

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

JOSÉ ALIÇANDRO BEZERRA DA SILVA

**FLORESCIMENTO E FRUTIFICAÇÃO EM
LARANJEIRAS ‘PÊRA’ [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]
COM CLOROSE VARIEGADA DOS CITROS (CVC)**

**Tese apresentada ao Instituto de Biologia
para obtenção do título de Doutor em
Biologia Vegetal.**

Orientador: Prof. Dra. Ana Maria Magalhães Andrade Lagôa

2003

FICHA CATALOGRÁFICA

DATA DA DEFESA: 02/12/ 2003

BANCA EXAMINADORA

TITULARES:

Dra. Ana Maria Magalhães Andrade Lagoa (Orientadora)

Dr. Camilo Lázaro Medina

Dra. Cleide Aparecida Abreu

Dr. Eduardo Caruso Machado

Prof. Dra. Marlene Aparecida Schiavinato

SUPLENTES:

Prof. Dr. Pedro Roberto Furlani

Prof. Dra. Claudia Regina Baptista Haddad

Aos meus pais e irmãos pois, mesmo sem perceberem, foram meus companheiros fazendo com que os dias mais árduos se tornassem mais brandos na batalha em busca dos meus objetivos.

À Dra. Ana Maria Magalhães Andrade Lagôa obrigado pela orientação, pelos ensinamentos e compreensão durante todo o curso e nos períodos críticos que nortearam os trabalhos.

Ao Dr. Eduardo Caruso Machado, um brilhante pesquisador e um exemplo de dedicação à pesquisa científica. Obrigado pelos ensinamentos e pelo compartilhamento do dia a dia dos meus trabalhos.

AGRADECIMENTOS

Primeiro agradeço a Deus pois, mesmo entre os desequilíbrios naturais do dia a dia, ele sempre esteve ao meu lado nas horas mais difíceis.

À Universidade Federal de Alagoas (UFAL) pela oportunidade de realizar os cursos de mestrado e doutorado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Ao Instituto Agronômico de Campinas e à Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) pela oportunidade e apoio para a realização deste trabalho.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento e apoio a realização deste trabalho (Processo 98/16259-1).

Aos professores Hilário Alencar da Silva e Carlos Gonçalves Oliveira e a as funcionárias da Pró-reitoria de Pós-graduação e Pesquisa da UFAL, Marineide de Almeida Coelho, Marinês da Silva Silveira e Terezinha Alves dos Santos Lobo (In memorian), aos quais serei eternamente grato tanto pela colaboração, compreensão como pelo incentivo a realização, tanto do curso de mestrado, como do doutorado.

Aos professores do Departamento de Fisiologia Vegetal do Instituto de Biologia da Unicamp pelos ensinamentos e, em especial, ao professor Ladaslav Sodek, pela colaboração durante a realização deste trabalho, ao qual aproveito a oportunidade para expressar minha admiração pela sua competência e sua exímia qualidade como professor.

Aos colegas Camilo Lázaro Medina e Mara de Menezes de Assis Gomes pela colaboração durante a realização deste trabalho.

Aos colegas, pesquisadores e funcionários do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Ecofisiologia e Biofísica Instituto Agronômico de Campinas.

A todos do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de solos e Recursos Ambientais do Instituto Agronômico de Campinas, em especial ao Prof. Dr. Pedro Furlani pela sua contribuição na elaboração da tese.

Aos professores Dra. Cleide Aparecida Abreu, Dr. Jorge Vega e Dra. Marlene Aparecida Schiavinato pela contribuição na elaboração da tese.

Aos amigos Andréa Santos Omena, Antonio Carlos, Alessandro de Oliveira Rios obrigado por estarem presentes durante todo o curso de Doutorado.

ÍNDICE

Banca examinadora.....	3
Agradecimento.....	5
Índice.....	7
Abreviaturas.....	10
Resumo.....	11
Summary.....	14
1. Introdução.....	17
2. Revisão de literatura.....	22
2.1 Caracterização da Clorose Variegada de Citros (CVC).....	22
2.2 Florescimento em de laranjeiras.....	24
3. Objetivo Geral.....	31
4. Material e Métodos.....	32
4.1. Localização do experimento.....	32
4.2. Condução do experimento.....	32
4.3. Quantificação dos botões florais, flores, inflorescências e brotos vegetativos.....	33
4.4. Determinação das trocas gasosas.....	34
4.5. Quantificação de carboidratos em folhas, ramos e raízes.....	35
4.6. Determinação da concentração de macro e micronutrientes nas folhas.....	38
4.6.1. Determinação do nitrogênio.....	39
4.6.2. Determinação do teor boro nas folhas.....	40
4.7. Quantificação do ácido abscísico (ABA).....	41
4.8. Quantificação do ácido 3-indol acético (AIA).....	43

5. Resultados.....	45
5.1. Período de indução floral.....	45
5.1.1. Açúcares.....	45
5.1.2. Trocas gasosas.....	49
5.1.3. Macronutrientes.....	58
5.1.4. Micronutrientes.....	61
5.2. Período de floração e frutificação.....	65
5.2.1. Açúcares.....	65
5.2.2. Produção botões florais, flores, inflorescências e brotos vegetativos.....	68
5.2.3. Trocas gasosas.....	74
5.2.4. Macronutrientes.....	83
5.2.5. Micronutrientes.....	87
5.2.6. Hormônios.....	90
6. Discussão.....	93
6.1. Período de indução floral.....	93
6.1.1. Açúcares.....	93
6.1.2. Trocas gasosas.....	96
6.1.3. Macronutrientes.....	99
6.1.4. Micronutrientes.....	105
6.2. Período de floração e frutificação.....	109
6.2.1. Açúcares.....	109

6.2.2. Produção de botões florais, flores, inflorescências e brotos vegetativos.....	114
6.2.3. Tocos gasosas.....	116
6.2.4. Macronutrientes.....	117
6.2.5. Micronutrientes.....	122
6.2.6. Hormônios.....	125
7. Conclusões.....	127
8. Apêndice.....	128
9. Referências.....	132

ABREVIATURAS

A	Taxa de assimilação de CO ₂ ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)
E	Taxa de transpiração ($\text{mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)
g_s	Condutância estomática ($\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)
C_i	Concentração interna de CO ₂ ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)
RFA	Radiação fotossinteticamente ativa ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)
T_f	Temperatura foliar (°C)
T	Temperatura (°C)
AIA	Ácido 3-indol acético
ABA	Ácido abscísico
J	Joule
NPA	Ácido naftilfitalâmico
MS	Matéria seca

FLORESCIMENTO E FRUTIFICAÇÃO EM LARANJEIRAS ‘PÊRA’ (*CITRUS SINENSIS* L. OSBECK) COM CLOROSE VARIEGADA DOS CITROS (CVC).

RESUMO

A citricultura brasileira vive constantemente mesclando bons períodos de tranquilidade com alguns períodos de turbulências, sem, contudo sofrer soluções de continuidade. Uma das principais causas dessas turbulências é a incidência de doenças como a Clorose Variegada dos Citros (CVC) que, apesar dos grandes avanços de conhecimentos com relação à sua caracterização, ainda hoje causa consideráveis perdas para os citricultores. A CVC é causada pela bactéria *Xylella fastidiosa* que se restringe a colonizar os vasos xilemáticos, causando sérios distúrbios no desenvolvimento das laranjeiras.

O objetivo foi avaliar as alterações de carboidratos, trocas gasosas e minerais em laranjeira ‘Pêra’, causadas pela CVC durante as fases de indução floral (primeiro período), floração e de frutificação (segundo período). O experimento foi conduzido sob condições de casa de vegetação, com laranjeiras ‘Pêra’ (*Citrus sinensis* L. Osbeck) enxertadas em limoeiros ‘Cravo’ (*Citrus limonia* Osbeck) e inoculadas com *X. fastidiosa* por encostia com plantas doentes.

Durante o período de indução floral verificou-se redução gradativa dos teores foliares de açúcares totais provocada principalmente pelos decréscimos dos teores de sacarose. Ficou claro que os açúcares, principalmente a sacarose, são essenciais para o processo de indução floral e que a sua maior demanda ocorreu em julho, mês que correspondeu à máxima atividade dos meristemas, que se encontram numa fase próxima a diferenciação dos órgãos reprodutivos ou vegetativos.

Nos ramos, durante a fase de indução floral, os decréscimos dos teores de açúcares não ocorreram continuamente. Os resultados indicaram que os ramos participam de forma menos

expressiva no fornecimento de carboidratos para o desenvolvimento das gemas durante o período de indução floral.

Durante o período de floração, a demanda por carboidratos atingiu seu nível máximo em agosto, mês em que foram verificados os menores teores de açúcares, tanto nas folhas sadias como nas doentes. Já os ramos, apresentaram quedas tanto no início do processo de floração como no de frutificação. A única exceção foi com relação aos teores de amido que parece ser pouco mobilizado durante o período de floração e frutificação.

