgadora.
Profa. Maria
(18/05/2001)

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
para a obtenção do Título de Doutor em
Biologia Vegetal.

Orientador: Prof. Dra. Ana Maria Magalhães Andrade Lagôa

Co-orientador: Prof. Dr. Eduardo Caruso Machado

2001

i

7797100

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	T/ UNICAMP
	G 585 r
V.	Ex.
TOMBO BC	46051
PROC.	16-392/01
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	16-08-01
N.º CPD	

CM00158815-B

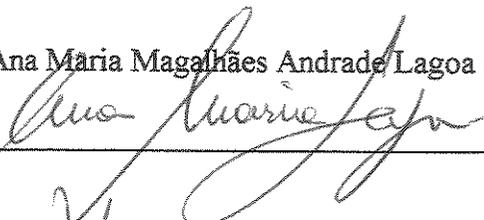
**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

- G585r** **Gomes, Mara de Menezes de Assis**
 Relações hídricas, trocas gasosas e conteúdo de ácido abscísico e ácido 3-indol acético em laranjeiras 'Pêra' com clorose variegada dos citros/Mara de Menezes de Assis
 Gomes. - - Campinas, S.P.[s.n.], 2001.
 155f. ilus.
- Orientadora: Ana Maria Magalhães Andrade Lagôa
 Co-Orientador: Eduardo Caruso Machado
 Tese(doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.
1. Ácido abscísico. 2. Citrus sinensis L-osbeck. 3. Ácido 3-indol acético. 4. Citros- clorose variegada. I. Lagôa, Ana Maria Magalhães Andrade. II. Machado, Eduardo Caruso. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

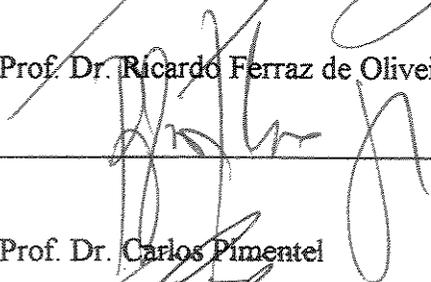
Data da defesa: 18/05/2001

Banca Examinadora:

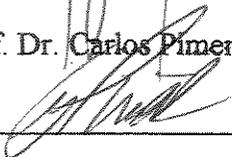
Prof. Dra. Ana Maria Magalhães Andrade Lagoa (Orientadora)



Prof. Dr. Ricardo Ferraz de Oliveira



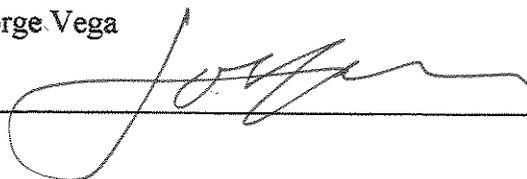
Prof. Dr. Carlos Pimentel



Prof. Dra. Marlene Aparecida Schiavinato



Prof. Dr. Jorge Vega



Prof. Dra. Cláudia Regina Baptista Haddad

Prof. Dr. Eliemar Campostrini

*Ao Eder e aos futuros frutos do nosso amor
dedico.*

“Experiência é o nome que damos aos nossos erros”

Oscar Wilde

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Eduardo Caruso Machado pelo incentivo nas horas difíceis e pelos momentos agradáveis que tornam a vida mais legal de ser vivida.

À Dra. Ana Maria Magalhães Andrade Lagôa pela amizade e dedicação nestes longos anos de trabalho.

Ao amigo Camilo Lázaro Medina pela grande contribuição na montagem, coleta de dados, discussões e papos ao longo das estradas, além do desenvolvimento do método de inoculação da bactéria *Xylella fastidiosa*, utilizado neste trabalho.

Aos Profs. Jorge Vega, Marlene Schiavinato e Ricardo Ferraz de Oliveira pelas sugestões na ocasião da pré-banca.

Ao Dr. Marcos Antônio Machado do Centro de Citricultura do IAC, em Cordeirópolis, pela utilização do telado e dos laboratórios.

À Marcia Bonato Pinton pela grande ajuda e companheirismo nos experimentos de laboratório.

Ao Dr. José Antônio Quaggio, do Centro de Solos do IAC, pela colaboração.

Aos Drs. Gilberto Barbante Kerbauy do Instituto de Botânica da Usp e Gilmar Zaffari pelo auxílio na montagem do equipamento de produção do diazometano.

Ao Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), Centro de Ecofisiologia e Biofísica, pela utilização dos equipamentos, laboratórios e sala de estudos.

À Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) e professores do Departamento de Fisiologia Vegetal pela oportunidade de realização deste trabalho e à secretária Josênia da Biologia Vegetal.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão de bolsa de estudos sem a qual seria impossível a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) pelo auxílio financeiro para realização dos experimentos (Processo 98/16259-1).

Aos funcionários do Centro de Citricultura do IAC, pela análise do PCR e manutenção do experimento.

Aos amigos que encontrei em Campinas: Andréa Domenica, Aminthas, Bibiana, Eduardo Bigato, Catarina, Carmencita, Carrera, Carlinha, Érico, Flora, Fábio Rato, Flávio, Fridão, Guilherme Kröll, Joe, Lara, Lelê, Lucília e Marcelo, Monge, Miguel Müller, Márcio Tokarski, Mariah, Marina, Miguel e Nalva, Raíza, Rogério, Rodox, Tati, Tony, Zulu, Zé Renato.

Aos amigos fisiologistas: Lúcia, Jurandi, Marquinhos, Mazinho, Cidinha, Marluci, Elenira, Célia, Gustavo Habermann, Rogéria, Guilherme Pereira, Julieta, Claudinha e Agostinho Didonet,...

Aos meus pais Oswaldo e Nina, que sempre me deram apoio emocional e financeiro para esta escalada acadêmica.

À minha família: Marcus, Soraya, Guilherme e Vitor, Marisa e Ricardo; Márcia, Luís e Luísa, Neuza, Maura e Olímpio, Ana, Flávio, Higor e Ana Flávia, Niltinho, Isabela e Giovana.

ÍNDICE GERAL

Ficha Catalográfica.....	ii
Banca Examinadora.....	iii
Dedicatória.....	v
Agradecimentos.....	vii
Índice.....	ix
Abreviaturas.....	xiii
Resumo.....	xv
Summary.....	xix
Introdução.....	1
Objetivos.....	15
Material e Métodos.....	17
1) Material Vegetal e inoculação da bactéria.....	17
2) Descrição dos tratamentos.....	18
3) Medidas das plantas no telado.....	19
3.1) Assimilação de CO ₂ , transpiração e condutância estomática.....	19
3.2) Potencial da água na folha.....	21
3.3) Umidade do substrato.....	22
3.4) Déficit de pressão de vapor (DPV _{f-ar}).....	22
4) Análises laboratoriais.....	23
4.1) Análise de ácido abscísico (ABA).....	23
4.1.1) Extração.....	24
4.1.2) Purificação.....	24
4.1.3) ELISA (enzyme-linked sorbent assay).....	24
4.1.4) Protocolo do ensaio imuno-enzimático.....	25
4.1.5) Cálculos da concentração de ABA.....	26
4.1.6) Curva padrão de ABA.....	26
4.2) Análise de ácido 3-indol acético (AIA).....	27
4.2.1) Extração.....	28
4.2.2) Purificação.....	28
4.2.3) Metilação de amostras.....	28
4.2.4) Curva padrão de AIA.....	29

4.3) Análise de carboidratos.....	30
4.3.1) Preparo dos reagentes.....	31
4.3.2) Extração.....	31
4.3.3) Dosagem de açúcares redutores.....	32
4.3.4) Dosagem de açúcares totais.....	32
4.3.5) Dosagem de amido.....	33
4.3.6) Curva padrão de glicose.....	33
4.3.7) Curva padrão de amido.....	34
5) Análise estatística.....	35
Resultados.....	37
1) Primeiro ciclo de Deficiência hídrica.....	37
1.1) Trocas gasosas.....	37
1.2) Relações hídricas.....	43
1.3) Conteúdo de ácido abscísico.....	46
1.4) Conteúdo de carboidratos.....	48
2) Segundo ciclo de Deficiência hídrica.....	50
2.1) Trocas gasosas.....	50
2.2) Relações hídricas.....	57
2.3) Conteúdo de ácido abscísico.....	59
2.4) Conteúdo de carboidratos.....	61
3) Terceiro ciclo de Deficiência hídrica.....	65
3.1) Trocas gasosas.....	65
3.2) Relações hídricas.....	74
3.3) Conteúdo de ácido abscísico.....	77
3.4) Conteúdo de carboidratos.....	79
4) Conteúdo de ácido 3-indol acético.....	84
5) Interações entre os resultados.....	85
Discussão.....	89
Conclusões.....	111
Literatura Citada.....	113

ABREVIATURAS

<i>A</i>	Taxa de assimilação de CO ₂
ABA	Ácido abscísico
AIA	Ácido 3-indol acético
ATP	Adenosina tri-fosfato
BHT	Hidroxitolueno butilado (2,[6]-di-tert-butil-p-cresol)
BHA	Hidroxianisol butilado (2,[3]-t-butil-4-hidroxianisol)
CVC	Clorose Variegada dos Citros
DFFFA	Densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos
DPV _{f-ar}	Déficit de pressão de vapor entre o ar e a folha
<i>E</i>	Taxa de transpiração
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay (ensaio imuno-enzimático)
<i>g</i>	Condutância estomática
IRGA	Infra Red Gas Analyser (Analisador portátil de fotossíntese)
PCR	Polymerase chain reaction (Reação em cadeia de polimerase)
3-PGA	Ácido 3-fosfo glicérico
PSI	Plantas sadias irrigadas
PSNI	Plantas sadias não irrigadas
PDI	Plantas doentes irrigadas
PDNI	Plantas doentes não irrigadas
Rubisco	Ribulose bis-fosfato carboxilase-oxigenase
TBST	Tampão Tris salino
TRIS	Hidroximetil amino metano
Ψ	Potencial da água na folha

RESUMO

Laranjeiras 'Pêra' (*Citrus sinensis* L. Osbeck) enxertadas sobre limoeiros 'Cravo' (*Citrus limonia* Osbeck) de um ano de idade foram infectadas pela bactéria *Xylella fastidiosa*, responsável pela doença Clorose Variegada dos Citros (CVC), pelo método de encostia. As laranjeiras crescidas em vasos de 100,0 L foram mantidas em telado, para impedir a entrada de cigarrinhas, vetores da bactéria. Seis meses após a inoculação, foi confirmada a presença da bactéria por meio da análise de PCR (reação em cadeia de polimerase). Como foi verificado que a deficiência hídrica (DH) intensifica os efeitos da CVC no campo, as plantas foram submetidas a três ciclos de DH no período de um ano (março e outubro de 1998 e abril de 1999) e divididas em quatro tratamentos: plantas saudas irrigadas (PSI); plantas saudas não irrigadas (PSNI); plantas doentes irrigadas (PDI) e plantas doentes não irrigadas (PDNI). No primeiro e segundo ciclos de DH, as taxas de fotossíntese (A), transpiração (E) e a condutância estomática (g) das plantas não irrigadas foram diminuindo à medida que o estresse foi se tornando mais severo. Os valores de A de PSNI e PDNI ficaram nulos após dez dias de deficiência hídrica. As plantas doentes foram as mais sensíveis ao aumento de DPV_{f-ar} (déficit de pressão de vapor entre o ar e a folha) durante o dia. As altas concentrações de ácido abscísico (ABA) encontradas em plantas não irrigadas, podem justificar a baixa condutância estomática verificada. No primeiro ciclo, as concentrações de amido e sacarose foram maiores em PSI quando comparada com os outros tratamentos (PDI, PSNI e PDNI). No segundo ciclo de DH, as concentrações de amido das plantas não irrigadas em relação às plantas irrigadas foram menores e não ocorreram diferenças entre as plantas saudas e doentes irrigadas. No terceiro ciclo de DH, os valores de A , g e E das plantas doentes foram, geralmente, menores que o das saudas. A fotossíntese, condutância estomática e a transpiração das plantas saudas

apresentaram, em todos os ciclos, os mesmos padrões de resposta quando as plantas foram submetidas à deficiência hídrica. A queda do potencial da água na folha das plantas saudas foi mais rápida após a suspensão da irrigação, pois as plantas saudas transpiraram mais e, portanto, o teor de umidade do substrato diminuiu mais rapidamente. As plantas doentes não irrigadas transpiraram menos que as plantas saudas, possivelmente, em decorrência das obstruções do sistema condutor de água por gomas, tiloses e agregados de bactérias. A fotossíntese das plantas infectadas há dois anos pela bactéria *Xylella fastidiosa* foi menor que nas plantas saudas, a partir do horário do dia em que a temperatura, radiação e déficit de pressão de vapor entre o ar e a folha aumentaram. Quando se suspendeu a irrigação das plantas doentes no terceiro ciclo, não foi possível detectar aumento de ABA, sugerindo que outros fatores poderiam estar atuando para que ocorresse diminuição da condutância estomática nestas plantas. A presença da bactéria *Xylella fastidiosa* não acarretou em aumento das concentrações de ácido 3-indol acético nas folhas. Após três ciclos de deficiência hídrica, ocorreu diminuição nas concentrações de ácido 3-indol acético nas plantas saudas e doentes no dia de estresse mais severo quando comparadas com os controles irrigados. No terceiro ciclo, as concentrações de amido das plantas doentes foram mais baixas que nas plantas saudas, independentemente da deficiência hídrica. Este fato poderia estar relacionado com a necessidade das plantas doentes utilizarem as reservas, visto que houve queda significativa da fotossíntese.

SUMMARY

'Pêra' sweet orange plants (*Citrus sinensis* L. Osbeck) grafted on 'Rangpur' lime rootstock (1 yr-old) (*Citrus limonia* Osbeck) were inoculated with *Xylella fastidiosa*, a xylem-limited bacterium pathogen, which causes Citrus Variegated Chlorosis (CVC), by using the spliced approach grafting method. These plants were cultivated in 100,0 L pots under a screen house to prevent CVC-insect-vectors. Six months after inoculation, leaves were assayed by PCR (polymerase chain reaction) to confirm the bacteria in its tissues. Since it was known that water deficiency in the field enhances CVC-effects on the plant, the trees were submitted to three cycles of water stress in one year term (March and October, 1998; and April, 1999) and divided in four treatments: healthy plants (HP); water-stressed healthy plants (WSHP); diseased plants (DP) and water-stressed diseased plants (WSDP). The photosynthesis (A) and transpiration (E) rates, and stomatal conductance (g) of water-stressed plants decreased in the first and second cycles of water deficiency, as the stress was increasing. The values of A for WSHP and WSDP were near zero after ten days of water deficiency. Diseased plants were more sensitive to the increase in VPD_{l-air} (vapor pressure deficit between the air and the leaf) during the day. The low stomatal conductance verified may be due to the high concentrations of abscisic acid (ABA) found in water-stressed plants. In the first cycle, the concentrations of starch and sucrose were greater in HP when compared with the other treatments (DP, WSHP and WSDP). In the second cycle of water deficiency, starch concentrations in water stressed plants were lower in relation to the irrigated ones; and there were no differences between the healthy and diseased irrigated plants. In the third cycle, values of A , g and E in diseased plants were, usually, lower than the healthy ones. In healthy plants, A , g and E showed the same response when these plants were submitted to water deficiency, independently of the cycle. The drop of leaf water potential in healthy plants was faster after irrigation was withheld,

because healthy plants transpired more and, therefore, the substrate water content decreased more quickly. WSDP transpired less than the healthy plants, possibly due to the xylem occlusions by gums, tyloses and bacteria aggregates. In plants infected for two years, the photosynthesis rates were lower than the healthy plants, starting from the time of the day that temperature, radiation and VPD_{l-air} increased. When the irrigation of WSDP was withheld in the third cycle, it was not possible to detect increases in ABA contents, suggesting that other factors could be acting to diminish the stomatal conductance in these plants. The presence of *Xylella fastidiosa* did not induce to an increase in indole-3-acetic acid content in the leaves. After three cycles of water deficiency, the concentrations of indole-3-acetic acid in WSHP and WSDP were lower than those concentrations in the irrigated controls, on the day water stress was more severe. In the third cycle, the concentrations of starch were lower in diseased plants compared to the healthy ones, independently of water deficiency. This fact could be related to the requirement for reserves in diseased plants, as they showed significant decreases in photosynthesis rates.

INTRODUÇÃO

A Clorose Variegada dos Citros (CVC) é uma doença causada pela bactéria *Xylella fastidiosa*, gram-negativa. As bactérias pertencentes a este grupo crescem no fluido do xilema que, apesar de conter baixas concentrações de compostos orgânicos (fontes de energia disponível), contém uma diversidade de aminoácidos, ácidos orgânicos e íons inorgânicos, que são essenciais para a bactéria (Purcell & Hopkins, 1996). A bactéria é transmitida por insetos sugadores, principalmente cigarrinhas da família *Cicadellidae*, que se alimentam da seiva do xilema (Hill & Purcell, 1995; 1997). Além de causar danos em citros (família *Rutaceae*), outras doenças estão também associadas com este grupo de bactérias limitadas ao xilema, tais como, a doença de Pierce da videira, a doença 'phony peach' no pessegueiro, a escaldadura da folha da ameixeira ('plum leaf scald'), doenças em café, carvalho, alfafa e em diversas outras plantas que não possuem importância econômica (Hopkins, 1989). Aproximadamente, trinta famílias de monocotiledôneas e dicotiledôneas são hospedeiras conhecidas da *Xylella fastidiosa*, entretanto, muitas não desenvolvem sintomas quando infectadas (Sherald & Lei, 1991).

A CVC foi primeiramente identificada no Brasil em 1987, em pomares do Triângulo Mineiro e no norte e noroeste do Estado de São Paulo. Embora essas regiões sejam as mais afetadas até hoje, a CVC já está presente em quase todas as áreas citricolas do país (Chang *et al.*, 1993; Lima *et al.*, 1996), manifestando-se, principalmente, em laranja doce (*Citrus sinensis* L.). Devido à maior severidade da doença nas regiões norte e oeste do Estado de São Paulo, há indicações de que a deficiência hídrica e/ou as temperaturas elevadas favoreçam o desenvolvimento da doença (Gravena *et al.*, 1997). Além disso, os citros adaptam-se melhor a climas temperados e úmidos e a solos bem drenados, que possuem menor capacidade de retenção de água e que favorecem a manifestação de deficiência hídrica.

As folhas de plantas com CVC, em geral, são menores do que as das plantas saudáveis, com teores mais baixos de zinco e potássio e apresentam pequenas bolhas na face abaxial. Essas bolhas se rompem formando pequenas lesões que correspondem às manchas cloróticas da face adaxial. Os frutos destas plantas são pequenos, endurecidos, amarelecem precocemente e se apresentam em maior número quando comparados com os das plantas saudáveis (Rossetti *et al.*, 1991). A maioria dos sintomas desta doença, tais como, necrose marginal das folhas, crescimento lento na primavera e declínio do vigor levando à morte da planta, sugere a disfunção do sistema condutor de água (Hopkins, 1989). Em algumas doenças vasculares, o estresse hídrico está relacionado com a oclusão do sistema vascular (Cohen *et al.*, 1983; Brilansky *et al.*, 1984). Em palmeira infectada por *Fusarium*, além das oclusões, ocorreu também redução no diâmetro do xilema, o que resultou na diminuição do fluxo de água (Mepsted *et al.*, 1995a,b). As células bacterianas, gomas e tiloses bloqueiam os vasos xilemáticos de plantas infectadas pela *Xylella fastidiosa*, entretanto, há divergência em relação à capacidade destas oclusões xilemáticas produzirem deficiência hídrica (Anderson & French, 1987; Evert, 1987).

Tanto a CVC como a deficiência hídrica associada a uma doença podem afetar vários aspectos da fisiologia da planta, tais como, as relações hídricas, as taxas fotossintéticas e transpiratórias, as respostas estomáticas, a produção de fotoassimilados, o conteúdo de hormônios vegetais, entre outros.

A água é o maior constituinte das células vegetais, sendo o fluxo de água necessário para o aumento do tamanho da célula e a manutenção da sua turgescência. As relações hídricas de plantas doentes podem ser afetadas em função de distúrbios no funcionamento dos estômatos e do aumento da resistência ao fluxo e/ou à absorção de água pelas raízes, tornando as plantas hospedeiras mais sensíveis à deficiência hídrica. Há casos em que sintomas de

deficiência hídrica ocorrem mesmo em condições adequadas de umidade do solo (Daly, 1976; Duniway, 1976). Plântulas de limoeiros (*Citrus jambhiri* Lush.) apresentaram sintomas visíveis de murcha nas folhas apenas 24 horas após a inoculação de *Fusarium solani*, ocorrendo também diminuição da condutância estomática, do potencial de água na folha e do conteúdo relativo de água. A transpiração e a condutividade da raiz foram menores em plantas doentes, mas a condutividade do tronco foi semelhante à das plantas saudáveis. Assim, os sintomas de murcha estariam relacionados com a incapacidade das raízes de suprirem água para as folhas (Nemec *et al.*, 1986).

Em citros com declínio, doença que afeta as relações hídricas, houve redução na condutividade hidráulica dos vasos do xilema em tronco, ramos e raízes (Hopkins, 1988). Além disto, estas plantas apresentaram condutâncias estomáticas e taxas de transpiração diurna menores, quando comparadas com plantas saudáveis. Plantas com declínio apresentaram folhas pequenas, em menor número e, conseqüentemente, com menor índice de área foliar por árvore (Syvertsen & Albrigo, 1980; Sinclair *et al.*, 1983). Folhas de videiras, com sintomas da doença de Pierce, também apresentaram menor potencial de água na folha e menor turgescência celular ao meio-dia, quando comparadas com folhas de plantas saudáveis (Goodwin *et al.*, 1988 a,b).

As folhas de citros com CVC apresentaram sintomas de deficiência hídrica, associados com decréscimos significativos nas taxas de assimilação de CO₂ e de transpiração. O decréscimo na taxa de assimilação estaria relacionado com os baixos valores de condutância estomática. Esses sintomas parecem ser decorrentes do aumento da resistência ao fluxo de água no xilema e não de alterações no funcionamento dos estômatos (Machado *et al.*, 1994). Em geral, o status de água na planta em casos de deficiência hídrica no campo é muito bem controlado pela planta (Tardieu, 1996). Os decréscimos na condutância estomática, na assimilação de CO₂ e na taxa de crescimento, são algumas das primeiras indicações em citros

submetidos ao estresse hídrico (Marler & Davies, 1988; Davies & Bower, 1994). Em laranjeiras, quando essa deficiência torna-se mais prolongada ou excessiva, pode ocasionar a perda das folhas, secagem progressiva nas extremidades dos ramos e drástica redução da produção dos frutos, uma vez que a abscisão das flores e frutos pode ser desencadeada (Syvertsen, 1999). Em casos de estresses muito rápidos e severos, a deficiência hídrica pode causar eventos ainda mais catastróficos tais como, a embolia do xilema e a desidratação celular.

É bem estabelecido que os processos das trocas gasosas nas folhas estão correlacionados, pois tanto os fluxos de CO₂, como o de vapor de água, são condicionados pela densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFFA), pelo déficit de pressão de vapor (DPV) e pela abertura dos estômatos (Germanà & Sardo, 1996). A condutância estomática em citros aumenta à medida que a DFFFA aproxima-se da saturação, ao redor de 500 $\mu\text{mol quanta/m}^2.\text{s}$ o que representa 25% da radiação plena do sol (Syvertsen, 1999). O DPV pode ser considerado como um índice que mede o poder de desidratação do ar, portanto, quanto maior o déficit, maior a taxa de evaporação de uma superfície úmida. Mesmo quando o solo está próximo da capacidade de campo, a condutância estomática pode ser reduzida pela alta demanda evaporativa decorrente do aumento do DPV (Syvertsen & Lloyd, 1994, Medina *et al.*, 1999). Em citros, a assimilação de CO₂ é muito sensível ao DPV que, por sua vez, induz decréscimo na condutância estomática, mas não necessariamente nas taxas de transpiração, reduzindo, assim, a eficiência do uso da água (Brakke & Allen, 1995). Em regiões de alto DPV, alguns frutos possuem grossas camadas de cera que oferecem uma barreira à perda de água afetando também as trocas gasosas (Hagenmaier & Baker, 1993).

Em condições de deficiência hídrica, ocorre decréscimo na atividade e na concentração da ribulose bisfosfato carboxilase-oxigenase (Rubisco) que limita a capacidade fotossintética de folhas, como foi observado em laranjeiras 'Valência'. Nestas plantas, os estômatos mantêm-se

fechados durante vários dias, mesmo após a reirrigação (Vu & Yelenosky, 1988a). Este fato foi constatado em várias outras espécies e é considerado o principal efeito pós-estresse, propiciando a inibição da perda de água (Chaves, 1991). Limoeiros e laranjeiras, que permaneceram sem irrigação, após a reirrigação dos vasos, apresentaram rápida recuperação do potencial da água na folha, mas a condutância estomática demorou a alcançar as mesmas taxas pré-estresse (Ruiz-Sánchez *et al.*, 1997; Medina & Machado, 1998).

A fotossíntese é essencial para o crescimento da planta sendo a fonte de carbono para as moléculas orgânicas e para a produção de carboidratos. As folhas de citros apresentam baixas taxas de assimilação de CO₂ (entre 8,0 e 10,0 µmol/m².s), quando comparadas com outras espécies perenes. Frequentemente, os citros apresentam depressão da fotossíntese ao meio-dia, diminuindo o suprimento interno de carbono. Por outro lado, as folhas sempre verdes dos citros podem assimilar carbono durante todo o ano compensando, assim, esse baixo suprimento (Waring, 1991; Brakke & Allen, 1995; Goldschmidt & Koch, 1996).

As folhas de citros são um importante compartimento de reserva de carboidratos, sendo o amido a principal forma de reservas (Goldschmidt & Golomb, 1982). Em condições de deficiência hídrica, é comum que ocorra decréscimo de amido e acúmulo de açúcares solúveis em folhas dessecadas. Esse último ocorre também em condições de alta concentração de CO₂ e baixas taxas de transporte de açúcares solúveis ou baixa demanda para os drenos (Schulze, 1986; Chaves, 1991). O efeito da deficiência hídrica na distribuição de fotoassimilados foi verificado em quatro espécies: eucalipto, girassol, videira e plantas de tremoço. Em todas, ocorreu decréscimo de amido em folhas estressadas, no entanto, a sacarose foi mantida em quantidades similares ou até maiores do que nas plantas controle, apesar das taxas de fotossíntese, observadas no campo, terem sido menores do que das plantas sem restrição de água (Quick *et al.*, 1992). Laranjeiras 'Valência' sob estresse hídrico também apresentaram

diminuição nas concentrações de amido e sacarose e aumento na concentração de açúcares redutores quando comparados com seus controles (Vu & Yelenosky, 1988b). Em folhas de milho e girassol a deficiência hídrica causou redução nas reservas de sacarose e outros metabólitos, tais como, 3-fosfo-gliceraldeído e malato (Lawlor & Fock, 1978). Os autores interpretaram que esta redução, provavelmente, não foi devida ao decréscimo das concentrações das enzimas responsáveis pela síntese de sacarose, mas, sobretudo, a mudanças de direção dos fluxos metabólicos. O carbono orgânico foi utilizado, provavelmente, para a produção de aminoácidos, tais como, glicina, serina e aminas como a glutamina. Observações similares foram constatadas em outras espécies durante períodos de deficiência hídrica (Hubac & Vieira Silva, 1980). Estes eventos podem contribuir para o ajuste osmótico que reduz os danos nos tecidos e garante a sobrevivência quando ocorre a perda de turgescência. Isto porque a concentração de açúcares torna o potencial das células mais negativo, evitando assim, a perda de água (Munns & Weir, 1981). Porém, em citros, a deficiência hídrica não promove ajuste osmótico (Syvertsen & Albrigo, 1980; Syvertsen *et al.*, 1981; Savé *et al.*, 1995). Na patogênese, a sacarose é utilizada como a principal fonte de carbono para o patógeno. Ao mesmo tempo, hexoses são produzidas pelo hospedeiro, como mecanismo de resistência à infecção, para a síntese de parede celular, para a produção de caloses, fitoalexinas, gomas e outros glucanos (Avigad, 1982).

A predisposição do hospedeiro ao ataque do patógeno pode estar relacionada com vários fatores: deficiência hídrica, alterações hormonais, condições ambientais, etc. Em certas doenças, o desequilíbrio hormonal é, provavelmente, consequência do estresse hídrico induzido pela infecção (Boyer, 1995).

Os hormônios agem como sinalizadores para estimular ou inibir o crescimento ou regular o desenvolvimento nas plantas. Estas substâncias naturais exercem sua ação,

provavelmente, por meio de receptores específicos em células, que transformam sinais em eventos bioquímicos e fisiológicos específicos (Fosket, 1994). Ataques de patógenos podem alterar as concentrações destes hormônios. A inter-relação de hormônios pode dificultar o estudo de um determinado problema, uma vez que eles agem simultaneamente em cada situação. Auxinas e giberelinas controlam o alongamento, enquanto que elas, juntamente com citocininas, controlam a divisão e a subsequente diferenciação celular. A combinação de auxina e etileno influencia o crescimento enquanto que o ácido abscísico, o etileno e as citocininas estão associados com processos da abscisão foliar em citros (Goldschmidt, 1980; Sagee *et al.*, 1980). Citocininas endógenas estão relacionadas com o crescimento da parte aérea e esta pode influenciar a taxa de produção de citocininas nas raízes (Hendry *et al.*, 1982 a,b). Na patogênese, concentrações alteradas destes hormônios podem estar relacionadas com sintomas como o aparecimento de tumores, epinastia, queda das folhas, atrofia, etc...

As respostas das plantas de citros ao estabelecimento e desenvolvimento da bactéria *Xylella fastidiosa* nos tecidos, podem estar relacionadas às alterações hormonais. Não se sabe se tais desequilíbrios são causa ou resultado da infecção, tornando-se assim primordial entender a fisiologia dos hormônios vegetais na patogênese.

A produção de ácido abscísico (ABA) em tecidos de citros é de grande importância pelo seu papel na senescência, no movimento estomático e por seu efeito indireto na abscisão. O acúmulo de ABA está, geralmente, associado com a deficiência hídrica, mas pouco se sabe sobre a sua influência no desenvolvimento de doenças. Steadman & Sequeira (1969) apresentaram a primeira evidência de que ocorreram concentrações elevadas de ABA, como consequência da patogênese. Aparentemente, o ABA estava presente, em maiores concentrações, em folhas de tabaco infectados por *Pseudomonas solanacearum* do que em tecidos sadios. Uma vez que o patógeno não sintetiza ABA *in vitro*, sugeriu-se que o aumento

observado nesses tecidos foi devido a uma resposta do hospedeiro ao patógeno. Os autores propuseram que o aumento nas concentrações de ABA estaria relacionado com a paralisação do crescimento observado nas plantas. Eles também encontraram uma relação entre concentrações elevadas de ABA e sintomas de murcha observados em plantas infectadas por *Pseudomonas solanacearum*. Em videira, também ocorreu aumento de ABA em folhas com sintomas da doença de Pierce, quando comparadas com as plantas sadias (Goodwin *et al.*, 1988b). Estas observações indicam a complexa natureza da interação hospedeiro-patógeno e enfatizam como o metabolismo do tecido infectado pode ser afetado por alterações de hormônios vegetais.

O aumento do conteúdo de ABA em plantas, principalmente nas raízes, pode estar relacionado com o teor de água no solo. Assim, quando as plantas passam por um período de deficiência hídrica, ocorre aumento da biossíntese de ABA nas raízes (Zhang & Davies, 1987; Zhang *et al.*, 1987; Gowing *et al.*, 1990; Zhang & Davies, 1990; Parry & Horgan, 1991; Parry *et al.*, 1992). Este ABA é transportado para a parte aérea, via xilema, e pode promover o fechamento estomático. Embora o ABA também possa ser transportado da parte aérea para as raízes, via floema, experimentos envolvendo bloqueio dos vasos do floema demonstraram que as raízes têm capacidade de sintetizar ABA. Este hormônio, por sua vez, influencia a condutividade hidráulica e o crescimento das raízes (Walton *et al.*, 1976; Cornish & Zeevaart, 1985, Gomes *et al.*, 1997).

O ABA em plantas é sintetizado a partir do metabolismo do ácido mevalônico, envolvendo a clivagem de um carotenóide oxigenado, possivelmente o 9'-cis-neoxantina, que produz xantoxinas que, finalmente, são convertidas em ácido abscísico (Rock & Zeevaart, 1990; Hoffman-Benning & Kende, 1992; Rock *et al.*, 1992; Cowan & Richardson, 1993). A relação entre a biossíntese de ABA e a desidratação das raízes varia entre as espécies e a razão

desta variação é desconhecida (Zhang & Tardieu, 1996). Não está claro, também, como as raízes regulam a concentração de ABA ou o fluxo de ABA no xilema, em resposta à deficiência hídrica no solo (Liang *et al.*, 1997). O aumento da concentração do ABA no xilema é uma resposta sequencial. O primeiro aumento sendo derivado das raízes e o subsequente, pelo menos parcialmente, das folhas estressadas (Zhang & Davies, 1989; Neales & McLeod, 1991). Tardieu & Davies (1993) desenvolveram um modelo integrando as relações hídricas e os sinais químicos, que controlam a condutância estomática das plantas em solo seco. Pelas simulações realizadas, estes autores concluíram que a mensagem das raízes seria capaz de fazer com que a planta verificasse as condições de extração da água do solo (status de água do solo e resistência ao fluxo de água) numa escala diária enquanto que, num longo prazo, a resposta da planta a esta mensagem dependeria da demanda evaporativa.

O transporte de ABA no apoplasto da folha, do xilema para a epiderme, é influenciado, dentre outros fatores, pelo pH, pela sua biossíntese e pelo seu metabolismo. O ABA é distribuído pelos compartimentos celulares das folhas através da difusão pela membrana por gradientes de pH. O ABA atravessa as membranas na forma protonada (ABAH). Nos compartimentos alcalinos (citosol ou estroma do cloroplasto), ele se dissocia no ânion ABA⁻. O primeiro sítio de ação do ABA, na regulação do movimento estomático, é a membrana externa da célula guarda. Em condições de estresse hídrico, o pH do apoplasto e as propriedades de captura do ânion são aumentadas, favorecendo o rápido acúmulo de ABA no seu sítio de ação (Hartung *et al.*, 1990).

Experimentos com mutantes de tomate do tipo *wilty*, que não são capazes de produzir ABA, sugerem que as plantas necessitam de ABA para manter um balanço positivo de água. Entretanto, não está bem claro se o controle estomático em plantas estressadas pode ser inteiramente explicado pelas modificações nas concentrações de ABA ou se, ainda, é necessário

alguma regulagem hidráulica (Bradford *et al.*, 1983). Munns & King (1988) verificaram que o ABA pode não ser o único inibidor da abertura estomática presente na corrente transpiratória. Em experimentos de campo, a sensibilidade de estômatos de milho às concentrações de ABA variou muito conforme o horário do dia. Sugeriu-se que isto ocorreu devido às mudanças no potencial da água na folha e da epiderme que aumentaram com a irradiância e o déficit de saturação à medida que o dia progrediu, logo, variações hídricas na epiderme poderiam agir como moduladores da resposta do estômato ao ABA (Tardieu *et al.*, 1992). Tardieu *et al.* (1996), estudando diversas espécies, concluíram que a condutância estomática, geralmente, esteve correlacionada com o potencial da água na folha, sugerindo que não são apenas as mensagens químicas entre a raiz-parte aérea que desempenhariam um papel importante no controle estomático. Em *Lupinus albus* L., sujeito a moderado estresse hídrico, ocorreu acúmulo de ABA no xilema suficiente para justificar a depressão na condutância estomática. Entretanto, quando a deficiência hídrica tornou-se mais severa, não foi possível estabelecer correlação entre o conteúdo de ABA e a condutância estomática (Correia & Pereira, 1995). Socias *et al.* (1997) não encontraram relações coerentes entre a condutância estomática em relação aos teores de ABA e o potencial da água na folha em plantas de trevo mantidas irrigadas.

As auxinas, a segunda classe de hormônios que será enfocada neste estudo, são sintetizadas nas plantas em regiões de crescimento ativo, como o meristema apical, as gemas axilares, as folhas jovens e os meristemas das raízes, sendo transportadas para diferentes órgãos onde atuam no mecanismo interno que controla o crescimento. O ácido 3-indol acético (AIA) está relacionado com o crescimento do caule, das folhas e das raízes, a indução de atividade cambial em plantas lenhosas, a dominância apical e o desenvolvimento da flor e do fruto.

As auxinas já foram detectadas em vários tecidos e órgãos dos citros (El Otomani *et al.*, 1995; Kojima *et al.*, 1994, 1996; Kojima, 1997). Em plantas vasculares, ela é metabolizada, principalmente, por duas vias: degradação oxidativa pela AIA oxidase ou peroxidase e formação de compostos conjugados com aminoácidos ou açúcares (Cohen & Bandurski, 1982; Plummer *et al.*, 1991).

O AIA pode influenciar a sensibilidade do estômato ao ABA. A relação dose/resposta entre ABA e fechamento estomático em epiderme isolada de milho, pôde ser consideravelmente modificada pela auxina (Snaith & Mansfield, 1982a). A auxina aplicada exógenamente em *Commelina communis* teve um papel determinante na abertura dos estômatos, em ambas as superfícies da folha, em diferentes condições ambientais (Pemadasa, 1982).

O ABA e o AIA são ácidos fracos e possuem os mesmos valores de pK (4,8), coeficiente de partição entre as membranas, portanto, seria esperado que o AIA e o ABA se redistribuíssem na planta da mesma forma durante estresse hídrico (Hartung *et al.*, 1992). Porém, estes dados não são coerentes com o possível papel do AIA como antagonista do ABA na resposta estomática porque, em condições de deficiência hídrica, as concentrações de AIA aumentariam em paralelo com as de ABA e isto provocaria a diminuição nos efeitos do ABA nas células guarda dos estômatos (Hartung *et al.*, 1992).

Alguns trabalhos sugerem que o ABA não é o único sinal responsável pelas respostas estomáticas em plantas que são submetidas a ciclos de estresse e reirrigação, porque o tempo do fechamento estomático, e subsequente recuperação, não estão relacionados com o acúmulo e com o declínio do ABA nas folhas. Alguns destes casos podem ser devidos à redistribuição do ABA pré-existente nas folhas. Se as concentrações de AIA também variam em folhas estressadas, então, é possível explicar a imperfeita correlação entre o ABA e a resposta estomática (Hartung *et al.*, 1992). Há poucas evidências das variações de AIA em plantas

submetidas à deficiência hídrica mas foi verificado, em arbustos da região mediterrânea, que a concentração de AIA aumentou nos primeiros dias de estresse e declinou após o terceiro dia. Nos dias subseqüentes, não houve diferença na concentração de AIA entre as plantas irrigadas e as plantas estressadas, enquanto que essas últimas, apresentaram aumento das concentrações de ABA durante todo o período de deficiência hídrica (Lopez-Carbonell *et al.*, 1996).

As auxinas acumulam-se, geralmente, em altas concentrações em plantas doentes e são produzidas por um amplo espectro de microrganismos, particularmente se seu precursor, o triptofano, estiver disponível. Isto porque está bem estabelecido que alguns microrganismos têm a capacidade de converter triptofano em AIA (Normanly *et al.*, 1995; Patten & Glick, 1996; Lindow *et al.*, 1998). O acúmulo de triptofano e outros aminoácidos aromáticos em tecidos doentes é atribuído, prioritariamente, ao aumento das taxas de síntese destas substâncias decorrentes da atividade acelerada da rota do ácido chiquímico (Sequeira, 1963; Matta & Gentile, 1968; Pegg & Sequeira, 1968). A primeira resposta da planta à produção elevada de auxina é o afrouxamento da parede celular. Em plantas infectadas por bactérias, pode ocorrer acúmulo de AIA ('hiperauxinia'), e não se sabe se tal aumento está relacionado à produção de auxina pelo patógeno, ao aumento de produção de auxina pelo hospedeiro, à suspensão do processo normal de degradação de hormônio (AIA oxidase) ou ainda, à alguma relação causal entre acúmulo de AIA e estabelecimento do patógeno no tecido hospedeiro (Goodman *et al.*, 1986). Há ocorrências de estímulo da produção de pêlos radiculares e iniciação lateral das raízes a partir do AIA produzido por fungos e bactérias (Costacurta & Vanderleyden, 1995; Tuomi & Rosenqvist, 1995). Os experimentos de Costacurta *et al.* (1998) concluíram que a biossíntese de AIA pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* foi aumentada na presença de extratos de plantas de citros. Porém, a natureza dos compostos que levam à biossíntese de AIA ainda é desconhecida. O zinco é um nutriente essencial para a

síntese de triptofano, precursor da auxina. Plantas de café deficientes em zinco, possuem entrenós, pecíolos e pedicelos curtos, área foliar e frutos menores. Estas características morfológicas externas são as mesmas apresentadas pelas plantas de café, infectadas pela *Xylella fastidiosa*. Sugeriu-se, então, que a bactéria, de algum modo, decresceu o teor de zinco na planta, ocasionando menor síntese de AIA e, conseqüentemente, diminuiu a expansão celular e o crescimento e promoveu a senescência (Queiroz-Voltan et al., 1998).

É importante ressaltar que os resultados de estudos de hormônios em plantas sadias e doentes mostraram que as respostas mediadas por hormônios não são, geralmente, devido à atividade de um único hormônio mas o resultado da interação de vários hormônios (Goodman et al., 1986).

O estudo das relações hormonais, das relações hídricas, das trocas gasosas e do conteúdo de fotoassimilados nas respostas de plantas de citros com CVC, irrigadas ou não, pode ajudar no esclarecimento de tais parâmetros na patogênese.

OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi conhecer as variações nas concentrações hormonais de ácido abscísico e ácido 3-indol acético, de carboidratos e estudar as relações hídricas e as trocas gasosas em laranjeiras 'Pêra', enxertadas sobre limoeiros 'Cravo', com Clorose Variegada dos Citros e sadias, submetidas a três ciclos de deficiência hídrica, aplicados no período de um ano.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento de campo foi realizado no Centro de Citricultura Sylvio Moreira do Instituto Agronômico de Campinas, Cordeirópolis (22°34'S; 47°34'O; 689 m de altitude), SP. As plantas permaneceram durante todo experimento em um telado (16X10 m), totalmente fechado para evitar a entrada dos insetos transmissores da bactéria.

1) Material vegetal e inoculação da bactéria

Foram utilizadas mudas, com um ano de idade, de laranjeiras 'Pêra' (*Citrus sinensis* L. Osbeck), enxertadas sobre limoeiros 'Cravo' (*Citrus limonia* Osbeck). Essas mudas foram transplantadas para vasos de 100,0 L com uma mistura de terra:areia:matéria orgânica (3:1:1) e sistema individual de irrigação por gotejamento.

A inoculação da bactéria *Xylella fastidiosa* foi realizada segundo método desenvolvido por Medina *et al.* (1998), que consiste na encostia de ramos de mudas de limoeiro contaminados pela bactéria, no caule das plantas a serem infectadas (fig.1). As mudas de limoeiro foram originadas de sementes de limão 'Cravo', com dois meses de idade, infectadas pela bactéria pela encostia em plantas doentes. Este método mostrou-se eficaz, pois seis meses após a inoculação, todas as plantas inoculadas apresentaram resultado positivo à análise de PCR (cadeia em reação de polimerase) (Pooler & Hartung, 1995). O PCR permitiu identificar a existência da bactéria nas plantas e é um teste de rotina realizado no Setor de Biotecnologia do Centro de Citricultura do IAC. Durante todo o período de experimentação, as plantas foram adubadas e pulverizadas com fungicidas e inseticidas, conforme a necessidade da cultura.



Figura 1: Detalhe do método de encostia para inoculação da bactéria *Xylella fastidiosa*, em laranjeiras ‘Pêra’ enxertadas sobre limoeiros ‘Cravo’, com um ano de idade (Medina *et al.*, 1998). (A) tubete com a planta infectada.

2) Descrição dos tratamentos

No telado, havia oitenta plantas, das quais a metade delas foi inoculada com a bactéria. No experimento, foram utilizadas vinte destas plantas para aplicação dos seguintes tratamentos, com cinco repetições cada:

* **PSI** (Plantas sadias irrigadas): plantas que permaneceram irrigadas, em todas as épocas.

* **PDI** (Plantas doentes irrigadas): plantas que permaneceram irrigadas, nas quais estudou-se a evolução da doença.

* **PSNI** (Plantas sadias não irrigadas): durante três épocas, no período de um ano, interromperam-se as irrigações em março de 1998 (primeiro ciclo de deficiência hídrica, plantas com dois anos e dois meses de idade), outubro de 1998 (segundo ciclo, plantas com dois anos e oito meses) e abril de 1999 (terceiro ciclo, plantas com três anos e dois meses).

* **PDNI** (Plantas doentes não irrigadas): o mesmo tratamento anterior, porém com plantas doentes.

A suspensão da irrigação foi realizada pela retirada do sistema de gotejamento dos vasos e colocação de plásticos na parte superior destes, para evitar a perda de água por evaporação e entrada de água da chuva. A duração do período de suspensão da irrigação foi determinada pelas taxas de fotossíntese das plantas não irrigadas, ou seja, quando estes valores ficavam nulos.

3) Medidas das plantas no telado

3.1) Assimilação de CO₂, transpiração e condutância estomática

As taxas de assimilação de CO₂ e de transpiração e a condutância estomática foram medidas em folhas de ramos previamente escolhidos. As folhas escolhidas tinham, aproximadamente, um ano de idade. No caso das plantas doentes, foram escolhidos ramos que apresentassem folhas com sintomas da doença (fig.2).

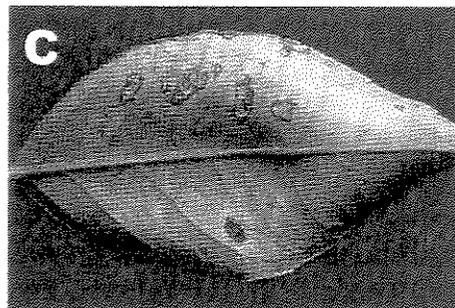
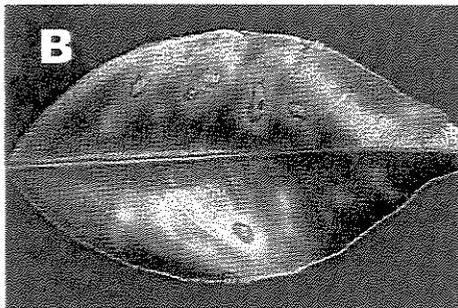


Figura 2: Sintomas característicos da Clorose Variegada dos Citros em laranjeira infectada pela bactéria *Xylella fastidiosa* (Fundecitrus, 1997). (A) Aspecto geral de laranjeira contaminada; (B) Face adaxial de folha com CVC; (C) Face abaxial de folha com CVC.

Estas medidas foram feitas utilizando-se o Sistema Portátil de Medida de Fotossíntese, IRGA (Infra Red Gas Analyser, Li 6200, Licor). A densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFFA) e a temperatura da folha, que é necessária para o cálculo do déficit de pressão de vapor (DPV), também foram registrados pelo IRGA no momento das medidas. A partir da suspensão da irrigação, as medidas foram realizadas em três horários durante o dia (8:30 h, 12:00 h e 15:00 h). Em alguns dias as medidas também foram realizadas às 9:30 h e às 10:30 h. Quando a fotossíntese alcançou taxas próximas ao zero, a irrigação foi reiniciada e avaliou-se o potencial de recuperação das plantas. Cada época de experimento durou, aproximadamente, trinta dias desde a suspensão da irrigação até a total recuperação das plantas.

3.2) Potencial da água na folha

O potencial da água na folha foi medido às 6:00 h e às 14:00 h, utilizando-se a câmara de pressão (Plant Moisture Stress, PMS Instruments). O potencial da água na folha às 6:00 h pode ser utilizado como estimativa do potencial da água no solo (Elfving *et al.*, 1972). Foram escolhidas folhas nos mesmos ramos em que as trocas gasosas foram medidas. As folhas foram envoltas em filme plástico de polietileno, para reduzir a perda de umidade, cortadas dos ramos com lâmina de barbear e medidas, imediatamente, na câmara de pressão, utilizando-se o método proposto por Turner (1981).

3.3) Umidade do substrato

Amostras de substrato foram retiradas dos vasos na porção mediana, por meio de um orifício lateral, e colocadas em vidros que foram, imediatamente, pesados em balança analítica (massa fresca). Após 72 horas de secagem a 100°C, a massa seca foi determinada pela pesagem dos vidros. A umidade relativa do solo foi calculada pela seguinte fórmula:

$$US = \frac{MF - MS}{MS} * 100, \text{ onde:}$$

US = umidade do substrato (%)

MF = massa fresca (g)

MS = massa seca (g)

3.4) Déficit de pressão de vapor (DPV_{f-ar})

As temperaturas do bulbo seco e bulbo úmido, utilizadas para o cálculo do DPV entre a folha e o ar, foram registradas numa mini estação meteorológica (Li-12000S, Licor), instalada no interior do telado, onde estavam localizadas as laranjeiras. O DPV_{f-ar} foi calculado segundo a equação abaixo:

$$e_s(T_f) = 0,61365 \exp\left(\frac{17,502T}{240,97+T}\right);$$

$$e_a = \gamma (T_{ar} - T'_{ar})$$

$$DPV_{f-ar} = e_a - e_s(T_f) = \gamma (T_{ar} - T'_{ar}) - e_s(T_f), \text{ onde:}$$

T_{ar} e T'_{ar} = temperaturas do ar do bulbo úmido e seco, respectivamente (°C)

T_f = temperatura da folha (°C)

γ = constante psicrométrica = -0,0658kPa/ °C

e_a = pressão de vapor atual do ar (kPa)

e_s = pressão de vapor de saturação (kPa)

4) Análises laboratoriais

As análises bioquímicas foram realizadas no Centro de Ecofisiologia e Biofísica do Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas, SP.

4.1) Análise de ácido abscísico

Em cada época de aplicação de deficiência hídrica, nos mesmos dias de medidas de trocas gasosas, foram escolhidas de quatro a seis folhas, no mesmo ramo em que se mediram as trocas gasosas. Nas plantas doentes escolheram-se folhas com sintomas do tipo 3%, de acordo com a escala diagramática (fig.3) de Amorim *et al.* (1993), nas três épocas de experimentos. As folhas foram retiradas, imediatamente colocadas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer (-80°C) até utilização delas para quantificação do ácido abscísico. O método de extração e quantificação foi adaptado do método desenvolvido por Norman *et al.* (1988,1990). No laboratório, as folhas foram maceradas em nitrogênio líquido e liofilizadas durante 72 horas.

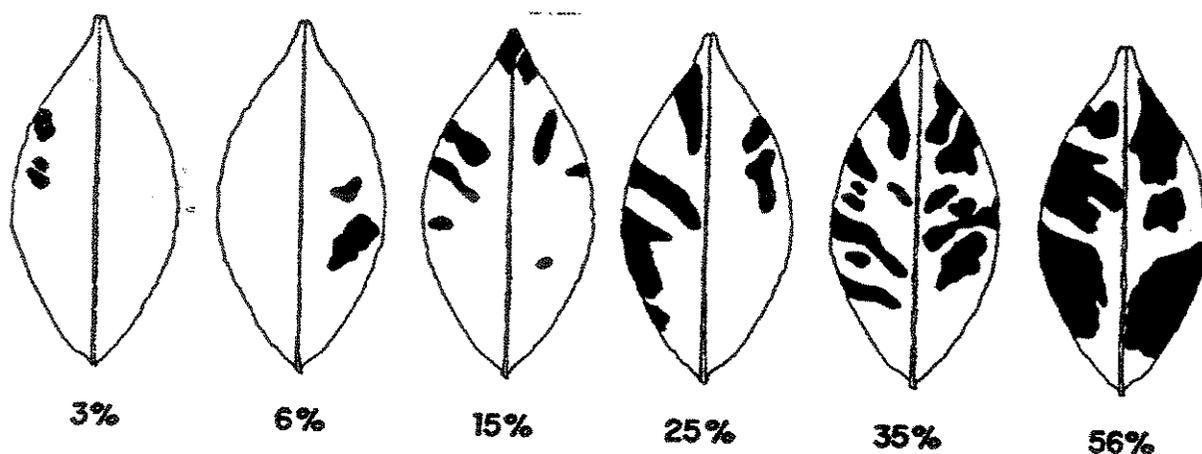


Figura 3: Escala diagramática para avaliação da severidade da Clorose Variegada dos Citros (Amorim *et al.*, 1993). As manchas escuras representam as regiões das folhas com sintomas da doença. A proporção de doença foi obtida pela divisão da somatória das áreas das manchas pela área total de cada folha.

4.1.1) Extração

As folhas maceradas e liofilizadas foram pesadas (50,0 mg) e extraídas em 1,5 mL em 80% acetona (v/v), contendo BHT (hidroxitolueno butilado), 100,0 mg/L e BHA (hidroxianisol butilado), 100mg/L. Os extratos foram mantidos durante duas semanas a 4°C.

4.1.2) Purificação

Uma alíquota do extrato (750,0 µL) foi completada com tampão TBS (tampão tris salino), pH 7,5, até o volume final de 5,0 mL. Este tampão é constituído pelas seguintes substâncias: 6,0 g de TRIS (hidroximetil amino metano); 0,2 g de MgCl₂; 8,8 g de NaCl; 0,1 g de NaN₃ (azida sódica) e 0,5 mL de TWEEN 20 para cada litro de tampão. O pH foi ajustado para 7,5 com HCl concentrado. A amostra foi centrifugada por 9 min, a 10.000 g, e filtradas em membranas de nylon (Millex, 0,22µm). Esse extrato foi analisado diretamente em ensaio imuno-enzimático.

4.1.3) ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay)

Foram utilizados kits de ensaio imuno-enzimático (Phytodetek), para detecção de ácido abscísico. Cada kit é composto por uma placa especial de poliestireno com 96 microcavidades (onde os anticorpos estão adsorvidos), de substância marcadora (três frascos de 1,0 mL), de diluente de marcador (15,0 mL), de solução de lavagem (dois frascos de 30,0 mL), de diluente de substrato (um frasco de 30,0 mL), de tabletes de substrato e de reagente de paralisação (um frasco de 5,0 mL).

O princípio do ensaio é a competição entre o hormônio marcado e o hormônio da amostra, pelos anticorpos adsorvidos na placa. O hormônio marcado com fosfatase alcalina (marcador) é adicionado com o extrato da planta ao anticorpo que está adsorvido às paredes das cavidades da placa. A reação de ligação competitiva é estabelecida entre uma quantidade constante de marcador, uma quantidade limitante de anticorpo e a amostra contendo uma quantidade desconhecida de ABA. O hormônio da amostra compete com o marcador pelos sítios de ligação do anticorpo. O marcador não ligado é lavado antes da adição de substrato. A concentração de hormônio, marcada com fosfatase alcalina, retida na placa será inversamente proporcional à quantidade de hormônio na amostra. Portanto, a cor amarela produzida, em decorrência da reação do substrato p-nitrofenol com a fosfatase alcalina, é inversamente proporcional à quantidade de hormônio na amostra. Por intermédio de uma curva padrão, com concentrações conhecidas de ABA, é possível calcular a concentração de hormônio de cada amostra.

4.1.4) Protocolo do ensaio imuno-enzimático

Um volume de 100,0 μL de cada padrão (verificar item 4.1.6) foi colocado em uma microcavidade da placa, em triplicata. Os extratos (100,0 μL) foram colocados aleatoriamente nas placas com três repetições. Em cada microcavidade foram adicionados 100,0 μL de marcador diluído, utilizando-se pipeta multicanal. As placas foram cobertas com filme selador e incubadas por três horas, a 5 °C. Após a incubação, descartou-se a solução e as microcavidades foram lavadas com 200,0 μL de solução de lavagem. A mistura foi novamente decantada e repetiu-se este último passo mais duas vezes. Adicionaram-se 200,0 μL de solução de substrato a cada cavidade e a placa foi selada e incubada, por 60 min, a 37°C. Após este período,

adicionou-se uma gota de reagente de paralisação a cada microcavidade que agiu por 5 min. Procedeu-se à leitura da densidade ótica num leitor de placa de ELISA, no comprimento de onda de 405 nm.

4.1.5) Cálculos da concentração de ABA

Calculou-se a média das absorvâncias de cada repetição dos padrões e das amostras. A porcentagem de ligação de cada padrão ou amostra foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ de Ligação} = \frac{D.O.(AouP) - D.O.LNE}{D.O.Bo - D.O.LNE} \times 100, \text{ onde:}$$

D.O. (A) = densidade ótica da amostra (nm)

D.O. (P) = densidade ótica do padrão (nm)

B₀ = 100,0 μL de tampão + 100,0 μL de marcador = 100% de ligação

Ligação não específica = 100,0 pmol/ 0,1mL de ABA + 100,0 μL de marcador = 0% de ligação

A relação linear foi calculada utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{Logit } (\%B/B_0) = \text{Ln} \left[\frac{(\%B/B_0)}{100 - (\%B/B_0)} \right]$$

4.1.6) Curva padrão de ABA

Dissolveram-se 0,0246 g de mistura de isômeros de ABA (Sigma) em 100,0 mL de metanol absoluto para obtenção de uma solução estoque de 1,0 mM. A partir desta solução estoque, foram preparados padrões em tampão TBST. Para cálculo da curva padrão foi necessário a leitura de absorvância da ligação não específica (LNE), ou seja, quando se tem excesso de ABA (100,0 pmol de ABA/0,1 mL + marcador) e do branco (tampão + marcador),

que foi equivalente a 100% de ligação dos anticorpos nos sítios de ligação. A linearidade do teste, segundo o fabricante dos kits, é considerada ótima entre 0,02 e 5,0 pmol/0,1mL. Para cada leitura do ensaio no leitor de placa foi incluída uma curva padrão. Todas as curvas dos ensaios realizados seguiram o modelo demonstrado pela fig.4:

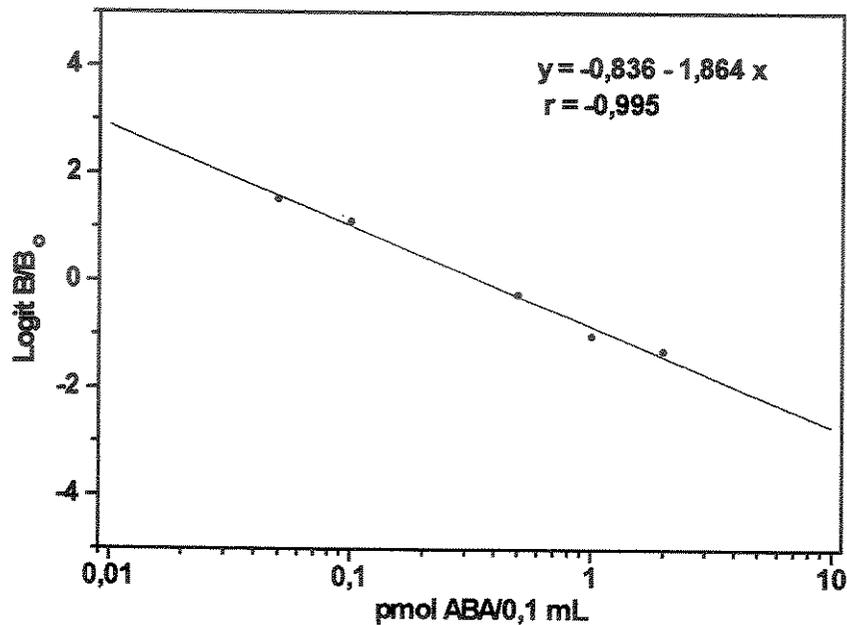


Figura 4: Curva padrão obtida a partir da leitura das densidades óticas das concentrações de ABA (0,05; 0,1; 0,5 pmol; 1,0 e 2,0 pmol de ABA/0,1mL). B= Densidade ótica da ligação do marcador ao anticorpo na presença de ABA (100,0 pmol/0,1mL); B₀= Densidade ótica da ligação do marcador na ausência de ABA. $\text{Logit } B/B_0 = \ln[(B/B_0)/100 - B/B_0]$.

4.2) Análise de ácido 3-indol acético (AIA)

As amostras de folhas, utilizadas nas análises de AIA, foram as mesmas utilizadas para análise de ABA. Os procedimentos de coleta, maceração e armazenamento podem ser verificados no item 4.1.

4.2.1) Extração

Foram pesados 50,0 mg de tecido foliar e colocados em 3,0 mL 80% metanol (v/v), contendo BHT, 100,0 mg/L e BHA, 100mg/L, durante 48h, no escuro, a 4°C.

4.2.2) Purificação

Os extratos foram centrifugados durante 20 min a 10.000 g. Após a centrifugação, 1,5 mL de extrato foi filtrado em membrana de nylon (Millex, 0,22 µm), conectado a uma coluna Sep-Pak C₁₈ (Waters), previamente ativada com metanol 80% (v/v). Após a retirada do filtro, passou-se pela coluna 1,5 mL de meio de extração para retirar o AIA que ficou retido na coluna. O material coletado foi seco num concentrador de amostras e ressuspenso em 1,0 mL de água, pH 2,5 e esse material foi extraído três vezes em éter anidro. O extrato foi seco novamente no concentrador e armazenado, a 5°C, para posterior metilação (Zaffari *et al.*, 1998).

4.2.3) Metilação das amostras

Após a secagem, as amostras foram metiladas com diazometano. A produção do diazometano foi realizada em capela por ser um material tóxico e muito explosivo. O Diazald (p-tolil-sulfonil-metil-nitrosamida) foi pesado (2,14 g) e dissolvido em 30,0 mL de éter num becker em banho com gelo. Em seguida 0,4 g de KOH foi dissolvido em algumas gotas de água, sendo adicionados 10,0 mL de etanol 96% à solução, mantida em becker em banho de

gelo. O conteúdo dos dois beakers foi misturado e colocado no balão do destilador mantido em banho-maria (40°C). A mistura foi destilada a 65°C, obtendo-se assim um líquido amarelo, o diazometano (Vogel, 1956; Schlenk & Gellerman, 1960). O produto foi armazenado, a -20°C, em frasco hermético por, no máximo, uma semana. Após este período, o diazometano perde a atividade. Toda a vidraria usada no preparo da substância foi lavada com ácido acético glacial para desativar o diazometano e o Diazald. O descarte foi feito em frascos e locais apropriados.

Para a metilação foram acrescentados 100,0 µL de diazometano a cada amostra e agitada. Para a garantia de que toda a amostra tenha sido metilada, mais 150,0 µL de diazometano foram adicionados. Após a metilação, adicionaram-se 5,0 mL de tampão TRIS 25,0 mM (3,035 g de TRIS (hidroximetil-amino-metano) e 0,2 g de NaN₃ (azida sódica) por litro), pH7,5.

4.2.4) Curva padrão de AIA

Dissolveram-se 0,01892 g de AIA (ácido 3-indol acético metil éster) em 100,0 mL de metanol absoluto, para obtenção de uma solução estoque de 1,0 mM. A partir desta solução estoque, foram preparadas as soluções padrões em tampão TRIS, pH 7,5. As concentrações escolhidas foram: 1,0; 5,0; 20,0 e 50,0 pmol/0,1mL. Para cálculo da curva padrão foram necessários os valores das densidades óticas da ligação não específica (100 pmol/0,1mL) e do branco (0,0 pmol/0,1mL). A linearidade do teste, segundo o fabricante dos kits, é considerada ótima entre 0,5 e 100,0 pmol/0,1mL. Para cada leitura do ensaio no leitor de placa foi incluída uma curva padrão. Todas as curvas dos ensaios realizados seguiram o modelo demonstrado pela fig.5:

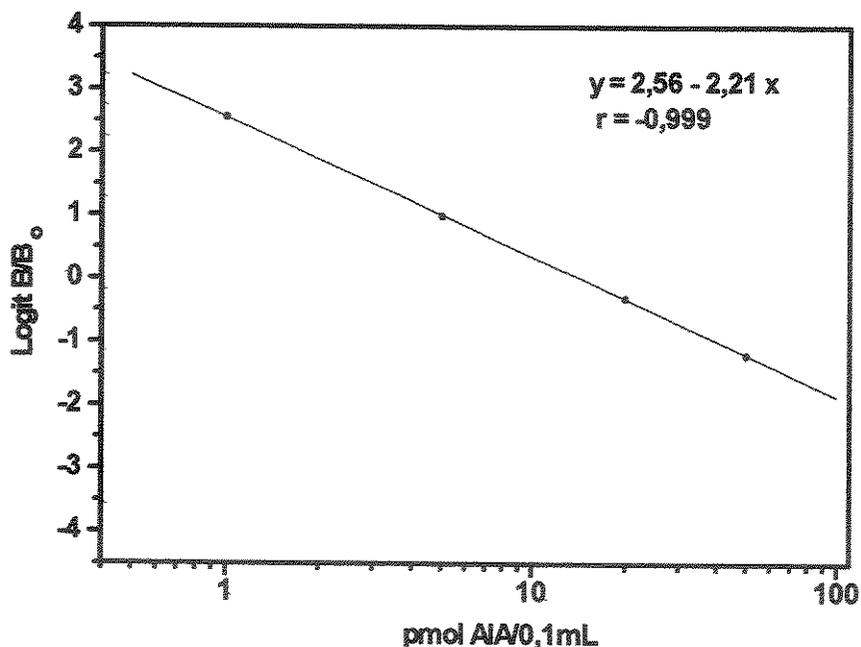


Figura 5: Curva padrão obtida a partir da leitura das densidades óticas das concentrações de AIA (1,0; 5,0; 20,0; 50,0 pmol de AIA/0,1mL). B= Densidade ótica da ligação do marcador ao anticorpo na presença de excesso de AIA (200,0 pmol/0,1 mL); B₀= Densidade ótica da ligação do marcador na ausência de AIA. $\text{Logit } B/B_0 = \ln[(B/B_0)/100 - B/B_0]$.

Foram utilizados kits de ensaio imuno-enzimático (Phytodetek), para detecção de ácido 3-indol acético. Os procedimentos do ensaio imuno-enzimático e os cálculos das concentrações de AIA foram os mesmos descritos para ABA (itens 4.1.4 e 4.1.5).

4.3) Análise de carboidratos

A quantificação de carboidratos foi feita em folhas coletadas nos mesmos ramos em que se mediram as trocas gasosas. As folhas foram excisadas dos ramos, mergulhadas em nitrogênio líquido e mantidas a 80°C durante 72 horas. Após a secagem, as folhas foram moídas. O

método de quantificação foi adaptado de Somogyi (1952) e Nelson (1944). No primeiro ciclo a coleta foi feita às 17:00 h e nos outros dois ciclos às 9:00 h, 12:00 h, 15:00 h e 17:00 h.

4.3.1) Preparo dos reagentes

Reagente A: Dissolveram-se 25,0 g de carbonato de sódio anidro (NaCO_3), 34,4g de tartarato de sódio e potássio; 20,0g de bicarbonato de sódio e 200,0g de sulfato de sódio em 1,0 L de água destilada.

Reagente B: Dissolveram-se 15,0 g de sulfato de cobre penta-hidratado em 100,0 mL de água destilada, adicionou-se 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado e completou-se o volume (1,0 L) com água destilada.

Reagente C: Dissolveram-se 25,0 g de molibdato de amônio em 450,0 mL de água destilada e adicionaram-se 21,0 mL de ácido sulfúrico concentrado e 3,0 g de arseniato ácido de sódio, previamente diluído em 21,0 mL de água destilada. Homogeneizou-se a solução e armazenou-se em frasco escuro, por 48h, a 37°C.

É importante salientar que a mistura do reagente A+B foi feita antes de sua utilização, na proporção de 25:1.

4.3.2) Extração

As folhas moídas foram pesadas (150,0 mg) e colocadas em 5,0 mL de etanol 80% (v/v), mantidas em banho-maria (70°C), durante 20 min. Centrifugou-se este extrato, durante 10min, a 10.000 g. O sobrenadante foi colocado em um becker. Adicionaram-se mais 5,0 mL de etanol 80% ao resíduo, repetiu-se a operação de extração em banho-maria e a centrifugação.

Os sobrenadantes foram misturados e levados para evaporação em banho-maria (70°C), para quantificação dos açúcares solúveis. Os resíduos dos tubos de centrífuga foram utilizados para dosagem de amido.

4.3.3) Dosagem de açúcares redutores

Após a evaporação do sobrenadante, água destilada foi colocada no becker para raspar o extrato formado e o volume foi completado para 25,0 mL (extrato inicial). Retiraram-se 2,5 mL desta amostra e completou-se o volume para 5,0 mL com água destilada. Destes 5,0 mL, retirou-se 1,0 mL e adicionou-se 1,0 mL do reagente A+B. Esta mistura ficou em banho-maria, a 100°C, por 20min e foi resfriada, rapidamente, com água gelada. Adicionou-se, então, 1,0 mL do reagente C. A mistura foi agitada vigorosamente em um agitador de tubos e completou-se o volume para 25,0 mL com água destilada. A absorbância da amostra foi analisada em espectrofotômetro a 540nm. A absorbância de uma solução com 1,0 mL de água destilada mais 1,0 mL do reagente A+B foi feita e considerada 'branco'. O cálculo das concentrações de carboidratos redutores foi feito a partir da curva padrão de glicose.

4.3.4) Dosagem de açúcares totais

A partir do extrato inicial, descrito anteriormente, retiraram-se 12,5 mL que foi hidrolisado com 1,5 mL de HCl concentrado e mantido em banho-maria (70°C), por 5 min. Deste extrato, retirou-se 2,5mL para neutralização da amostra com NaOH e, em seguida, completou-se o volume para 12,5mL. A partir deste extrato, retirou-se 1,0 mL para reação e seguiu-se os passos realizados para açúcares redutores.

Pela diferença entre o conteúdo de açúcares totais e açúcares redutores foi possível calcular as concentrações de sacarose do tecido.

4.3.5) Dosagem de amido

No resíduo proveniente da extração dos açúcares, adicionaram-se 5,0 mL de ácido perclórico (HClO_4), 72% (v/v). O extrato ficou em banho-maria (70°C), por 30min e foi centrifugado, por 10 min, a 10.000 g. O sobrenadante foi filtrado em balão volumétrico. Esta operação foi repetida mais uma vez e o volume do balão foi completado para 100,0 mL com água destilada. Deste, retiraram-se 5,0 mL e completou-se o volume para 25,0 mL, de onde foi retirado 1,0 mL para reação de coloração, colocando-se 1,0 mL de fenol (5%) e 5,0 mL de ácido sulfúrico. A leitura da absorbância do amido foi feita em espectrofotômetro, a 490nm. Os cálculos foram feitos pela curva de amido com concentrações conhecidas de amido (item 4.3.7).

4.3.6) Curva padrão de glicose

A curva padrão foi feita a partir da diluição de glicose anidra pura. Dissolveram-se 100,0 mg de glicose em 100,0 mL de água e a partir desta solução fez-se diluições em várias concentrações. Retirou-se 1,0 mL de cada concentração feita e seguiu-se o procedimento da reação de coloração do método de quantificação, para obtenção da seguinte curva:

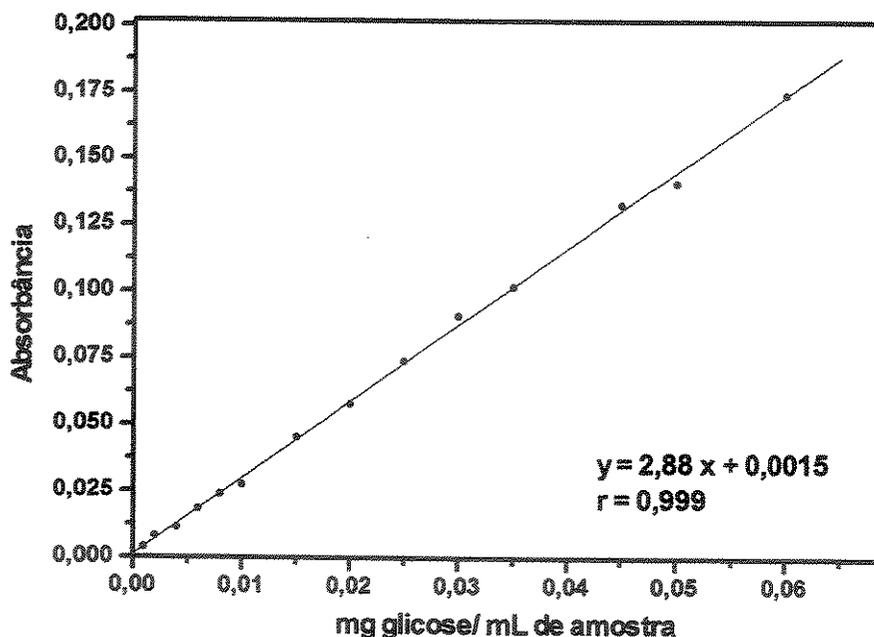


Figura 6: Curva padrão de glicose a partir de várias diluições de glicose (entre 0,005 a 0,06 mg glicose/mL). As densidades óticas das concentrações dos padrões foram lidas a 540 nm.

4.3.7) Curva padrão de amido

Pesaram-se 100,0 mg de amido e foram dissolvidos em 100,0 mL de água. Retiraram-se alíquotas correspondentes às diluições desejadas. Adicionaram-se 10,0 mL de ácido perclórico, por 30 min, em banho-maria (70°C), para depois completar o volume para 100,0 mL com água destilada. Em seguida, retirou-se 1,0 mL para reação de coloração e seguiu-se o procedimento de quantificação para dosagem de amido. A curva padrão obtida está apresentada a seguir:

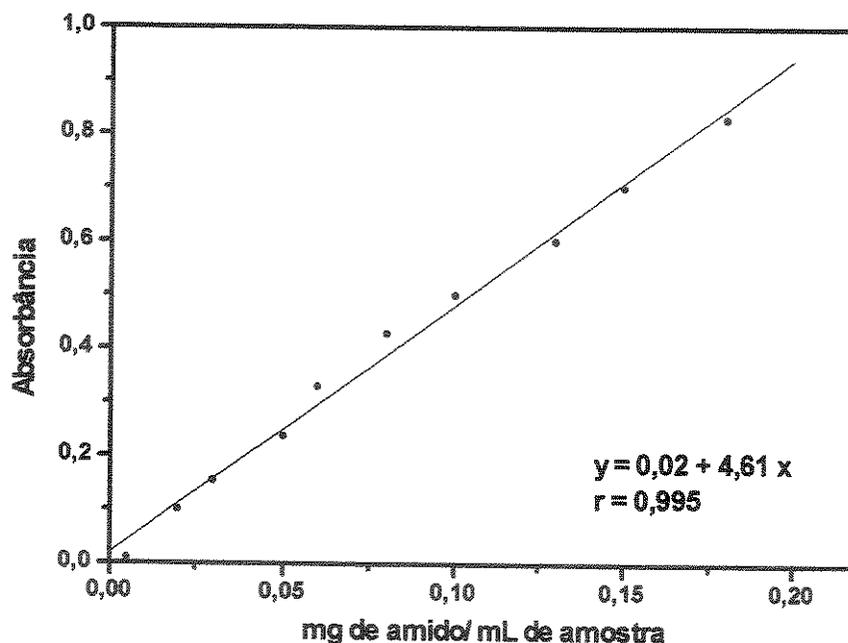


Figura 7: Curva padrão de amido a partir de várias diluições (entre 0,01 a 0,2 mg amido/mL). As densidades óticas das concentrações dos padrões foram lidas a 490 nm.

5) Análise estatística

Os resultados dos tratamentos, com cinco repetições, de todas as análises feitas neste trabalho, foram comparados entre eles pela análise de variância (ANOVA), pelo teste F, ao nível de 5% de probabilidade, sendo calculada a diferença mínima significativa (DMS) pelo teste de Duncan, ao nível de 5% de probabilidade. Para testar se a distribuição dos dados foi normal, utilizou-se o teste de Kolmogorov-Smirnov, modificado por Lilliefors. Para avaliar a homogeneidade das variâncias foi usado o teste de Bartlett. O teste de Dixon foi utilizado para a determinação dos valores discrepantes (Campos, 1983; Pimentel Gomes, 1990).

RESULTADOS

1) Primeiro ciclo de deficiência hídrica

1.1) Trocas gasosas

Nas figs. 8 a 12 estão representadas as respostas das plantas em relação às variáveis medidas, durante o primeiro ciclo de deficiência hídrica, em março/abril de 1998 (um ano e dois meses após a inoculação da bactéria).

Um dia após a suspensão da irrigação (fig.8), não houve diferenças significativas nas variáveis medidas entre os tratamentos. A assimilação de CO_2 (A) tendeu a decrescer à medida que o dia progrediu. No meio da tarde, por volta das 16:00 h, ocorreu uma tendência de decréscimo da fotossíntese já que a DFFFA também decresceu, coincidindo com a diminuição da condutância estomática (g). A transpiração das plantas (E) foi mais intensa ao meio-dia quando os estômatos estavam mais abertos. A fotossíntese esteve entre 8,5 a 10,0 $\mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$ entre 10:00 h e 12:00 h, mas, à tarde, este valor caiu, ficando ao redor de 5,0 a 6,0 $\mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$. A média da condutância estomática de todos os tratamentos ficou ao redor de 0,15 $\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$ até, aproximadamente, às 12:00 h, decaindo para 0,12 $\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$, ao redor das 16:00 h. O maior valor de transpiração (3,5 $\text{mmol}/\text{m}^2.\text{s}$) ocorreu ao meio-dia.