As reduções dos teores de açúcares nas raízes, principalmente no início do processo de floração, presumivelmente foram provocadas pela alta demanda por carboidratos ocorrida na parte aérea, para produção de flores e frutos.

A presença da bactéria nas plantas de laranjeiras limitou o fluxo de carboidratos para o desenvolvimento das gemas, pois os teores de açúcares nas folhas, ramos e raízes foram geralmente maiores nas plantas doentes do que nas plantas sadias. Provavelmente, isto se deve ao fato das plantas sadias não apresentarem grandes restrições ao fluxo de carboidratos para o desenvolvimento paralelo de estruturas vegetativas e reprodutivas, pois, apesar das plantas doentes apresentarem um maior teor de açúcares durante o período de indução floral, verificou-se que a produção de ramos vegetativos foi muito inferior aos das plantas sadias.

De acordo com dados apresentados neste trabalho pode-se inferir que a produção de flores é sensivelmente afetada pelo desenvolvimento dos brotos vegetativos, devido a estes demandarem uma grande quantidade de carboidratos para seu desenvolvimento.

No final do período de indução floral, em julho, as taxas de fotossíntese foram maiores, tanto nas plantas sadias como doentes. Possivelmente este aumento foi devido ao aumento da demanda por carboidratos para a finalização do desenvolvimento das gemas e posterior desenvolvimento das flores, que exigiu das plantas um grande fluxo de carboidratos. Após as plantas atingirem a máxima taxa fotossintética, no mês seguinte, em agosto, logo após o final do período de indução floral, quando as plantas estavam em pleno desenvolvimento das flores, ocorreu redução das taxas fotossintéticas, mantendo-se os patamares constantes no mês

seguinte. Os dados indicaram que somente na transição do período de indução floral para o de floração é que houve uma maior exigência por fotoassimilados e desta forma uma presumível necessidade das plantas aumentarem suas taxas fotossintéticas.

Durante todo período avaliado de florescimento e frutificação foi observado que a CVC causou reduções significativas e gradativas das taxas fotossintéticas, transpiração e condutância estomática pois, na sua quase totalidade, as taxas fotossintéticas apresentadas pelas plantas sadias foram sempre superiores às apresentadas pelas plantas com CVC.

Com relação ao desenvolvimento dos órgãos reprodutivos, as plantas com CVC apresentaram, em agosto, as maiores produções de órgãos florais e frutos do que as sadias enquanto que, a produção de ramos vegetativos nas plantas doentes foi inferior ao número de ramos produzidos pelas plantas sadias.

Em termos gerais, verificou-se que a CVC causou alterações nos teores de alguns macro e micronutrientes tanto nas folhas velhas como novas pois, durante o período de florescimento e frutificação as concentrações foliares de alguns nutrientes nas folhas das plantas com CVC foram bem diferentes em comparação com os teores encontrados nas folhas das laranjeiras sadias.

Os resultados indicaram que, dependendo dos estádios de desenvolvimento das plantas, pode ocorrer uma maior ou menor demanda por determinados compostos como açúcares, minerais entre outros. Pode-se também inferir que a infecção provocada pela *Xylella fastidiosa* limitou o metabolismo de açúcares como também reduziu as taxas de fotossíntese durante o desenvolvimento do processo reprodutivo.

FLOWERING AND FRUCTIFICATION OF ORANGE TREES 'PÊRA' (*CITRUS SINENSIS* L. OSBECK) WITH CITRUS VARIEGATED CHLOROSIS (CVC).

SUMMARY

Citrus farming in Brazil frequently faces periods of tranquillity as well as of turbulence, without, however, being discontinued. One of the main causes for such turbulence is the incidence of diseases such as Citrus Variegated Chlorosis (CVC), which, despite the great advances in disease know-how, is still responsible for considerable losses in citrus farms. A type of bacteria called *Xylella fastidiosa* that usually colonizes xylem vessels causes CVC and induces serious disturbances to the development of orange trees.

Its goal was to evaluate alterations in carbohydrate levels, gas exchanges and mineral levels caused by CVC during floral induction, (first period), and flowering and fructification, (second period), in sweet orange trees. The experiment was carried out under natural conditions with sweet orange trees, (*Citrus sinensis* L. Osbeck), that had been grafted onto Rangpur lime trees (*Citrus limonia* Osbeck), planted in trough and inoculated with *X. fastidiosa* through grafting with sick plants.

During floral induction, a gradual decrease in total foliar sugar concentration was detected as the plants came to the end of the process, caused mainly by decreasing saccharose concentration levels. There was a clear evidence that sugars, mainly saccharose, are essential to the process of floral induction, and that they are highly demanded in July, when there was the highest meristem activity, close to the differentiation stage of the reproductive or vegetative organs.

Decrease in the sugar concentration levels did not occur continuously in the branches during floral induction. Results indicated that branches take a less active role in carbohydrate export during bud development in the floral induction period.

During the flowering period, the demand for carbohydrates reached its peak in August, when the lowest sugar concentration levels were detected, both on healthy and diseased leaves. The branches, on the other hand, presented the lowest sugar concentrations at the starting flowering period as well as in the beginning of fructification. The only exception observed was the level of starch, which appeared to be relatively not mobile during flowering and fructification periods.

Decreased sugar concentration in the roots, mainly in the beginning of the flowering period, was probably caused by high demand for carbohydrates in the aerial part for the production of flowers and fruits.

The presence of bacteria in orange tree limited the flow of carbohydrates for the bud development, since sugar concentrations in the leaves, branches and roots were generally higher in the sick plants than in the healthy ones. This was probably due to the fact that healthy plants did not restrict carbohydrate flow to the parallel development of vegetative or reproductive structures. Despite the sick plants presented higher sugar concentration during floral induction, it was found that the vegetative branch production was much lower than the one observed in the healthy plants. From the data obtained in this study, it can be inferred that flower production is greatly affected by vegetative sprout development since their growth demands a great deal of carbohydrates.

At the end of floral induction, in July, photosynthesis rates increased for both the healthy and unhealthy plants. This increase was possibly due to a greater demand for carbohydrates for the completion of bud development and latter flower development. After the plants reached their maximum rate of photosynthesis in the following month (August), right

after the floral induction period when the plants were still developing flowers, a drop in the rate of photosynthesis occurred, and similar rates were found in the following month. The data showed that a greater demand for photoassimilates occurred only during the transition phase from floral induction to flowering, consequently bringing about a need for the plants to increase photosynthetic rates.

It was observed throughout the entire flowering and fructification period under evaluation, that CVC significantly and gradually reduced photosynthetic rates, transpiration, and stomata conductance, since the photosynthetic rates presented by healthy plants were all higher than those observed in plants affected by Citrus Variegated Chlorosis.

As far as the development of reproductive organs, plants with CVC presented higher production of floral organs and fruits than the healthy ones, and, perhaps due to the limited flow of carbohydrates mentioned previously, a drastic reduction in the production of vegetative branches was also observed.

In general terms, CVC caused alteration on mineral levels in either old or new leaves; despite the lower levels detected in some of the diseased plants, they were still in the range considered hurtful for plant development.

The results showed that depending on which stage of development a plant is in, there may be a greater or lesser demand for certain compounds such as sugars, minerals or others. It can also be inferred, based on the results of this study, that the incidence of *Xylella fastidiosa* limits the metabolism of sugars besides maximizing photosynthetic rates during the reproductive process.

1. INTRODUÇÃO

Com provável origem no sudeste asiático, compreendendo desde o leste da Arábia até as Filipinas e do sul do Himalaia até a Indonésia ou Austrália, o gênero *Citrus* tem sido cultivado e seus frutos apreciados por mais de 4000 anos (Davies & Albrigo, 1994).

O Brasil é considerado o maior produtor de laranja e de suco de laranja concentrado do mundo. O Estado de São Paulo com uma área de aproximadamente 740 mil hectares cultivada com citros é o maior produtor brasileiro de laranja (Amaro *et al.*, 1998, Abecitrus, 2003).

O avanço tecnológico atual e a crescente demanda por produtos de qualidade feita pelo mercado consumidor, exigem do setor agrícola o entendimento dos fatores limitantes do processo produtivo e a atualização das técnicas empregadas. As doenças representam uma enorme limitação ao meio de produção de alimentos, podendo afetar os ganhos e até mesmo propiciar mudanças radicais no sistema produtivo (Habermann, 1999).

Várias regiões do Brasil vêm sendo ameaçadas por uma doença denominada de Clorose Variegada de Citros (CVC), que possui como agente etiológico a bactéria *Xylella fastidiosa* (Habermann, 1999). O ataque da bactéria pode causar várias conseqüências no desenvolvimento de plantas de citros, podendo interferir em diversos processos fisiológicos como transporte de água e nutrientes para parte aérea, fotossíntese, biossíntese de compostos entre outros (Machado *et al.*, 1994; Gomes, 2001; Medina, 2002).