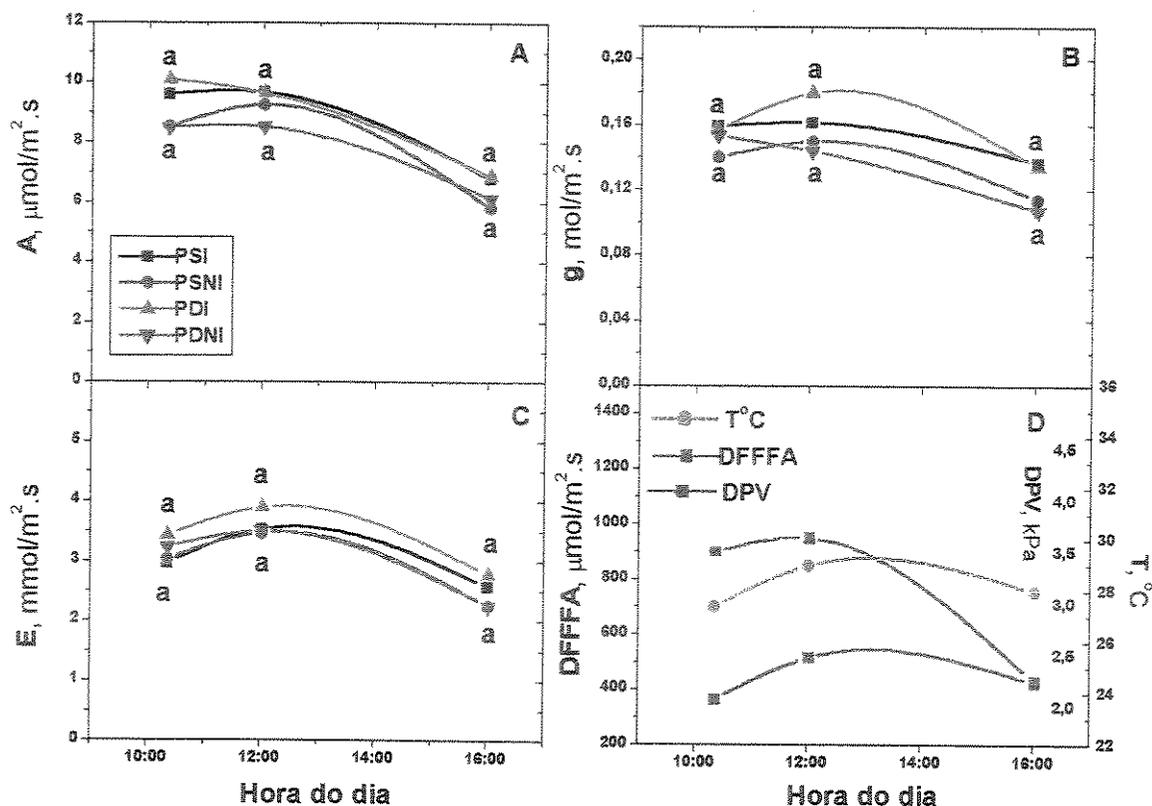


Figura 8: Efeito de um dia de deficiência hídrica em laranjeiras ‘Pêra’ enxertadas sobre limoeiros ‘Cravo’, sadias ou infectadas pela bactéria *Xylella fastidiosa*, no primeiro ciclo. (A) A (assimilação de CO_2); (B) g (condutância estomática); (C) E (transpiração) e (D) DFFFA (densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos); T (temperatura do ar) e DPV (déficit de pressão de vapor entre o ar e a folha); PSI (plantas sadias irrigadas); PSNI (plantas sadias não irrigadas); PDI (plantas doentes irrigadas); PDNI (plantas doentes não irrigadas). Cada ponto representa a média de 5 repetições. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si estatisticamente (teste de Duncan, 5%).

No terceiro dia de deficiência hídrica (fig.9) começaram a ocorrer diferenças significativas, ao redor das 14:00 h, entre as plantas sadias irrigadas (PSI) e as plantas sadias não irrigadas (PSNI). Os valores de A , g e E de PSNI foram, aproximadamente, 25% menores que os de PSI. Não ocorreram diferenças significativas em A , g e E entre plantas doentes irrigadas (PDI) e plantas doentes não irrigadas (PDNI), nos três horários avaliados. As diferenças em A , g e E entre os tratamentos das plantas sadias irrigadas e as doentes irrigadas,

observadas às 14:00 h, sugerem que em dias e horários com maior temperatura e DPV, as plantas infectadas com a bactéria são mais sensíveis às variações ambientais (fig.9D). Nas plantas do tratamento PSI a condutância estomática foi maior e, conseqüentemente, transpiraram mais que PDI.

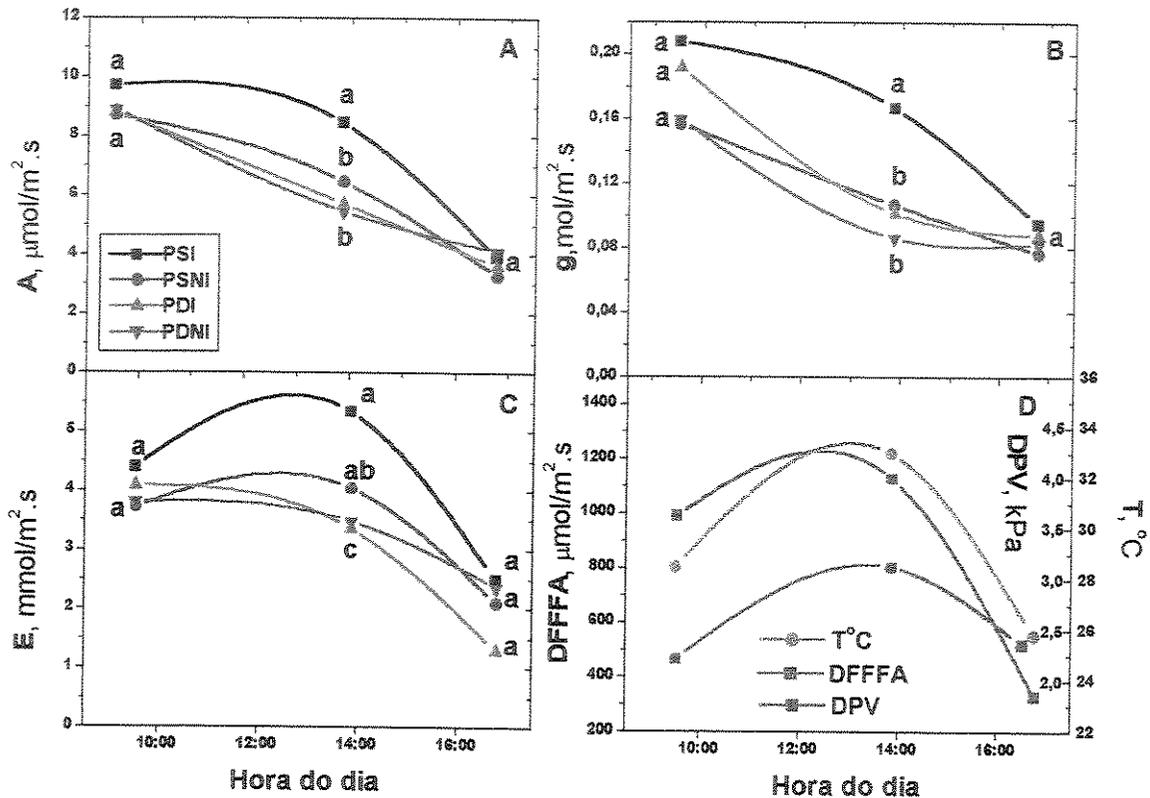


Figura 9: Efeito de três dias de deficiência hídrica em laranjeiras 'Pêra' enxertadas sobre limoeiros 'Cravo', sadias ou infectadas pela bactéria *Xylella fastidiosa*, no primeiro ciclo. (A) *A* (assimilação de CO₂); (B) *g* (condutância estomática); (C) *E* (transpiração) e (D) DFFFA (densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos); T (temperatura do ar) e DPV (déficit de pressão de vapor entre o ar e a folha); PSI (plantas sadias irrigadas); PSNI (plantas sadias não irrigadas); PDI (plantas doentes irrigadas); PDNI (plantas doentes não irrigadas). Cada ponto representa a média de 5 repetições. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si estatisticamente (teste de Duncan, 5%).

No oitavo dia de deficiência hídrica (fig.10) observou-se que em PSNI foram verificados os menores valores de A , g e E em todos os horários analisados, indicando a falta de água. Enquanto que em PSI a assimilação de CO_2 foi $9,3 \mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$ às 9:30 h, em PSNI, neste mesmo horário, A foi apenas um terço deste valor. Ao meio-dia, as diferenças aumentaram, pois em PSNI A foi apenas 20% em relação ao PSI.

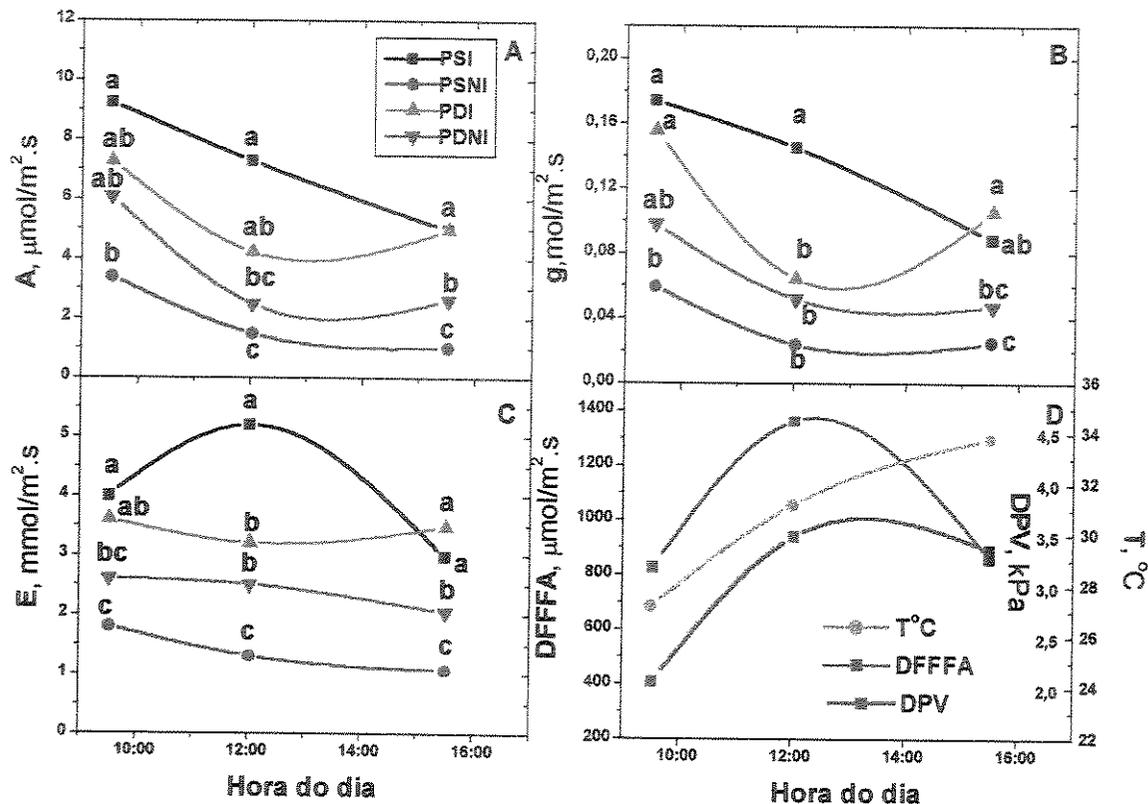


Figura 10: Efeito de oito dias de deficiência hídrica em laranjeiras 'Pêra' enxertadas sobre limoeiros 'Cravo', sadias ou infectadas pela bactéria *Xylella fastidiosa*, no primeiro ciclo. (A) A (assimilação de CO_2); (B) g (condutância estomática); (C) E (transpiração) e (D) DFFFA (densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos); T (temperatura do ar) e DPV (déficit de pressão de vapor entre o ar e a folha); PSI (plantas sadias irrigadas); PSNI (plantas sadias não irrigadas); PDI (plantas doentes irrigadas); PDNI (plantas doentes não irrigadas). Cada ponto representa a média de 5 repetições. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si estatisticamente (teste de Duncan, 5%).

As plantas doentes (PDI e PDNI) apresentaram valores estatisticamente diferentes somente no final da tarde. Os tratamentos PSI e PDI diferiram nos valores de g e E somente às 12:00 h.

A fig. 11 representa o dia em que a deficiência hídrica foi mais severa. Em todos os horários, os valores de A , g e de E , para as plantas não irrigadas, foram bem menores que os das plantas mantidas irrigadas. A fotossíntese de PSNI chegou a ser apenas 10% dos valores de A de PSI pela manhã. Às 13:00 h, este valor aproximou-se do zero, com os estômatos praticamente fechados. Já a fotossíntese em PDNI foi 25% da taxa observada em PDI pela manhã, e 20% às 13:00 h, mantendo-se assim até a última medida da tarde. Neste dia, não se observou diferença estatística entre as plantas sadias irrigadas e plantas com CVC irrigadas. Ambos os tratamentos apresentaram depressão da fotossíntese e menor condutância estomática com elevação da transpiração, às 13:00 h.

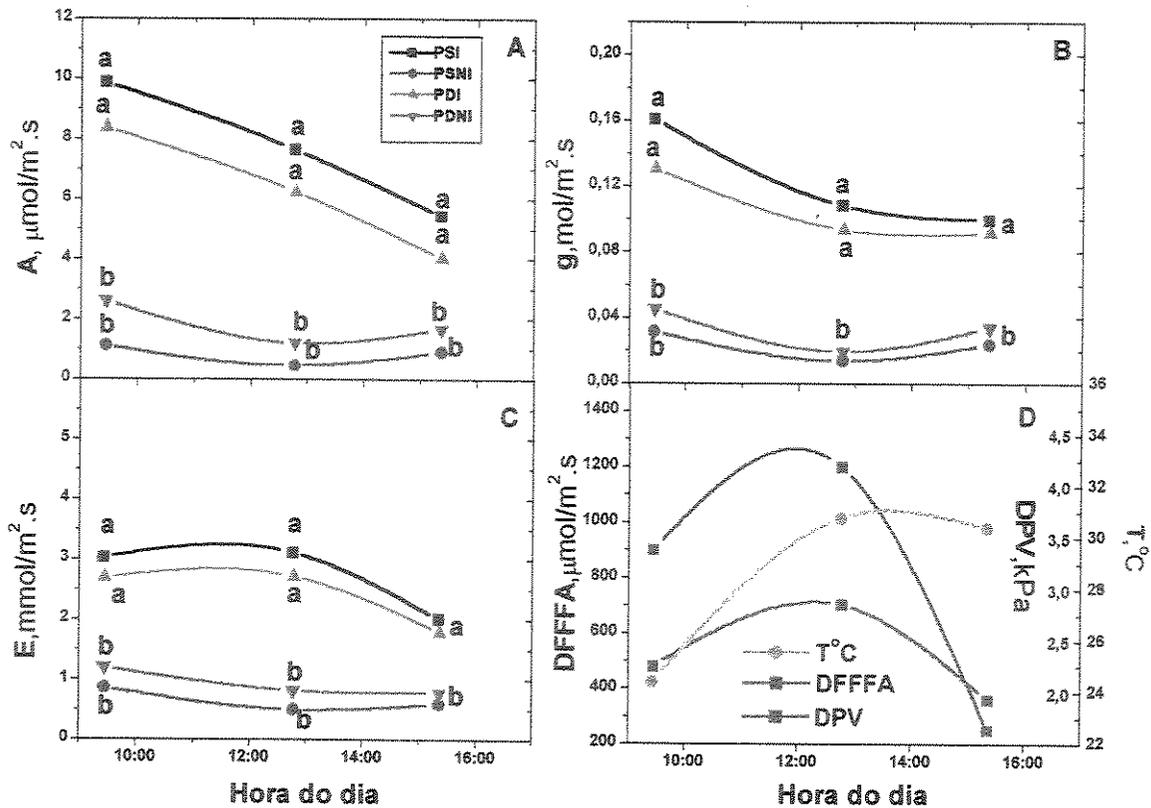


Figura 11: Efeito de onze dias de deficiência hídrica em laranjeiras ‘Pêra’ enxertadas sobre limoeiros ‘Cravo’, sadias ou infectadas pela bactéria *Xylella fastidiosa*, no primeiro ciclo. (A) A (assimilação de CO_2); (B) g (condutância estomática); (C) E (transpiração) e (D) DFFFA (densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos); T (temperatura do ar) e DPV (déficit de pressão de vapor entre o ar e a folha); PSI (plantas sadias irrigadas); PSNI (plantas sadias não irrigadas); PDI (plantas doentes irrigadas); PDNI (plantas doentes não irrigadas). Cada ponto representa a média de 5 repetições. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si estatisticamente (teste de Duncan, 5%).

Dez dias após o reinício da irrigação das plantas (fig.12), tanto as plantas sadias não irrigadas quanto as plantas doentes não irrigadas, apresentaram taxas similares aos seus respectivos controles (PSI e PDI). Porém, as plantas com CVC apresentaram menores valores de A , g e E , quando comparadas com as plantas sadias, às 12:30 h.

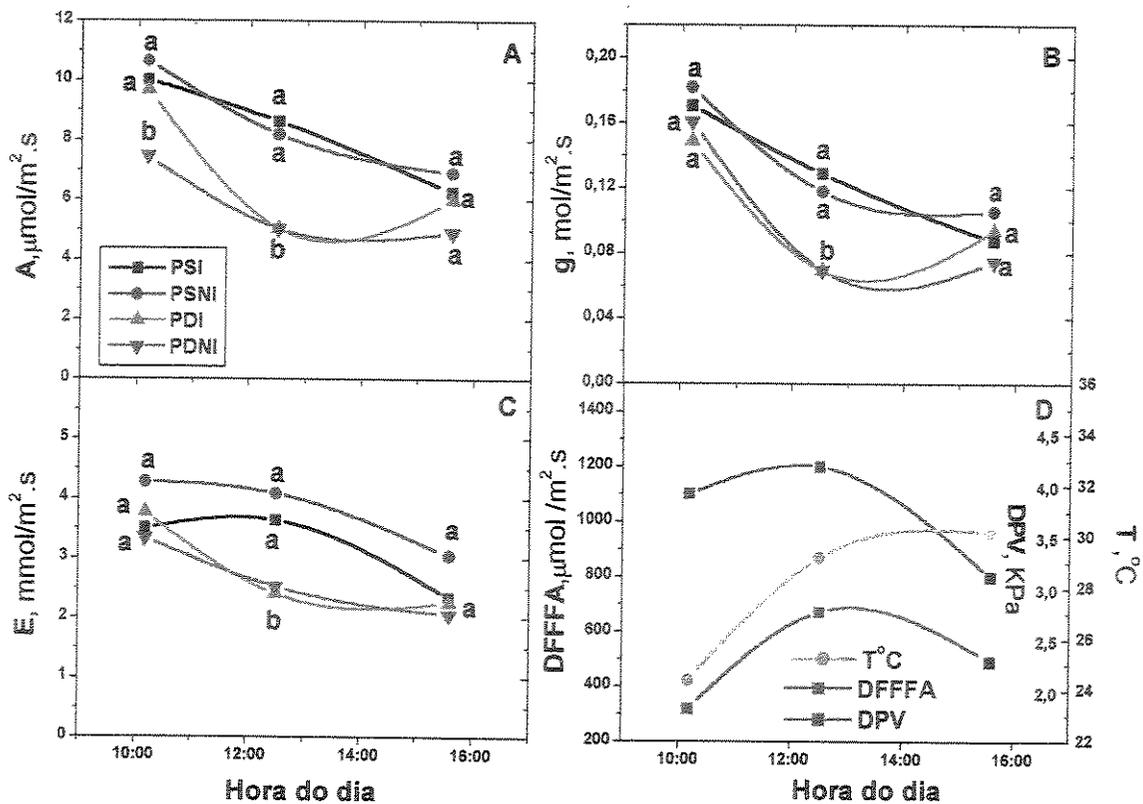


Figura 12: Efeito de dez dias após o reinício da irrigação em laranjeiras ‘Pêra’ enxertadas sobre limoeiros ‘Cravo’, sádas ou infectadas pela bactéria *Xylella fastidiosa*, no primeiro ciclo. (A) A_i (assimilação de CO_2); (B) g (condutância estomática); (C) E (transpiração) e (D) DFFFA (densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos); T (temperatura do ar) e DPV (déficit de pressão de vapor entre o ar e a folha); PSI (plantas sádas irrigadas); PSNI (plantas sádas não irrigadas); PDI (plantas doentes irrigadas); PDNI (plantas doentes não irrigadas). Cada ponto representa a média de 5 repetições. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si estatisticamente (teste de Duncan, 5%).

1.2) Relações hídricas

O potencial da água da folha (Ψ) às 6 horas da manhã (fig.13), que representa uma estimativa do potencial da água do solo, manteve-se ao redor de $-0,3$ MPa, tanto para PSI, quanto para PDI, durante esta fase do experimento. Quando se suspendeu a irrigação, notou-se que o potencial da água da folha das plantas sádas não irrigadas decresceu mais rápido do que

o Ψ das plantas doentes, como pôde ser constatado no oitavo dia após o início da deficiência hídrica. Após onze dias com limitação de água, PSNI e PDNI apresentaram Ψ similares, ao redor de -2,5 MPa. Após a reirrigação das plantas, não houve diferença estatística no Ψ às 6:00 h, entre os tratamentos.

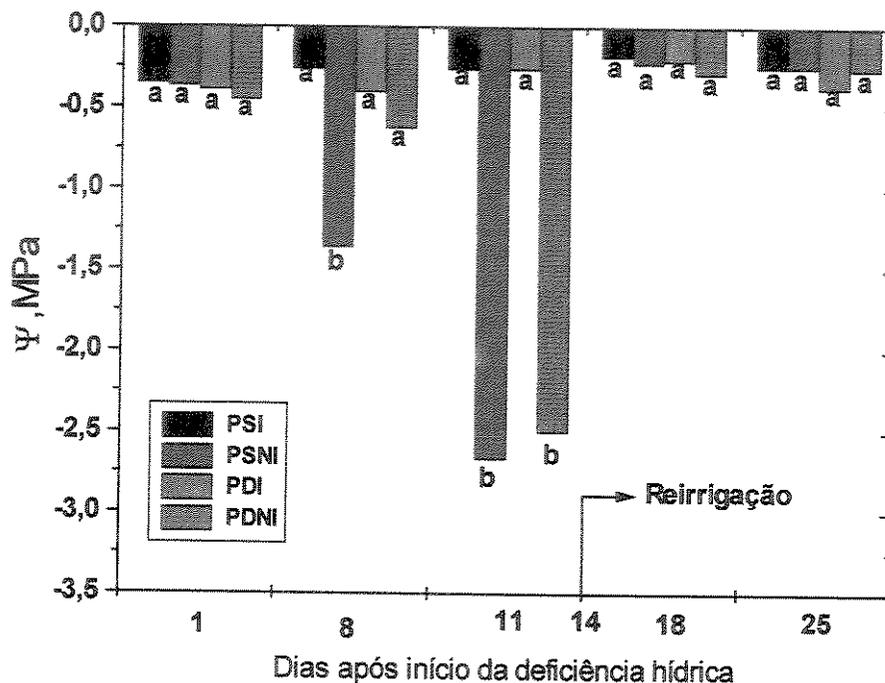


Figura 13: Efeito da deficiência hídrica no potencial da água da folha (Ψ), às 6:00 h da manhã, em laranjeiras ‘Pêra’ enxertadas sobre limoeiros ‘Cravo’, sadias ou infectadas pela bactéria *Xylella fastidiosa* no primeiro ciclo. A reirrigação ocorreu no décimo quarto dia após início da deficiência hídrica. PSI (plantas sadias irrigadas); PSNI (plantas sadias não irrigadas); PDI (plantas doentes irrigadas); PDNI (plantas doentes não irrigadas). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si estatisticamente. Cada coluna representa a média de 5 repetições (teste de Duncan, 5%).

A fig.14 ilustra o potencial da água da folha às 14:00 h. A média de Ψ das plantas com CVC irrigadas foi menor do que a média das plantas sadias irrigadas, -1,5 MPa e -0,75 MPa, respectivamente. Entretanto, o Ψ de PSI e de PDI foram estatisticamente semelhantes no

primeiro e no décimo primeiro dias após início da deficiência hídrica. O potencial da água na folha das plantas doentes não irrigadas só foi estatisticamente diferente das plantas com CVC irrigadas no décimo primeiro dia de deficiência hídrica, enquanto que, a partir do sétimo dia após início da deficiência hídrica, PSI e PSNI apresentavam diferenças entre elas. O potencial das plantas mantidas em deficiência hídrica (PSNI e PDNI), igualou-se ao dos respectivos controles (PSI e PDI), três dias após a reirrigação.

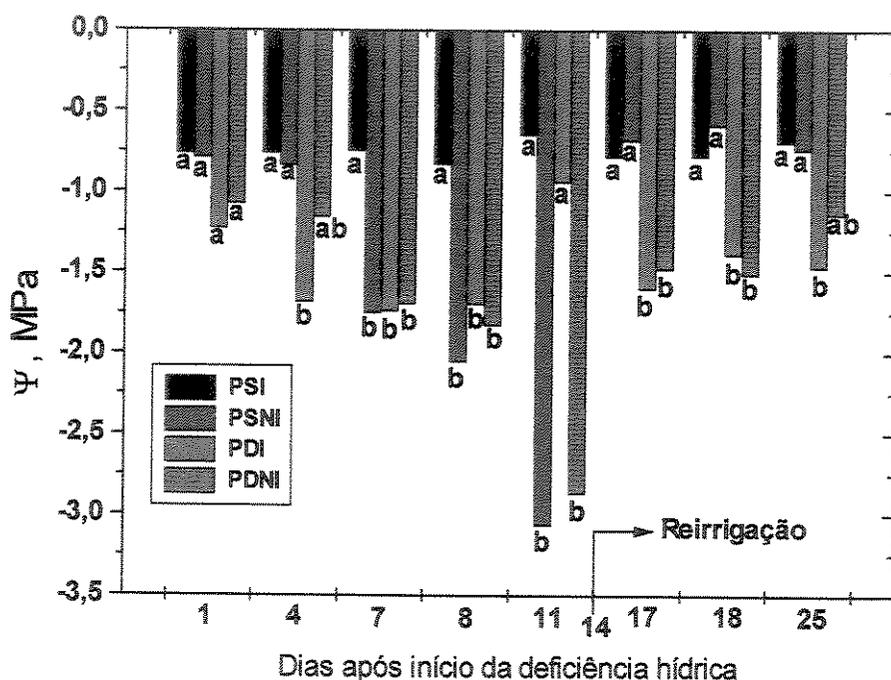


Figura 14: Efeito da deficiência hídrica no potencial da água da folha (Ψ), às 14:00 h, em laranjeiras ‘Pêra’ enxertadas sobre limoeiros ‘Cravo’, sadias ou infectadas pela bactéria *Xylella fastidiosa* no primeiro ciclo. A reirrigação ocorreu no décimo quarto dia após início da deficiência hídrica. PSI (plantas sadias irrigadas); PSNI (plantas sadias não irrigadas); PDI (plantas doentes irrigadas); PDNI (plantas doentes não irrigadas). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si estatisticamente. Cada coluna representa a média de 5 repetições (teste de Duncan, 5%).

1.3) Conteúdo de ácido abscísico

No primeiro dia após o início da deficiência hídrica, não se observaram diferenças significativas entre os tratamentos quanto ao conteúdo de ácido abscísico (fig.15). A concentração de ABA variou entre 0,58 $\mu\text{g/g}$ de massa seca para PDNI e 0,86 $\mu\text{g/g}$ de massa seca para PSNI. No oitavo dia após início da deficiência hídrica, o conteúdo de ácido abscísico nas plantas sadias não irrigadas apresentou aumento de 3,5 vezes em relação ao PSI, coincidindo com os baixos valores de condutância estomática às 12:00 h (fig.10B). Entretanto, neste mesmo dia, para PDNI, o conteúdo de ABA foi, aproximadamente, duas vezes maior que o de PDI, embora esta diferença não tenha sido significativa. As plantas doentes (PDI e PDNI) apresentaram valores de *g* semelhantes às 12:00 h (fig.10B) no oitavo dia de deficiência hídrica e as concentrações de ABA destes tratamentos também foram semelhantes. Apesar dos valores de *g* das plantas doentes no oitavo dia terem sido menores que os das plantas sadias irrigadas, as concentrações de ABA destes tratamentos não variaram. O dia em que as plantas estavam mais estressadas (11 dias após início da deficiência hídrica), coincidiu com o aumento significativo de ABA em PSNI e PDNI, 3,35 e 3,04 $\mu\text{g/g}$ de massa seca, respectivamente e com as menores condutâncias estomáticas (fig.11B). Após a reirrigação, não houve diferença significativa nos teores de ABA para os diversos tratamentos. As plantas dos tratamentos PSI, PDI e PDNI, 15 dias após a reirrigação, apresentaram concentrações de ABA ao redor de 0,55 $\mu\text{g/g}$ de massa seca, enquanto PSNI apresentou concentrações ao redor de 0,92 $\mu\text{g/g}$ de massa seca, entretanto não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos.

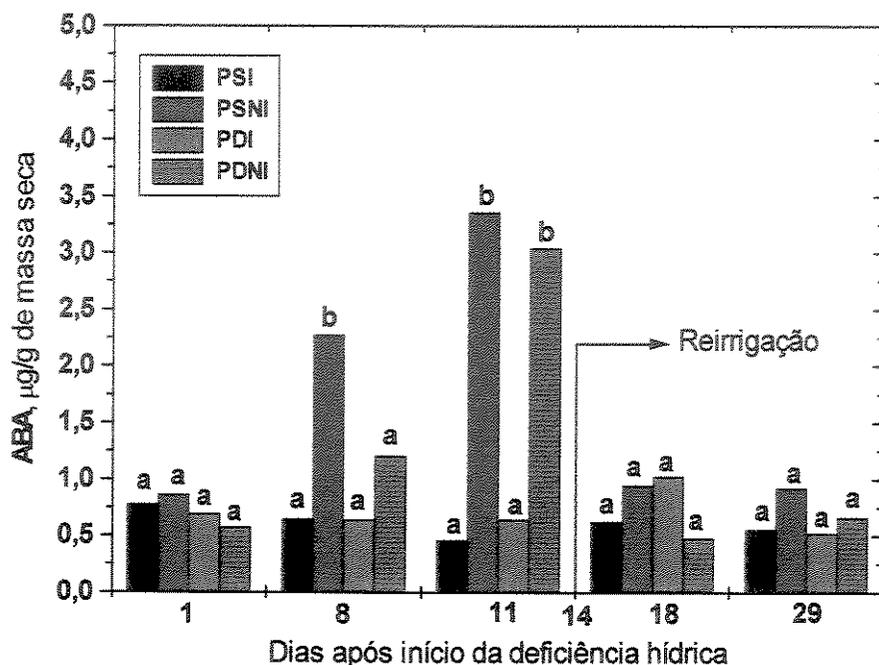


Figura 15: Efeito da deficiência hídrica no conteúdo de ácido abscísico (ABA) das folhas de laranjeiras ‘Pêra’ enxertadas sobre limoeiros ‘Cravo’, sadias ou infectadas pela bactéria *Xylella fastidiosa* no primeiro ciclo. A reirrigação ocorreu no décimo quarto dia após início da deficiência hídrica. PSI (plantas sadias irrigadas); PSNI (plantas sadias não irrigadas); PDI (plantas doentes irrigadas); PDNI (plantas doentes não irrigadas). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si estatisticamente. Cada coluna representa a média de 5 repetições (teste de Duncan, 5%).

1.4) Conteúdo de carboidratos

A fig. 16 representa a concentração de carboidratos e a assimilação de CO_2 às 17:00 h no primeiro ciclo de deficiência hídrica. No dia de estresse mais severo (11 dias após início da deficiência hídrica), os teores de açúcares redutores (fig. 16B) foram maiores nos tratamentos PSNI, PDNI e PDI em relação ao PSI. As concentrações de amido (fig. 16C) decresceram em PSNI e PDNI conforme aumentou a intensidade da deficiência hídrica, principalmente no oitavo e no décimo primeiro dia, tendendo a recuperar-se após o reinício da irrigação. Nos tratamentos de deficiência hídrica (PSNI e PDNI), após a reirrigação, apesar dessas plantas não terem apresentado teores semelhantes de amido quando comparadas com seus respectivos controles irrigados (PSI e PDI), ocorreu aumento de amido com recuperação de *A*. O teor de amido em PDI foi muito variável nos dias de medidas quando comparados com os teores de PSI. A sacarose (fig. 16D) decresceu em PSNI à medida que o estresse foi se tornando mais severo. Após a reirrigação dessas plantas, não foi observada recuperação nos teores de sacarose quando comparadas com PSI. Não foram encontradas diferenças significativas entre as concentrações de sacarose de PDI e PDNI, a não ser no quarto dia após o início da deficiência hídrica, quando PDNI apresentou concentrações semelhantes às de PSI e PSNI. No geral, PSI apresentou as maiores concentrações de sacarose nos dias avaliados.

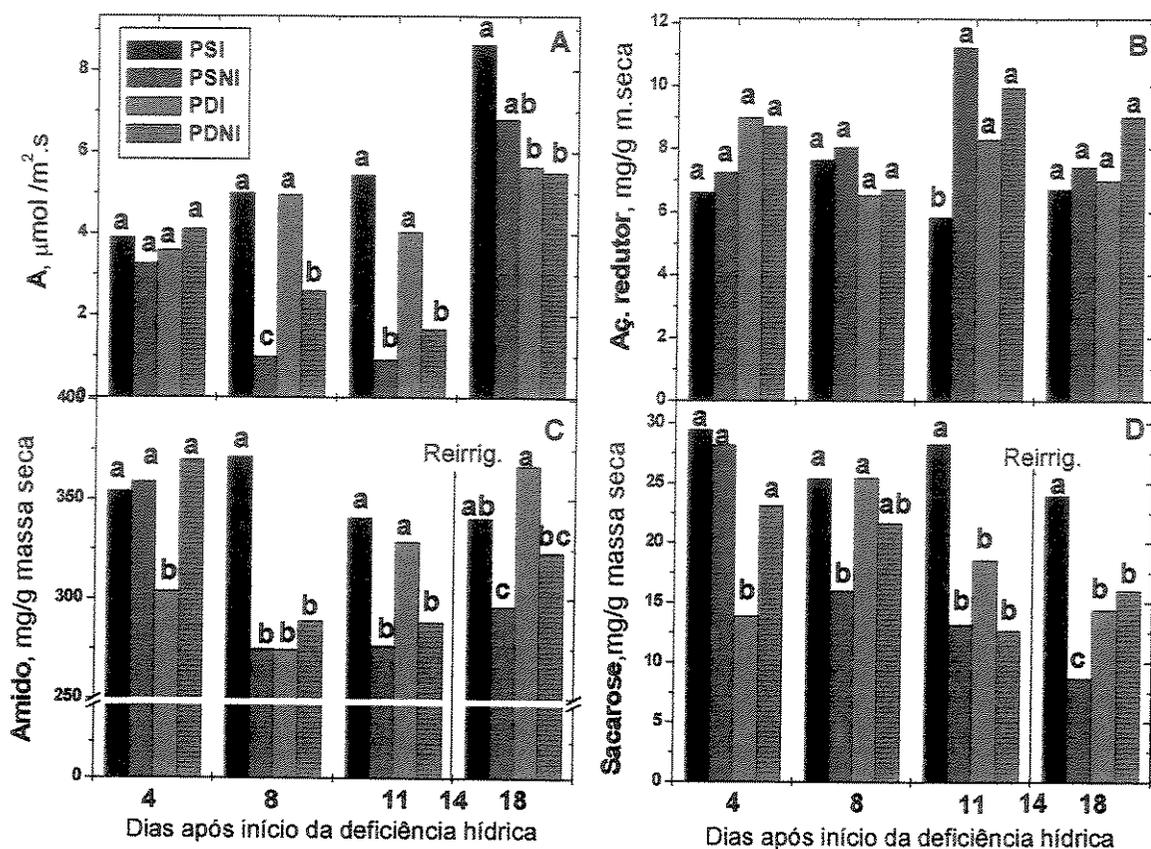


Figura 16: Efeito da deficiência hídrica na (A) assimilação de CO₂; (B) açúcar redutor; (C) amido e (D) sacarose às 17:00 h, nas folhas de laranjeiras 'Pêra' enxertadas sobre limoeiros 'Cravo', sadias ou infectadas pela bactéria *Xylella fastidiosa* no primeiro ciclo. A reirrigação ocorreu no décimo quarto dia após início da deficiência hídrica. PSI (plantas sadias irrigadas); PSNI (plantas sadias não irrigadas); PDI (plantas doentes irrigadas); PDNI (plantas doentes não irrigadas). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si estatisticamente. Cada ponto representa a média de 5 repetições (teste de Duncan, 5%).

2) Segundo ciclo de deficiência hídrica

2.1) Trocas gasosas

O segundo ciclo de deficiência hídrica iniciou em outubro de 1998, seis meses após o primeiro ciclo, realizado em março/abril de 1998.

No primeiro dia de medidas (fig.17) as plantas doentes apresentaram valores de A , pela manhã, inferiores aos das plantas saudas, o que pôde ser observado, neste horário, durante todos os dias avaliados neste segundo ciclo. No primeiro ciclo, os valores de A destas plantas foram similares pela manhã. Às 13:00 h, ocorreu depressão da fotossíntese nas plantas saudas, ao redor de 50%, em relação aos valores de A medidos na manhã. Os valores de g também decaíram em relação ao observado às 9:00 h. No entanto, mesmo nestas condições, essas plantas, às 13:00 h, ainda continuaram apresentando os mesmos valores de E , observados pela manhã, em função do aumento de temperatura e do alto DPV neste dia. Na última medida, realizada por volta das 15:30 h, as plantas saudas e as plantas doentes não apresentaram diferenças significativas nas variáveis avaliadas.

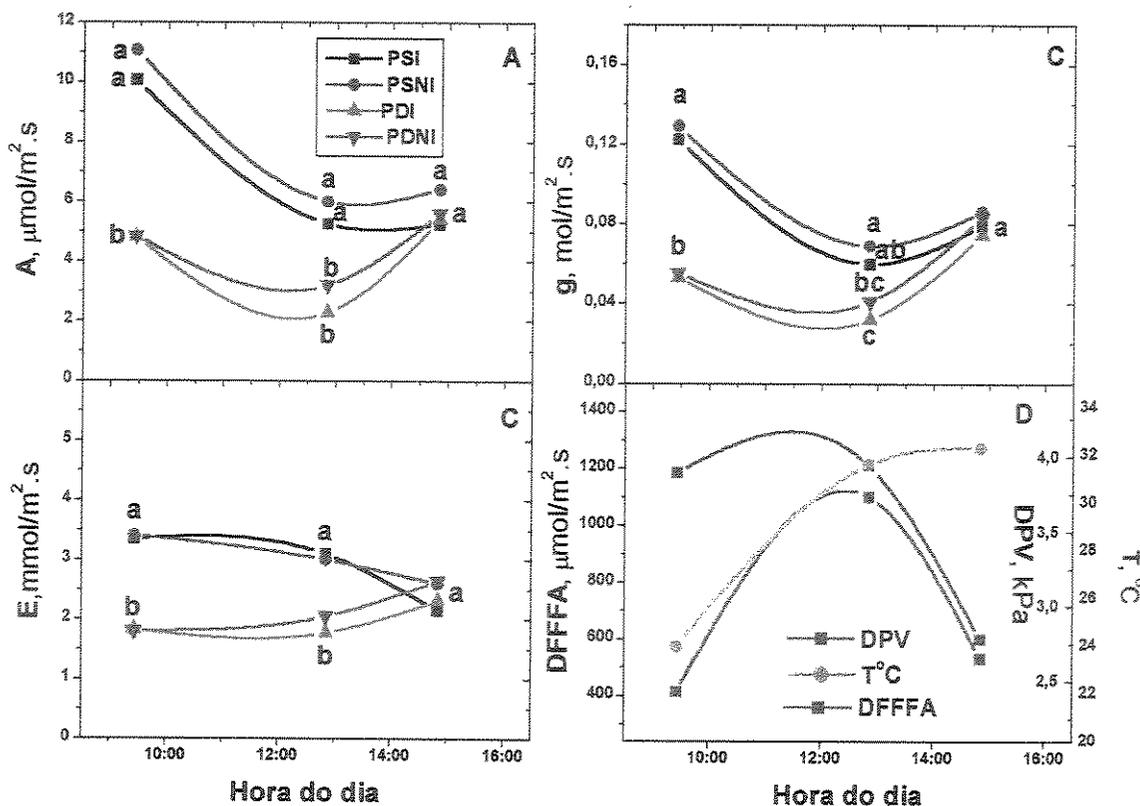


Figura 17: Efeito de um dia após a interrupção da irrigação do segundo ciclo de deficiência hídrica em laranjeiras ‘Pêra’ enxertadas sobre limoeiros ‘Cravo’, sadias ou infectadas pela bactéria *Xylella fastidiosa*. (A) A (assimilação de CO₂); (B) g (condutância estomática); (C) E (transpiração) e (D) DFFFA (densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos); T (temperatura do ar) e DPV (déficit de pressão de vapor entre o ar e a folha); PSI (plantas sadias irrigadas); PSNI (plantas sadias não irrigadas); PDI (plantas doentes irrigadas); PDNI (plantas doentes não irrigadas). Cada ponto representa a média de 5 repetições. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si estatisticamente (teste de Duncan, 5%).

Sete dias após a suspensão da irrigação (fig.18), os valores de A , g e E de PSNI diminuiriam significativamente em todos os horários, em relação ao seu controle irrigado (PSI). Em PDNI, quando comparado com PDI, houve diferença estatística apenas às 12:30 h, em todas as variáveis avaliadas. Os valores de A , g e E de PSI, comparados com os de PDI, foram estatisticamente iguais apenas às 12:30 h, mais pelo fato de PSI ter apresentado depressão da fotossíntese neste horário. As plantas sadias irrigadas assimilaram $9,0 \mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$ na manhã e, às

12:30 h, esta taxa caiu, aproximadamente, 50% ($4,8 \mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$). Em PDI estas taxas só diminuíram, aproximadamente, $2,0 \mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$ em relação às taxas observadas na manhã ($6,3 \mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$), que correspondeu a uma diminuição de apenas 35%. Os valores de E de PSI e PDI só foram estatisticamente diferentes no final da tarde. As plantas dos tratamentos PSNI e PDNI apresentaram valores distintos em A , na manhã, e em E no final da tarde. Não foram encontradas diferenças significativas entre PSNI e PDNI nos valores de g em todos os horários de medidas.

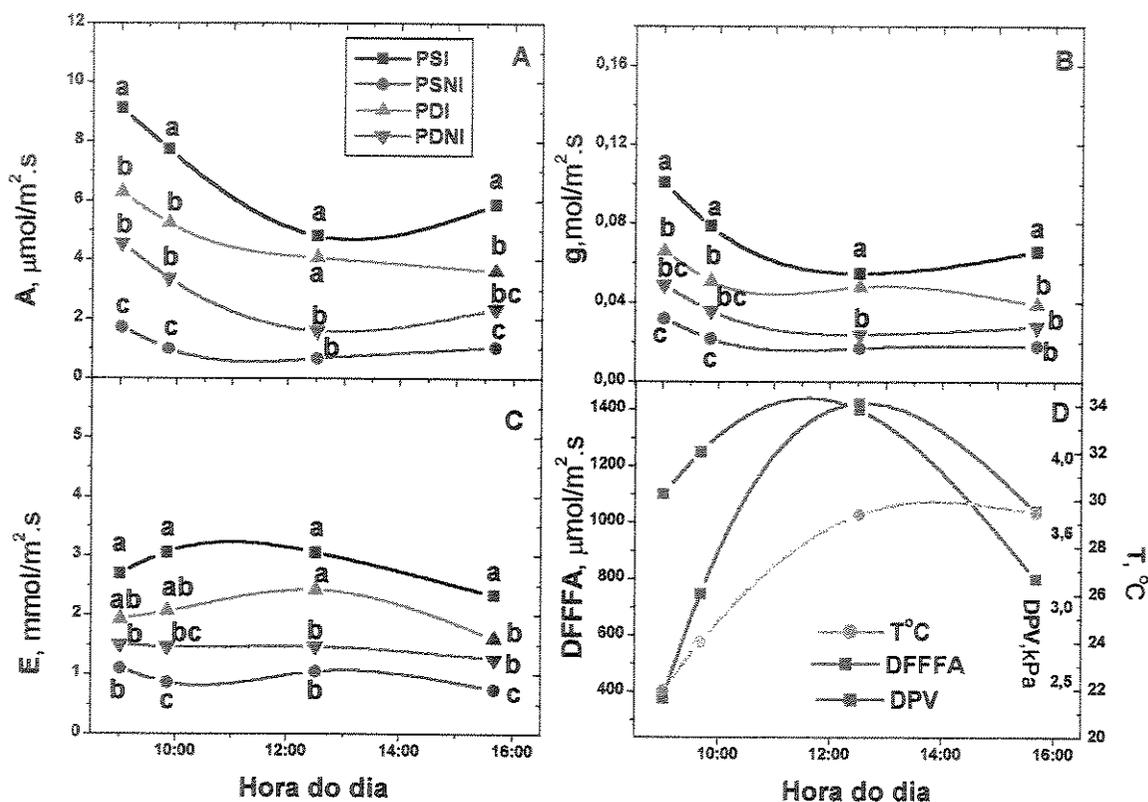


Figura 18: Efeito de sete dias de deficiência hídrica em laranjeiras ‘Pêra’ enxertadas sobre limoeiros ‘Cravo’, sadias ou infectadas pela bactéria *Xylella fastidiosa*, no segundo ciclo. (A) A (assimilação de CO_2); (B) g (condutância estomática); (C) E (transpiração) e (D) DFFFA (densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos); T (temperatura do ar) e DPV (déficit de pressão de vapor entre o ar e a folha); PSI (plantas sadias irrigadas); PSNI (plantas sadias não irrigadas); PDI (plantas doentes irrigadas); PDNI (plantas doentes não irrigadas). Cada ponto representa a média de 5 repetições. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si estatisticamente (teste de Duncan, 5%).

O nono dia após a suspensão da irrigação representou o dia de estresse mais severo, neste ciclo (fig. 19). Os valores de A , tanto em PSNI quanto em PDNI estiveram entre 0,5 e 1,0 $\mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$ durante o dia e a condutância estomática ao redor de 0,025 $\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$. No final da tarde, as plantas doentes não irrigadas apresentaram condutâncias estomáticas maiores que PSNI e transpiraram mais, apresentando diferenças significativas entre estes tratamentos nestas variáveis (g e E). Em PDI, as diferenças significativas nos valores de A e E , quando comparados com os de PSI, foram observadas nas medidas realizadas antes das 9:30 h e às 12:30 h. As condutâncias estomáticas destas plantas (PSI e PDI) só foram estatisticamente semelhantes ao redor das 9:30 h.

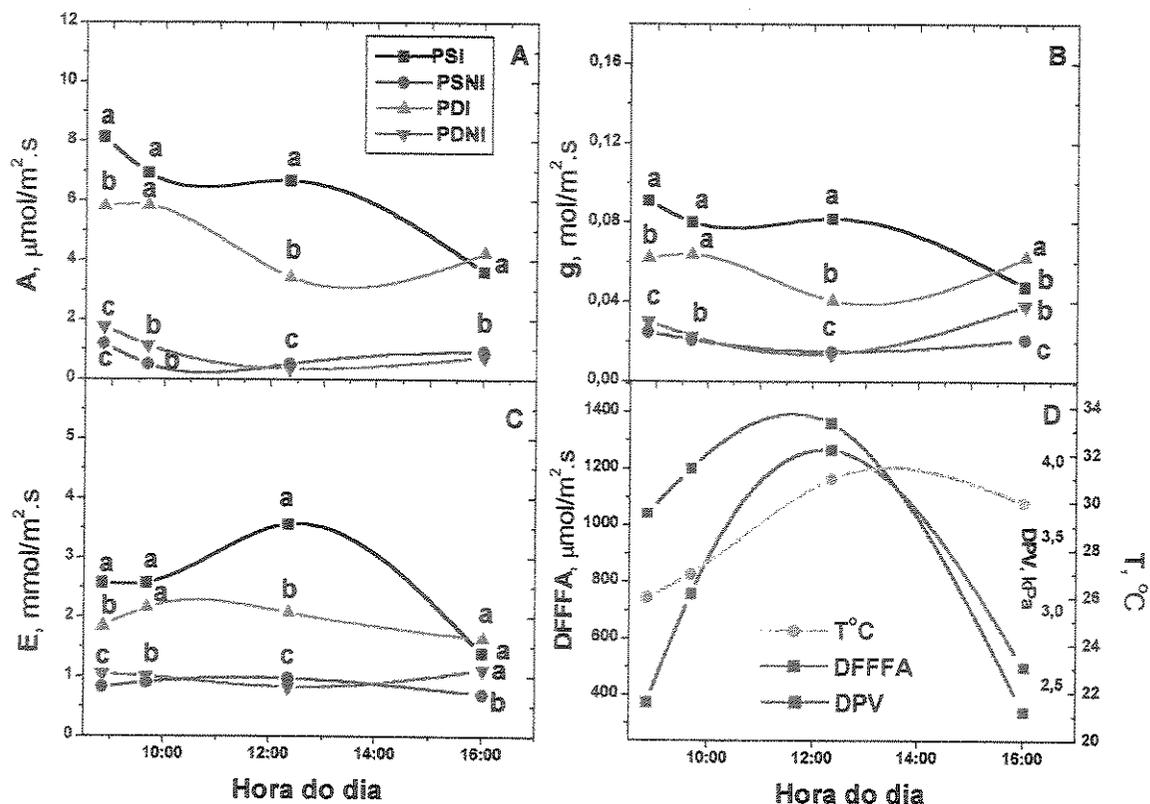


Figura 19: Efeito de nove dias de deficiência hídrica em laranjeiras ‘Pêra’ enxertadas sobre limoeiros ‘Cravo’, sadias ou infectadas pela bactéria *Xylella fastidiosa*, no segundo ciclo. (A) A (assimilação de CO_2); (B) g (condutância estomática); (C) E (transpiração) e (D) DFFFA (densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos); T (temperatura do ar) e DPV (déficit de pressão de vapor entre o ar e a folha); PSI (plantas sadias irrigadas); PSNI (plantas sadias não irrigadas); PDI (plantas doentes irrigadas); PDNI (plantas doentes não irrigadas). Cada ponto representa a média de 5 repetições. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si estatisticamente (teste de Duncan, 5%).

Doze dias após a reirrigação (fig.20) A e g em PSNI foram semelhantes aos de PSI no primeiro horário avaliado (9:00 h). Uma hora mais tarde, à medida que a temperatura e a DFFFA aumentavam, essas taxas voltaram a apresentar diferenças significativas. Às 12:00 h e às 16:00 h, A e E em PSNI e PSI foram semelhantes. Verificou-se que em PSI ocorreu depressão na fotossíntese e na condutância estomática às 12:00 h, enquanto que em PSNI foi

observado aumento nestas taxas em relação às medidas feitas às 10:00 h. As condutâncias estomáticas de PSI e PSNI foram diferentes nas medidas realizadas na manhã. Quando se comparou PDNI com PDI não houve diferenças nos valores de A , g e E , em todos os horários avaliados. Ao meio-dia, tanto PDI quanto PDNI apresentaram menores condutâncias estomáticas e menores valores de A e E quando comparados com PSI e PSNI. Somente no final da tarde, é que todas as plantas dos diferentes tratamentos não apresentaram diferenças significativas.

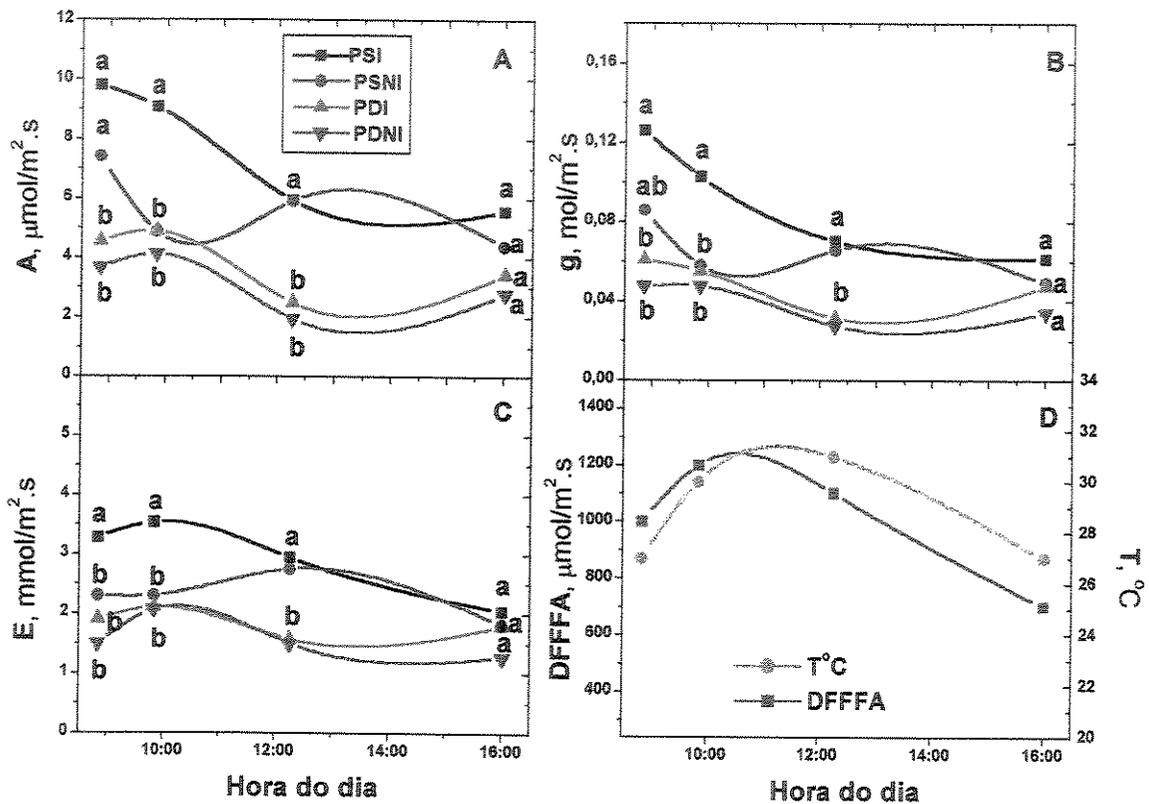


Figura 20: Efeito de doze dias após o reinício da irrigação em laranjeiras ‘Pêra’ enxertadas sobre limoeiros ‘Cravo’, sadias ou infectadas pela bactéria *Xylella fastidiosa*, no segundo ciclo de deficiência hídrica. (A) A (assimilação de CO_2); (B) g (condutância estomática); (C) E (transpiração) e (D) DFFFA (densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos); T (temperatura do ar); PSI (plantas sadias irrigadas); PSNI (plantas sadias não irrigadas); PDI (plantas doentes irrigadas); PDNI (plantas doentes não irrigadas). Cada ponto representa a média de 5 repetições. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si estatisticamente (teste de Duncan, 5%).

Pela fig. 21 notou-se que, mesmo 22 dias após a reirrigação dos vasos, PSNI ainda apresentou menores valores de A , g e E às 12:30 h, portanto, não houve total recuperação dessas plantas quando comparadas com PSI. Não ocorreram diferenças significativas em A , g e E entre PDI e PDNI, mas as variáveis analisadas foram sempre menores que as de PSI, exceto às 15:30 h, quando não ocorreram diferenças significativas entre todos os tratamentos.

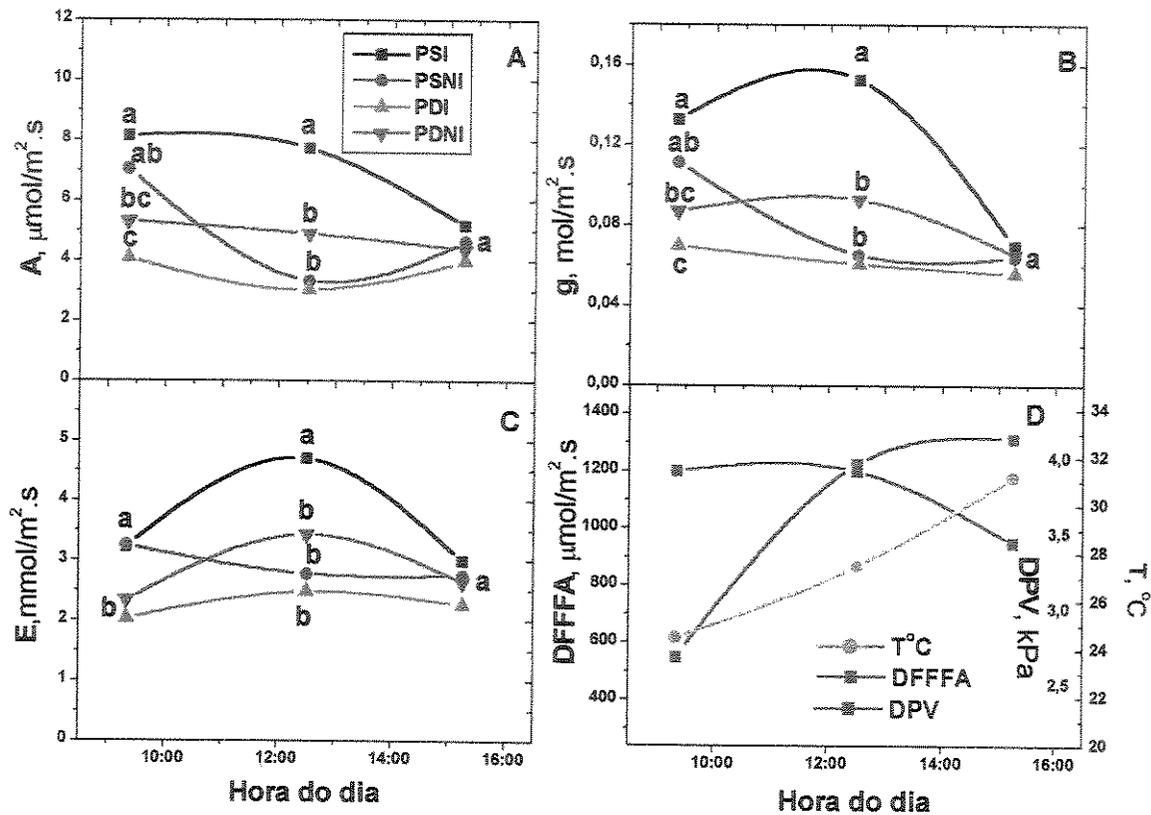


Figura 21: Efeito de vinte e dois dias após o reinício da irrigação em laranjeiras 'Pêra' enxertadas sobre limoeiros 'Cravo', sadias ou infectadas pela bactéria *Xylella fastidiosa*, no segundo ciclo de deficiência hídrica. (A) A (assimilação de CO_2); (B) g (condutância estomática); (C) E (transpiração) e (D) DFFFA (densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos); T (temperatura do ar) e DPV (déficit de pressão de vapor entre o ar e a folha); PSI (plantas sadias irrigadas); PSNI (plantas sadias não irrigadas); PDI (plantas doentes irrigadas); PDNI (plantas doentes não irrigadas). Cada ponto representa a média de 5 repetições. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si estatisticamente (teste de Duncan, 5%).

Os valores de A , g e E de PSI variaram entre os dias de medidas. Isto pode estar relacionado com as variações ambientais como, temperatura, DFFFA e DPV entre o ar e a folha. O DPV aumentou no meio do dia, quando foram observados os valores mais elevados de temperatura e de radiação solar com concomitante queda das taxas fotossintéticas. No entanto, temperaturas mais baixas (menores que 30°C) associadas com alto DPV, como observado na fig.21D, podem levar ao aumento da condutância estomática neste horário, mantendo assim A e E elevados em plantas saudáveis.

2.2) Relações hídricas

Os valores de ψ às 6:00 h em PSNI foram menores que os dos outros tratamentos (fig.22), no sexto dia de deficiência hídrica. Em PDNI o ψ começou a decrescer a partir do sétimo dia após a suspensão da irrigação, no entanto, neste dia os valores de ψ de PSNI já eram estatisticamente diferentes dos de PDNI, a queda do potencial foi mais rápida em PSNI. As laranjeiras saudáveis irrigadas mantiveram o ψ ao redor de -0,2 MPa enquanto que, nas laranjeiras doentes mantidas irrigadas, o ψ variou entre -0,25 a -0,35 MPa. No dia de deficiência hídrica mais severa (11 dias após a suspensão da irrigação), o ψ de PSNI foi -3,5 MPa e o de PDNI foi -3,0 MPa. As medidas feitas após a reirrigação, não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos.

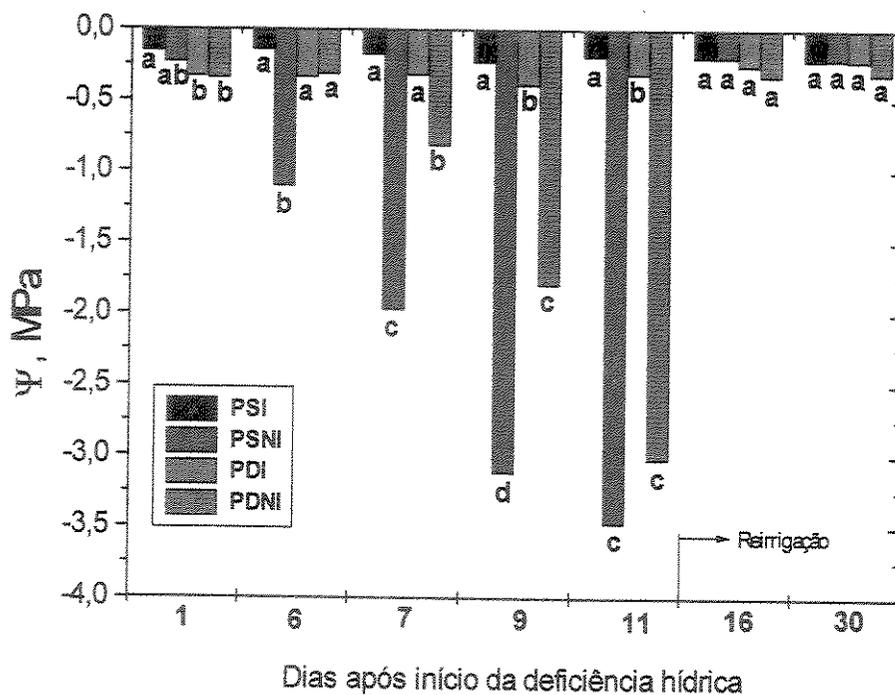


Figura 22: Efeito do segundo ciclo de deficiência hídrica no potencial da água da folha (Ψ), às 6:00 h, em laranjeiras ‘Pêra’ enxertadas sobre limoeiros ‘Cravo’, sadias ou infectadas pela bactéria *Xylella fastidiosa*. A reirrigação ocorreu no décimo primeiro dia após início da deficiência hídrica. PSI (plantas sadias irrigadas); PSNI (plantas sadias não irrigadas); PDI (plantas doentes irrigadas); PDNI (plantas doentes não irrigadas). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si estatisticamente. Cada coluna representa a média de 5 repetições (teste de Duncan, 5%).

O potencial da água na folha às 14:00 h (fig.23) em PSI foi entre 30 a 50% superior ao Ψ de PDI ao longo de todo experimento. Esta foi uma tendência que já tinha sido observada no potencial da água na folha do primeiro ciclo de deficiência hídrica (fig.14). Em PSNI o Ψ foi ao redor de $-2,0$ MPa, no sexto dia sob deficiência hídrica. Em PDNI, neste dia, o potencial da água na folha ainda era semelhante ao seu controle irrigado (PDI), ao redor de $-1,25$ MPa. A partir do sétimo dia, os tratamentos não irrigados apresentaram Ψ mais baixos que seus respectivos controles irrigados. No nono dia de deficiência hídrica, em PSNI o valor de Ψ foi mais baixo que em PDNI. Após a reirrigação, tanto PSNI quanto PDNI apresentaram valores

similares aos respectivos controles (PSI e PDI), entretanto, o potencial da água na folha das laranjeiras com CVC foi menor que o Ψ das plantas saudas.

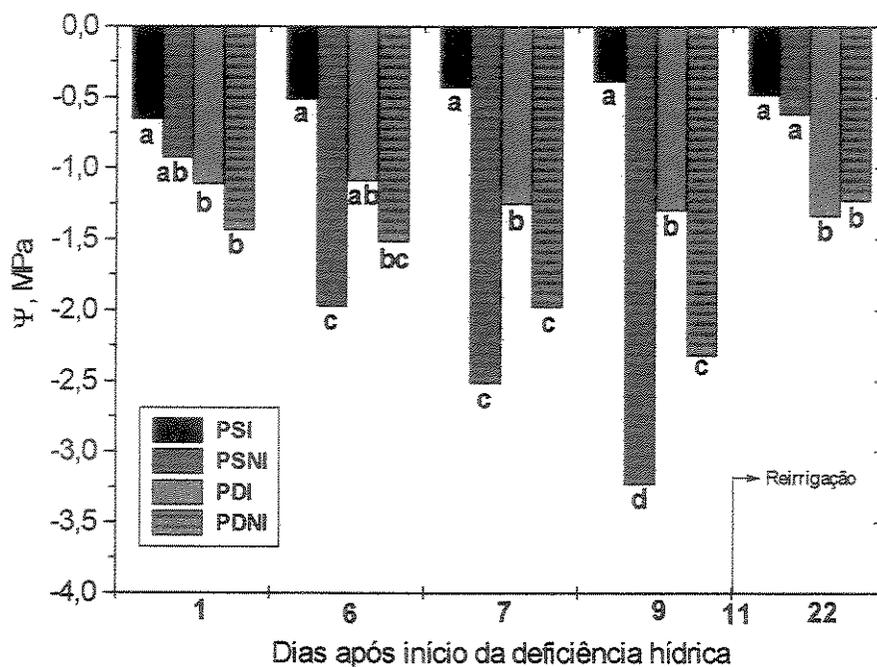


Figura 23: Efeito do segundo ciclo de deficiência hídrica no potencial da água da folha (Ψ), às 14:00 h, em laranjeiras ‘Pêra’ enxertadas sobre limoeiros ‘Cravo’, saudas ou infectadas pela bactéria *Xylella fastidiosa*. A reirrigação ocorreu no décimo primeiro dia após início da deficiência hídrica. PSI (plantas saudas irrigadas); PSNI (plantas saudas não irrigadas); PDI (plantas doentes irrigadas); PDNI (plantas doentes não irrigadas). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si estatisticamente. Cada coluna representa a média de 5 repetições (teste de Duncan, 5%).

2.3) Conteúdo de Ácido Abscísico

Não foram detectadas variações nas concentrações de ABA no primeiro dia de deficiência hídrica (fig.24). No sétimo dia, o conteúdo de ácido abscísico em PSNI foi maior (1,2 $\mu\text{g/g}$ de massa seca), sendo esta concentração 5,2 vezes maior do que a encontrada em PSI. Não foram constatadas diferenças significativas no conteúdo de ABA de PDI e PDNI, no sétimo dia de deficiência hídrica, apesar da condutância estomática em PDNI (fig.18B), às

12:30 h, ter sido mais baixa que em PDI. Os valores de Ψ , no sétimo dia, às 6:00 h e 14:00 h (fig.22 e 23), foram mais baixos em PDNI que em PDI. As concentrações de ABA em PSNI e PDNI foram mais elevadas, em relação aos respectivos controles (PSI e PDI), no nono dia de limitação de água, não tendo ocorrido diferenças significativas entre os tratamentos estressados (fig.24). As condutâncias estomáticas, neste mesmo dia, para PSNI e PDNI, foram as menores observadas durante o experimento (fig.19B). Após a reirrigação, todas as laranjeiras apresentaram concentrações de ABA similares às observadas no início do experimento.

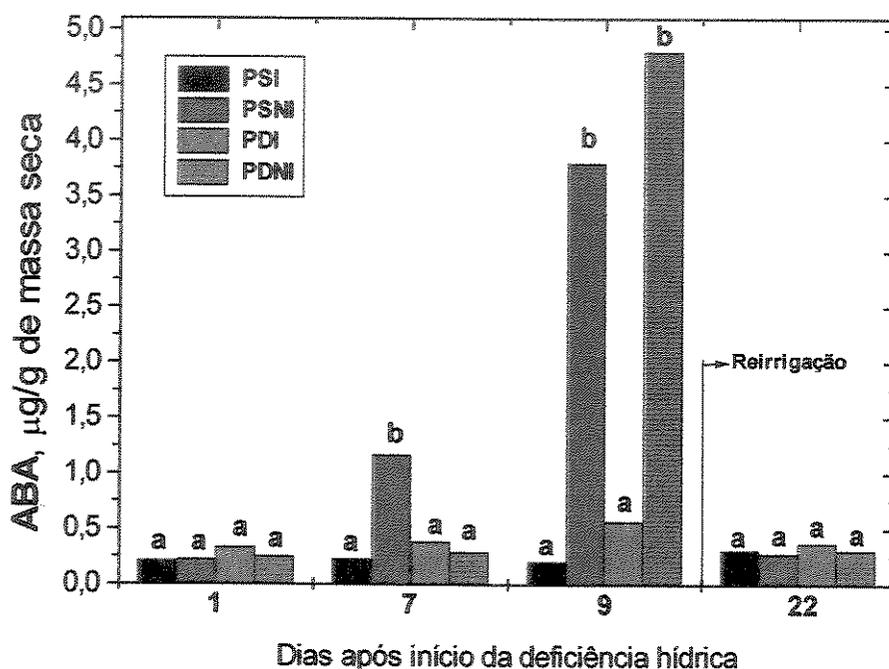


Figura 24: Efeito do segundo ciclo de deficiência hídrica no conteúdo de ácido abscísico (ABA) das folhas de laranjeiras 'Pêra' enxertadas sobre limoeiros 'Cravo', sadias ou infectadas pela bactéria *Xylella fastidiosa*. A reirrigação ocorreu no décimo primeiro dia após início da deficiência hídrica. PSI (plantas sadias irrigadas); PSNI (plantas sadias não irrigadas); PDI (plantas doentes irrigadas); PDNI (plantas doentes não irrigadas). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si estatisticamente. Cada coluna representa a média de 5 repetições (teste de Duncan, 5%).

2.4) Conteúdo de carboidratos

Para a dosagem de carboidratos foram escolhidos três dias de coletas: antes do tratamento de deficiência hídrica, no dia de estresse mais severo e após o reinício da irrigação. Optou-se neste trabalho, em apresentar apenas o nono dia (estresse mais severo), pois foi o único dia em que foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos quanto aos teores de carboidratos.

Comparando-se PSI com PSNI (fig.25), observou-se um maior acúmulo de sacarose às 12:00 h em PSNI (fig.25A) e que o conteúdo de açúcares redutores foi sempre maior que nas laranjeiras irrigadas, com exceção às 17:00 h, em que as concentrações destes dois tratamentos ficaram semelhantes (fig.25B). O teor de amido (fig.25C) foi sempre menor em PSNI, quando comparado com PSI.

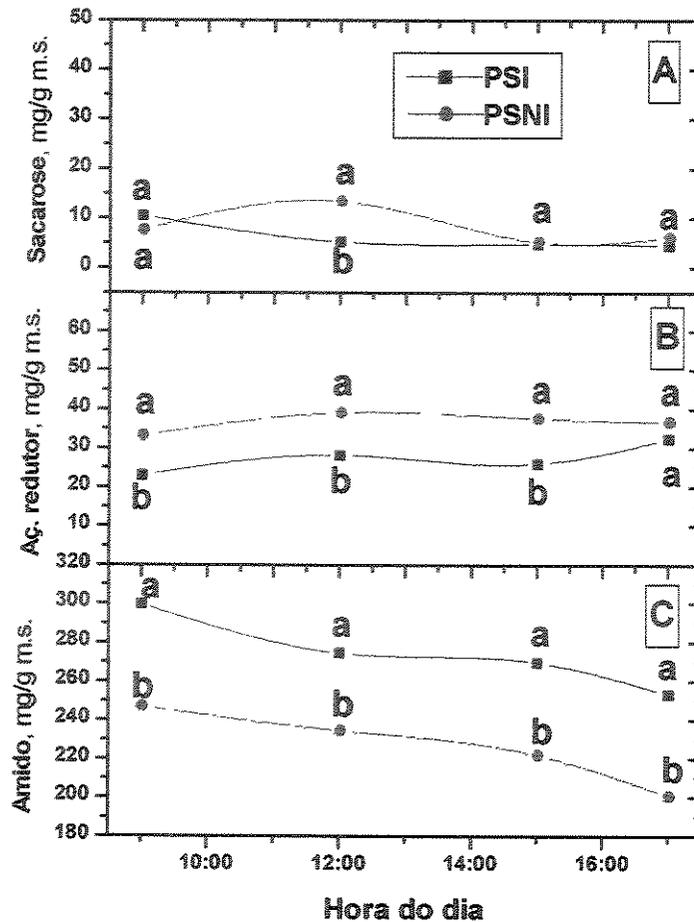


Figura 25: Efeito de nove dias de deficiência hídrica no segundo ciclo nas concentrações de (A) sacarose, (B) açúcar redutor e (C) amido, após nove dias de interrupção da irrigação, nas folhas de laranjeiras ‘Pêra’ enxertadas sobre limoeiros ‘Cravo’. Plantas saudas irrigadas (PSI) e plantas saudas não irrigadas (PSNI). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si estatisticamente. Cada ponto representa a média de 5 repetições (teste de Duncan, 5%).

Os teores de sacarose (fig.26A) foram estatisticamente distintos entre PDI e PDNI, com exceção às 12:00 h, quando ocorreu aumento nas concentrações de sacarose em PDNI. Os teores de açúcares redutores (fig.26B) entre PDI e PDNI só diferiram ao meio-dia, quando ficou mais elevado em PDNI. A deficiência hídrica, nas plantas com CVC, acarretou em decréscimo nas concentrações de amido (fig.26C). No final do dia, PDNI apresentou queda nos teores de amido a partir das 15:00 h.

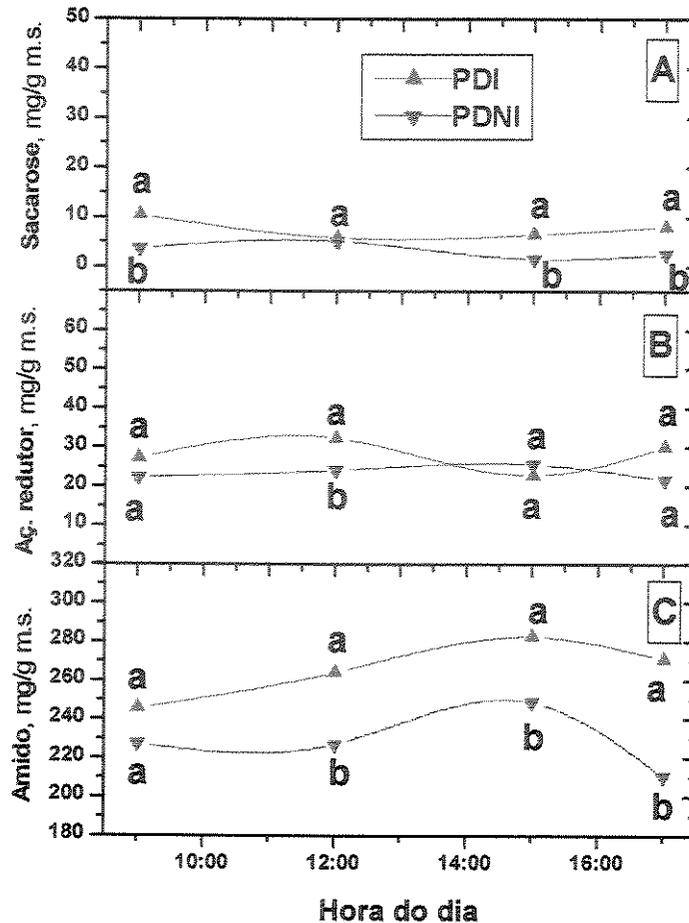


Figura 26: Efeito de nove dias de deficiência hídrica no segundo ciclo nas concentrações de (A) sacarose; (B) açúcar redutor e (C) amido, após nove dias de interrupção da irrigação, nas folhas de laranjeiras ‘Pêra’ enxertadas sobre limoeiros ‘Cravo’, infectadas pela bactéria *Xylella fastidiosa*. Plantas doentes irrigadas (PDI) e plantas doentes não irrigadas (PDNI). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si estatisticamente. Cada ponto representa a média de 5 repetições (teste de Duncan, 5%).