A Clorose Variegada dos Citros (CVC) foi reconhecida no Brasil em 1987, afetando todas as variedades comerciais de laranja doce. As plantas apresentam áreas cloróticas na face superior das folhas mais velhas que, com o tempo, podem evoluir para lesões marrons. Os frutos também são afetados perdendo seu valor comercial devido à redução no tamanho.

Os sintomas e o grau de severidade do ataque da *X. fastidiosa* parecem estar, freqüentemente, relacionados com o grau de colonização dos vasos do xilema. Existem vários estudos mostrando que a condutividade dos vasos do xilema em plantas afetadas pela doença é menor em relação às plantas sadias (Hopkins, 1989). A localização da bactéria pode causar às plantas sérios problemas no fluxo de água e conseqüentemente no transporte de outros componentes necessários ao seu metabolismo. Foi constatado em vários trabalhos, que o aparecimento de sintomas de déficit hídrico é um dos fenômenos mais freqüentes em plantas atacadas com CVC (Machado *et al.*, 1994; Gomes, 2001; Medina, 2002).

Medina (2002), relata em seu trabalho que a taxa de assimilação de CO₂, a transpiração e a condutância estomática foram significativamente alteradas, sofrendo quedas relacionadas com a alteração das relações hídricas nas plantas com CVC. Tais resultados indicaram que o hábito da bactéria de colonizar o xilema causa desbalanço hídrico sendo o principal fator da patogenicidade da *X. fastidiosa*.

Gomes (2001) verificou que a fotossíntese nas plantas infectadas há dois anos e dois meses com a *X. fastidiosa* foi menor que nas plantas sadias, a partir do momento do dia em que a temperatura, radiação e déficit de pressão vapor entre o ar e a folha aumentaram.

A composição de açúcares solúveis em folhas de laranjeira 'Pêra' com CVC não foram afetadas até os nove meses após a infecção com *X. fastidiosa* (Medina, 2002). Gomes (2001), trabalhando com irrigação e infecção da bactéria *X. fastidiosa* em plantas de laranjeiras 'Pêra', verificou que após dois anos de infecção pela bactéria, as concentrações de amido nas folhas das plantas doentes foram mais baixas que nas plantas sadias, independentemente da aplicação da deficiência hídrica.

De acordo com as análises de vários trabalhos, pode-se conjecturar que o ataque da CVC pode afetar outros processos fisiológicos, entre eles a produção de ramos vegetativos, o florescimento e a frutificação. A regulação hormonal de eventos morfogênicos na planta é um

outro fenômeno que pode ser alterado pelo ataque da *X. fastidiosa* principalmente quando este mecanismo está diretamente relacionado com a ontogenia das plantas (Mircetich *et al.*, 1976; Donadio & Moreira, 1997; Gomes, 2001).

O crescimento vegetativo ou o florescimento a partir de gemas axilares "in situ" é regulado pelas interações entre órgãos que "in vitro" podem ser substituídas por hormônios. Em *Scrofularia arguta* (planta de dias longos) e *Chenopodium poluspermum* (plantas de dias curtos), o desenvolvimento reprodutivo de gemas axilares foi controlado pela parte aérea e pela raiz. O efeito inibitório das raízes na formação de flores nessas plantas pode ser simulado pela aplicação de citocininas. Já, a formação de flores no ápice terminal pode ser reproduzida pela aplicação de auxina e ácido abscísico. Em orquídea, uma planta de dia neutro, foi observada uma correlação entre o efeito inibidor do ácido 3-indol-acético (AIA), sobre o florescimento, onde a decapitação do ápice da parte aérea resultou em florescimento das gemas axilares. Segundo Zeevaart (1976) o AIA pode substituir o efeito inibitório do ápice da parte aérea, vários trabalhos mostraram o envolvimento dos hormônios de plantas (IAA, ABA, GAs) na formação de folhas e flores de laranjeiras (Kojima *et al.*, 1994; Kojima, 1996; Kojima *et al.*, 1996; Koshita *et al.*, 1999).

O balanço interno dos reguladores de crescimento nas plantas pode ser influenciado por vários fatores entre os quais: estágio de desenvolvimento dos órgãos, temperatura, estresses, nutrição, entre outros. A integração de atividades da raiz e da parte aérea é complexa e esta pode envolver o movimento de hormônios entre as duas estruturas. Estresses como seca, alagamento, salinidade ou impedimento mecânico nas raízes e caules, muitas vezes têm efeitos drásticos na parte aérea. Em muitos casos, pode-se verificar o fechamento estomático, curvatura epinástica dos pecíolos ou redução no crescimento da parte aérea (Monselise & Goren, 1978; Elt-Otmani *et al.*, 1995; Hoad, 1995).

As presenças de determinadas concentrações de fitorreguladores, carboidratos, proteínas e elementos minerais em certas regiões das plantas, são fundamentais para o desenvolvimento de vários órgãos da parte aérea (folhas, flores e frutos), como também para a raiz. Em citros, por exemplo, tanto a deficiência hídrica como a interrupção do fluxo de seiva nos vasos condutores, alteram significativamente seu desenvolvimento floral, podendo-se verificar alterações tanto no desenvolvimento e pegamento, como no abortamento de flores e frutos (Agusti *et al.*, 1992).

Durante o crescimento das laranjeiras, as concentrações foliares de macronutriente e micronutrientes passam por alterações que são influenciadas por vários fatores como condições de absorção, estádios fitossanitários das plantas, fases do ciclo de desenvolvimento das laranjeiras, entre outros (Sale, 1998, Paramavisaan *et al.*, 2000). Segundo Reddy *et al.*, (1991) a composição química das folhas de laranjeiras (*Citrus sinensis*) com idade entre 10 e 15 anos apresentaram variações das concentrações com reduções dos teores de N, P, K, Mg, Mn, Zn e Cu ao longo do florescimento e frutificação. Esse mesmo autor verificou que no mesmo período os teores de Ca mantiveram-se constantes.

A transição para o florescimento é uma alteração decisiva no ciclo de vida de uma planta. Em muitas espécies, ela marca o final do crescimento vegetativo e o início do reprodutivo. Em plantas perenes, o desenvolvimento reprodutivo ocorre em certas regiões da planta enquanto o crescimento vegetativo continua. O conhecimento da transição do estágio vegetativo para o florescimento e suas interações com os fatores que regulam este evento são de fundamental importância para que se possa obter bons resultados com relação ao desenvolvimento dos frutos, obtendo-se desta forma aumentos na produção.

Considerando-se que a floração e o desenvolvimento do fruto constituem processos cruciais na determinação e na qualidade da colheita, acredita-se que estudos sobre efeitos de qualquer tipo de estresse sobre o florescimento e frutificação de plantas, como por exemplo, os

causados pela infecção da *X. fastidiosa* em plantas de citros, sejam importantes, não só para obtenção de novos conhecimentos, como também para controle e obtenção de uma produção de excelente qualidade.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CARACTERIZAÇÃO DA CLOROSE VARIEGADA DE CITROS (CVC)

A citricultura brasileira vem sofrendo nos últimos anos a ação da CVC, conhecida popularmente como amarelinho. Estima-se que 36% das laranjeiras do Estado de São Paulo apresentem sintomas desta doença (Salva *et al.*, 1995, Fundecitrus, 2003). A CVC é uma doença que foi observada primeiramente em pomares cítricos do triângulo mineiro e nas regiões Norte e Nordeste do Estado de São Paulo, onde sua disseminação ocorreu rapidamente (Júnior & Leite, 1991; Rossetti, 1991). Em 1991, determinou-se que o agente etiológico da CVC é a bactéria *X. fastidiosa*. Durante o período de infecção a bactéria encontra-se limitada ao xilema de plantas, podendo atacar várias espécies vegetais, causando vários danos em seus hospedeiros, como é o caso do mal-de-pierce em videira (Gohen *et al.*, 1973), escaldadura das folhas em ameixeira (Hopkins, 1989), escaldadura das folhas em amendoeira (Mircetich *et al.*, 1976). Sua presença em cafeeiro foi primeiramente registrada por Paradela Filho *et al.*, (1995,1997).

De acordo com alguns pesquisadores, a ocorrência da CVC pode causar inicialmente distúrbios no fluxo de água no xilema em ramos de laranjeiras e em outras espécies, como pessegueiro (Aldrich, 1992). Foi verificado em laranjeiras que a queda na assimilação de CO₂ está associada ao fechamento estomático. Este fechamento pode ser provocado por vários fatores, entre eles, o estresse hídrico, a presença de toxina e pela regulação hormonal (Andersen & French, 1987; Goodwiin *et al.*, 1988a,b; Hopkins, 1989; Machado, 1997).

Em citros, a bactéria afeta as plantas causando vários sintomas como clorose nas folhas, inicialmente na parte mediana e superior da copa, tomando depois toda a planta. A queda da taxa fotossintética em plantas afetadas pela CVC pode estar relacionada,

parcialmente, com a presença de necroses e cloroses nas folhas mais velhas, o que provoca uma diminuição de sua área ativa. Com relação aos estudos das estruturas anatômicas dos tecidos de plantas cítricas com sintomas de CVC, foi observada na região do mesofilo uma redução do número de cloroplastos, associada a uma maior concentração de cristais de hesperedina, estando os cloroplastos, nas regiões cloróticas, quase que totalmente destruídos. Também foi verificado que ocorreram divisões celulares anormais no parênquima lacunoso do mesofilo, resultando em células com espessamento de lignina e espaços intercelulares reduzidos ou ausentes; essas áreas correspondiam exatamente às “bolhas de goma” na face abaxial e às áreas cloróticas na face superior das folhas sintomática (Queiroz-Voltan & Paradela Filho, 1997).

Folhas com CVC podem apresentar sintomas de deficiências nutricionais, principalmente de zinco, boro e potássio. Plantas infectadas com CVC e plantas com deficiências nutricionais apresentam similaridade de sintomas, principalmente de magnésio e de zinco e, é importante destacar que os sintomas ocorrem principalmente nas regiões entre as nervuras das folhas (Malavolta *et al.*, 1993).

Em plantas com CVC, os frutos apresentam um amarelecimento precoce, em geral, são endurecidos e apresentam tamanhos reduzidos. A intensidade do amarelecimento dos frutos pode resultar posteriormente em lesões pardas que podem atingir até a metade dos mesmos. Ocasionalmente, os frutos podem apresentar gomas pardacentas no albedo e nos gomos (De Negri, 1990; Malavolta *et al.*, 1993; Rossetti & De Negri, 1990; Donadio *et al.*, 1997).

Plantas severamente afetadas pela CVC apresentam aspectos de debilidade geral, torna-se comum a ocorrência de redução do crescimento da planta, bem como desfolha e morte dos ramos ponteiros. Em algumas partes da planta, há um maior vigor e frequência de brotamentos das gemas em relação às plantas saudáveis, o que causa um maior definhamento da planta (Laranjeiras, 1997)

2.2. O FLORESCIMENTO EM LARANJEIRAS

De modo geral, a região citrícola do Estado de São Paulo se situa principalmente na região norte do Estado, sendo que as maiores concentrações de pomares encontram-se nas regiões de Bebedouro e São José do Rio Preto. Nestas regiões, o clima é classificado na categoria C e principalmente do sub-tipo Cwa (clima subtropical), que apresenta inverno curto, ameno e seco, com verão quente e chuvoso, apresentando estações distintas (Di Giorgi, 1991).

As plantas de citros apresentam, normalmente, de dois a cinco surtos de crescimento anuais. Estes surtos dependem da espécie e de fatores climáticos, podendo durar até 41 dias, aproximadamente (Guardiola, 1977; Figueiredo, 1980). O início do surto crescimento torna-se visível quando os meristemas das gemas localizadas nas brotações terminais entram em processo de diferenciação. Todavia, não há referência quanto ao tempo necessário entre o início da diferenciação e o aparecimento de novo surto. Variações tanto na fisiologia como na morfologia, tornam-se visíveis após a ocorrência da diferenciação celular (Erickson, 1968; Amaral, 1977).

As plantas cítricas, nas condições de clima subtropical, encontradas no Estado de São Paulo, começam a se preparar para o florescimento entre os meses de junho a agosto, quando o clima é seco e frio. No entanto, devido à insensibilidade ao fotoperíodo, a variação do regime pluviométrica e da temperatura pode propiciar a ocorrência de novas floradas. Assim, pode-se induzir um manejo adequado de plantas e obter colheitas diferenciadas (Moss, 1971; Moss, 1976; Di Giorgi, 1991).

O florescimento em citros só ocorre em ramos devidamente preparados, isso que dizer: ter uma idade ou um desenvolvimento que permitam as mudanças internas. Os ramos que nascem de fevereiro a abril estão preparados para produzir flores na primavera, enquanto que os ramos de outubro produzem flores de fevereiro a abril e os de dezembro em maio. Plantas

com carga excessiva de frutos podem não produzir ramos vegetativos e não ter produção de flores, ou então, se produzirem, provavelmente terão uma redução no número de flores (Guardiola, 1982; Souza, 1979).

Os primeiros estímulos para a indução floral começam, segundo Lima (1990), dos 80 aos 120 dias antes do florescimento, através de mensageiros químicos provenientes das folhas. No Hemisfério Norte, a indução floral atinge seu pico de dezembro ao início de janeiro. Logo, para o Hemisfério Sul corresponde ao final de julho e início de agosto (Guardiola *et al.*, 1982 citado por Habermann, 1999).

As espécies de citros são de dia neutro, isto quer dizer, que para as plantas entrarem em processo de florescimento, não dependem da variação do comprimento do dia. O controle deste fenômeno fica a cargo, principalmente, das concentrações de fitorreguladores destacando-se a maior influência das giberelinas endógenas, da temperatura e das condições hídricas do solo e da planta (Bernier, 1988; Salisbury & Ross, 1991; Agustí, 2000). Estes fatores são responsáveis pelo desencadeamento de várias reações metabólicas na planta. Estas reações estão diretamente relacionadas com o balanço de carboidratos e nitrogênio, que são compostos utilizados como substratos para a síntese de várias substâncias como aminoácidos, ácidos graxos, proteínas, celulose, entre outras (Goldschmidt & Monselise, 1972; Hopkins, 1989; Taiz & Zaiger, 1998).

Temperaturas de 27 °C/13 °C dia/noite, de acordo com as considerações feitas sobre a indução do florescimento em citros, induzem à formação de um grande número de flores. Estas variações de temperatura normalmente ocorrem no inverno, período seco e de frio, condições ideais para a indução floral. O florescimento no verão pode ser induzido por temperaturas baixas, entretanto, em climas tropicais, o estresse por baixas temperaturas pode ser substituído por condição de déficit hídrico, ou seja, seca (Moss, 1976). Em cultivares de laranja doce como Valência, tem-se reportado que para ocorrer o desenvolvimento floral há

necessidade de temperaturas noturnas abaixo de 20 °C. Quanto menor for a temperatura mínima, menor será o tempo necessário para que ocorra o início do florescimento (Lomas & Burd, 1983; Di Giorgi, 1991).

Alterações sazonais e diárias da temperatura do solo e do ar pode interferir consideravelmente no crescimento de laranjeiras. Alguns estudos têm mostrado que o efeito da temperatura do solo no desenvolvimento floral de planta de Citros pode interagir com efeitos das oscilações da temperatura do ar determinando uma maior ou menor produção de órgãos florais (Khairi & Hall, 1976; Hall, et al., 1977).

De acordo com Guardiola *et al.* (1977), as brotações cítricas podem ser classificadas conforme os números de folhas e flores contidos nos diversos tipos brotos: os vegetativos (só com folhas), generativos uniflorais (com uma flor e sem folhas), generativos multiflorais (com várias flores e sem folhas), mistos uniflorais (com uma flor e várias folhas) e os brotos mistos multiflorais (com várias flores e várias folhas).

As inflorescências com folhas têm pegamento entre quatro a seis vezes maior, em relação às inflorescências que não têm folhas. A contribuição das folhas deve-se, provavelmente, a fatores hormonais e nutricionais. Em inflorescências com folhas o conteúdo endógeno de giberelinas foi maior em comparação com àquelas que não possuíam folhas. Quanto a citocinina, foi encontrada uma maior concentração deste fitorregulador nos frutos provenientes de brotos mistos (Lens, 1966; Monselise *et al.*, 1981; Saidha *et al.*, 1985).

As plantas adultas de citros podem produzir em cada floração de 25.000 a 250.000 flores por planta, todavia, apenas de 0,1 a 3,5 % das flores tornam-se frutos (Monselise, 1986). A época de maturação dos frutos coincide com a dormência das gemas até a floração, podendo coexistirem, numa mesma planta, frutos e flores (Villafane *et al.*, 1989). Entretanto, a presença de frutos na planta é um forte inibidor do florescimento em citros, equivalendo-se ao efeito da aplicação de um fitorregulador inibidor de florescimento (Erner, 1992).

A aplicação de giberelina durante a diferenciação floral foi capaz de inibir consideravelmente o florescimento de laranjeiras e de limoeiros na primavera. De acordo com Garcia-Luiz *et al.* (1996) a sensibilidade a giberelinas apresentada pelas laranjeiras, limoeiros ou tangerinas é muito maior no início do inverno. Alguns pesquisadores verificaram que os picos de respostas à aplicação de giberelinas ocorrem nos meses de outono e no primeiro mês do inverno e que aplicações posteriores são pouco eficientes para inibir ou reduzir o florescimento (Monselise & Halevy, 1964; Lord & Eckard, 1987; Garcia-Luiz *et al.*, 1996).

Como em muitas árvores frutíferas, o florescimento em citros é inibido pelo aumento da concentração do ácido giberélico em determinadas partes da planta. Este aumento de concentração pode ser proveniente de duas vias: da biossíntese da própria planta ou da aplicação exógena. A prática de aplicação exógena é usualmente utilizada como forma de regular o florescimento, como é o caso, de aplicações feitas em pomares de laranja doce (Guardiola *et al.*, 1982; Davenport, 1983; Sagee & Erner, 1991; Ogata *et al.*, 1995).