Não foram observadas diferenças significativas em relação ao conteúdo de sacarose e açúcares redutores entre PSI e PDI (figs.27A e B). O conteúdo de amido variou apenas no período da manhã (9:00 h), quando as plantas com CVC apresentaram menores teores de amido quando comparadas com as plantas sadias (fig. 27C).

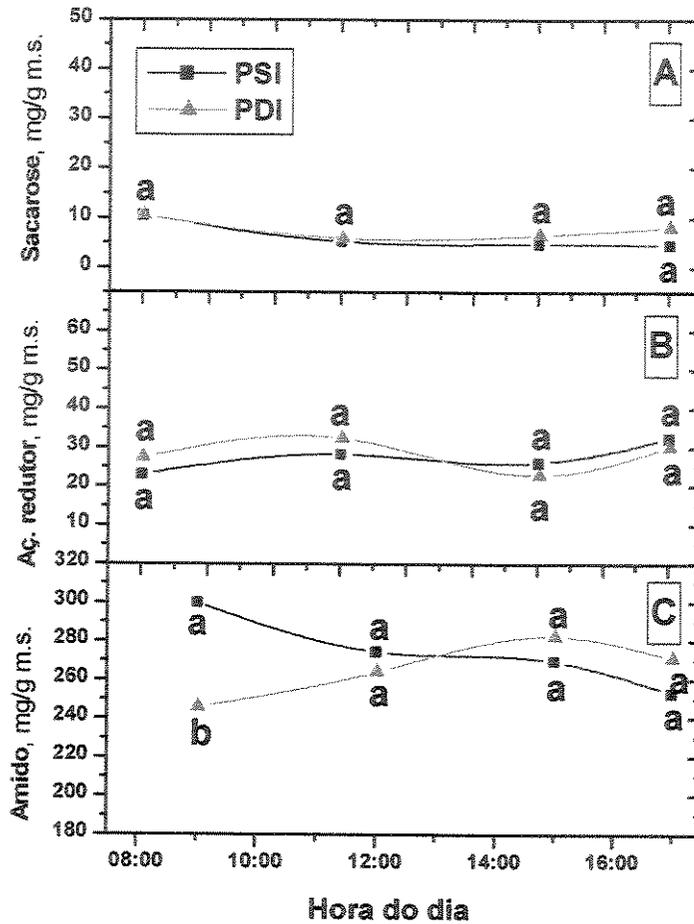


Figura 27: Efeito de um ano e oito meses após a inoculação da bactéria *Xylella fastidiosa* nas concentrações de (A) sacarose; (B) açúcar redutor e (C) amido, nas folhas de laranjeiras 'Pêra' enxertadas sobre limoeiros 'Cravo'. Plantas saudáveis irrigadas (PSI) e plantas doentes irrigadas (PDI). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si estatisticamente. Cada ponto representa a média de 5 repetições (teste de Duncan, 5%).

3) Terceiro ciclo de deficiência hídrica

3.1) Trocas gasosas

No primeiro dia de medidas do terceiro ciclo de deficiência hídrica, realizado em abril de 1999, a fotossíntese das plantas com CVC foi menor que a das plantas saudias, com exceção do primeiro horário de medida (fig.28). Às 8:30 h a condutância estomática das plantas dos diversos tratamentos variou entre 0,16 a 0,19 mol/m².s e as taxas de assimilação de CO₂, entre 7,6 e 9,6 μmol/m².s e de transpiração entre 2,8 a 3,2 mmol/m².s. Uma hora mais tarde, independentemente dos tratamentos, *g* caiu e se manteve assim ao longo do dia. As condutâncias estomáticas das plantas saudias foram, aproximadamente, 50% maiores (0,13 mol/m².s) que nas laranjeiras com CVC (0,05 mol/m².s). A transpiração alcançou as taxas mais elevadas ao redor das 11:00 h para PSI e PSNI (aproximadamente 4,0 mmol/m².s), decrescendo em seguida. As taxas de transpiração de PDI e PDNI, a partir das 11:00 h, mantiveram-se praticamente constantes até o final do dia, por volta de 2,0 e 1,5 mmol/m².s, respectivamente.

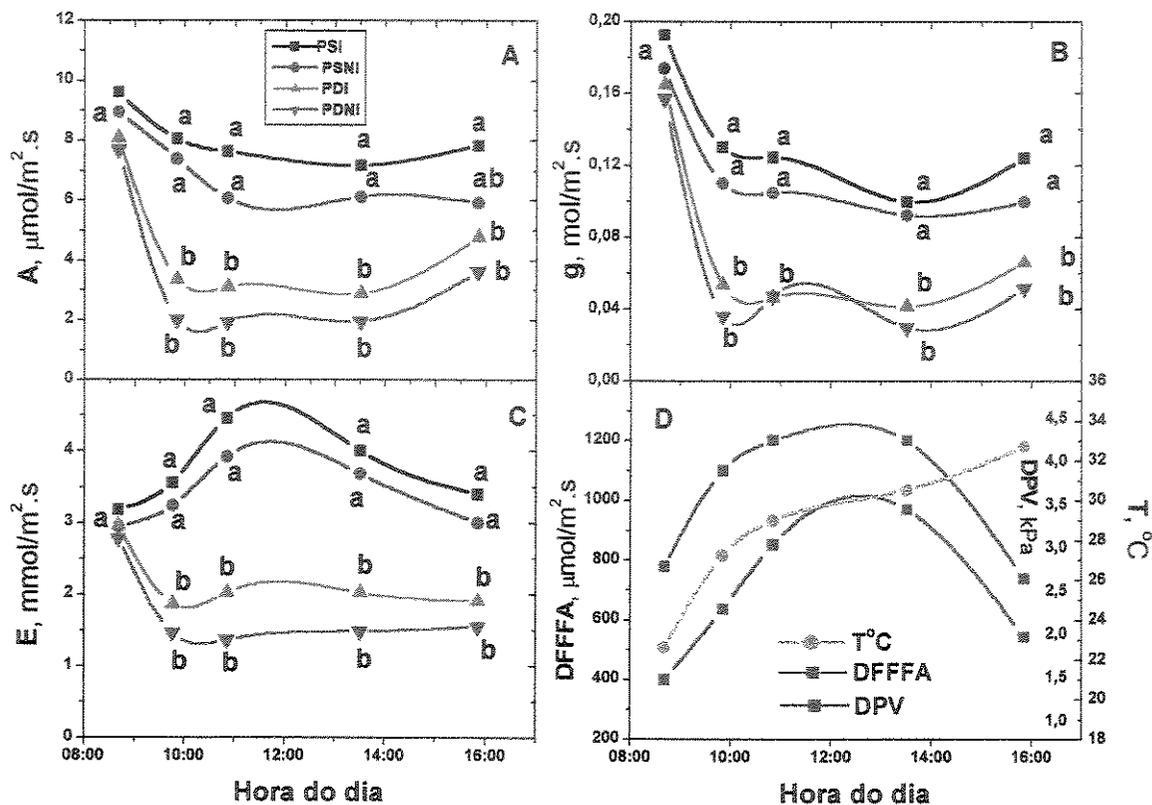


Figura 28: Efeito de um dia de deficiência hídrica em laranjeiras ‘Pêra’ enxertadas sobre limoeiros ‘Cravo’, sadias ou infectadas pela bactéria *Xylella fastidiosa*, no terceiro ciclo. (A) A (assimilação de CO_2); (B) g (condutância estomática); (C) E (transpiração) e (D) DFFFA (densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos); T (temperatura do ar) e DPV (déficit de pressão de vapor entre o ar e a folha); PSI (plantas sadias irrigadas); PSNI (plantas sadias não irrigadas); PDI (plantas doentes irrigadas); PDNI (plantas doentes não irrigadas). Cada ponto representa a média de 5 repetições. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si estatisticamente (teste de Duncan, 5%).

Após o quinto dia sem irrigação (fig.29), as laranjeiras sadias não irrigadas apresentaram valores de A decrescentes, em relação ao primeiro horário de medidas. Entretanto, estas medidas só foram estatisticamente diferentes, quando comparadas com os valores de A de PSI, às 16:00 h. As taxas de fotossíntese de PSI e PSNI, às 13:30 h, foram, aproximadamente, $5,2 \mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$ e $3,7 \mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$, respectivamente. Os valores de A e E de PDNI foram semelhantes aos de PDI, mas a condutância estomática, por volta das 13:30 h, foi menor do que de PDI. O valor de A das plantas doentes, às 8:00 h, foi, aproximadamente, $5,7 \mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$ e, nas demais medidas do dia, esteve ao redor de $3,0 \mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$. As taxas de fotossíntese de PDI foram, geralmente, 50% menores que as das laranjeiras sadias irrigadas, nas medidas feitas após as 9:00 h. Os valores de g e E em PSI foram sempre maiores que os de PDI, com exceção das medidas feitas às 8:00 h, que não apresentaram diferenças significativas entre os quatro tratamentos. Comparando-se estes resultados com os apresentados na fig.28, os tratamentos apresentaram o mesmo padrão de resposta, com exceção de PSNI, que apresentou diferenças significativas nos valores de A , g e E , a partir das 14:00 h, quando comparado com PSI.

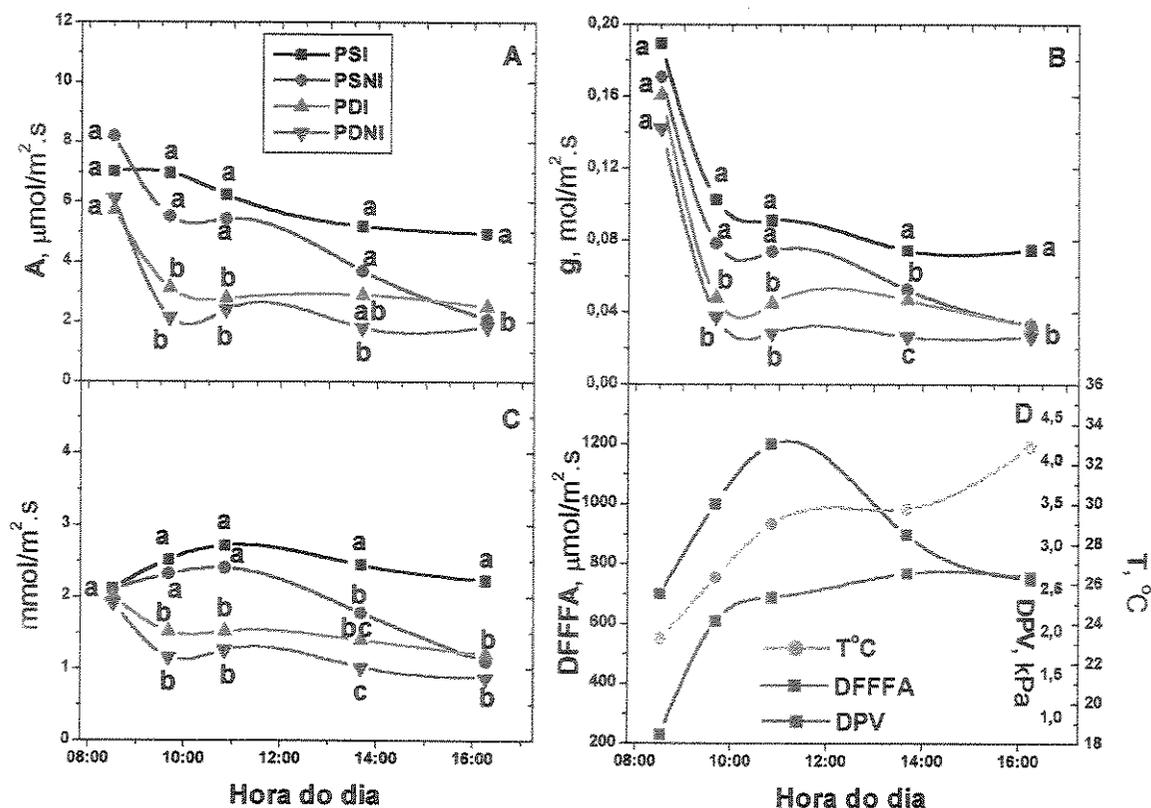


Figura 29: Efeito de cinco dias de deficiência hídrica em laranjeiras ‘Pêra’ enxertadas sobre limoeiros ‘Cravo’, sadias ou infectadas pela bactéria *Xylella fastidiosa*, no terceiro ciclo. (A) A (assimilação de CO_2); (B) g (condutância estomática); (C) E (transpiração) e (D) DFFFA (densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos); T (temperatura do ar) e DPV (déficit de pressão de vapor entre o ar e a folha); PSI (plantas sadias irrigadas); PSNI (plantas sadias não irrigadas); PDI (plantas doentes irrigadas); PDNI (plantas doentes não irrigadas). Cada ponto representa a média de 5 repetições. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si estatisticamente (teste de Duncan, 5%).

A fig.30 representa o oitavo dia de deficiência hídrica. Os valores de A de PSNI foram, aproximadamente, 15% das taxas de PSI. Os valores de E e g foram 45% das taxas das PSI, às 9:30 h e nas demais medidas realizadas durante o dia, representaram 25 a 30% das taxas de PSI. Não foram encontradas diferenças significativas em g entre PDI e PDNI. Quanto às taxas de fotossíntese e transpiração destas plantas, ocorreram diferenças apenas às 9:30 h.

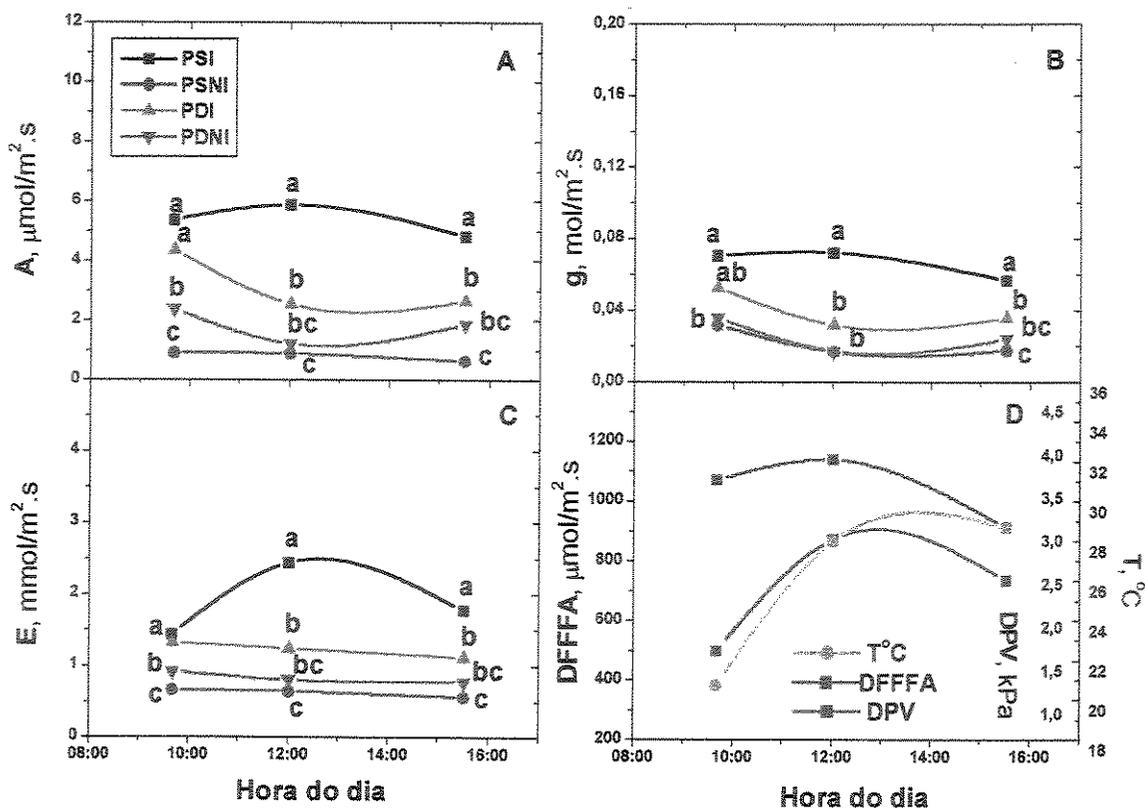


Figura 30: Efeito de oito dias de deficiência hídrica em laranjeiras ‘Pêra’ enxertadas sobre limoeiros ‘Cravo’, sadias ou infectadas pela bactéria *Xylella fastidiosa*, no terceiro ciclo. (A) A (assimilação de CO_2); (B) g (condutância estomática); (C) E (transpiração) e (D) DFFFA (densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos); T (temperatura do ar) e DPV (déficit de pressão de vapor entre o ar e a folha); PSI (plantas sadias irrigadas); PSNI (plantas sadias não irrigadas); PDI (plantas doentes irrigadas); PDNI (plantas doentes não irrigadas). Cada ponto representa a média de 5 repetições. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si estatisticamente (teste de Duncan, 5%).

O décimo dia de deficiência hídrica (fig.31) foi o mais severo para PSNI, quando apresentou os menores valores de A , g e E . A fotossíntese de PSI (fig.31A) foi da ordem de $7,7 \mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$, enquanto que em PSNI foi $0,5 \mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$, às 8:30 h. Pela manhã, o valor de g de PSNI foi $0,038 \text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$, enquanto que g para PSI foi, aproximadamente, três vezes este valor. Às 12:00 h, g de PSI foi 5,5 vezes maior que em PSNI. As taxas de transpiração de PSNI, conseqüentemente, foram as mais baixas observadas (fig.31C). Embora PDNI também estivesse

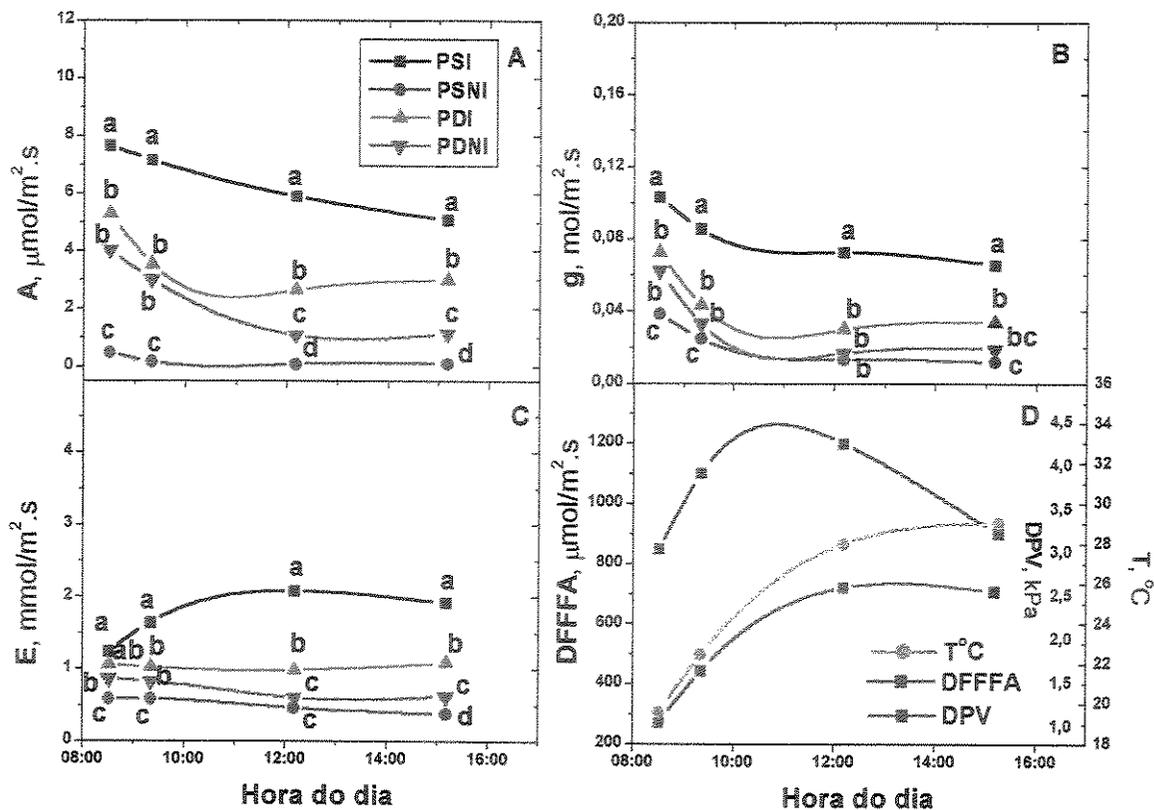


Figura 31: Efeito de dez dias de deficiência hídrica em laranjeiras ‘Pêra’ enxertadas sobre limoeiros ‘Cravo’, sadias ou infectadas pela bactéria *Xylella fastidiosa*, no terceiro ciclo. (A) A (assimilação de CO_2); (B) g (condutância estomática); (C) E (transpiração) e (D) DFFFA (densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos); T (temperatura do ar) e DPV (déficit de pressão de vapor entre o ar e a folha); PSI (plantas sadias irrigadas); PSNI (plantas sadias não irrigadas); PDI (plantas doentes irrigadas); PDNI (plantas doentes não irrigadas). Cada ponto representa a média de 5 repetições. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si estatisticamente (teste de Duncan, 5%).

com o mesmo período sem irrigação, ainda não havia ocorrido limitação da fotossíntese pela manhã, quando comparado com PDI, o que só foi observado a partir da medida realizada às 12:00 h. Mesmo apresentando baixos valores de g , PDNI assimilou mais CO_2 que PSNI, a partir das 12:00 h. Os valores de A e g em PSI foram sempre superiores aos observados em PDI. Os valores de E , nas medidas realizadas às 8:30 h, foram semelhantes em PSI e PDI, provavelmente, em função do baixo déficit de pressão de vapor (1,1 kPa) e da temperatura

(19,6°C), observados neste horário. Nas demais medidas de E de PSI e PDI, os valores foram distintos. Comparando os resultados de A do terceiro ciclo com os dos ciclos anteriores, pôde-se observar as diferenças de respostas de PSI em relação ao PDI. No primeiro ciclo, não ocorreram diferenças de resposta, entre estas plantas, com exceção em algumas medidas feitas às 12:00 h, apesar das plantas terem apresentado sintomas da doença nesta fase (figs.9A e 12A). No segundo ciclo, os valores de A de PSI e PDI foram, geralmente, estatisticamente diferentes nas medidas realizadas desde a manhã até, aproximadamente, às 14:00 h. No final da tarde, os valores de A foram semelhantes entre PSI e PDI. No terceiro ciclo, em todos os dias avaliados, com exceção da primeira medida, realizada por volta das 8:30 h, houve diferenças estatísticas entre PSI e PDI. À medida que a doença evoluiu, as taxas de fotossíntese tanto de PDI como de PDNI tenderam a decrescer ao longo do dia. Dez dias após a interrupção da irrigação, PDNI não apresentou a mesma taxa de fotossíntese e de teor de umidade do substrato (Ver fig.34, pág.74) observados em PSNI. As taxas mais baixas de transpiração observadas em PDNI diminuíram a taxa de secagem do substrato. A reirrigação foi imposta em PSNI, pois estas laranjeiras apresentavam-se estressadas e começando a cair as folhas. Decidiu-se reiniciar a irrigação de PDNI quando o teor de umidade do substrato fosse semelhante ao encontrado em PSNI (15%) no dia da reirrigação.

Após quatro dias de reirrigação, A , g e E em PSNI recuperaram-se parcialmente, sendo seus valores menores que os observados em PSI (fig.32). Essas taxas foram, aproximadamente, 50% inferiores às observadas em PSI. Os valores de A em PDNI (fig.32A) apresentaram diferenças significativas, quando comparadas com os de PDI, em todos os horários de medidas. Os valores de A em PDNI, às 12:00 h chegaram próximos ao zero, em função da diminuição da condutância estomática. Os valores de E e g em PDI e PDNI (figs. 32B e 32C) foram diferentes às 12:00 h e 16:00 h.

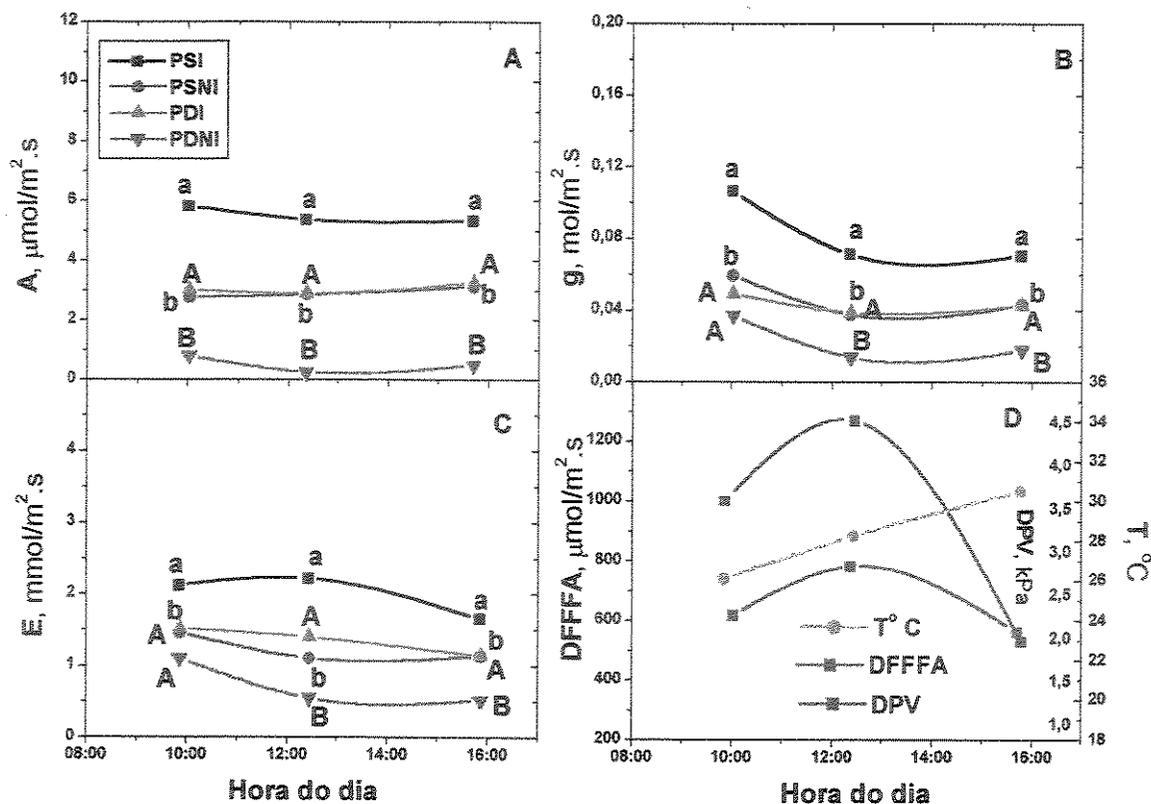


Figura 32: Efeito do terceiro ciclo de deficiência hídrica em laranjeiras ‘Pêra’ enxertadas sobre limoeiros ‘Cravo’, sadias ou infectadas pela bactéria *Xylella fastidiosa*, quatro dias após o reinício da irrigação em PSNI e quatorze dias após a interrupção da irrigação em PDNI. (A) A (assimilação de CO_2); (B) g (condutância estomática); (C) E (transpiração) e (D) DFFFA (densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos); T (temperatura do ar) e DPV (déficit de pressão de vapor entre o ar e a folha); PSI (plantas sadias irrigadas); PSNI (plantas sadias não irrigadas); PDI (plantas doentes irrigadas); PDNI (plantas doentes não irrigadas). Cada ponto representa a média de 5 repetições. Letras minúsculas representam a comparação entre as plantas sadias e as letras maiúsculas a comparação entre as plantas doentes. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si estatisticamente (teste de Duncan, 5%).

Após 17 e 12 dias de reirrigação para PSNI e PDNI, respectivamente, pôde-se observar que ambos os tratamentos apresentaram valores de A , g e E semelhantes aos seus respectivos controles, PSI e PDI (fig. 33).

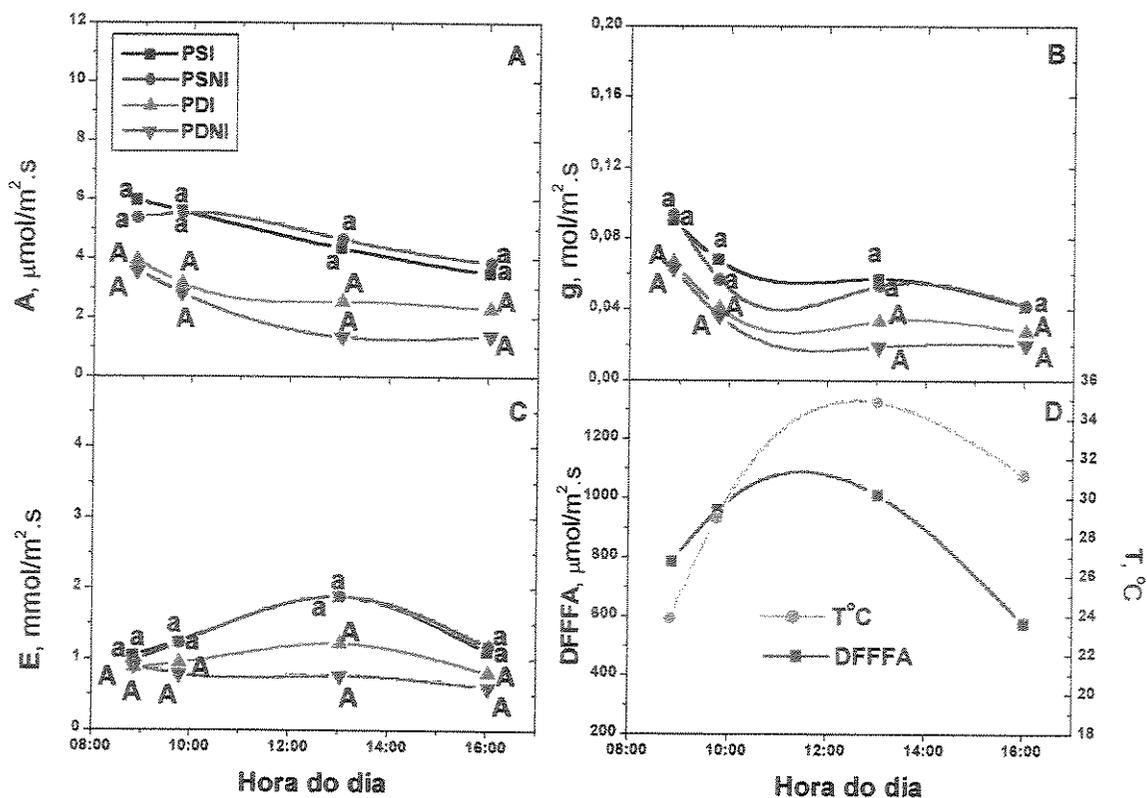


Figura 33: Efeito do terceiro ciclo de deficiência hídrica em laranjeiras ‘Pêra’ enxertadas sobre limoeiros ‘Cravo’, sadias ou infectadas pela bactéria *Xylella fastidiosa*, dezessete e doze dias após o reinício da irrigação em PSNI e PDNI, respectivamente. (A) *A* (assimilação de CO₂); (B) *g* (condutância estomática); (C) *E* (transpiração) e (D) DFFFA (densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos) e *T* (temperatura do ar); PSI (plantas sadias irrigadas); PSNI (plantas sadias não irrigadas); PDI (plantas doentes irrigadas); PDNI (plantas doentes não irrigadas). Cada ponto representa a média de 5 repetições. Letras minúsculas representam a comparação entre as plantas sadias e as letras maiúsculas a comparação entre as plantas doentes. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si estatisticamente (teste de Duncan, 5%).

Fazendo um paralelo com os dados de *A*, *g* e *E* obtidos no primeiro ciclo de deficiência hídrica, pôde-se verificar que, naquela época, PDI apresentou diferenças em relação às medidas de PSI, principalmente, nas medidas das 12:00 h. Após um ano do primeiro ciclo de deficiência hídrica, verificou-se que as diferenças observadas entre PSI e PDI puderam ser observadas em quase todos os horários com exceção das medidas realizadas nos primeiros horários do dia.

3.2) Relações hídricas

A fig.34 ilustra, de forma bem concisa, que a desidratação do substrato dos vasos das laranjeiras com CVC não irrigadas ocorreu mais devagar. Com três dias de deficiência hídrica, o substrato de PSNI apresentou 25% de teor de umidade, contra 28,5% em PDNI. A partir do sexto dia o teor de umidade do substrato de PSNI foi sempre menor do que de PDNI. No décimo dia, a umidade do substrato de PSNI chegou a 14,3%. Para atingir valor semelhante, PDNI levou mais cinco dias (14,8%).

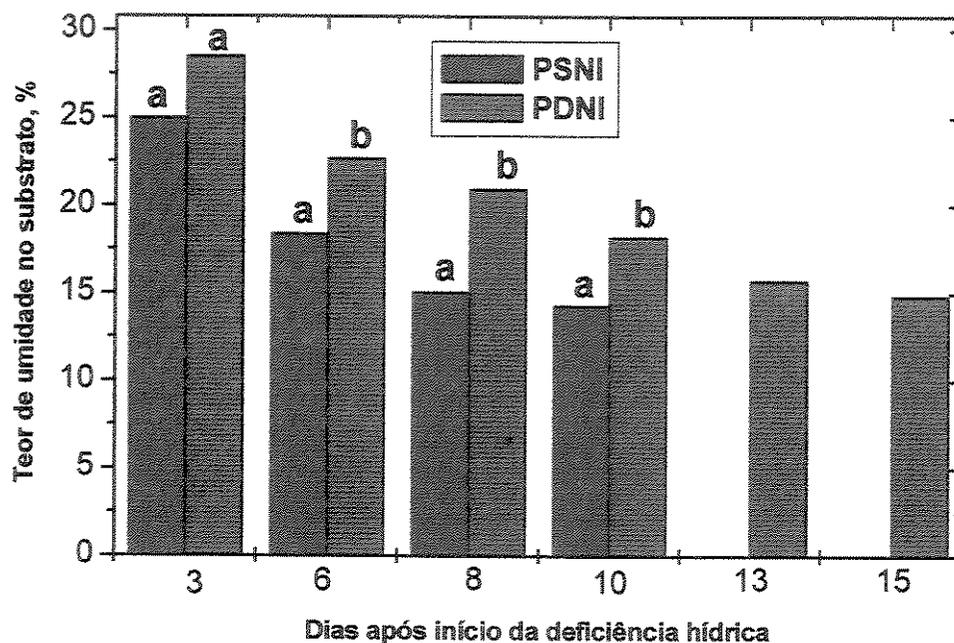


Figura 34: Efeito do terceiro ciclo de deficiência hídrica no teor de umidade do substrato, às 7:00 h, em laranjeiras 'Pêra' enxertadas sobre limoeiros 'Cravo', saudáveis ou infectadas pela bactéria *Xylella fastidiosa*. PSNI (plantas saudáveis não irrigadas); PDNI (plantas doentes não irrigadas). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si estatisticamente. Cada coluna representa a média de 5 repetições (teste de Duncan, 5%).

Na fig. 35 pôde-se observar que a média do potencial da água na folha às 6:00 h, em PSI (-0,2 MPa) foi, aproximadamente, 100% superior à média do Ψ em PDI (-0,5 MPa). As médias dos dois tratamentos foram estatisticamente diferentes do primeiro ao décimo dia de

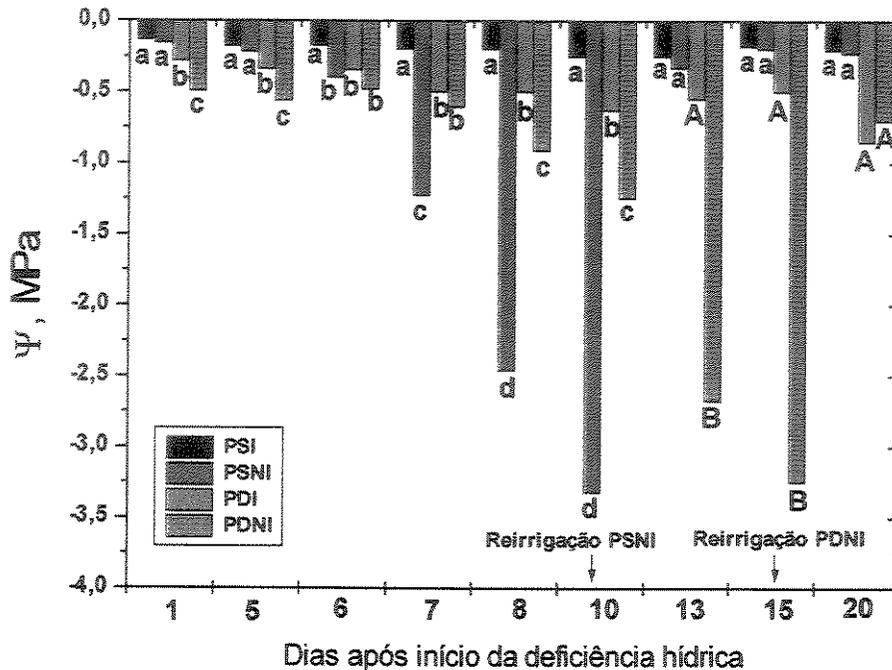


Figura 35: Efeito do terceiro ciclo de deficiência hídrica no potencial da água da folha (Ψ), às 6:00 h, em laranjeiras 'Pêra' enxertadas sobre limoeiros 'Cravo', sadias ou infectadas pela bactéria *Xylella fastidiosa*. A reirrigação das PSNI e PDNI ocorreu, respectivamente, dez e quinze dias após início da deficiência hídrica. PSI (plantas sadias irrigadas); PSNI (plantas sadias não irrigadas); PDI (plantas doentes irrigadas); PDNI (plantas doentes não irrigadas). Letras minúsculas representam a comparação entre as plantas sadias e as letras maiúsculas a comparação entre as plantas doentes. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si estatisticamente. Cada coluna representa a média de 5 repetições (teste de Duncan, 5%).

medidas. O potencial mais baixo observado em PDI já vinha sendo observado nos ciclos anteriores. No primeiro ciclo de deficiência hídrica, o Ψ de PSI foi, aproximadamente, 25% maior que o Ψ de PDI (fig.13). No segundo ciclo de deficiência, o Ψ (fig.22) de PDI foi, praticamente, a metade do Ψ de PSI. Das três épocas avaliadas, o Ψ de PDI foi menor neste terceiro ciclo. O Ψ de PSNI, após a suspensão da irrigação, apresentou o mesmo perfil dos

experimentos anteriores. O Ψ dessas plantas, pela manhã, decresceu mais rápido que em PDNI. Enquanto o Ψ de PSNI foi -3,3 MPa, dez dias após o início do estresse hídrico, em PDNI o potencial da água na folha demorou mais cinco dias para atingir este valor aproximado. O Ψ das PDNI decresceu mais lentamente após a suspensão da irrigação. Devido a menor transpiração das plantas doentes, em decorrência do entupimento do xilema, há menor consumo de água e, conseqüentemente, uma queda mais vagarosa da umidade do substrato acarretando no Ψ mais alto em relação ao PSNI. O potencial da água na folha em PSNI levou cinco dias para alcançar os mesmos valores de Ψ de PDI e PDNI, que estavam mais baixos desde o primeiro dia de medidas. Entretanto, a partir do sexto dia, PSNI apresentou Ψ mais baixo que os de PDI e PDNI. Nos oitavo e décimo dias avaliados, apesar do decréscimo do Ψ em PDNI, quando comparado com PDI, o Ψ de PDNI foi sempre estatisticamente diferente do Ψ de PSNI. A partir da reirrigação do substrato em PSNI, os tratamentos foram analisados separadamente, uma vez que PSNI estava em condições diferentes de PDNI. Nas medidas realizadas três, cinco e dez dias após a reirrigação de PSNI, não ocorreram diferenças significativas quando comparado com o potencial da água na folha de PSI. Cinco dias após o reinício da irrigação em PDNI, não foram encontradas diferenças estatísticas entre estas plantas e as plantas doentes irrigadas (PDI).