A elevação da biossíntese de açúcares, o armazenamento e o fluxo de assimilados podem promover uma maior floração e frutificação devido a uma maior taxa de fixação desses órgãos na planta. Os mecanismos de síntese e consumo de fotoassimilados têm explicado a regulação da fotossíntese e sua correlação com a produção alternada. É esperado que plantas com alta produção tenham, no ano seguinte, poucas reservas para se obter uma boa produção comparada à anterior (Kalil *et al.*, 1999).

Os meristemas em condições vegetativas são pobres em nutrientes e para que ocorra sua diferenciação e posterior formação de flores é necessário que se tenha uma elevação na absorção e concentração destes nutrientes dentro da célula, o que é possível com aplicação de algumas técnicas como estresse hídrico, anelamento de troncos e ramos. O estrangulamento do tronco em plantas de citros causou um aumento da massa seca no caule e na folha também foi

verificado um relativo aumento no número de flores em espécies de plantas de ‘Satsuma mandarina’ e ‘Pomelo’ (Yamanishi, 1994).

A interrupção do movimento basípeto de fotoassimilados em citros é largamente dependente do tempo, duração e grau de estrangulamento. O anelamento realizado antes da diferenciação da gema induz o florescimento, enquanto que o estrangulamento do tronco antes do florescimento promove a paternocarpia do fruto. Muitos trabalhos mostraram o efeito positivo do anelamento no aumento, maturação e qualidade dos frutos. Por outro lado, ocorre uma significativa redução do crescimento da parte aérea, da absorção de água pela planta, da transpiração e da razão fotossintética das folhas (Yamanishi, 1995; Yamanishi *et al.*, 1995; Yamanishi & Hasegawa, 1995).

Em plantas de *Sinapis alba* foi verificado que o aumento da concentração de sacarose nos meristemas se dá antes de qualquer alteração morfológica. Este aumento consiste num pré-requisito necessário para que ocorra um aumento do potencial osmótico para o posterior alongamento celular, além de suprir de substratos as mitocôndrias, que são responsáveis diretamente pelo fornecimento de ATP para células com elevada atividade metabólica. Assim, os mecanismos de hidrólise do amido são importantes como determinantes da eficiência respiratória na indução floral (Bodson & Outlaw, 1985; Lejeune *et al.*, 1993).

A inibição do florescimento pode ocorrer devido à maior drenagem de carboidratos para fruto, ou então, por meio da produção do ácido giberélico (GA₃) pelo mesmo, podendo acarretar um atraso no desenvolvimento floral. No Hemisfério Sul o florescimento em plantas de laranjeiras sem frutos, ocorre normalmente no final de julho e início de agosto, todavia, nas plantas de laranjeiras com frutos o florescimento só ocorre no final de agosto e início de setembro. Quanto mais cedo os frutos forem removidos, maior será a floração no ciclo seguinte. Atribui-se como efeito inibidor da floração, bem mais a produção de hormônios

inibidores do que a drenagem de fotoassimilados, uma vez que esta inibição é bem maior em períodos nos quais o fruto não acumula mais carboidratos (Garcia-Luiz *et al.*, 1986).

Plantas com ramos que exibem uma grande produção de frutos terão uma redução no teor de carboidratos, hormônios e balanço mineral no ano seguinte, podendo apresentar, na próxima florada, pouca conversão de flor em frutos ou então, nestes mesmos ramos pode não ocorrer florescimento (Erner, 1992; Marinho, 1994).

A terceira e última fase determinante da produção é a do desenvolvimento dos frutos, que é caracterizada por intensa expansão celular e alta taxa respiratória. No Hemisfério Norte, esta fase se dá entre dezembro e agosto, que corresponde em nossas condições de agosto a janeiro (Di Giorgi, 1991). Durante o período de desenvolvimento dos frutos existe uma fase crítica no índice de fixação dos frutos que é bastante influenciada pelas condições do ambiente. No Hemisfério Norte esta fase é conhecida como queda de junho ou "June Drop" e corresponde a um período de intensa queda de frutos, nos meses de maio a julho, quando os frutos atingem um diâmetro entre 10 a 25 mm. A queda está associada principalmente a temperaturas elevadas e à deficiência hídrica (Reuther, 1973). Em nossas condições este período estende-se da segunda quinzena de outubro até ao início de dezembro (Di Giorgi, 1991).

A produção de uma planta está intimamente ligada à quantidade de água, nutrientes, temperatura e de energia disponível durante o período de crescimento. Em citros, estes fatores influenciam diretamente a produção de brotos vegetativos, flores e frutos um vez que, durante os estádios de crescimento algumas alterações dos fatores ambientais como água, temperatura e luz são fundamentais para que ocorram as distintas fases de crescimento das plantas, como por exemplo, o processo reprodutivo. Em plantas de limão 'Eureca' quando o suprimento de água foi mantido constante e na capacidade de campo, com luz e temperatura adequadas, as plantas não floresceram (Nir *et al.*, 1972; Khatibu *et al.*, 1985; Jordan, 1993; Agusti, 2003).

A avaliação do estado nutricional das plantas durante seu ciclo de vida é de extrema importância pois, de acordo com alguns trabalhos, essas alterações ocorrem tanto durante as fases de crescimento das plantas como nos períodos correspondentes às etapas de crescimento dos órgãos como folhas, flores, fruto, entre outros (Singh *et al.*, 1997; El-Sayed & Shaaban, 1999; Storey & Treeby, 2002). Sema *et al.*, (1999), verificou alterações no fluxo de Fe, Zn e Mn à medida que as folhas tornavam-se mais velhas. Os teores de ferro diminuíram enquanto que as concentrações de zinco e manganês aumentaram com a elevação da idade foliar.

Assim, o esclarecimento dos mecanismos que interferem no processo reprodutivo das plantas de laranjeiras, como por exemplo, a possível interferência da clorose variegada dos citros sobre o florescimento e frutificação de laranjeiras pode fornecer subsídios importantes para que se obtenha uma substancial melhoria no cultivo e na produção de laranjas no Brasil.

3. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da infecção causada pela *Xylella fastidiosa* sobre a formação e desenvolvimento dos órgãos reprodutivos em laranjeiras ‘Pêra’ e suas correlações com as trocas gasosas, metabolismo dos carboidratos, fitorreguladores e minerais durante os períodos de indução floral, floração e frutificação.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. LOCALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO

O experimento foi realizado no Núcleo Experimental de Campinas (NEC) do Instituto Agronômico de Campinas, localizado no município de Campinas, Estado de São Paulo, apresentando as seguintes coordenadas, latitude 22 24' Sul, longitude 44 05' Oeste e altitude de 674 metros. As plantas foram mantidas durante todo o experimento em casa de vegetação com o objetivo de evitar a circulação e ataque de cigarrinhas, insetos transmissores da bactéria *Xylella fastidiosa*.

4.2. CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO

Mudas de laranjeiras 'Pêra' [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] com um ano de idade, enxertadas sobre limoeiro 'Cravo' (*Citrus limonia* Osbeck), foram transplantadas para vasos de 25 L contendo uma mistura de terra e matéria orgânica, ficando nestes recipientes pelo período de dois anos. Após este período, as plantas foram transplantadas para canteiros de 0,5 m de largura, 2,0 m de comprimento e 0,6 m de altura (Apêndice 1), contendo uma mistura de terra e adubo orgânico.

Das quatorze plantas utilizadas, sete foram inoculadas com a bactéria. A inoculação da bactéria *X. fastidiosa* foi feita pelo método da encostia de ramos de mudas de laranjeiras infectadas em ramos de plantas sadias (Medina *et al.*, 1998). Foi realizada a análise de PCR (Cadeia de Reação de Polimerase) (Bereta *et al.*, 1997), na qual se verificou o estabelecimento da bactéria nas plantas. De acordo com a análise de solo (Apêndice 2 e 3), realizada após o preenchimento dos canteiros com terra e adubo e antes do plantio das laranjeiras na casa de

vegetação, constatou-se a necessidade de aplicação de sulfato de magnésio na quantidade de 100 g no canteiro 3 e nos demais foram aplicados 50 g (Apêndice 1).

Durante o período de fevereiro a outubro, as plantas foram adubadas, com aplicações via no solo de ácido bórico (H_3BO_3) 0,225 g/10 L por planta e nitrato de cálcio [$Ca(NO_3)_2$] 100 g por planta. A aplicação de sulfato de zinco e manganês foi feita através de pulverização das plantas, nas concentrações respectivas dos micronutrientes de 50 g/20 L.

Antes dos períodos de indução floral, floração e frutificação foram feitas aplicações dos inseticidas suparacid (400 CE), vertimec (18 CE), ridomil gold MZ, aliect, ethion e assist nas concentrações especificadas em bula (20 litros de solução de cada inseticida em cada aplicação).

Em cada planta foram escolhidos, aleatoriamente, quatro ramos com diâmetros semelhantes de $1,8 \pm 2$ cm, correspondentes aos pontos cardeais (Norte, Sul, Leste e Oeste), onde foram feitas as análises quantitativas referentes à produção de órgãos florais e vegetativos; determinação das trocas gasosas, dos teores de minerais e açúcares. Os ramos selecionados apresentaram características plenas com relação a sua competência para realização dos processos de florescimento e frutificação, ou seja, ramos com um período de crescimento e desenvolvimento com cerca de cinco meses de idade.

4.3. QUANTIFICAÇÃO DAS FLORES, BOTÕES FLORAIS E BROTOS VEGETATIVOS

Nos ramos selecionados em cada planta, durante o período de maio a outubro, foram quantificadas as produções de botões florais, de flores, de inflorescências, frutos e de ramos vegetativos.

As quantificações dos órgãos florais foram feitas por amostragens em que, foram selecionados quatro ramos em cada planta, localizados nas regiões norte, sul, leste e oeste. O critério para uniformização dos ramos foi estabelecido com relação ao diâmetro, selecionado um ramo em cada região ramos com 2,0 cm de diâmetro.

As quantificações dos botões florais foram feitas a partir do momento em que estes atingiram o comprimento de $0,4 \pm 0,1$ cm. As flores foram quantificadas após a antese e o número de inflorescências foi determinado quando as mesmas apresentavam no mínimo duas flores com ou sem folhas. Para a quantificação dos frutos, estabeleceu-se o parâmetro de comprimento inicial de 0,3 cm de comprimento e 0,3 cm de diâmetro. Na determinação do número de ramos vegetativos foram utilizados ramos com folhas nos primeiros estádios de desenvolvimento (primórdios foliares).

4.4. DETERMINAÇÃO DAS TROCAS GASOSAS

Para a realização das medidas das trocas gasosas, foram sorteadas ao acaso cinco plantas de cada tratamento. Em cada planta foram selecionadas três folhas, em ramo localizado na região norte da planta. As folhas escolhidas apresentaram características bem uniformes quanto à cor, idade e tamanho. As medidas foram feitas durante três dias, em cada mês, com céu aberto, de hora em hora, no intervalo das 9:00 às 15:00 horas.

Durante os meses de maio a outubro, foram feitas as medidas de temperatura da superfície foliar (T_f), radiação fotossinteticamente ativa (**RFA**), taxa de assimilação líquida de CO_2 (**A**), taxa de transpiração (**E**), concentração interna de CO_2 (**Ci**) e condutância estomática (**g_s**) nas folhas dos ramos previamente selecionados. Para a determinação destas medidas foi utilizado um analisador portátil de fotossíntese por radiação infravermelha (Infra Red Gas Analyser, Li 6400, Licor).

4.5. QUANTIFICAÇÃO DE CARBOIDRATOS EM FOLHAS, RAMOS E RAÍZES.

As coletas dos materiais vegetais foram feitas nos dias 15 e 30 de cada mês. Tanto para as coletas das folhas como para os ramos e raízes foram selecionadas as regiões correspondentes aos pontos cardeais.

Em cada ramo, localizados nas regiões Norte, Sul, Leste e Oeste foi coletada uma folha, em um total de quatro por planta. As coletas foram feitas após as 15:00 horas. As folhas das plantas sadias foram uniformizadas quanto à cor verde escuro, comprimento em torno de $\pm 10,0$ cm e largura de $\pm 8,0$ cm, posicionadas na região próxima ao ápice do ramo. Nas plantas doentes, as folhas foram padronizadas de acordo com a severidade da doença e as selecionadas foram aquelas que apresentavam um comprimento de $\pm 8,0$ cm, largura em torno de 6,0 cm e escala diagramática da severidade da CVC, que variou entre 15 e 25 %. Escala utilizada foi a estabelecida por Amorim *et al.* (1993). Após a coleta as folhas foram imersas em nitrogênio líquido e depois colocadas em estufa a 60 °C, durante 96 horas.

Para a coleta dos ramos foi escolhida a região norte, retirando-se um por planta e por coleta. Cada ramo tinha um diâmetro de 0,3 a 0,5 cm. Durante cada coleta os ramos foram imediatamente imersos em nitrogênio líquido e colocados em estufa a 60 °C durante 120 horas.

Nas mesmas plantas utilizadas para obtenções das amostras foliares e de ramos foram coletadas raízes com diâmetros de 0,3 a 0,5 cm, localizadas na região norte do sistema radicular. Durante cada coleta as raízes foram lavadas, mergulhadas em nitrogênio e colocadas em estufa a 60 °C durante 120 horas.

Após a secagem do material vegetal (folhas, ramos e raízes), processou-se a moagem, conservando-se, posteriormente, o material moído em frascos de vidro hermeticamente fechado até a realização das análises de carboidratos.

As determinações dos teores dos açúcares foram realizadas de acordo com métodos aplicados nos trabalhos de Nelson (1944) e Somogy (1952). A preparação dos reagentes utilizados na determinação dos carboidratos foi feita da seguinte forma:

Na preparação do reagente A foram dissolvidos 25,0 g de carbonato de sódio anidro (NaCO_3), 3,4 g de tartarato de sódio e potássio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), 20 g de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) e 200 g de sulfato de sódio (NaSO_4) em 1,0 L de água destilada.

Para a produção do reagente B foram dissolvidos 15 g de sulfato de cobre pentaidradato ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) em 100 mL de água destilada, adicionado-se 2 gotas de ácido sulfúrico (H_2SO_4), antes de completar o volume.

Para obtenção do reagente C foram dissolvidos 25 mg de molibdato de amônio [$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot \text{H}_2\text{O}$] em 450 mL de água destilada e adicionados 21 mL de ácido sulfúrico concentrado e 3 g de arseniato de sódio ($\text{Na}_3\text{HSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), que foram previamente diluídos em 21 mL de água destilada. Em seguida, foi promovida a homogeneização e a solução foi guardada em frasco escuro durante 48 horas, a 37 °C antes de utilizá-la.

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

Para o processo de extração dos açúcares foram pesados 75 mg de massa seca moída de cada tecido e colocados em 5 mL de etanol 80%, deixando o material em banho-maria a 75 °C, durante 20 minutos. Em seguida, o extrato foi centrifugado a 7.000 rpm, durante 10 minutos, obtendo-se o primeiro sobrenadante que foi colocado num béquer de 250 mL. Cinco mL de etanol 80% foram adicionados ao precipitado, repetindo-se a operação anterior de extração e obtendo-se o segundo sobrenadante. Para quantificação dos açúcares solúveis, os

sobrenadantes foram misturados e levados para evaporação em banho-maria a 75 °C. Os precipitados que permaneceram nos tubos de centrífuga foram guardados, para posterior dosagem de amido.

A determinação dos açúcares redutores foi realizada após a evaporação do sobrenadante onde foi colocada água destilada no béquer para dissolver os açúcares fixados nas suas paredes e, em seguida, o volume foi completado para 12,5 ml. Depois, foi retirado 1,25 mL da solução anterior e completado o volume para 2,5 mL com água destilada. Dos 2,5 mL, foi retirado 0,25 mL e adicionado 0,25 mL de reagente A + B de Nelson. Esta mistura foi fervida por 20 minutos e depois resfriada rapidamente em banho de gelo. Logo após, a adição de 0,25 mL do reagente e C a mistura foi agitada vigorosamente. O próximo passo foi completar o volume para 6,25 mL com água destilada e feitas as leituras das absorvâncias das amostras em espectrofotômetro, a 540 nm. Para cada seqüência de análise com as respectivas leituras foi feito um branco (0,25 mL de água destilada, 0,25 mL do reagente A+B e 0,25 mL do reagente de Nelson C).

A determinação dos açúcares totais foi feita a partir dos 12,5 ml do extrato diluído, obtido após a evaporação, dos quais foram retirados 6,25 mL e colocados em um béquer de 20 mL. Em seguida, adicionou-se 0,75 mL de HCL concentrado com o objetivo de promover a hidrólise e esta solução foi mantida em banho-maria, por 5 minutos. Depois de promover a neutralização de cada amostra com hidróxido de sódio (NaOH), o volume foi completado para 12,5 mL. Dos 12,5 mL, foi retirado 0,25 mL e adicionado 0,25 mL de reagente A + B de Nelson. Esta mistura foi fervida por 20 minutos e depois resfriada rapidamente em banho de gelo. Logo após, foi adicionado 0,25 mL do reagente C sendo que a mistura foi agitada vigorosamente em um agitador vortex. Completou-se o volume para 6,25 mL com água destilada e, em seguida, foram feitas as leituras das absorvâncias das amostras em

espectrofotômetro, a 540 nm. A preparação do branco foi feita de forma semelhante ao das amostras vegetais.