A média do Ψ de PDI, -1,9 MPa (fig.36) foi menor do que nos ciclos anteriores. No primeiro e segundo ciclos, a média de PDI esteve ao redor de -1,5 MPa (fig.14) e -1,2 MPa (fig.23), respectivamente. Conforme observado na fig.35, o Ψ de PSNI, levou seis dias para atingir o mesmo potencial de PDI e PDNI à tarde. Os tratamentos PDI e PDNI ainda foram semelhantes no sexto dia de interrupção de irrigação. A mudança no Ψ de PDNI em relação a PDI, foi detectada somente no oitavo dia após o início da deficiência hídrica. Neste dia, não

ocorreram diferenças significativas entre PSNI (-2,8 MPa) e PDNI (-2,5 MPa). No décimo dia, o potencial de PSNI decresceu até o ponto limite esperado neste experimento, não ocorrendo o mesmo com PDNI, que foi atingir este Ψ , no período da tarde, quatro dias depois. Após a reirrigação de PSNI e PDNI, ambos os tratamentos apresentaram potencial da água na folha semelhante aos seus controles irrigados.

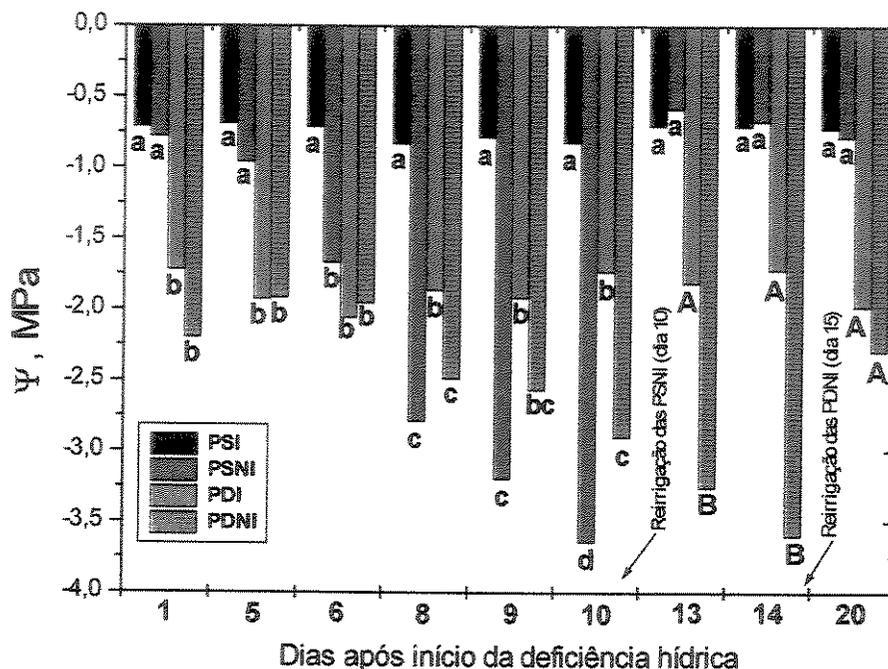


Figura 36: Efeito do terceiro ciclo de deficiência hídrica no potencial da água da folha (Ψ), às 14:00 h, em laranjeiras 'Pêra' enxertadas sobre limoeiros 'Cravo', sadias ou infectadas pela bactéria *Xylella fastidiosa*. A reirrigação das PSNI e PDNI ocorreu, respectivamente, dez e quinze dias após início da deficiência hídrica. PSI (plantas sadias irrigadas); PSNI (plantas sadias não irrigadas); PDI (plantas doentes irrigadas); PDNI (plantas doentes não irrigadas). Letras minúsculas representam a comparação entre as plantas sadias e as letras maiúsculas a comparação entre as plantas doentes. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si estatisticamente. Cada coluna representa a média de 5 repetições (teste de Duncan, 5%).

3.3) Conteúdo de ácido abscísico

A análise do ABA neste período (fig. 37) apresentou padrão de resposta diferente dos experimentos anteriores. Neste ciclo, o aumento de ABA em PDNI, não foi tão elevado,

quando comparado com o conteúdo de ABA em PDI, ao contrário do observado nos dois últimos ensaios. Até o quinto dia de deficiência hídrica não foram encontradas diferenças significativas entre as concentrações de ABA dos quatro tratamentos. O aumento de ABA em

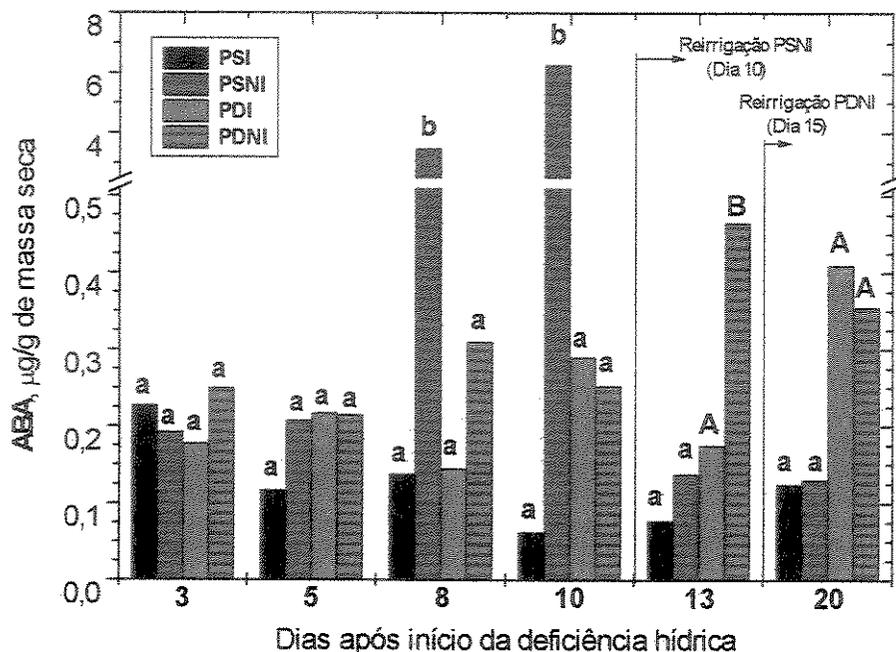


Figura 37: Efeito do terceiro ciclo de deficiência hídrica no conteúdo de ácido abscísico (ABA) nas folhas de laranjeiras ‘Pêra’ enxertadas sobre limoeiros ‘Cravo’, sadias ou infectadas pela bactéria *Xylella fastidiosa*. A reirrigação de PSNI e PDNI ocorreu, respectivamente, dez e quinze dias após início da deficiência hídrica. PSI (plantas sadias irrigadas); PSNI (plantas sadias não irrigadas); PDI (plantas doentes irrigadas); PDNI (plantas doentes não irrigadas). Letras minúsculas representam a comparação entre as plantas sadias e letras maiúsculas a comparação entre as plantas doentes. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si estatisticamente. Cada coluna representa a média de 5 repetições (teste de Duncan, 5%).

PSNI foi detectado no oitavo dia de deficiência hídrica, com 3,5 µg/g de massa seca, correspondente a um aumento de 25 vezes, em relação às concentrações de ABA em PSI. Neste dia, a condutância estomática em PSNI representou, aproximadamente, 23% de *g* em PSI ao redor das 12:00 h (fig.30B). Neste terceiro ciclo, somente PSNI apresentou teores tão elevados (6,3 µg/g massa seca), no dia de deficiência hídrica mais severa (décimo dia). Esta

concentração correspondeu a um aumento de, aproximadamente, 100 vezes, em relação às concentrações de ABA de PSI. No décimo terceiro dia de deficiência hídrica para PDNI, o ABA aumentou apenas 2,7 vezes em relação a PDI. Após a detecção de aumento nas concentrações de ABA em PDNI, quando comparadas com as de PDI, foi possível verificar diferenças significativas nas condutâncias estomáticas dessas plantas, no dia posterior, ou seja, décimo quarto dia de deficiência hídrica (fig. 32B), ao redor das 13:00 h. É importante notar que a média do ABA variou nas plantas controle (PSI e PDI) durante os dias e durante os ciclos. Neste ciclo, o ABA de PSI variou entre 0,05 e 0,25 $\mu\text{g/g}$ de massa seca e em PDI entre 0,15 e 0,3 $\mu\text{g/g}$ de massa seca. Nos ciclos anteriores a média do ABA em PSI foi 0,6 $\mu\text{g/g}$ de massa seca no primeiro ciclo e 0,25 $\mu\text{g/g}$ de massa seca no segundo ciclo. Em PDI, a média do conteúdo de ácido abscísico foi 0,7 e 0,4 $\mu\text{g/g}$ de massa seca, respectivamente aos mesmos períodos. Após o reinício da irrigação dos tratamentos PSNI e PDNI, não ocorreram diferenças significativas no conteúdo de ABA quando comparados com PSI e PDI, respectivamente.

3.4) Conteúdo de carboidratos

O conteúdo de carboidratos foi medido durante três dias (seis e oito dias após início do estresse e após o reinício da irrigação), mas optou-se por mostrar somente o oitavo dia, onde foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos.

O conteúdo de sacarose de PSNI foi, geralmente, mais elevado que em PSI, ocorrendo uma queda entre 12:00 h e 14:00 h quando se verificou diferença significativa entre os dois tratamentos. A partir de então houve novamente um aumento no conteúdo de sacarose em PSNI (fig.38A). Os açúcares redutores em PSNI apresentaram teores mais elevados que em PSI durante o dia todo, com exceção às 17:00 h (fig.38B). Não ocorreram diferenças

significativas nos teores de amido, no entanto, a partir das 15:00 h, as concentrações em PSNI começaram a decrescer, sendo diferentes das de PSI, às 17:00 h.

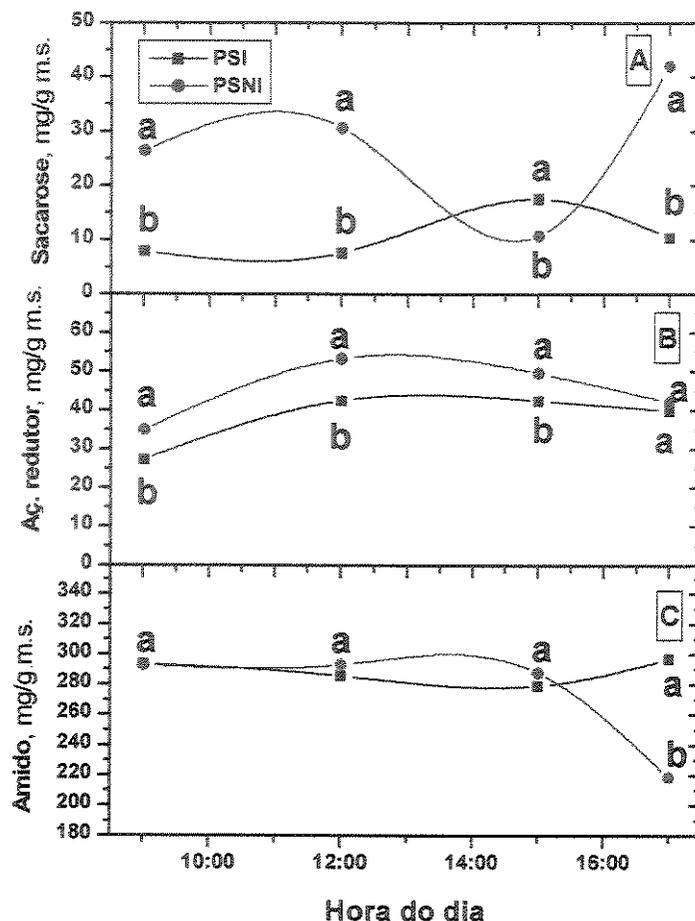


Figura 38: Efeito de oito dias de deficiência hídrica nas concentrações de (A) sacarose; (B) açúcar redutor e (C) amido, nas folhas de laranjeiras ‘Pêra’ enxertadas sobre limoeiros ‘Cravo’. Plantas saudas irrigadas (PSI) e plantas saudas não irrigadas (PSNI). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si estatisticamente. Cada ponto representa a média de 5 repetições (teste de Duncan, 5%).

Em relação aos ciclos anteriores, quando os teores de amido de PSNI (figs.16C e 25C) foram sempre menores que os de PSI no dia de deficiência hídrica mais severa, é importante ressaltar que neste terceiro ciclo (fig.38C), o oitavo dia de deficiência hídrica, não foi o dia de estresse mais severo e, conseqüentemente, PSNI apresentou teores mais baixos de amido em

relação a PSI somente no final do dia. O conteúdo de açúcares redutores, geralmente, foi maior em PSNI, em comparação com PSI, nos três ciclos avaliados (figs.16B, 25B, 38B).

Comparando-se PDI com PDNI, ocorreram diferenças significativas nos teores de sacarose às 8:00 h e 17:00 h (fig.39A). As diferenças encontradas entre essas plantas, nas concentrações de açúcares redutores (fig.39B), foram detectadas às 9:00 h, quando PDI apresentou menores teores de açúcares redutores, e às 15:00 h, com maior acúmulo em PDI. O conteúdo de amido não variou, entre estes tratamentos até às 15:00 h, porém, ocorreu uma queda em PDI, às 17:00 h (fig.39C).

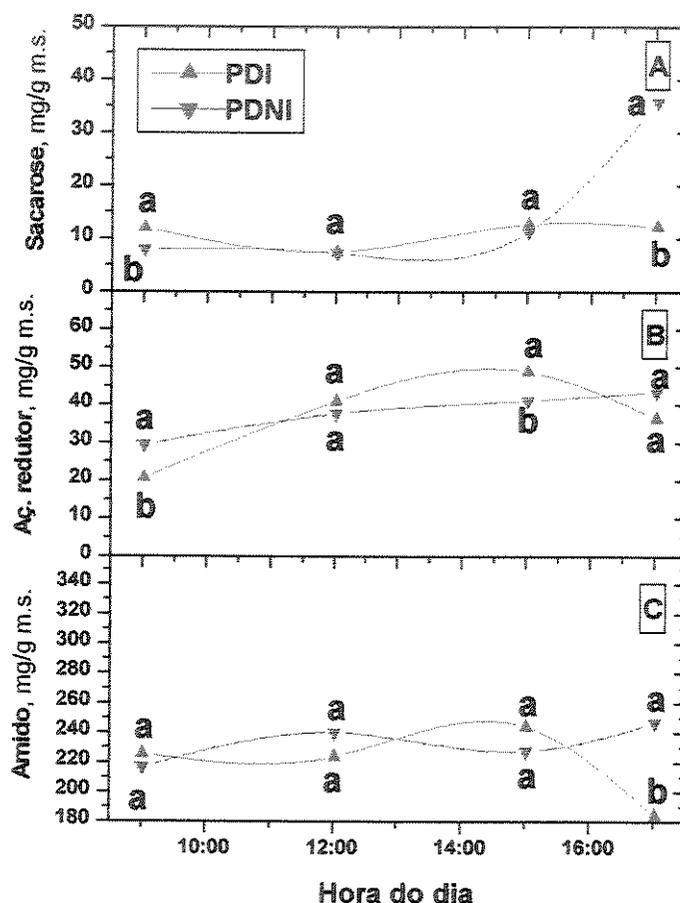


Figura 39: Efeito de oito dias deficiência hídrica nas concentrações de (A) sacarose; (B) açúcar redutor e (C) amido, nas folhas de laranjeiras 'Pêra' enxertadas sobre limoeiros 'Cravo', infectadas pela bactéria *Xylella fastidiosa*. Plantas doentes irrigadas (PDI) e plantas doentes não irrigadas (PDNI). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si estatisticamente. Cada ponto representa a média de 5 repetições (teste de Duncan, 5%).

Quando se compararam as plantas sadias irrigadas com as plantas doentes irrigadas, com dois anos e dois meses após a inoculação da bactéria, percebeu-se que as concentrações de sacarose variaram pouco entre elas (fig.40A). Entretanto, foi possível detectar diferenças significativas às 9:00 h, quando PDI apresentou teores de sacarose maiores que os de PSI, e às 15:00 h, quando esta situação se inverteu (fig.40A). Quanto aos teores de açúcares redutores, houve uma ligeira elevação em PSI, em relação a PDI, às 15:00 h (fig.40B). Neste dia, o teor de amido das plantas doentes foi menor que o das plantas sadias, durante todos os horários avaliados (fig.40C). Esta foi a diferença mais significativa, entre estes dois tratamentos, e que também pôde ser constatada nos dois outros dias avaliados, durante este experimento (dados não apresentados).

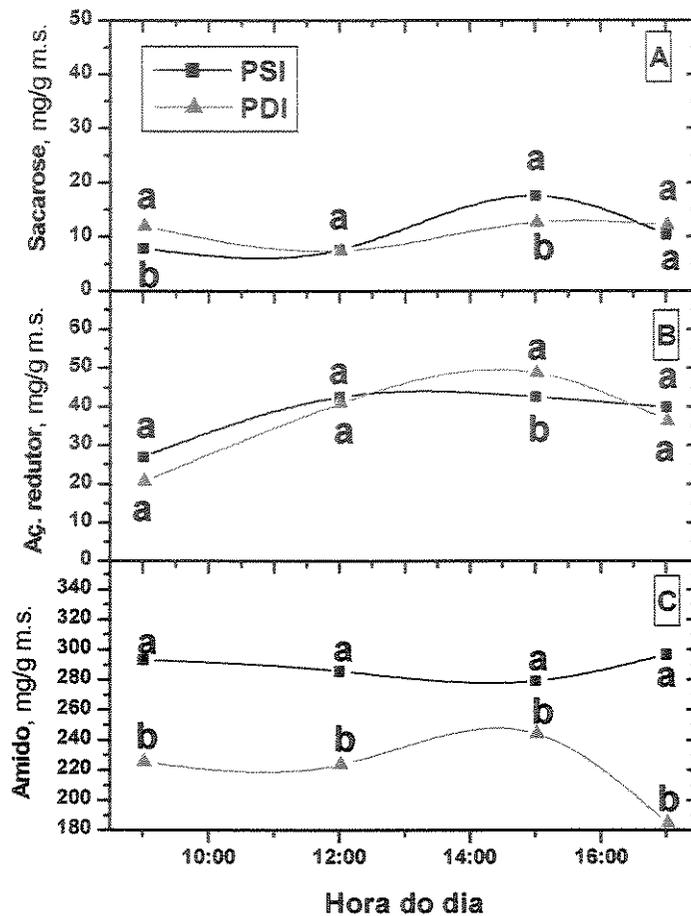


Figura 40: Efeito de dois anos e dois meses após a inoculação bactéria *Xylella fastidiosa* nas concentrações de (A) sacarose; (B) açúcar redutor e (C) amido, nas folhas de laranjeiras 'Pêra' enxertadas sobre limoeiros 'Cravo'. Plantas saudáveis irrigadas (PSI) e plantas doentes irrigadas (PDI). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si estatisticamente. Cada ponto representa a média de 5 repetições (teste de Duncan, 5%).

4) Conteúdo de Ácido 3-indol acético (AIA)

A tabela 1 mostra os resultados obtidos no primeiro e no terceiro ciclos, após dez dias de restrição de água. No primeiro ciclo, o tratamento PSI apresentou a maior concentração de AIA, 15,7 µg/g de massa seca. As laranjeiras com CVC irrigadas apresentaram concentrações semelhantes às observadas em PSNI que, por sua vez, foram diferentes das concentrações de PSI. As plantas doentes estressadas apresentaram as menores concentrações de AIA nesta época (7,35 µg/g de massa seca).

No terceiro ciclo, os tratamentos submetidos à deficiência hídrica apresentaram as menores concentrações de AIA, 7,9 e 7,2 µg/g de massa seca para PSNI e PDNI, respectivamente. Os tratamentos PSI e PDI, neste ciclo, não foram diferentes entre si e apresentaram concentrações mais altas de AIA que as das plantas estressadas.

Tabela I: Efeito de dez dias de deficiência hídrica no conteúdo de ácido 3-indol acético nas folhas de laranjeiras 'Pêra' enxertadas sobre limoeiros 'Cravo', sadias ou infectadas pela bactéria *Xylella fastidiosa*, no primeiro e no terceiro ciclo. Cada resultado representa a média de 5 repetições (teste de Duncan, 5%). Estatística realizada dentro de cada ciclo. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si estatisticamente, em cada ciclo.

	PSI	PSNI	PDI	PDNI
Primeiro ciclo	15,66a	10,20b	11,52b	7,35c
Terceiro ciclo	12,45a	7,90b	10,80a	7,20b

5) Interações entre os resultados

A Fig. 41 ilustra a curva clássica exponencial negativa da condutância estomática em função do conteúdo de ácido abscísico. Quanto maior o conteúdo de ABA, menor a condutância estomática. Quando as condutâncias estomáticas variaram de 0,05 a 0,2 mol/m².s, às 12:00 h, não foram encontradas alterações no conteúdo de ácido abscísico neste mesmo horário. Quando as condutâncias estomáticas foram inferiores a 0,05 mol/m².s, observou-se

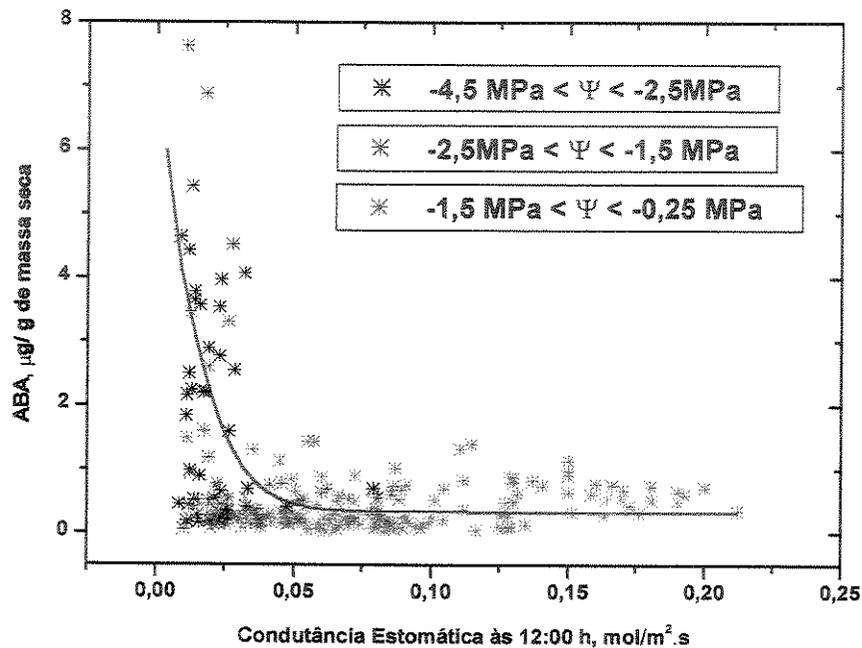


Figura 41: Relação da condutância estomática, às 12:00 h, concentração de ácido abscísico nas folhas e do potencial da água na folha às 14:00 h, em laranjeiras 'Pêra' enxertadas sobre limoeiros 'Cravo', em plantas saudias ou infectadas pela bactéria *Xylella fastidiosa*. Dados obtidos a partir de 220 observações realizadas nos três ciclos e nos quatro tratamentos.

aumento nas concentrações de ABA. Na fig.41, foram utilizados dados de todos os tratamentos, logo, os teores de ABA superiores a 1,0 µg/g de massa seca, referiram-se aos tratamentos que foram submetidos à deficiência hídrica. As maiores condutâncias estomáticas, ao redor das 12:00 h (superiores a 0,10 mol/m².s), foram observadas, geralmente, em Ψ altos,

entre -1,5 e -0,25 MPa. Quando o acúmulo de ABA foi maior que 3,5 $\mu\text{g/g}$ de massa seca, este potencial estava menor que -2,5 MPa.

As condutâncias estomáticas inferiores a 0,05 $\text{mol/m}^2\cdot\text{s}$ coincidiram com a diminuição no potencial da água às 6:00 h (fig. 42). Uma vez que o potencial da água na folha, na manhã, reflete uma estimativa do potencial da água no substrato, observou-se que o status de água na folha pela manhã, também poderia estar influenciando na condutância estomática, observada nas primeiras horas do dia. Quanto mais baixo o potencial da água na folha às 6:00 h, menor a condutância estomática.

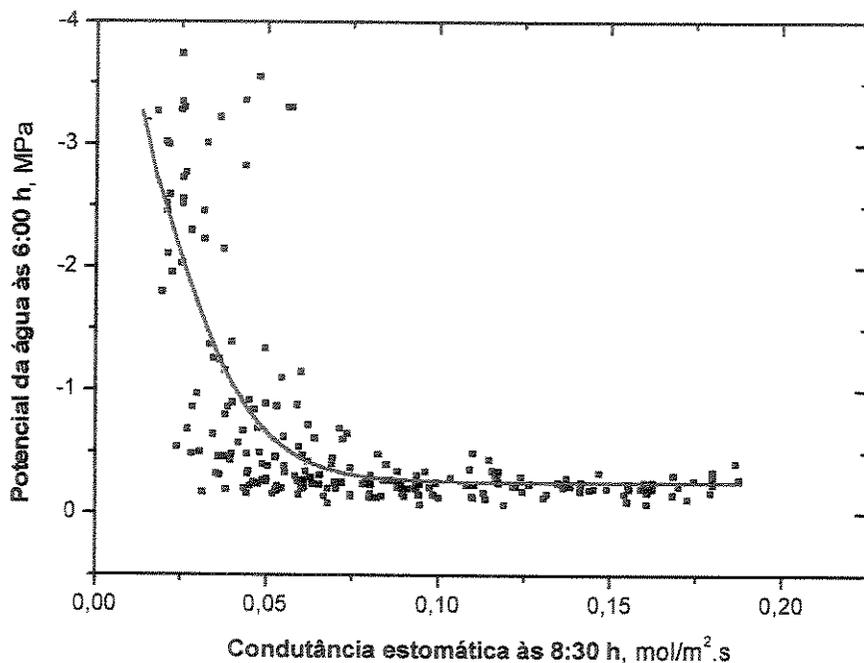


Figura 42: Relação entre potencial da água da folha (MPa), às 6:00 h, e condutância estomática em laranjeiras 'Pêra' enxertadas sobre limoeiros 'Cravo', em plantas sadias ou infectadas pela bactéria *Xylella fastidiosa*. Dados obtidos a partir de 220 observações realizadas nos três ciclos e nos quatro tratamentos.

Quanto maior a condutância estomática, maior a transpiração (fig. 43). Quando o potencial da água na folha tornou-se muito baixo ($-2,5$ a $-4,5$ MPa), a condutância estomática e a transpiração foram diminuídas. Quando o Ψ variou entre $-1,5$ e $-2,5$ MPa, ainda ocorreu perda de água via transpiração. Plantas em condições mais adequadas de umidade ($-1,5$ a $-0,25$ MPa) variaram a condutância estomática em função da demanda evaporativa.

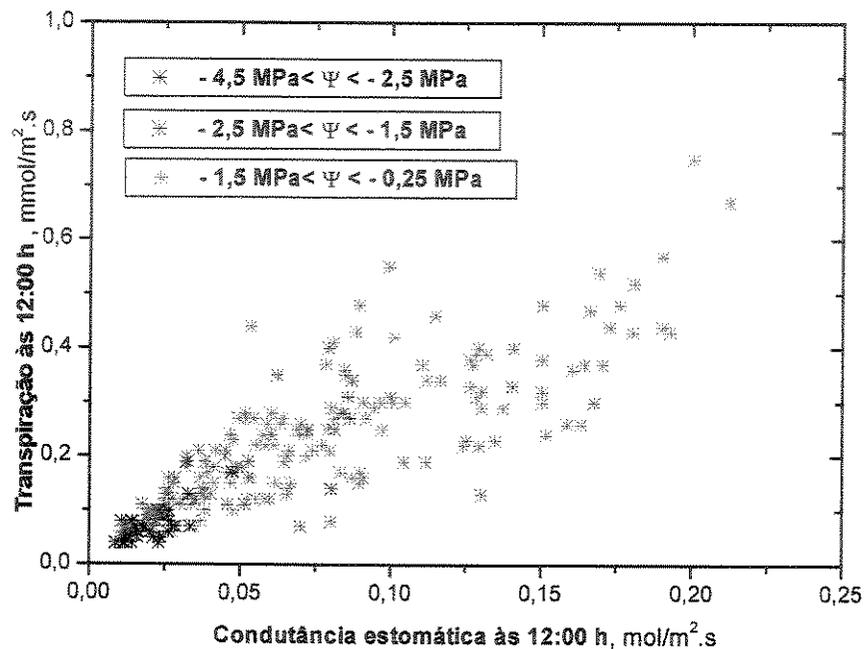


Figura 43: Relação entre a condutância estomática, às 12:00 h, transpiração, às 12:00 h e potencial da água na folha às 14:00 h, em laranjeiras ‘Pêra’ enxertadas sobre limoeiros ‘Cravo’, em plantas sadias ou infectadas pela bactéria *Xylella fastidiosa*. Dados obtidos a partir de 220 observações realizadas nos três ciclos e nos quatro tratamentos.

DISCUSSÃO

As taxas de assimilação de CO₂ das laranjeiras, tanto sadias como doentes, foram mais elevadas pela manhã em todos os ciclos estudados. A partir das 9:00 h, essas taxas começaram a declinar, à medida que o DPV ao longo do dia aumentava. Assim, os estômatos se fecharam, diminuindo *A* e também a perda de água pela transpiração. A depressão da fotossíntese ao meio-dia, observada em todos os tratamentos, é um fenômeno típico em citros e mesmo quando os solos estão próximos da capacidade de campo, o *g* das laranjeiras pode ser reduzido pela alta demanda evaporativa decorrente do aumento no DPV (Sinclair & Allen, 1982; Vu & Yelenosky, 1988a, Syvertsen & Lloyd, 1994; Medina *et al.*, 1999). Os resultados de Brakke & Allen (1995) indicaram que as maiores taxas de fotossíntese em laranjeiras foram obtidas quando a temperatura da folha e o DPV entre a folha e o ar oscilavam ao redor de 29°C e 2,6 kPa, respectivamente, e os valores mais baixos de *A* foram verificados com temperatura ao redor de 37°C e alto DPV, 3,6 kPa. As respostas às altas temperaturas estão, principalmente, ligadas a efeitos não estomáticos, enquanto os efeitos no aumento do DPV estariam mais associados com decréscimos na condutância estomática. A diminuição nas taxas de fotossíntese, em ambientes quentes e secos, geralmente, é acompanhada pela melhoria na eficiência do uso da água (Khairi & Hall, 1976a,b; Vu *et al.*, 1986). A depressão da fotossíntese ao meio-dia ocorre também em outras espécies como *Arbutus unedo*, cujos estômatos apresentam habilidade de fechamento em atmosferas secas pelo desenvolvimento de uma grande sensibilidade a mudanças de umidade (Raschke & Resemann, 1986). Tyree & Sperry (1988) sugeriram que esta diminuição da condutância estomática às 12:00 h, em algumas espécies de plantas, estaria relacionada à prevenção da disfunção do xilema. A água nos vasos do xilema está sob tensão, ou seja, o potencial de pressão do xilema é negativo. Esta

tensão aumenta à medida que a umidade do solo decresce e/ou a transpiração aumenta. A água sob tensão poderia levar à cavitação e embolia da coluna de água no xilema. Raschke & Resemann (1986) consideraram que a depressão da fotossíntese ao meio-dia ocorre simultaneamente com as respostas estomáticas, porém, em alguns casos, a queda na fotossíntese precede a diminuição da condutância estomática. Mesmo se o suprimento de água para a planta é ótimo, as respostas estomáticas ao aumento de DPV ocorrem, independentemente do conteúdo relativo de água ou do potencial da água na folha (Raschke & Resemann, 1986). Além disso, o ácido abscísico (ABA) pode ser responsável por esta depressão da fotossíntese ao meio-dia, pois Burschka *et al.* (1985) detectaram aumento do conteúdo de ABA, ao meio-dia, em folhas de *Arbutus unedo* estressadas e não estressadas.

No primeiro ciclo de deficiência hídrica, à medida que o estresse foi se tornando mais severo, *A* das plantas não irrigadas (PSNI e PDNI) foi decrescendo em relação às irrigadas (PSI e PDI). Os potenciais da água da folha de PSNI e de PDNI, às 6:00 h, também foram diminuindo gradativamente. Geralmente, o potencial de água na folha mais baixo observado em períodos de deficiência hídrica, resultou em decréscimo na transpiração. Sob estresse hídrico, as plantas de citros foram mais sensíveis aos aumentos da temperatura e do DPV, resultando em redução das taxas de assimilação de CO₂ e de transpiração. Embora a transpiração seja controlada, principalmente, pela atividade estomática, os valores de *A* das plantas não irrigadas também poderiam ser afetados por fatores não estomáticos, tais como, decréscimos nas reações dos fotossistemas e na atividade de algumas enzimas fotossintéticas, como a ribulose biscofosfato carboxilase-oxigenase (Rubisco), resultando na redução da assimilação do carbono fotossintético. Em laranjeiras 'Valência' a redução da concentração da Rubisco nas folhas foi o efeito mais marcante do estresse hídrico. Entretanto, o mecanismo de redução dessa enzima ainda não está bem estabelecido, podendo consistir numa diminuição da síntese e/ou aumento

na degradação (Vu *et al.*, 1987; Vu & Yelenosky, 1988b). As plantas irrigadas (PSI e PDI), geralmente, não apresentaram diferenças significativas nos valores de A , g e E , nesta primeira fase do ensaio, a não ser às 12:00 h quando a temperatura e o DPV eram maiores (figs.9 e 12). Nesta situação, as plantas doentes irrigadas, geralmente, apresentaram condutâncias estomáticas e taxas de transpiração menores, quando comparadas com PSI, sendo estes os primeiros sinais de disfunção no sistema condutor de água. Resposta semelhante foi observada em pessegueiros infectados pela *Xylella fastidiosa*, que apresentaram queda no potencial de água na folha às 12:00 h e reduções na assimilação de CO₂ e na condutância estomática (Anderson & French, 1987). Laranjeiras 'Pêra' com CVC apresentaram maior eficiência do uso da água e menor potencial da água na folha em resposta a diferentes DPV (1,2 e 2,5 kPa), diminuindo as taxas de fotossíntese e de transpiração em relação às plantas saudas (Habermann *et al.*, 1999).

No segundo ciclo de deficiência hídrica, em PDI, os valores de A , g e E foram, geralmente, menores que em PSI, ao longo do dia, com exceção no final da tarde, o que pode ser consequência do tempo de infecção com a *Xylella fastidiosa*, afetando a planta em relação ao status de água. As relações hídricas de plantas com CVC foram alteradas devido ao possível entupimento do xilema, diminuindo a capacidade de movimento da água nas raízes, nos troncos e nos ramos. É importante observar que no segundo ciclo de deficiência hídrica, as plantas doentes irrigadas mantiveram durante todas as medidas de Ψ às 14:00 h valores significativamente inferiores aos de PSI. Desde a primeira medida realizada, oito meses após a inoculação da bactéria, já foi possível observar que o Ψ das plantas doentes às 14:00 h foi, geralmente, menor do que das plantas saudas, sendo as plantas doentes mais sensíveis às variações de temperatura e DPV, diminuindo a condutância estomática. A diminuição do Ψ das plantas doentes poderia estar relacionada com a produção de gomas, resinas e taninos que, em

geral, são relativamente tóxicos aos fitopatógenos, além de lhes constituírem barreiras físicas quando solidificados e a presença de tiloses e agregados de bactérias nos vasos xilemáticos (Hopkins, 1989). Isto deve ter ocasionado a redução do fluxo de água, com conseqüente aparecimento de sintomas de murchas nas folhas durante o dia. Em laranjeiras doentes com clorose variegada dos citros, foi constatado o aparecimento de gomas e tiloses no sistema condutor de água que, certamente, interferem na condutividade hidráulica (Rossetti *et al.*, 1998). As tiloses são protuberâncias das células do parênquima que se formam no interior de vasos do xilema como resposta da planta à invasão por patógenos vasculares, dificultando o fluxo de seiva e a disseminação do patógeno dentro dos vasos (Romeiro, 1987). Em plantas com CVC, Oliveira *et al.* (2000) verificaram menor condutividade hidráulica em relação às plantas saudas. A grande resistência ao fluxo de seiva no xilema na doença de Pierce em videira (Goodwin *et al.*, 1988b), causada pela *Xylella fastidiosa*, refletiu o bloqueio do xilema em plantas doentes. Em citros com declínio, as obstruções observadas no lumem do xilema foram responsáveis pelo decréscimo do fluxo de água, resultando na diminuição dos valores de A e decréscimo na condutância estomática. Além disso, o potencial de água na folha, em plantas com declínio, decresceu mais rápido durante o dia e permaneceu com potenciais menores por mais tempo, quando comparado com o das plantas saudas (Allen & Cohen, 1974; Young & Garnsey, 1977; Syvertsen *et al.*, 1980; Cohen *et al.*, 1983; Brlansky *et al.*, 1984).

Apesar de PSNI ter apresentado queda mais rápida, nos valores de A que em PDNI pela manhã, em relação aos respectivos controles, ambos os tratamentos apresentaram mesmos valores de A , g e E no dia de estresse máximo. No vigésimo segundo dia após a reirrigação, foi observado que A , g e E de PSNI não se recuperaram aos níveis de PSI às 12:00 h (fig.21). Quando o estresse é severo, como no presente caso em que o potencial da água na folha às 6:00 h da manhã foi menor que $-2,5$ MPa, a recuperação da condutância estomática foi mais

demorada como também relatou Syvertsen em folhas de *Citrus sinensis* com diferentes idades (1982). Em laranjeiras 'Valência' submetidas a estresse hídrico muito severo, as folhas mais novas que se desenvolveram pós-estresse e com regime normal de irrigação durante dois meses, ainda apresentaram baixas condutâncias estomáticas (Ferer *et al.*, 1979). As plantas do tratamento PDNI, apenas doze dias após a reirrigação (fig.20), apresentaram os mesmos valores de A , g e E de PDI. A recuperação mais lenta em PSNI pode estar relacionada ao maior período que o seu Ψ às 6:00 h permaneceu abaixo de $-3,0$ MPa, em relação ao PDNI (fig.22).