A partir dos precipitados provenientes das extrações de açúcares solúveis das folhas, dos ramos e das raízes, foram feitas as determinações das concentrações de amido. Para cada amostra vegetal precipitada no tubo de centrífuga foram adicionados 5,0 mL de ácido perclórico 52% (HClO₄), deixados em banho-maria a 75 °C por 30 minutos e, depois, centrifugados a 7.000 rpm. O sobrenadante foi filtrado em tubos de Follin Wu e o volume foi completado para 25,0 mL com água destilada. Deste, foi retirado 1,25 mL para folha, 0,75 mL para ramos e 0,5 mL para raízes e os volumes completados para 6,25 mL com água destilada. Destas soluções foi retirado 0,5 mL para reação de cor, colocando-se 0,5 mL de fenol (5%) e 2,5 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄). Por último, foi feita a leitura da absorbância, em espectrofotômetro, com comprimento de onda de 490 nm.

4.6. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE MACRO E MICRONUTRIENTES NAS FOLHAS

Mensalmente, foram coletadas quatro folhas novas e quatro velhas, localizadas em regiões na planta correspondentes aos pontos cardeais, Norte, Sul, Leste e Oeste. As folhas foram previamente lavadas em água corrente e depois enxaguadas com água deionizada. Todas as amostras foliares, após o processo de lavagem, foram secas por 48 horas a 65 °C. Após a moagem, as amostras foliares foram guardadas para posterior determinação dos teores dos macro e micronutrientes (Bataglia *et al.*, 1983).

A extração de Ca, K, Mg, P, Fe, Cu, Mn, Zn e B foi feita usando a digestão por via seca de acordo com Bataglia *et al.* (1983), utilizando 1,0 g de cada uma das amostras de material vegetal, colocado em cápsulas de porcelana, deixando na mufla a 500 °C, por 3 horas. Após este

período, as amostras foram retiradas da mufla e colocadas para esfriar. Depois de completado o esfriamento, o material foi levado para capela onde foram adicionadas de 2 a 3 gotas de água, com o objetivo de umedecer as cinzas das amostras e adicionados 2 mL de HCl 6 mol.L⁻¹.

Após a adição do ácido clorídrico, o material foi colocado numa chapa elétrica a 100 °C, por 2 a 3 horas, até evaporar todo o líquido. Após a secagem, foram adicionadas duas alíquotas de 10 mL de solução de HCl 2 mol.L⁻¹. Foi feita a filtração do material em um balão volumétrico de 50 mL, utilizando-se filtros de filtração média (faixa branca). As cápsulas de porcelana foram lavadas com água deionizada e todo o líquido obtido foi filtrado no mesmo balão volumétrico com o material remanescente da primeira filtragem. Completou-se o volume para 50 mL com água deionizada.

Após a extração dos minerais das amostras foliares, os teores dos elementos Ca, Mg, P, Fe, Cu e Zn foram determinados através do espectrômetro de emissão óptica por plasma de argônio (Marca: Jobin Yvon, modelo JY50P).

A quantificação dos teores de potássio foi feita através do uso da técnica de fotometria de emissão em chama (Micronal, modelo B252), conforme descrição feita por Bataglia *et al.* (1983).

4.6.1. DETERMINAÇÃO DO NITROGÊNIO

Foi pesado 0,100 g de material vegetal e, em seguida, as amostras foram transferidas para um tubo de digestão (tipo Follin-Wu), foram incluídos uma amostra de padrão e um branco.

Ao material no tubo de digestão foi adicionado 1g de mistura digestora [10 g de sulfato de potássio (K₂SO₄), 10 g de sulfato de cobre (CuSO₄.5H₂O), 1g de selênio (Se)] e 3 mL de ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄). Os tubos foram cobertos com funil de vidro e colocados

nos blocos digestores a cerca de 360 °C. Após o líquido ter clareado, as amostras foram digeridas ao ponto de ebulição da mistura por 60 minutos, logo a seguir foram resfriadas a temperatura ambiente e o material levado para o processo de destilação.

O tubo digestor contendo a amostra foi conectado ao destilador micro-Kjeldahl (Tecnal, modelo TE-036/1) e, em seguida, foi feita a alcalinização do material adicionando-se 15 mL de hidróxido de sódio (NaOH), 10 % (v/v). A amônia produzida foi arrastada por vapor d'água e recolhida, após condensação, em uma solução de ácido bórico 2% mais indicador (20 mL). O mesmo procedimento foi feito para a destilação do branco.

Na titulação, utilizou-se uma solução padrão de ácido sulfúrico 0,005 mol.L⁻¹, cuja mudança de cor foi de azul (ou verde) para rosa ou lilás.

4.6.2. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE BORO NAS FOLHAS

A determinação do boro nas folhas foi baseada na formação de um complexo colorido resultante da reação do ácido bórico com o reagente azometina H (Bataglia *et al.*, 1983).

Cadinhos de porcelana contendo 250 mg de material vegetal seco e moído, foram colocados em mufla à temperatura de 500 °C por duas horas. Após este período, as cinzas foram dissolvidas em 10 mL de HCl 0,1 mol.L⁻¹ e homogeneizada. Após 30 minutos, foi retirada uma alíquota de 2 mL e transferida para tubos de ensaio, adicionando logo em seguida 2 mL de solução tampão [500 g de acetato de etila e 30 g de EDTA (sal dissódico) com 800 mL de água deionizada e 250 mL de ácido acético glacial]. Por último, adicionaram-se 2 mL de solução de azometina-H a 0,45 % (0,45 g de azometina H em 100 mL de solução 1% de ácido ascórbico-L), agitando em seguida. Depois de trinta minutos, foram procedidas as leituras em um espectrofotômetro UV-visível (Marca Hitachi – Modelo U-2000) a 420 nm.

4.7. QUANTIFICAÇÃO DO ÁCIDO ABCSÍCIO

As quantificações das concentrações de ácido abscísico nos botões florais e nas flores foram feitas de acordo com a metodologia descrita no trabalho de Gomes *et al.* (2003). As etapas das determinações serão discriminadas a seguir.

Quando os botões florais atingiram um tamanho padrão de 1,3 a 1,5 cm de comprimento, foram coletadas aleatoriamente 20 unidades em cada planta que em seguida, foram imersos em nitrogênio líquido. O mesmo número de flores abertas foi coletado procedendo-se também à imersão em nitrogênio líquido. Em seguida, os botões florais e as flores foram armazenados em ultrafreezer (-80 °C) até a realização do processo de quantificação de hormônios.

Para extração do ácido abscísico as amostras foram moídas em nitrogênio líquido e liofilizadas por 48 horas. De cada amostra liofilizada foram utilizados 15 mg, colocados em tubo de centrífuga e logo após, adicionou-se 1,5 mL de meio de extração constituído de acetona 80%, 100 mg.L⁻¹ de BHT (hidroxitolueno butilado) e 100 mg.L⁻¹ de BHA (hidroxianisol butilado). Os extratos foram armazenados a 4 °C, por uma semana.

Após o período de armazenamento foi realizada a purificação do extratos, centrifugando-os por cinco minutos a 10.000 g. Em seguida, retirou-se uma alíquota de 750 µL que foi diluída em 4,25 mL de tampão TBST (6,0 g de Tris; 0,2 g de MgCl₂, 8,8 g de NaCl; 0,1 g de NaNO₃ e 0,5 mL.L⁻¹ de TWEEN 20), pH 7,5. As amostras foram centrifugadas por nove minutos a 10.000 g e passadas por um filtro Millex de nylon de 0,22 µm. Logo após, os extratos foram analisados utilizando-se a técnica imuno-enzimática (teste Elisa).

Kits de ensaio imuno-enzimático (Phytodetecck) foram utilizados para detecção de ácido abscísico. Cada kit era composto por: uma placa especial com 96 microcavidades (onde

os anticorpos estão adsorvidos); substância marcadora (três frascos de 1,0 mL); diluente do marcador (um frasco de 15 mL); solução de lavagem (dois frascos de 30,0 mL); diluente do substrato (um frasco com 30,0 mL); tabletes de substrato e reagente de paralisação (um frasco de 5 mL).

O princípio do ensaio imunoenzimático é a competição entre o hormônio marcado e o hormônio da amostra pelos anticorpos adsorvidos na placa. O hormônio marcado com fosfatase alcalina (marcador) foi adicionado com o extrato do tecido ao anticorpo adsorvido às paredes das microcavidades da placa. A reação de ligação competitiva é estabelecida entre uma quantidade constante do marcador, uma quantidade limitante de anticorpo e 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 do substrato. A quantidade de hormônio marcado com fosfatase alcalina retida na placa será inversamente proporcional à quantidade de hormônio da amostra. A reação do substrato p-nitrofeninol com a enzima fosfatase alcalina produz uma cor amarela que é inversamente proporcional à quantidade de hormônio na amostra. Por intermédio da curva padrão, utilizando concentrações conhecidas de ABA, é possível calcular a concentração de hormônio de cada amostra.