Na terceira época de medidas, os valores de A , g e E entre PSI e PDI (figs.28 a 31) foram diferentes praticamente durante todo dia. Em relação aos ciclos anteriores, as plantas doentes foram mais sensíveis às variações do DPV, dificultando o fluxo de água e diminuindo ainda mais o potencial da água na folha às 14:00 h, quando comparadas com as plantas sadias irrigadas. Possivelmente, esta maior sensibilidade está ligada a um maior entupimento do xilema. Ao contrário do primeiro e segundo ciclos de deficiência hídrica, quando as plantas doentes irrigadas, geralmente, não apresentaram diferenças significativas, quando comparadas com PSI, no Ψ às 6:00 h da manhã, no terceiro ciclo o potencial das 6:00 h já foi mais baixo que em PSI, refletindo a deficiência hídrica das folhas. As evidências sugerem que folhas de plantas infectadas por patógenos que causam disfunção no sistema condutor de água, desidratam pelo fato de não haver fluxo de água suficiente para manter a turgescência das folhas. Machado *et al.* (1994) observaram que o impedimento ao transporte ou à absorção de água em plantas com CVC, em decorrência do avanço da doença provocando maior entupimento dos vasos, poderia explicar o baixo valor da condutância e da transpiração e, conseqüentemente, diminuir a taxa de fotossíntese e o potencial da água das folhas. No presente trabalho, a queda da fotossíntese em plantas com CVC poderia ainda estar relacionada, em parte, com a presença de necroses e cloroses nas folhas, que acarretariam

diminuição de sua área fotossintética. Em muitas enfermidades, patógenos produzem toxinas que podem atuar inibindo a fotossíntese, danificando cloroplastos ou ativando clorofilases (enzimas que degradam a clorofila). De qualquer forma, o fenômeno é interpretado como sendo um mecanismo de ataque do patógeno e sua interferência na fotossíntese ocasionaria distúrbio na geração de ATP pela planta, diminuindo os valores de A (Romeiro, 1987).

No terceiro ciclo de deficiência hídrica, PSNI apresentou o mesmo padrão de resposta à aplicação da deficiência hídrica das outras épocas, diminuindo as taxas gradualmente até ficarem praticamente nulas, após dez dias sem irrigação, quando foi realizada a reirrigação. Após quatro dias de reirrigação, os valores de A , g e E de PSNI recuperaram-se parcialmente em relação ao dia de estresse máximo mas ainda foram menores que em PSI. Os ciclos repetidos de deficiência hídrica não tiveram qualquer influência nas trocas gasosas de PSNI, pois este tratamento respondeu ao estresse hídrico de forma semelhante nos três ciclos aplicados.

As respostas em PDNI foram diferentes em relação aos outros ciclos, provavelmente, pelo fato dessas plantas apresentarem maior entupimento do sistema condutor de água, diminuindo a perda de água pela transpiração e, conseqüentemente, diminuindo o consumo de água (fig.34). Essas plantas levaram mais tempo para atingirem valores de A próximos ao zero (fig.32A). Nos outros ciclos PDNI levou dez dias para apresentar valores nulos de A enquanto no terceiro ciclo foram necessários quinze dias, coincidindo com o teor de umidade no substrato observado em PSNI no dia de estresse mais severo. No presente trabalho, o potencial das plantas sob deficiência hídrica, no dia de estresse máximo, foi mais baixo que $-2,5$ MPa às 6:00 h, tanto em PSNI quanto em PDNI (décimo e décimo quinto dia de deficiência hídrica, respectivamente), mas a condutância estomática, ao contrário do ocorrido nos ciclos anteriores,

foi recuperada em relação aos tratamentos PSI e PDI, dez e doze dias após a reirrigação, respectivamente.

Quando se analisaram as curvas de condutância estomática e potencial da água da folha às 6:00h da manhã das plantas sob deficiência hídrica, pôde-se observar que o fechamento estomático ocorreu em função da diminuição desse potencial, pois ele depende, principalmente, das condições da umidade do solo. Verificou-se, na fig. 43, que quanto mais baixo o Ψ , às 14:00 h, a condutância estomática foi menor e, conseqüentemente, as plantas transpiraram menos, diminuindo a perda de água como ocorrido nas plantas doentes, principalmente no terceiro ciclo em que o Ψ às 14:00 h, ao redor de -2,0 MPa, foi inferior ao das plantas sadias. O potencial de água na folha (Ψ) não modula diretamente o movimento estomático de folhas de citros em condições bem irrigadas (Syvertsen, 1982), porém em laranjeiras sob deficiência hídrica (PSNI e PDNI), o fechamento estomático foi determinado quando o Ψ atingiu valores correspondentes a -2,5 MPa e o total fechamento estomático ocorreu com Ψ ao redor de -3,0 MPa.

O mecanismo de enrolamento foliar é um mecanismo eficiente e complementar na regulação dos estômatos e da transpiração. As plantas dos tratamentos PSNI e PDNI apresentaram enrolamento foliar em todos os ciclos avaliados, à medida que a temperatura e o DPV aumentavam e, conseqüentemente, o Ψ às 14:00 h estava mais baixo que em PSI e PDI. Ruiz-Sánchez *et al.* (1997) também observaram, em limoeiro sob deficiência hídrica, enrolamento foliar quando as folhas apresentaram potencial da água às 6:00 h, ao redor de -3,0 MPa. Mesmo as plantas doentes irrigadas cujo Ψ às 14:00 h foi, em geral, mais baixo que em PSI, também apresentaram sintomas de murcha nas folhas a partir das 12:00 h, a partir do segundo ciclo de deficiência hídrica.

Nos três ciclos avaliados, as concentrações de ABA em PSNI, após a suspensão da irrigação, aumentaram atingindo os teores mais elevados, nos dias de deficiência hídrica mais severa. No terceiro ciclo, as concentrações de ABA de PSNI foram as mais elevadas em relação ao PSI, possivelmente, pela exposição repetida a ciclos de estresse, exigindo maiores concentrações de ABA para exercerem as mesmas funções nas respostas estomáticas. A diminuição da fotossíntese em PSNI poderia também estar relacionada com este acúmulo de ABA nas folhas estressadas. As concentrações elevadas de ABA, medidas em folhas desidratadas, poderiam estar envolvidas na diminuição da afinidade da enzima de carboxilação ao seu substrato, pois Raschke & Fischer (1987) constataram que a aplicação de ABA em folhas de *Xanthium strumarium* inibiu a carboxilação da Rubisco. Norman *et al.* (1990), também em laranjeiras submetidas à deficiência hídrica, observaram que o conteúdo de ABA aumentou substancialmente quando comparado com o conteúdo de ABA de plantas não estressadas. Em todos os ciclos, após a reirrigação, as concentrações de ABA em PSNI apresentaram valores semelhantes aos de PSI, embora a condutância estomática, no segundo ciclo, ainda fosse menor que a das plantas irrigadas, apesar da assimilação de CO₂ e do potencial da água na folha terem se recuperado. Em laranjeiras 'Valência', Medina & Machado (1998) observaram esta mesma resposta em relação às trocas gasosas, pois quanto mais severa a deficiência hídrica, maior o período necessário para recuperação da condutância estomática (Feres *et al.*, 1979). Liang & Zhang (1999) verificaram que as concentrações de ABA do xilema e das folhas correlacionaram-se com o fechamento estomático em *Acacia confusa* e *Leucaena leucocephala*, submetidas à deficiência hídrica. Estes autores observaram que após a reirrigação, apesar das concentrações de ABA, do Ψ às 6:00 h e do conteúdo da água no solo terem sido semelhantes aos das plantas irrigadas, os estômatos necessitaram um período maior

para se recuperarem. Esse período de recuperação foi dependente do grau de estresse e da espécie da planta.

No primeiro e segundo ciclos de deficiência hídrica, PDNI apresentou as mesmas respostas que em PSNI em relação ao aumento do conteúdo de ABA, juntamente com o efeito clássico no fechamento estomático. Entretanto, no terceiro ciclo, praticamente, não ocorreu aumento da concentração de ABA em PDNI em relação ao PDI. As concentrações de ABA em PDNI foram diferentes de PDI somente no décimo terceiro dia de deficiência hídrica, mesmo assim este aumento nas concentrações de ABA foi pequeno quando se compara com o seu aumento em PSNI em relação ao PSI (fig.37). Vários fatores podem estar relacionados com o pequeno acúmulo de ABA nestas plantas doentes submetidas à deficiência hídrica, no terceiro ciclo, apesar da condutância estomática e do potencial da água na folha terem sido mais baixos que em PDI.

Um destes fatores poderia estar relacionado com a velocidade em que o estresse se desenvolveu. O estresse se desenvolveu mais devagar em PDNI em decorrência da menor velocidade de secagem do substrato, possivelmente devido a menor taxa de transpiração em consequência ao entupimento do xilema. Em plantas doentes, o Ψ e o teor de umidade do substrato decresceram mais devagar do que em PSNI, após a interrupção da irrigação, podendo ter levado ao menor acúmulo de ABA. Henson (1985) verificou que o acúmulo de ácido abscísico nas folhas de *Pennisetum americanum* L foi dependente da velocidade na qual o estresse hídrico se desenvolveu, assim como a intensidade do mesmo. Entretanto, o conteúdo de ABA que aumentou por unidade de potencial da água foi maior quando o estresse se desenvolveu mais rápido.

Outro fator para explicar o menor acúmulo do ABA, no terceiro ciclo, seria o aumento da resistência ao fluxo de água, diminuindo o fluxo de ABA na seiva. O ABA, embora em

baixas concentrações, produzido nas raízes em decorrência da deficiência hídrica e transportados pela corrente transpiratória, teria sido rapidamente redistribuído nas folhas, provocando o fechamento estomático, sem contudo provocar acúmulo de ABA nas mesmas.

Também pode ter ocorrido que a umidade do substrato de PDNI, no dia de coleta da amostra, não tenha atingido o mesmo valor que em PSNI, não tendo ocorrido estímulo para produção de ABA nas raízes. Muitos autores sugerem que o declínio na condutância estomática estaria mais relacionado com o aumento nas concentrações de ABA na seiva do xilema, do que com o fluxo de ABA entrando nas folhas num determinado período (Zhang & Davies, 1991; Jackson *et al.*, 1995; Trejo *et al.*, 1995; Jia *et al.*, 1996). Entretanto, outros estudos mostraram que a condutância da folha pode responder tanto à concentração de ABA do xilema como ao fluxo de ABA (Gowing *et al.*, 1993; Jarvis & Davies, 1997; Zhang *et al.*, 1997). Jia & Zhang (1999) constataram que o ABA proveniente do xilema foi substancialmente aumentado pelo uso de um inibidor do catabolismo de ABA (tetcyclacis). Os resultados mostraram que a cinética do fechamento estomático, induzida pelo ABA, não foi correlacionada com o acúmulo de ABA derivado do xilema. Estes estudos indicaram que os estômatos respondem principalmente ao ABA que está vindo da corrente transpiratória do que às concentrações acumuladas deste ABA nas folhas. O potencial da água na folha das plantas doentes foi menor que o das plantas saudas podendo ser responsável pela sensibilidade do estômato a concentrações do ácido abscísico, pois Tardieu & Davies (1992) relataram que o fluxo de água pode diluir a concentração da mensagem, na seiva do xilema, e a sensibilidade do estômato à mensagem é aumentada, à medida que o potencial da água da folha decresce.

Plantas com clorose variegada dos citros poderiam apresentar disfunção do xilema em decorrência da obstrução dos poros das paredes. Estes poros funcionariam para reduzir a disseminação das embolias de ar mas, por outro lado, como os diâmetros dos vasos xilemáticos

foram reduzidos, eles funcionariam como filtros de moléculas. Polissacarídeos extracelulares, produzidos pelas bactérias, poderiam desempenhar um papel muito importante no bloqueio físico dos vasos (Van Alfen, 1989). O ABA produzido nas raízes, em consequência do estresse hídrico, pode não ter sido transportado para as folhas, em decorrência da obstrução dos poros do xilema por polissacarídeos extracelulares, filtrando as moléculas de ABA. Se a passagem de água pelo xilema diminui por causa das obstruções, logo, terá efeito na transpiração e na diminuição do fluxo de água. Constatou-se que embolias causadas por patógenos podem ocasionar deficiência hídrica e murchamento das folhas em muitas doenças vasculares. Muitas teorias de como patógenos poderiam causar embolias no xilema relatam a entrada do patógeno nos vasos ou traqueídeos podendo causar ferimentos de tamanho suficiente para permitir a entrada de ar no vaso (Zimmermann & Jeje, 1981). É muito provável que isso ocorra em doenças que causam murchas cujos patógenos são bactérias, uma vez que o movimento dos patógenos de vaso para vaso é acompanhado de enzimas que rompem as paredes. O tamanho dos poros das paredes também desempenharia, provavelmente, alguma função na determinação da suscetibilidade das plantas ao rompimento do xilema pelos patógenos (Wallis & Truter, 1978; Van Alfen *et al.*, 1987; Sperry & Tyree, 1988).

De uma forma geral, o mecanismo do movimento estomático pode ser resumido da seguinte forma: a luz estimula a assimilação de CO₂ nas células guarda, e assim, a concentração de CO₂ diminui, ocorrendo diminuição do pH nestas células. Com estas condições, ocorre a síntese de glicolato e fotofosforilação acíclica, que fornece energia na forma de ATP utilizada para o mecanismo ativo de acúmulo de potássio nas células guarda. A entrada de potássio provoca uma diminuição do potencial osmótico destas células, permitindo a entrada de água, que faz com que aumente a turgidez das células, determinando a abertura dos estômatos (Reichardt, 1985). As laranjeiras com CVC apresentam, geralmente, deficiência de potássio nas

folhas (Quaggio, 1988; Vitti *et al.*, 1989), o que poderia estar influenciando na diminuição da condutância estomática dessas plantas, pois ocorre uma resposta marcante entre o estômato e o suprimento de potássio na planta. Este mecanismo agiria independentemente da produção e acúmulo de ABA nas folhas. Plantas deficientes em potássio apresentaram estômatos muito mais fechados do que plantas sem deficiência. A deficiência hídrica no solo também decresce a absorção, pelas raízes, de nutrientes, tal como o potássio, que influenciariam as respostas estomáticas em relação ao ABA (Burrows & Milthorpe, 1976; Snaith & Mansfield, 1982b; Schurr *et al.*, 1992).

O pH das plantas pode ser modificado em decorrência da deficiência hídrica e da infecção por fitopatógenos (Schurr *et al.*, 1992; Tetlow & Farrar, 1993). O aumento do pH do xilema pode agir também como sinal para as folhas fecharem os estômatos (Gollan *et al.*, 1986; Wilkinson & Davies, 1997; Wilkinson *et al.*, 1998; Wilkinson, 1999). Tetlow & Farrar (1993) verificaram que plantas de *Hordeum vulgare*, infectado pelo fungo da ferrugem, apresentaram o pH da folha aumentado de 6,6 para 7,3. Estes autores sugeriram que o fungo afetou a composição de açúcares do apoplasto da folha, afetando o pH. Se as plantas com CVC também apresentassem este pH aumentado, este poderia funcionar como sinal de estresse, influenciando a abertura estomática, sem a ocorrência de acúmulo de ABA nas folhas. O aumento do pH da seiva do xilema de tomateiros passou de 5,0 para 8,0 quando as plantas foram submetidas à deficiência hídrica (Wilkinson *et al.*, 1998). Quando se aplicou seiva do xilema, com pH artificialmente modificado, em folhas de tomateiro do tipo selvagem, as taxas de transpiração foram reduzidas. Esta mesma aplicação foi feita em tomateiro do tipo *flacca*, isto é, que não têm habilidade para sintetizar ABA, e não foram observadas reduções nessas taxas de *E*. Entretanto, quando foi aplicado ácido abscísico nas folhas de *flacca*, a transpiração foi reduzida. O aumento do pH reduziu a transpiração das folhas de *flacca*, em combinação com

baixas concentrações de ABA, demonstrando a necessidade de ABA, ainda que em concentrações reduzidas para que ocorram diminuições nas taxas de transpiração.

Os compostos fenólicos, que tendem a aumentar quanto maior o grau de infestação de uma doença, podem agir como estimulador do fechamento estomático (Harborne, 1980). Deve-se levar em conta que a impregnação das paredes dos vasos com um revestimento rico em lipídios e a infusão de paredes do xilema por compostos fenólicos poderiam, efetivamente, tornar os vasos impermeáveis, reduzindo, substancialmente, a passagem de água e solutos para dentro e para fora do tecido condutor de água (Robb *et al.*, 1980). Em murchas causadas por *Verticillium*, o grau de flacidez da folha foi correlacionado positivamente com a proporção de vasos revestidos por camadas lipídicas. Se este revestimento resulta no bloqueio do fluxo de água no xilema, poderia exercer seu efeito pela inibição do movimento lateral de água (Robb *et al.*, 1982). Em plantas com CVC, a presença de compostos fenólicos e fitoalexinas que, geralmente, acumulam-se em plantas em resposta a ataques de fitopatógenos, poderiam, possivelmente, estar atuando no controle do movimento estomático. Numa série de experimentos conduzidos por Plumbe & Willmer (1985, 1986a, 1986b), foram estudados os efeitos de diversos compostos nas respostas estomáticas tais como as fitoalexinas, os ácidos graxos, os compostos fenólicos e substâncias relacionadas ao estresse hídrico (prolina e o ABA). Quando as fitoalexinas foram aplicadas nos estômatos de *Commelina communis* L. e *Vicia faba* L., algumas foram capazes de inibir a abertura estomática no mesmo grau que o ABA (Plumbe & Willmer, 1986a). Os compostos fenólicos, tais como p-cumárico, ácido caféico, ácido clorogênico, ácido salicílico e ácido sinápico foram fortes inibidores da abertura estomática de *Commelina communis* L. Com exceção da prolina e da glutamina, que se acumularam nas folhas estressadas em larga escala, todos os outros compostos inibiram a abertura e causaram algum fechamento no estômato já aberto (Plumbe & Willmer, 1986b).

Alguns autores ainda questionam que o ABA não deve ser o único responsável pelo fechamento estomático em decorrência da secagem do solo. Quando se retirou o ABA da seiva extraída de plantas de trigo submetidas à deficiência hídrica e essa seiva foi aplicada em folhas destacadas de trigo, notou-se o mesmo fechamento estomático. Assim, os autores sugeriram a existência de um outro composto, na seiva do xilema, com capacidade de induzir fechamento estomático (Munns & King, 1988; Munns, 1992; Munns & Cramer, 1996).

A condutância estomática pode também ser afetada pela secagem do solo devido a um suprimento reduzido de um promotor da abertura estomática, usualmente transportado de raízes túrgidas para a parte aérea (Correia & Pereira, 1995). Blackman & Davies (1985) forneceram evidência para tal mecanismo envolvendo a produção de citocininas. De acordo com Davies & Zhang (1991), a importância relativa do ABA e das citocininas no controle da abertura estomática, pode variar com o grau de secagem do solo. A importância das citocininas torna-se mais relevante nos últimos estágios de secagem, como resultado do aumento da injúria nas raízes. Este argumento recebeu suporte de Waringer *et al.* (1990), em amendoeiras, onde foi verificado que o ABA decresceu no fim da estação seca, quando o déficit de água no solo aumentava.

Apesar da *Xylella fastidiosa* ser o mesmo patógeno das doenças de Pierce e da CVC, não ocorreu acúmulo de ABA nas folhas de laranjeiras doentes irrigadas, com 3% de lesões necróticas, enquanto que em videira com a doença de Pierce, folhas com 2 a 5% de necrose e clorose nas margens, apresentaram o dobro das concentrações de ácido abscísico das folhas sadias (Goodwin *et al.*, 1988b).

Quando as laranjeiras, tanto sadias quanto doentes, foram submetidas à deficiência hídrica, as folhas sofreram injúrias, mas não caíram. Elas permaneceram presas até que o estresse fosse cessado e após a irrigação, elas caíram. Para que ocorra este processo de

abscisão foliar, é necessário que o ABA seja previamente acumulado nas raízes e depois transportado para as folhas (Gómez-Cadenas *et al.*, 1996). No terceiro ciclo de deficiência hídrica, em plantas com CVC (PDNI), foi observado uma queda muito menor de folhas após a reirrigação, quando comparado com PSNI, coincidindo com as menores concentrações de ABA encontradas em PDNI. Sagee *et al.* (1980) também relataram que o ABA induziu as atividades da celulase e da poligalacturonase que levam à abscisão das folhas de citros. É possível que o fato do ABA em PDNI não ter sido sintetizado nas raízes para que ocorresse este acúmulo nas folhas, elas se mantiveram por mais tempo nos ramos (dados não apresentados).

O papel do AIA, em citros, é mais enfocado nas relações hormonais de flores e frutos (Kojima, 1996; Koshita *et al.*, 1999) mas, apesar dos estudos já realizados em tecidos vegetativos, como nas folhas (Sagee *et al.*, 1986; Cohen *et al.*, 1987), pouco se encontra na bibliografia relacionado com estresses ambientais e doença.

A concentração de AIA disponível para mediar respostas biológicas na célula, num determinado período, é regulada por uma série de taxas: de síntese de AIA por algum precursor, tal como triptofano, de uso de AIA no crescimento, de outros processos que resultam na destruição de AIA, de transporte de AIA para dentro do tecido e de hidrólise dos conjugados de AIA (Cohen & Bandurski, 1982; Normanly *et al.*, 1995).

No primeiro ciclo de deficiência hídrica, o conteúdo de AIA de PSI foi mais elevado que os dos demais tratamentos, ocorrendo diferenças significativas em relação ao PDI. No terceiro ciclo de deficiência hídrica, quando a infecção era maior, não foram encontradas diferenças significativas nos conteúdos de AIA em PSI e PDI. Logo, o efeito do aumento de auxina nos tecidos ('hiperauxinia') que, geralmente, ocorre em tecidos infectados por bactérias (Goodman *et al.*, 1986), não foi observado nas plantas com CVC. Entretanto, em folhas de

pereiras infectadas por *Pseudomonas syringae*, ocorreu aumento de auxinas em tecidos doentes (Lindow *et al.*, 1998). Em laranjeiras com CVC há redução na concentração de zinco das folhas (Vitti *et al.*, 1989; Malavolta & Prates, 1991), que é necessário para síntese de triptofano que, por sua vez, é precursor das auxinas. Talvez esta seja a razão de não terem sido encontradas altas concentrações de AIA em folhas de plantas doentes.

Nos casos de plantas submetidas à deficiência hídrica, as plantas dos tratamentos PSNI e PDNI tiveram as concentrações de AIA reduzidas nos dias de estresse mais severo, em relação ao PSI, nos dois ciclos avaliados. Em folhas de algodoeiro, as concentrações de ABA e o pH aumentaram com a desidratação das folhas, mas as concentrações de AIA permaneceram aproximadamente constantes. As concentrações constantes de AIA no apoplasto, durante estresse, implicam que interações antagonistas com ABA podem não afetar respostas estomáticas em relação ao estresse *in situ* (Hartung *et al.*, 1992). No presente trabalho, as mudanças nas concentrações entre ABA e AIA em plantas estressadas não evidenciaram qualquer correlação. Em estudos conduzidos em *Fatsia japonica*, submetida à deficiência hídrica, Lopez-Carbonell *et al.* (1994a) avaliaram que a diminuição da condutância estomática promovida pelo ABA, relacionada com o aumento da deficiência hídrica, pôde ser detectada, mas não foi possível verificar qualquer efeito da deficiência hídrica nas concentrações de AIA. Analisando-se os efeitos da deficiência hídrica em *Fatsia japonica*, utilizando-se PEG para induzir estresse, Lopez-Carbonell *et al.* (1994b) constataram que as concentrações endógenas de AIA foram muito variáveis. O aumento nas concentrações de AIA em *Fatsia japonica* foi constatado somente no sétimo dia de deficiência hídrica, ocorrendo aumento de até sete vezes nas folhas, quando se comparou com as concentrações de AIA de folhas das plantas controle. As concentrações de AIA também foram avaliadas em *Lavandula stoechas* L. e *Rosmarinus officinalis* L. As concentrações de AIA em *R. officinalis* alcançou um pico após três dias de

deficiência hídrica. Entretanto, após este pico, ocorreu um declínio gradual nas concentrações de AIA durante o curso do experimento até o último dia, não ocorrendo diferenças significativas entre plantas bem irrigadas e plantas submetidas a quatro, cinco ou seis dias de deficiência hídrica. As plantas de *L. stoechas*, submetidas ao estresse hídrico, aumentaram em três vezes a concentração de AIA, em relação as plantas controles, dois dias após a deficiência hídrica mas após este dia, as plantas estressadas apresentaram concentrações similares de AIA das plantas controle (Lopez-Carbonell *et al.*, 1996). É possível que as laranjeiras, tanto sadias como doentes, pudessem já ter apresentado estas concentrações mais altas de AIA, em relação aos respectivos controles, no início do desenvolvimento do estresse, não tendo sido possível determinar se ocorreu este aumento pois as coletas foram realizadas nos dias de estresse mais severo.

Os citros, geralmente, não apresentam deficiência no suprimento de carboidratos, pois possuem folhas perenes, fotossintetizando durante um período amplo de tempo, apresentando reservas de amido em vários órgãos das plantas. Embora as concentrações de amido e açúcares solúveis apresentem alguma flutuação diurna, a maior parte dos carboidratos permanece nas folhas. Esses dados indicam que, em adição às baixas taxas de fotossíntese, as folhas de citros funcionam como órgãos de reserva (Goldschmidt & Koch, 1996). No presente trabalho, as plantas sadias irrigadas apresentaram altas concentrações de amido nas folhas nos três ciclos avaliados. O amido é o principal carboidrato de reserva nas plantas e seu acúmulo ocorre nos cloroplastos, durante a fotossíntese. Quando este estoque transitório é rapidamente preenchido, os carbonos fotoassimilados fluem para fora dos plastídios para a síntese de sacarose. Nas plantas, a sacarose é o produto no qual a maior porção de CO₂ fixado pela fotossíntese é capturado e a principal forma que o carbono orgânico é transportado para órgãos não fotossintéticos (Avigad & Dey, 1997; Brownleader *et al.*, 1997).

As doenças, de um modo geral, podem alterar o metabolismo dos carboidratos de diferentes formas, dependendo do patógeno e do hospedeiro. No primeiro ciclo de deficiência hídrica, as concentrações de açúcares redutores, sacarose e amido das plantas doentes, foram muito variáveis no horário avaliado (17:00 h). Apesar da fotossíntese dessas plantas terem sido distintas de PSI no último dia do experimento (reirrigação das plantas estressadas), não houve um padrão de resposta de PDI quando comparada com PSI. As plantas doentes apresentaram maiores concentrações de açúcares redutores e menores concentrações de sacarose, quando comparadas com as plantas sadias irrigadas, no décimo primeiro dia de experimento. Isto pode estar relacionado com o grau de infecção das folhas, pois Scholes *et al.* (1994) verificaram que, em folhas de cevada infectadas com míldio, houve um aumento na atividade da invertase ácida, que causou aumento na concentração de glicose e frutose e concomitante redução na exportação de sacarose da folha. Entretanto, não está claro se o aumento nos açúcares redutores contribuíram para a habilidade das folhas de citros de suportarem uma deficiência hídrica, pois não há evidência de ajuste osmótico em citros, mesmo quando as plantas foram submetidas à deficiência hídrica severa (Syvertsen *et al.*, 1980). Em PDI, ocorreu acúmulo de amido no último dia de avaliação e menor taxa de fotossíntese em relação ao PSI, esta alta concentração de carboidratos poderia causar, diretamente ou indiretamente, uma regulação no ciclo de Calvin, levando a uma inibição da fotossíntese (Scholes *et al.*, 1994). Em tomateiro, os ferimentos mecânicos ou a infecção por fungos, ocasionaram mudanças no conteúdo de carboidratos solúveis em folhas infectadas, ligadas a um aumento da atividade das invertases ácidas do hospedeiro ou do patógeno, aumentando a concentração de açúcares redutores e diminuindo a de sacarose (Zulu *et al.*, 1991).

No segundo ciclo, as concentrações de sacarose e açúcares redutores das plantas doentes em relação às plantas sadias, praticamente, não apresentaram diferenças significativas.

Por outro lado, os efeitos do míldio (*Erysiphe graminis* f. sp. *tritici*) em folhas de trigo sugeriram que o estímulo da atividade da invertase alterou as relações fonte-dreno na folha levando ao acúmulo de carboidratos solúveis tais como sacarose, glicose, frutose e hexose fosfato e decréscimo na síntese de sacarose (Wright *et al.*, 1995a,b).

O efeito mais marcante em relação à CVC, observada no terceiro ciclo de deficiência hídrica, foi a redução nas concentrações de amido das plantas doentes, tanto irrigadas quanto não irrigadas, em relação às plantas saudas. Este fato poderia estar relacionado com a necessidade das plantas doentes utilizarem as reservas, visto que houve queda significativa da fotossíntese. As plantas com CVC apresentam, geralmente, deficiência de potássio nas suas folhas (Quaggio, 1988; Vitti *et al.*, 1989), o que poderia também estar contribuindo com as baixas concentrações de amido no terceiro ciclo em relação às plantas saudas pois a deficiência de potássio atua, geralmente, no metabolismo de carboidratos, em folhas de citros, resultando em baixas concentrações de amido e maiores concentrações de açúcares solúveis, assim como um grande aumento nas atividades das β -amilases e invertases ácidas (Lavon *et al.*, 1995). As folhas de videira, infectadas com a bactéria *Xylella fastidiosa*, também apresentaram deficiência de potássio e baixas concentrações de amido em relação às plantas saudas (Goodwin *et al.*, 1988b).

Nos três ciclos avaliados, a deficiência hídrica em PSNI ocasionou aumento nos teores de açúcares redutores quando estes foram comparados com os das plantas irrigadas. As concentrações de sacarose diminuíram no primeiro ciclo, em relação ao PSI, mas não apresentaram grandes variações nos demais. Nos dois primeiros ciclos, as concentrações de amido em PSNI foram inferiores às concentrações de PSI. Em laranjeiras ‘Valência’ submetidas à deficiência hídrica, Vu & Yelenosky (1988b) também verificaram menor conteúdo de amido e sacarose nas folhas, devido às menores taxas de fotossíntese e maiores concentrações de

açúcares redutores que seus controles. No terceiro ciclo de deficiência hídrica, não foi observada diminuição do conteúdo de amido em PSNI em relação ao PSI, mas deve-se levar em consideração que este dia de coleta não foi o dia de estresse máximo para estas plantas. Em eucalipto sob deficiência hídrica, folhas estressadas apresentaram altas concentrações de açúcares solúveis, mas o amido estava em concentrações bem menores, quando comparados com folhas não estressadas (Quick *et al.*, 1989). As concentrações de sacarose apresentaram alguns picos de concentração durante o dia, no segundo e terceiro ciclos, pois curtos períodos de deficiência hídrica podem estimular a síntese de sacarose, pela ativação da enzima sacarose fosfato sintase, como foi constatado por Quick *et al.* (1992) em folhas de espinafre. A consequência do acúmulo de sacarose atuando nas taxas de fotossíntese, nas concentrações de glicose e frutose e na própria síntese de sacarose depende largamente da sua distribuição entre compartimentos dentro das células e nos fluxos entre os compartimentos e entre células. Se os carboidratos estão, predominantemente, no apoplasto, vacúolo ou nas células epidérmicas, a fotossíntese não será afetada a curto prazo. Se, entretanto, eles se acumularem em altas concentrações no citosol, a fotossíntese pode ser inibida como resultado da inibição do produto final (via limitação do fósforo inorgânico) ou, num período mais longo, pelo decréscimo na síntese de enzimas fotossintéticas (Scholes *et al.*, 1994). No terceiro ciclo, houve um acúmulo de sacarose em PSNI, a partir das 15:00 h com um concomitante decréscimo nos teores de amido. Este fato pode estar relacionado com a rápida troca de carbono que ocorre entre amido e sacarose. O amido do cloroplasto é degradado, fornecendo triose-fosfato, que é exportada do cloroplasto para assegurar síntese contínua de sacarose no citoplasma. Geralmente, ocorre durante todo o tempo, um fluxo ativo de troca de carbonos entre amido e sacarose. A transferência de moléculas de triose-fosfato, que é facilitada pelo transportador 3PGA/P_i na

membrana plastídica, explica a rápida troca de carbono que ocorre entre cloroplasto (amido) e citoplasma (sacarose) (Preiss, 1982).

No primeiro e segundo ciclos, a concentração de amido em PDNI, no dia de deficiência hídrica mais severa, foi inferior ao de PDI, provavelmente em consequência das baixas taxas de fotossíntese, observadas em PDNI. Em folhas de feijão, submetido a estresse hídrico moderado, ocorreu redução na síntese de amido, como resultado dos mesmos efeitos que limitam a formação de amido em baixas taxas de fotossíntese, tais como, baixas concentrações de 3-fosfogliceraldeído, que, geralmente, foram encontradas em folhas estressadas (Vassey & Sharkey, 1989). No primeiro ciclo, não houve diferenças entre PDI e PDNI quanto às concentrações de açúcares redutores e sacarose, no dia de deficiência hídrica mais severa. Em videira, as plantas com deficiência hídrica apresentaram similares concentrações de açúcares solúveis, quando comparadas com os controles, mas as concentrações de amido foram menores que das plantas irrigadas e não se recuperaram no dia seguinte à reirrigação (Quick *et al.*, 1992). Nos demais ciclos, ocorreram algumas variações diurnas entre estas plantas, mas a deficiência hídrica aplicada não ocasionou diferenças, entre estas plantas, detectáveis durante todo o dia. Toritaka *et al.* (1974) constataram que o amido e os açúcares solúveis apresentam alguma flutuação diária, mas a maioria dos carboidratos permanece nas folhas. A mobilização do amido formado é pequena em citros, quando comparada com outras espécies e, algumas vezes, incompleta, mesmo em períodos de alta demanda fotossintética (Goldschmidt & Koch, 1996). No terceiro ciclo, essas diferenças só foram detectadas às 17:00 h, quando o teor de amido de PDI foi maior que em PDNI, mas as taxas de fotossíntese dessas plantas foram semelhantes. Entretanto, é importante ressaltar que este dia foi o oitavo dia de deficiência hídrica para estas plantas, que demoraram mais sete dias para atingirem o mesmo teor de umidade no substrato das plantas sadias não irrigadas.

CONCLUSÕES

- A fotossíntese das plantas infectadas há dois anos e dois meses pela bactéria *Xylella fastidiosa* foi menor que nas plantas saudias, a partir do momento do dia em que a temperatura, radiação e déficit de pressão de vapor entre o ar e a folha aumentaram.
- Os potenciais da água nas folhas medidos às 6:00 h e às 14:00 h, nas plantas doentes infectadas há dois anos e dois meses, também foram menores em relação aos das plantas saudias.
- A queda do potencial da água na folha nas plantas saudias foi mais rápida após a suspensão da irrigação, pois as plantas saudias transpiraram mais e, portanto, o teor de umidade do substrato diminuiu mais rapidamente.
- Após dois anos de infecção pela bactéria, as concentrações de amido das plantas doentes foram mais baixas que nas plantas saudias, independentemente da aplicação da deficiência hídrica.
- Laranjeiras saudias apresentaram altas concentrações de ABA nos três ciclos de deficiência hídrica a que foram submetidas, coincidindo com a diminuição da condutância estomática.
- As concentrações de ABA das plantas saudias foram similares às das plantas doentes sem deficiência hídrica, nas três épocas de medidas.

- Quando se suspendeu a irrigação das plantas doentes no terceiro ciclo, não foi possível detectar aumento do ABA, sugerindo que outros fatores poderiam estar atuando para que ocorresse diminuição da condutância estomática nestas plantas.
- A presença da bactéria *Xylella fastidiosa* não acarretou em aumento das concentrações de ácido 3-indol acético nas folhas.
- Após três ciclos de deficiência hídrica ocorreu diminuição nas concentrações de ácido 3-indol acético das plantas sadias e doentes no dia de estresse mais severo, quando comparadas com as dos controles irrigados.
- A condutância estomática, a fotossíntese e a transpiração das plantas sadias apresentaram, em todos os ciclos, os mesmos padrões de resposta quando as plantas foram submetidas à deficiência hídrica.

LITERATURA CITADA

- Allen, L. H. & Cohen, M., 1974. Water stress and stomatal diffusion resistance in citrus affected with blight and young tree decline. Proc. Fla. State Hort. Soc. 87:96-101.
- Amorim, L.; Bergamin F^o, A.; Palazzo, D. A.; Bassanezi, R. B.; Godoy, C. V.; Torres, G. A. M., 1993. Clorose variegada dos citros: uma escala diagramática para avaliação da severidade da doença. Fitopatol. Bras. 18(2):174-180.
- Anderson, P. C. & French, W. J., 1987. Biophysical characteristics of peach trees infected with phony peach disease. Physiol. Mol. Plant Pathol. 31:25-40.
- Avigad, G., 1982. Sucrose and Other Disaccharides. IN: Encyclopedia of Plant Physiology, Intracellular Carbohydrates. Vol., (F.A. Loewus, & W. Tanner, eds.), Springer-Verlag, Berlin, vol.13A, pp.217-347.
- Avigad, G. & Dey, P. M., 1997. Carbohydrate metabolism: Storage carbohydrates. IN: Plant Biochemistry (P.M. Dey, & J. B. Harborne, eds.), Academic Press, London, pp.143-204.
- Blackman, P. G. & Davies, W. J., 1985. Root-to-shoot communication in maize plants of the effects of soil drying. J. Exp. Bot. 36:39-48.
- Boyer, J. S., 1995. Biochemical and biophysical aspects of water deficits and the predisposition to disease. Annu. Rev. Phytopathol. 33:251-274.
- Bradford, K. J.; Sharkey, T. D.; Farquhar, G. D., 1983. Gas exchange, stomatal behavior and $\delta^{13}\text{C}$ values of the *flacca* tomato mutant in relation to abscisic acid. Plant Physiol. 72:245-250.
- Brakke, M. & Allen Jr., L. H., 1995. Gas exchange of Citrus seedlings at different temperatures, vapor-pressure deficits and soil water contents. J. Am. Soc. Hort. Sci. 120(3):497-504.

- Brlansky, R. H.; Timmer, L. W.; Lee, R. F.; Graham, J. H., 1984. Relationship of xylem plugging to reduced water uptake and symptom development in citrus trees with blight and blightlike declines. *Phytopathology* 74(11):1325-1328.
- Brownleader, M. D.; Harborne, J. B. & Dey, P. M., 1997. Carbohydrate metabolism: Primary metabolism of monosaccharides. IN: *Plant Biochemistry* (P. M. Dey & J. B. Harborne, eds.), Academic Press, London, pp.111-142.
- Burrows, F. J. & Milthorpe, F. L., 1976. Stomatal conductance in the control of gas exchange. IN: *Water deficits and Plant Growth* (T.T. Kozlowski, ed.), vol.4, Academic Press, London, pp.103-152.
- Burschka, C.; Tenhunen, J. D., Hartung, W., 1985. Diurnal variations in abscisic acid content and stomatal response to applied abscisic acid in leaves of irrigated and non-irrigated *Arbutus unedo* plants under naturally fluctuating environmental conditions. *Oecologia* 58:128-131.
- Campos, H., 1983. *Estatística Experimental Não-Paramétrica*, 4ª edição, Esalq, Piracicaba, 349p.
- Chang, C. J.; Garnier, M.; Zreik, L.; Rossetti, V.; Bové, J. M., 1993. Culture and serological detection of the xylem-limited bacterium causing citrus variegated chlorosis and its identification as a strain of *Xylella fastidiosa*. *Curr. Microbiol.*, 27:137-142.
- Chaves, M., 1991. Effects of water deficits on carbon assimilation. *J. Exp. Bot.*42(234):1-16.
- Cohen, J. D. & Bandurski, R. S., 1982. Chemistry and physiology of the bound auxins. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 33:403-30.
- Cohen, J. D.; Bausher, M. G.; Bialek, K.; Buta, J. G.; Gocal, G. F. W.; Janzen, L. M.; Pharis, R. P.; Reed, A. N.; Slovin, J. P., 1987. Comparison of a commercial ELISA assay for indole-3-acetic acid at several stages of purification and analysis by gas chromatography-

- selected ion monitoring-mass spectrometry using a $^{13}\text{C}_6$ -labeled internal standard. *Plant Physiol.* 84:982-986.
- Cohen, M.; Pelosi, R. R.; Brlansky, R. H., 1983. Nature and location of xylem blockage in trees with citrus blight. *Phytopathology* 73(8):1125-1130.
- Cornish, K. & Zeevaart, J. A. D., 1985. Abscisic acid accumulation by roots of *Xanthium strumarium* L. and *Lycopersicon esculentum* Mill. in relation to water stress. *Plant Physiol.* 79:653-658.
- Correia, M. J. & Pereira, J. S., 1995. The control of leaf conductance of white lupin by xylem ABA concentration decreases with the severity of water deficits. *J. Exp. Bot.* 46(282):101-110.
- Costacurta, A. & Vanderleyden, J., 1995. Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* 21(1):1-18.
- Costacurta, A.; Mazzafera, P.; Rosato, Y. B., 1998. Indole-3-acetic acid biosynthesis by *Xanthomonas axonopodis* pv. citri is increased in the presence of plant leaf extracts. *FEMS Microbiol. Lett.* 159:215-220.
- Cowan, A. K. & Richardson, G. R., 1993. 1',4'-trans-(^{14}C) abscisic acid diol: a major product of R-(2- ^{14}C)- mevalonic acid metabolism in extracts of *Citrus sinensis* exocarp. *J. Plant Physiol.* 142:730-734.
- Daly, J. M., 1976. The carbon balance of diseased plants: changes in respiration, photosynthesis and translocation. IN: *Physiological Plant Pathology. Encyclopedia of Plant Physiology*, (R. Heitefuss & P. H. Williams, eds.), vol. 4, new series, Springer-Verlag, Berlin, pp. 450-479.
- Davies, F. S. & Bower, J., 1994. Water stress, gas exchange and fruit set of 'Olinda' Valencia orange trees in Eastern Transvaal area of South Africa. *Acta. Hort.* 365:121-127.

- Davies, W. J. & Zhang, J., 1991. Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 42:55-76.
- Duniway, J. M., 1976. Water status and imbalance. In: *Physiological Plant Pathology. Encyclopedia of Plant Physiology* (R. Heitefuss & P. H. Williams, eds.), vol.4, new series, Springer-Verlag, Berlin, pp. 430-449.
- Elfving, D.C.; Kaufmann, M. R.; Hall, A. E., 1972. Interpreting leaf water potential measurements with a model of the soil-plant-atmosphere continuum. *Physiol. Plant.* 27:161-168.
- El-Otomani, M.; Lovatt, C. J.; Coggins Jr., C. W.; Agustí, M., 1995. Plant growth regulators in citriculture: factors regulating endogenous levels in citrus tissues. *Crit. Rev. Plant Sci.* 14(5):367-412.
- Evert, D. R., 1987. Influence of phony disease of peach on stem hydraulic conductivity and leaf xylem pressure potential. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 112:1032-1036.
- Fereres, E.; Cruz-Romero, G.; Hoffman, G. J.; Rawlins, S. L., 1979. Recovery of orange trees following severe water stress. *J. Appl. Ecol.* 16:833-842.
- Fosket, D. E., 1994. *Plant Growth and Development: a molecular approach*, Academic Press, London, 460p.
- Fundecitrus, 1997. *Manual de convivência com CVC*, Fundo Paulista de Defesa da Citricultura, Bebedouro, SP, 15p.
- Germanà, C. & Sardo, V., 1996. Relationship between net photosynthesis and transpiration rate in citrus trees. *Proc. Int. Citric.*, 1117-1121.
- Goldschmidt, E. E., 1980. Abscisic acid in citrus flower organs as related to floral development and function. *Plant Cell Physiol.* 21:193-197.

- Goldschmidt, E. E. & Golomb, A., 1982. The carbohydrate balance of alternate bearing citrus trees and the significance for reserves for flowering and fruiting. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 107:206-209.
- Goldschmidt, E. E. & Koch, K. E., 1996. Citrus. IN: Photoassimilate distribution in plants and crops. Source-sink relationships (E. Zamski & A. A. Schaffer, eds.), Marcel Dekker Inc., New York, pp.797-823.
- Gollan, T.; Passioura, J. B.; Munns, R., 1986. Soil water status affects the stomatal conductance of fully turgid wheat and sunflower leaves. *Aust. J. Plant Physiol.* 13:459-464.
- Gomes, M. M. A., Lagôa, A. M. A.; Machado, E. C.; Furlani, P. R., 1997. Trocas gasosas e quantificação do ácido abscísico em duas cultivares de arroz de sequeiro submetidas à deficiência hídrica. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* 9(3):177-183.
- Gómez-Cadenas, A.; Tadeo, F. R.; Talon, M.; Primo-Millo, E., 1996. Leaf abscission induced by ethylene in water-stressed intact seedlings of Cleopatra mandarin requires previous abscisic acid accumulation in roots. *Plant Physiol.* 112:401-408.
- Goodman, R. N.; Kiraly, Z.; Zaitlin, M., 1986. Growth Regulator Metabolism IN: The biochemistry and Physiology of Plant Disease, University of Missouri Press, Columbia, pp. 245-286.
- Goodwin, P. H.; De Vay, J. E.; Meredith, C. P., 1988a. Roles of water stress and phytotoxins in the development of Pierce's disease of the grapevine. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 32: 1-15.
- Goodwin, P. H.; De Vay, J. E.; Meredith, C. P., 1988b. Physiological responses of *Vitis vinifera* cv. 'Chardonnay' to infection by the Pierce's disease bacterium. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 32:17-32.

- Gowing, D. J. G.; Davies, W. J.; Jones, H.G., 1990. A positive root-sourced signal as an indicator of soil drying in apple, *Malus x domestica* Borkh. J. Exp. Bot. 41(233):1535-1540.
- Gowing, D. J. G.; Jones, H. G.; Davies, W. J., 1993. Xylem transported abscisic acid: the relative importance of its mass and its concentration in the control of stomatal aperture. Plant Cell Environ. 16:453-459.
- Gravena, S.; De Negri, J. D.; Quaggio, J. A.; Gonzalez, M. A.; Pinto, W. B. S.; Basile, G. B., 1997. Manejo de cigarrinhas e CVC no pomar. IN: Clorose Variegada dos Citros (L. C. Donadio & C. S. Moreira, eds.), Fundecitrus, Bebedouro, pp. 91-113.
- Habermann, G.; Rodrigues, J.D.; Machado, E.C.; Medina, C.L.; Gomes, M.M.A., 1999. Efeito de diferentes déficits de saturação de vapor em medidas de trocas gasosas em folhas de laranjeiras 'Pêra' com e sem CVC. R. Bras. Fisiol. Veg. 2:suplemento, resumos, p.28.
- Hagenmaier, R. D. & Baker, R. A., 1993. Reduction in gas exchange of citrus fruit by wax coatings. J. Agric. Food Chem. 41:283-287.
- Harborne, J.B., 1980. Plant Phenolics. IN: Secondary Plant Products (E.A.Bell & B.V. Chalwood), Encyclopedia of Plant Physiology, vol 8, Springer-Verlag, berlin, pp.329-402.
- Hartung, W.; Slovik, S.; Baier, M., 1990. pH changes and redistribution of abscisic acid within the leaf under stress, In: Importance of Root to Shoot Communication in the Responses to environmental Stress, Monograph 21. (W. J. Davies B. & Jeffcoat, eds.), British Society for Plant Growth Regulation, Bristol, pp.215-236.
- Hartung, W.; Weiler, E. W.; Radin, J. W., 1992. Auxin and cytokinins in the apoplastic solution of dehydrated cotton leaves. J. Plant Physiol. 40:324-327.

- Hendry, N. S.; van Staden, J.; Allan, P., 1982a. Cytokinins in citrus. I. Fluctuations in the leaves during seasonal and developmental changes. *Sci. Hortic.* 16:9-16.
- Hendry, N. S.; van Staden, J.; Allan, P., 1982b. Cytokinins in citrus. II. Fluctuations during growth in juvenile and adult plants. *Sci. Hortic.* 17:247-256.
- Henson, I. E., 1985. Dependence of abscisic acid accumulation in leaves of pearl millet (*Pennisetum americanum* L. Leeke) on rate of development of water stress. *J. Exp. Bot.* 36(169):1232-1239.
- Hill, B. L. & Purcell, A. H., 1995. Multiplication and movement of *Xylella fastidiosa* within grapevine and four other plants. *Phytopathology* 85:1368-1372.
- Hill, B.L. & Purcell, A. H., 1997. Populations of *Xylella fastidiosa* in plants required for transmission by an efficient vector. *Phytopathology* 87:1197-1201.
- Hoffmann-Benning, S. & Kende, H., 1992. On the role of abscisic acid and gibberelin in the regulation of growth in rice. *Plant Physiol.* 99:1156-1161.
- Hopkins, D. L., 1988. Production of diagnostic symptoms of blight in Citrus inoculated with *Xylella fastidiosa*. *Plant Dis.* 72:432-435.
- Hopkins, D. L., 1989. *Xylella fastidiosa*: xylem-limited bacterial pathogen of plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 27:271-290.
- Hubac, C. & Vieira da Silva, J., 1980. Indicateurs métaboliques de contraintes mésologique. *Physiol. Vég.* 18:45-53.
- Jackson, G. E.; Irvine, J.; Grace, J.; Khalil, A. A. M., 1995. Abscisic acid concentrations and fluxes in droughted conifer samplings. *Plant Cell Environ.* 18:13-22.
- Jarvis, A. J. & Davies, W. J., 1997. Whole-plant ABA flux and the regulation of water loss in *Cedrella odorata*. *Plant Cell Environ.* 20:521-527.

- Jia, W. & Zhang, J., 1999. Stomatal closure is induced rather by prevailing xylem abscisic acid than by accumulated amount of xylem-derived abscisic acid. *Physiol. Plant.* 106:268-275.
- Jia, W.; Zhang, J.; Zhang, D-P., 1996. Metabolism of xylem-delivered ABA in relation to ABA flux and concentration in leaves of maize and *Commelina communis*. *J. Exp. Bot.* 47:1085-1091.
- Khairi, M. M. A.; Hall, A. E., 1976a. Comparative studies of net photosynthesis and transpiration of some citrus species and relatives. *Physiol. Plant.* 36:35-39.
- Khairi, M. M. A.; Hall, A. E., 1976b. Temperature and humidity effects on net photosynthesis and transpiration of citrus. *Physiol. Plant.* 36:29-34.
- Kojima, K., 1996. Changes of abscisic acid, indole-3-acetic acid and gibberelin-like substances in the flowers and developing fruitlets of citrus cultivar 'Hyuganatsu'. *Sci. Hortic.* 65:263-272.
- Kojima, K., 1997. Changes of ABA, IAA and GAs levels in reproductive organs of Citrus. *JARQ* 31:271-280.
- Kojima, K.; Yamada, Y.; Yamamoto, M., 1994. Distribution of ABA and IAA within a developing Valencia orange fruit and its parts. *J. Jap. Soc. Hort. Sci.* 63(2):335-339.
- Kojima, K.; Yamamoto, M.; Goto, A.; Matsumoto, R., 1996. Changes in ABA, IAA and GAs contents in reproductive organs of Satsuma mandarin. *J. Jap. Soc. Hort. Sci.* 65(2):237-243.
- Koshita, Y.; Takahara, T.; Ogata, T.; Goto, A., 1999. Involvement of endogenous plant hormones (IAA, ABA, GAs) in leaves and flower bud formation of satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.). *Sci. Hortic.* 79:185-194.

- Lavon, R.; Goldschmidt, E. E.; Salomon, R.; Frank, A., 1995. Effect of potassium, magnesium and calcium deficiencies on carbohydrate pools and metabolism in *Citrus* leaves. *J. Am. Soc. Hortic. Sci* 120:54-58.
- Lawlor, D. W. & Fock, H., 1978. Photosynthesis, respiration and carbon assimilation in water-stressed maize at two oxygen concentrations. *J. Exp. Bot.* 28:579-593.
- Liang, J., Zhang, J. & Wong, M. H., 1997. How do roots control xylem sap ABA concentration in response to soil drying? *Plant Cell Physiol.* 38(1):10-16.
- Liang, J. & Zhang, J., 1999. The relations of stomatal closure and reopening to xylem ABA concentration and leaf water potential during soil drying and rewatering. *Plant Growth Regul.* 29:77-86.
- Lima, J. E. O., Coutinho, A., Roberto, S. R., Miranda, V. S., Carlos, E. F., Salva, R. & Massari, C., 1996. New developments on Citrus Variegated Chlorosis research at Fundecitrus, Brazil. *Proc. Int. Soc. Citric.* 1:435-439.
- Lindow, S. E.; Desurmont, C.; Elkins, R.; McCourty, G.; Clark, E.; Brandl, M., 1998. Occurrence of indole-3-acetic acid producing bacteria on pear trees and their association with fruit russet. *Phytopathology* 88(11):1149-1157.
- Lopez-Carbonell, M.; Alegre, L.; van Onckelen, H., 1994a. Effects of water stress on cellular ultrastructure and on concentrations of endogenous abscisic acid and indole-3-acetic acid in *Fatsia japonica* leaves. *Plant Growth Regul.* 14:29-35.
- Lopez-Carbonell, M.; Alegre, L.; van Onckelen, H., 1994b. Changes in cell ultrastructure and endogenous abscisic acid and indole-3-acetic acid concentrations in *Fatsia japonica* leaves under polyethylene glycol-induced water stress. *Plant Growth Regul.* 15:165-174.

- Lopez-Carbonell, M.; Alegre, L.; Pastor, A.; Prinsen, E.; van Onckelen, H., 1996. Variations in abscisic acid, indole-3-acetic acid and zeatin riboside concentrations in two Mediterranean shrubs subjected to water stress. *Plant Growth Regul.* 20:271-277.
- Machado, E. C.; Quaggio, J. A.; Lagôa, A. M. A.; Ticelli, M.; Furlani, P. R., 1994. Trocas gasosas e relações hídricas em laranjeiras com clorose variegada dos citros. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* 6(1):53-57.
- Malavolta, E. & Prates, H.S., 1991. Alterações na composição mineral das folhas de pomares afetados pela anomalia 'amarelinho' ou clorose variegada. *Laranja* 12:315-329.
- Marler, T. E. & Davies, F. S., 1988. Soil water content and leaf gas exchange of young, field grown 'Hamlin' orange trees. *Proc. Int. Am. Soc. Hort.* 32:51-64.
- Matta, A. & Gentile, I. A., 1968. The relation between polyphenoloxidase activity and ability to produce indole acetic acid in *Fusarium*-infected tomato plants. *Neth. J. Plant Pathol.* 74:47-51.
- Medina, C. L.; Nunes, W. M. C.; Machado, M. A., Machado, E. C., 1998. Transmission of *Xylella fastidiosa* by spliced approach grafting. IN: XIV International Organization of Citrus Virologists, Campinas, SP, Brasil, resumos, p.25.
- Medina, C.L. & Machado, E.C., 1998. Trocas gasosas e relações hídricas em laranjeira 'Valência' enxertada sobre limoeiro 'Cravo' e Trifoliata e submetida à deficiência hídrica. *Bragantia* 57(1):15-22.
- Medina, C. L.; Machado, E. C.; Gomes, M. M. A., 1999. Condutância estomática, transpiração e fotossíntese em laranjeiras 'Valência' sob deficiência hídrica. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* 11(1): 29-34.
- Mepsted, R.; Flood, J.; Cooper, R. M., 1995a. Fusarium wilt of oil palm I. Possible causes of stunting. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 46:361-372.

- Mepsted, R.; Flood, J.; Cooper, R. M., 1995b. Fusarium wilt of oil palm II. Stunting as a mechanism to reduce water stress. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 46: 373-387.
- Munns, R., 1992. A leaf elongation assay detects an unknown inhibitor in xylem sap from wheat and barley. *Aust. J. Plant Physiol.* 19:127-135.
- Munns, R. & Cramer, G. R., 1996. Is coordination of leaf and root growth mediated by abscisic acid? *Opinion. Plant Soil* 185:33-49.
- Munns, R. & King, R. W., 1988. Abscisic acid is not the only stomatal inhibitor in the transpiration stream of wheat plants. *Plant Physiol.* 88:703-708.
- Munns, R. & Weir, R., 1981. Contribution of sugars to osmotic adjustment in elongating and expanding zones of wheat leaves during moderate water deficits at two light levels. *Aust. J. Plant Physiol.* 8:93-105.
- Neales, T. F. & McLeod, A. L., 1991. Do leaves contribute to the abscisic acid present in the xylem sap of 'droughted' sunflower plants? *Plant Cell Environ.* 14:979-986.
- Nelson, N. A., 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. *J. Biol. Chem.* 153:375-380.
- Nemec, S.; Syvertsen, J. P.; Levy, Y.; 1986. Water relations of rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush.) citrus seedlings infected with *Fusarium solani*. *Plant Soil* 93:231-239.
- Norman, S. M.; Poling, S. M.; Maier, V. P., 1988. An indirect enzyme-linked immunosorbent assay for (+)-abscisic acid in *Citrus*, *Ricinus* and *Xanthium* leaves. *J. Agric. Food Chem.* 36:225-231.
- Norman, S. M.; Maier, V. P.; Pon, D. L., 1990. Abscisic acid accumulation and carotenoid and chlorophyll content in relation to water stress and leaf age of different types of citrus. *J. Agric. Food Chem.* 38:1326-1334.

- Normanly, J.; Slovin, J. P.; Cohen, J. D., 1995. Rethinking auxin biosynthesis and metabolism. *Plant Physiol.* 107:323-329.
- Oliveira, R. F.; Machado, E. C.; Marin, F. R.; Medina, C. L., 2000. Sap flow rates and stomatal conductance of sweet orange 'Pêra' (*Citrus sinensis* L. Osb.) infected by *Xylella fastidiosa*. IN: IX International Society of Citriculture Congress, Florida, USA, p.161.
- Parry, A. D. & Horgan, R., 1991. Abscisic acid biosynthesis in roots. I The identification of potential abscisic acid precursors and other carotenoids. *Planta* 187:185-191.
- Parry, A. D.; Griffiths, A.; Horgan, R., 1992. Abscisic acid biosynthesis in roots. II The effects of water stress in wild type and abscisic acid deficient mutant (*notabilis*) plants of *Lycopersicon esculentum* Mill. *Planta* 187:192-197.
- Patten, C. H. & Glick, B. R., 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Can. J. Microbiol.* 42:207-220.
- Pegg, G. F. & Sequeira, L., 1968. Stimulation of aromatic biosynthesis in tobacco plants infected by *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 58:476-483.
- Pemadasa, M. A., 1982. Differential abaxial and adaxial stomatal responses to indole 3-acetic acid in *Commelina communis* L. *New Phytol.* 90:209-219.
- Pimentel Gomes, F., 1990. Curso de Estatística Experimental, Esalq, Piracicaba, 13ª edição, 468p.
- Plumbe, A. M. & C. M. Willmer, 1985. Phytoalexins, water stress and stomata. I. Do phytoalexins accumulate in leaves under water stress? *New Phytol.* 101:269-274.
- Plumbe, A. M. & C. M. Willmer, 1986a. Phytoalexins, water stress and stomata. II. The effects of phytoalexins on stomatal responses in epidermal strips and on guard cell protoplasts. *New Phytol.* 102:375-384.

- Plumbe, A. M. & C. M. Willmer, 1986b. Phytoalexins, water stress and stomata. III. The effects of some phenolics, fatty acids and some other compounds on stomatal responses. *New Phytol.* 103:17-22.
- Plummer, J. A.; Mullins, M. G.; Vine, J. H., 1991. Seasonal changes in endogenous ABA and IAA and the influence of applied ABA and auxin in relation to shoot growth and abscission in Valencia orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). *Plant Growth Regul.* 10:139-151.
- Pooler, M. R. & Hartung, J. S., 1995. Specific PCR detection and identification of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chlorosis. *Curr. Microbiol.* 31:377-381.
- Preiss, J., 1982. Plant Carbohydrates. IN: Macromolecular carbohydrates-Occurrence. Metabolism, function and biosynthesis of starch and its regulation. *Encyclopedia of Plant physiology* (F. A. Loewus & W. Tanner, eds.), vol. 13A, new series, Springer-Verlag, Berlin, pp.395-417.
- Purcell, A. H. & Hopkins, D. L., 1996. Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34:131-151.
- Quaggio, J.A., 1988. Distúrbios nutricionais em citros afetados por CVC. Ata da 1ª reunião do Grupo de Trabalho sobre CVC, Secretaria da Agricultura, SP.
- Queiroz-Voltan, R.B.; Paradela Filho, O.P.; Carelli, M.L.C., Fahl, J.I., 1998. Aspectos estruturais de cafeeiro infectado com *Xylella fastidiosa*. *Bragantia* 57(1):23-33.
- Quick, P.; Siegl, G.; Neuhaus, E., Feil, R.; Stitt, M., 1989. Short term water stress leads to a stimulation of sucrose synthesis by activating sucrose-phosphate synthase. *Planta* 177:535-546.
- Quick, P.; Chaves, M. M.; Wendler, R.; David, M.; Rodrigues, M. L.; Passarinho, J. S.; Pereira, J. S.; Adcock, M. D.; Leegood, R. C.; Stitt, M., 1992. The effect of water stress

- on photosynthetic carbon metabolism in four species grown under field conditions. *Plant Cell Environ.* 15:25-35.
- Raschke, K. & Fischer, E., 1987. Carboxylation of ribulose 1,5,-bisphosphate inhibited after application of the phytohormone abscisic acid to whole leaves of *Xanthium strumarium* (C₃) and *Zea mays* (C₄). IN: Progress in photosynthesis research. (J. Biggins, ed.), Martinus Nijhoff Publ., vol. IV, Dordrecht, 481p.
- Raschke, K. & Resemann, A., 1986. The midday depression of CO₂ assimilation in leaves of *Arbutus unedo* L.: diurnal changes in photosynthetic capacity related to changes in temperature and humidity. *Planta* 168:546-558.
- Reichardt, K., 1985. A água: absorção e translocação. IN: Fisiologia Vegetal 1 (M. G. Ferri, ed.), EPU, São Paulo, pp.3-74.
- Robb, J.; Busch L.; Rauser, W. E., 1980. Zinc toxicity and xylem wall vessel wall alterations in white beans. *Ann. Bot.* 46:43-50.
- Robb, J.; Smith, A.; Busch, L., 1982. Wilts caused by *Verticillium* species. A cytological survey of vascular alterations in leaves. *Can. J. Bot.* 60:825-837.
- Rock, C. D. & Zeevaart, J. A. D., 1990. Abscisic (ABA)-aldehyde is a precursor to, and 1'4'-*trans*-ABA-diol a catabolite of ABA in apple. *Plant Physiol.* 93:915-923.
- Rock, C. D.; Heath, T. G.; Zeevaart, J.A.D., 1992. 2-*trans* Abscisic acid biosynthesis and metabolism of ABA-aldehyde and xanthoxin in wild type and the *aba* mutant of *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 43:249-256.
- Romeiro, R. S., 1987. Fundamentos de fisiologia do parasitismo em fitopatologia, Boletim n° 253, Imprensa Universitária, UFV, Viçosa, 31p.

- Rossetti, V.; Garnier, M.; Bové, J. M.; Beretta, M. J. G. & Teixeira, A. R. R., 1991. Occurrence of xylem-restricted bacteria in sweet orange trees affected by chlorosis variegation, a new citrus disease in Brazil. *Plant Prot. Bull.* 39:115-116.
- Rossetti, V.; Gonzales, M. A.; Donadio, L.C., 1998. A História da CVC.IN: Clorose Variegada dos Citros (L. C. Donadio & C. S. Moreira, eds.), Fundecitrus, Bebedouro, pp. 1-21.
- Ruiz-Sánchez, M. C.; Domingo, R.; Savé, R.; Biel, C.; Torrecillas, A., 1997. Effects of water stress and rewatering on leaf water relations of lemon plants. *Biol. Plant.* 39(4):623-631.
- Sagee, O.; Goren, R.; Riov, J., 1980. Abscission of citrus leaf explants. Interrelations of ABA, ethylene and hydrolytic enzymes. *Plant Physiol.* 66:750-753.
- Sagee, O., Maoz, A.; Mertens, R.; Goren, R.; Riov, J., 1986. Comparison of different enzyme immunoassays for measuring indole-3-acetic acid in citrus tissues. *Physiol. Plant.* 68:265-270.
- Savé, R.; Biel, C.; Domingo, R.; Ruiz-Sánchez, M. C.; Torrecillas, A., 1995. Some physiological and morphological characteristics of citrus plants for drought resistance. *Plant Sci.* 110: 167-172.
- Schlenk, H. & Gellerman, J. L., 1960. Esterification of fatty acids with diazomethane on a small scale. *Anal. Chem.* 32:1412-1414.
- Scholes, J. D.; Lee, P. J.; Horton, P.; Lewis, D. H., 1994. Invertase: understanding changes in the photosynthetic and carbohydrate metabolism of barley leaves infected with powdery mildew. *New Phytol.* 126:213-222.
- Schulze, E. D., 1986. Carbon dioxide and water vapor exchange in response to drought in the atmosphere and in the soil. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 37:247-74.

- Schurr, U.; Gollan, T.; Schulze, E. D., 1992. Stomatal response to drying soil in relation to changes in the xylem sap composition of *Helianthus annuus*. II. Stomatal sensitivity to abscisic acid imported from the xylem sap. *Plant Cell Environ.* 15:561-72.
- Sequeira, L., 1963. Growth regulators in plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 1:5-30.
- Sherald, J. L. & Lei J. D., 1991. Evaluation of a rapid ELISA test kit for detection of *Xylella fastidiosa* in landscape trees. *Plant Dis.* 75(2):200-203.
- Sinclair, T. R.; Allen Jr., L. H., 1982. Carbon dioxide and water vapor exchange of leaves on field-grown citrus trees. *J. Exp. Bot.* 33(137):1166-1175.
- Sinclair, T. R.; Allen Jr., L. H.; Cohen, M., 1983. Citrus blight effects on carbon dioxide assimilation. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 108(3):503-506.
- Snaith, P. J. & Mansfield, T. A., 1982a. Control of the CO₂ responses of stomata by indol-3 y-acetic acid and abscisic acid. *J. Exp. Bot.* 33(133):360-365.
- Snaith, P. J. & Mansfield, T. A., 1982b. Stomatal sensitivity to abscisic acid: can it be defined? *Plant Cell. Environ.* 5:309-11.
- Socias, X.; Correia, M. J.; Chaves, M.; Medrano, H., 1997. The role of abscisic acid and water relations in drought responses of subterranean clover. *J. Exp. Bot.* 48(311):1281-1288.
- Somogyi, M., 1952. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* 195:19-23.
- Sperry, J. S. & Tyree, M. T., 1988. Mechanism of water stress induced xylem embolism. *Plant Physiol.* 88:581-87.
- Steadman, J. R. & Sequeira, L., 1969. A growth inhibitor from tobacco and its possible involvement in pathogenesis. *Phytopathology* 59: 499-503.
- Syvertsen, J. P., 1982. Minimum leaf water potential and stomatal closure in citrus leaves of different ages. *Ann. Bot.* 47:827-834.

- Syvvertsen, J. P., 1999. Physiological determinants of citrus tree growth and development IN: Proceedings of the First International Symposium of Fruit Crop- Production and Quality of Citrus Fruits (J. D. Rodrigues, ed.), Unesp, Botucatu, pp. 123-160.
- Syvvertsen, J. P. & Albrigo, L. G., 1980. Seasonal and diurnal citrus leaf and fruit water relations. *Bot. Gaz.* 141(4):440-446.
- Syvvertsen, J. P. & Lloyd, J., 1994. Citrus. IN: Handbook of environmental Physiology of Fruit crops. Sub-tropical and Tropical Crops. (B. Schaffer & P. Andersen, eds.), vol. 2, CRC Press, Boca Raton, Florida, p.65-99.
- Syvvertsen, J. P.; Bausher, M. G.; Albrigo, L. G., 1980. Water relations and related leaf characteristics of healthy and blight affected citrus trees. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 105(3):431-434.
- Syvvertsen, J. P.; Smith Jr., M. L.; Allen, J. C., 1981. Growth rate and water relations of citrus leaf flushes. *Ann. Bot.* 47:97-105.
- Tardieu, F., 1996. Drought perception by plants. Do cells of droughted plants experience water stress? *Plant Growth Regul.* 20(93):93-104.
- Tardieu, F. & Davies, W. J., 1992. Stomatal response to abscisic acid is a function of current plant water status. *Plant Physiol.* 98:540-545.
- Tardieu, F. & Davies, W. J., 1993. Integration of hydraulic and chemical signaling in the control of stomatal conductance and water status of droughted plants. *Plant Cell Environ.* 16:341-349.
- Tardieu, F.; Zhang, J.; Davies, W. J., 1992. What information is conveyed by an ABA signal from maize roots in drying soil? *Plant Cell Environ.* 15:185-191.

- Tardieu, F.; Lafarge, T.; Simonneau, T., 1996. Stomatal control by fed or endogenous xylem ABA in sunflower: interpretation of correlations between leaf water potential and stomatal conductance in anisohydric species. *Plant Cell Environ.* 19:75-84.
- Tetlow, I.J. & Farrar, J.F., 1993. Apoplastic sugar concentration and pH in barley leaves infected with brown rust. *J. Exp. Bot.* 44:929-936.
- Toritaka, H.; Hara, H.; Torii, S.; Sakibara, K., 1974. Studies on the effect of crop load on the composition of Satsuma mandarin trees. I. Diurnal and seasonal fluctuation in osmotic concentration, solute ratio, soluble solids, and moisture content in leaves and stems. *J. Jap. Soc. Hort. Sci.* 43:15-23.
- Trejo, C. L.; Clephan, A. L.; Davies, W. J., 1995. How do stomata read abscisic acid signals? *Plant Physiol.* 109:803-811.
- Trejo, C. L. & Davies, W. J., 1991. Drought induced closure of *Phaseolus vulgaris* L. stomata precedes leaf water deficit and any increase in xylem ABA concentration. *J. Exp. Bot.* 42(245):1507-1515.
- Trejo, C. L.; Davies, W. J.; Ruiz, L. M. P., 1993. Sensitivity of stomata to abscisic acid. *Plant Physiol.* 102:497-502.
- Tuomi, T. & Rosenqvist, H., 1995. Detection of abscisic, gibberellic and indole-3-acetic acid from plants and microbes. *Plant Physiol. Biochem.* 33(6):725-734.
- Turner, N. C., 1981. Techniques and experimental approaches for the measurement of plant water status. *Plant Soil* 58:339-366.
- Tyree, M. T. & Sperry, J. S., 1988. Do woody plants operate near the point of catastrophic xylem dysfunction caused by dynamic water stress? *Plant Physiol.* 88:574-580.
- Van Alfen, N. K., 1989. Reassessment of plant wilt toxins. *Annu. Rev. Phytopathol.* 27:533-50.

- Van Alfen, N. K.; McMillan, B. D.; Dryden, P., 1987. The multi-component extracellular polysaccharide of *Clavibacter michiganense* subsp. *insidiosum*. *Phytopathology* 77:496-501.
- Vassey, T. L. & Sharkey, T. D., 1989. Mild water stress of *Phaseolus vulgaris* plants leads to reduced starch synthesis and extractable sucrose phosphate synthase activity. *Plant Physiol.* 89:1066-1070.
- Vitti, G.C.; Marchi, R.J.; Borella, M.L.; Vaz Filho, D., 1989. Estudo de prováveis desequilíbrios nutricionais em pomares cítricos no município de Colina-SP, FCAV, Unesp, Jaboticabal, 12p.
- Vogel, A. I., 1956. Practical organic chemistry. Longman, New York, 1188p.
- Vu, J.C.V.; Yelenosky, G., 1988a. Water deficit and associated changes in some photosynthetic parameters in leaves of 'Valencia' orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck.) *Plant Physiol.* 88:375-378.
- Vu, J.C.V.; Yelenosky, G., 1988b. Solar irradiance and drought stress effects on the activity and concentration of ribulose biphosphate carboxylases in 'Valencia' orange leaves. *Israel J. Bot.* 37:245-256.
- Vu, J. C. V.; Yelenosky, G.; Bausher, M.G., 1986. CO₂ exchange rate, stomatal conductance and transpiration in attached leaves of 'Valencia' orange. *Hort Sci.* 21(1):143-144.
- Vu, J. C. V.; Allen Jr., L. H.; Bowes, G., 1987. Drought stress and elevated CO₂ effects on soybean ribulose biphosphate carboxylase activity and canopy photosynthetic rates. *Plant Physiol.* 83:573-578.
- Wallis, F. M. & Truter, S. J., 1978. Histopathology of tomato plants infected with *Pseudomonas solanacearum* with emphasis on ultrastructure. *Physiol. Plant Pathol.* 13:307-17.

- Walton, D. C.; Harrison, M. A. & Côte, P., 1976. The effects of water stress on abscisic acid levels and metabolism in roots of *Phaseolus vulgaris* L. and other plants. *Planta* 131:141-144.
- Waring, R.H., 1991. Responses of evergreen trees to multiple stresses, IN: Responses of Plants to Multiple Stresses. (H. A. Mooney; W. E. Winner; E. J. Pell, eds.), Academic Press Inc., New York, pp.371-390.
- Wartinger, A.; Heilmeyer, H.; Hartung, W.; Schulze, E. D., 1990. Daily and seasonal courses of leaf conductance and abscisic acid in the xylem sap of almond trees (*Prunus dulcis* 'Miller' D.A. Webb) under desert conditions. *New Phytol.* 116:581-7.
- Wilkinson, S. & Davies, W. J., 1997. Xylem sap pH increase: a drought signal received at the apoplastic face of the guard cell that involves the suppression of saturable abscisic acid uptake by the epidermal symplast. *Plant Physiol.* 113:559-573.
- Wilkinson, S.; Corlett, J. E.; Oger, L.; Davies, W. J., 1998. Effects of xylem pH on transpiration from wild-type and *flacca* tomato leaves. *Plant Physiol.* 117:703-709.
- Wilkinson, S., 1999. PH as a stress signal. *Plant Growth Regul.* 29:87-99.
- Wright, D. P.; Baldwin, M. C.; Shephard, M. C.; Scholes, J. D., 1995a. Source-sink relationships in wheat leaves infected with powdery mildew. I. Alterations in carbohydrate metabolism. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 47:237-253.
- Wright, D. P.; Baldwin, M. C.; Shephard, M. C.; Scholes, J. D., 1995b. Source-sink relationships in wheat leaves infected with powdery mildew. II. Changes in the regulation of the Calvin cycle. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 47:255-267.
- Young, R. H. & Garnsey, S. M., 1977. Water uptake patterns in blighted citrus trees. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 102:751-756.

- Zaffari, G. R.; Peres, L. E. P.; Kerbauy, G. B., 1998. Endogenous levels of cytokinins, indole acetic acid, abscisic acid and pigments in variegated somaclones of micropropagated banana leaves. *J. Plant Growth Regul.* 17:59-61.
- Zhang, J. & Davies, W. J., 1987. Increased synthesis of ABA in partially dehydrated root tips and ABA transport from roots to leaves. *J. Exp. Bot.* 38:2015-2023.
- Zhang, J. & Davies, W. J., 1989. Abscisic acid produced in dehydrating roots may enable the plant to measure the water status of the soil. *Plant Cell Environ.* 12:73-81.
- Zhang, J. & Davies, W. J., 1990. Changes in the concentration of ABA in xylem sap as a function of changing soil water status can account for changes in leaf conductance and growth. *Plant Cell Environ.* 13:277-285.
- Zhang, J. & Davies, W. J., 1991. Antitranspirant activity in xylem sap of maize plants. *J. Exp. Bot.* 42:317-321.
- Zhang, J. & Tardieu, F., 1996. Relative contribution of apices and mature tissues to ABA synthesis in droughted maize root systems. *Plant Cell Physiol.* 37(5):598-605.
- Zhang, J.; Schurr, U.; Davies, W. J., 1987. Control of stomatal behavior by abscisic acid which apparently originates in the roots. *J. Exp. Bot.* 38:1174-1181.
- Zhang, J.; Jia, W.; Zhang, D-P., 1997. Re-export and metabolism of xylem-delivered ABA in attached maize leaves under different transpirational fluxes and xylem ABA concentrations. *J. Exp. Bot.* 48(313):1557-1564.
- Zimmermann, M. H. & Jeje, A. A., 1981. Vessel length distribution in stems of some American woody plants. *Can. J. Bot.* 59:1882-92.
- Zulu, J. N.; Farrar, J. F.; Whitbread, R., 1991. Effects of phosphate supply on wheat seedlings infected with powdery mildew: carbohydrate metabolism of first leaves. *New Phytol.* 118:553-558.