Para o ensaio imunoenzimático foram utilizados 100,0 μ L de cada padrão que, foi colocado em uma microcavidade, em triplicata. Os extratos (100,0 μ L) foram colocados, aleatoriamente, nas placas com três repetições. Em cada microcavidade, foram adicionados 100,0 μ L de marcador diluído, usando 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 μ L de solução de lavagem. A mistura foi decantada repetindo-se este último passo mais duas vezes. Adicionaram-se 200,0 μ L de solução de

substrato a cada microcavidade. A placa foi selada e incubada, por 60 minutos, a 37 °C. Após este período, adicionou-se uma gota de reagente de paralisação a cada microcavidade que agiu por 5 minutos. Procedeu-se à leitura da densidade ótica num leitor de placa de ELISA, no comprimento de onda de 405 nm.

4.8. QUANTIFICAÇÃO DO ÁCIDO 3-INDOL ACÉTICO (AIA)

As quantificações das concentrações do AIA nos botões florais e nas flores foram feitas de acordo com a metodologia descrita no trabalho de Gomes *et al.* (2003). Os procedimentos de coleta, maceração e armazenamento de amostras e de flores e botões foram os mesmos utilizados na análise do ABA.

Para a extração do AIA foram utilizados 50 mg das amostras de flores e botões colocados em 3,0 mL de meio de extração (80% metanol) contendo BHT e BHA, 100 mg.L⁻¹, por um período de 48 h, no escuro a 4 °C.

Para realização do processo de purificação do Ácido 3-Indol Acético (AIA) os extratos foram centrifugados durante 20 minutos a 10.000 g. Após a centrifugação, 1,5 mL de extrato foi passado por um filtro Millex de nylon (0,22 µm) (marca millipore) conectado a uma coluna SEP-PAK C₁₈ (marca 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 em um concentrador de amostras e ressuspendido em 1,0 mL de água, pH 2,5 e 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).

Após a secagem, as amostras foram metiladas com diazometano que foi preparado da seguinte forma: 2,4 g de diazald (p-tolilsulfonilmetilnitrosamida) foram dissolvidos em 30,0 mL de éter num béquer, em banho de gelo. Em seguida, 0,4 g de KOH (hidróxido de

potássio) foi dissolvido em algumas gotas de água, sendo adicionados 10,0 mL de etanol 96%, mantendo-se em banho de gelo. O conteúdo dos dois béqueres foi misturado e colocado no balão destilador e a mistura destilada a 65 °C (Voguel, 1956; Schlenk & Gellerman, 1960). O produto foi armazenado a -20 °C, em frascos herméticos por, no máximo, uma semana, um vez que, após este período o diazometano perde a sua atividade. Toda a vidraria usada no preparo da substância foi lavada com ácido acético glacial para desativar o diazometano e o diazald.

Para o processo de metilação, acrescentaram-se 100 µL de diazomato a cada amostra e, em seguida, promoveu-se sua agitação. Para a garantia de que toda a amostra tenha sido metilada, mais 150 µL de diazomato foram adicionados. Após a metilação, adicionaram-se 5,0 mL de tampão TRIS 25 mM [3,035 g de TRIS (hidroximetil-amino-metano) e 0,2 g de NaN₃ (azida sódica) por litro], pH 7,5.

Para o ensaio imunoenzimático foram utilizados 100,0 µL de cada padrão que, foi colocado em uma microcavidade, 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, usando 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 decantada e repetiu-se este último passo mais duas vezes. Adicionaram-se 200,0 µL de solução de substrato a cada microcavidade. A placa foi selada e incubada, por 60 minutos, a 37 °C. Após este período, adicionou-se uma gota de reagente de paralisação a cada microcavidade que agiu por 5 minutos. Procedeu-se à leitura da densidade ótica num leitor de placa de ELISA, no comprimento de onda de 405 nm.

5. RESULTADOS

5.1. PERÍODO DE INDUÇÃO FLORAL

5.1.1. AÇÚCARES

Os teores de açúcares totais em folhas de laranjeiras ‘Pêra’ (Figura 1A), diminuíram durante o período de indução floral, tanto em plantas sadias como nas doentes. Nas plantas sadias, a redução dos teores de açúcares totais, na passagem do mês de maio para junho, chegou a ser de 37 % enquanto que, nas plantas doentes, a redução foi menor, 28 %. Esta diminuição dos teores foi provocada, principalmente, pela redução dos teores de sacarose (Figura 1C) pois, os teores de açúcares redutores tanto nas plantas sadias como nas doentes não apresentaram diminuição significativa ao longo dos meses (Figura 1B).

Com relação aos teores foliares de sacarose ao longo dos meses, verificou-se redução de 58 % nas plantas sadias e 63 % nas plantas doentes (Figura 1C).

Para cada mês, quando se compararam os teores de açúcares solúveis (açúcares redutores e sacarose) nas plantas sadias com os das plantas doentes, verificou-se com maior frequência, que as concentrações de açúcares solúveis nas folhas das plantas sadias foram inferiores aos das plantas doentes (Figura 1B e 1C), somente nas medições dos teores de amido é que se notou situação inversa, ou seja, os teores foliares foram maiores nas plantas sadias (Figura 1D). Avaliados ao longo dos meses, os teores foliares de amido nas plantas sadias diminuíram no mês de junho e mantiveram-se constantes no mês seguinte. Entretanto, as concentrações de amido nas folhas das plantas doentes apresentaram oscilações, porém,

sem linearidade de resposta com relação ao período de indução floral, pois em junho, verificou-se as menores concentrações (Figura 1D).

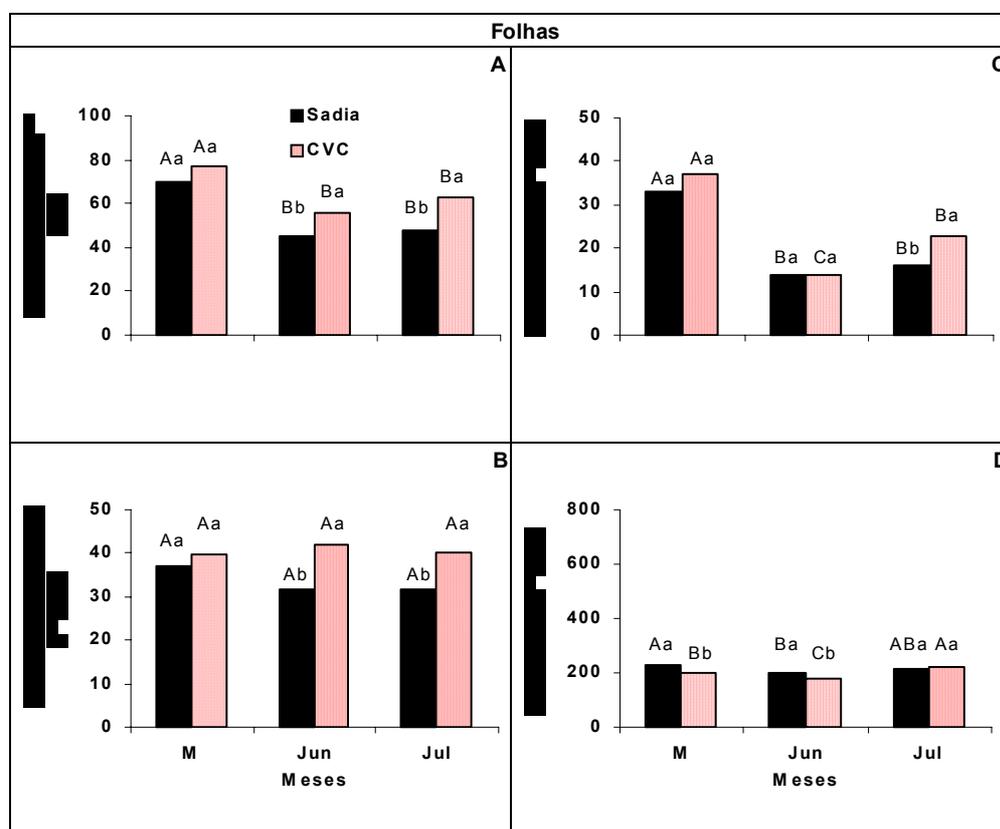


Figura 1. Teores de açúcares totais (A), açúcares redutores (B), sacarose (C) e amido (D) em folhas de laranjeiras ‘Pêra’ sadias e com Clorose Variegada dos Citros (CVC), durante o período de indução floral (maio – M, junho – Jun, e julho - Jul). Médias com as mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade. Letras maiúsculas referem-se aos testes comparativos entre meses para cada tratamento e as letras minúsculas aos testes comparativos entre tratamentos para cada mês de avaliação.

Quando se comparou, em cada mês, as concentrações de açúcares totais, redutores, sacarose e de amido nos ramos das plantas sadias com os das plantas doentes (Figura 2), observou-se que não ocorreram diferenças significativas entre os tratamentos nos meses de maio e julho. Entretanto, em junho as plantas com CVC apresentaram maiores teores dos açúcares em comparação com as plantas sadias, à exceção do amido que apresentou os

maiores teores nos ramos das plantas sadias. Com relação à sacarose verificou-se que seu teor nos ramos das plantas sadias foi superior ao das plantas doentes em 50 % nos mês de junho.

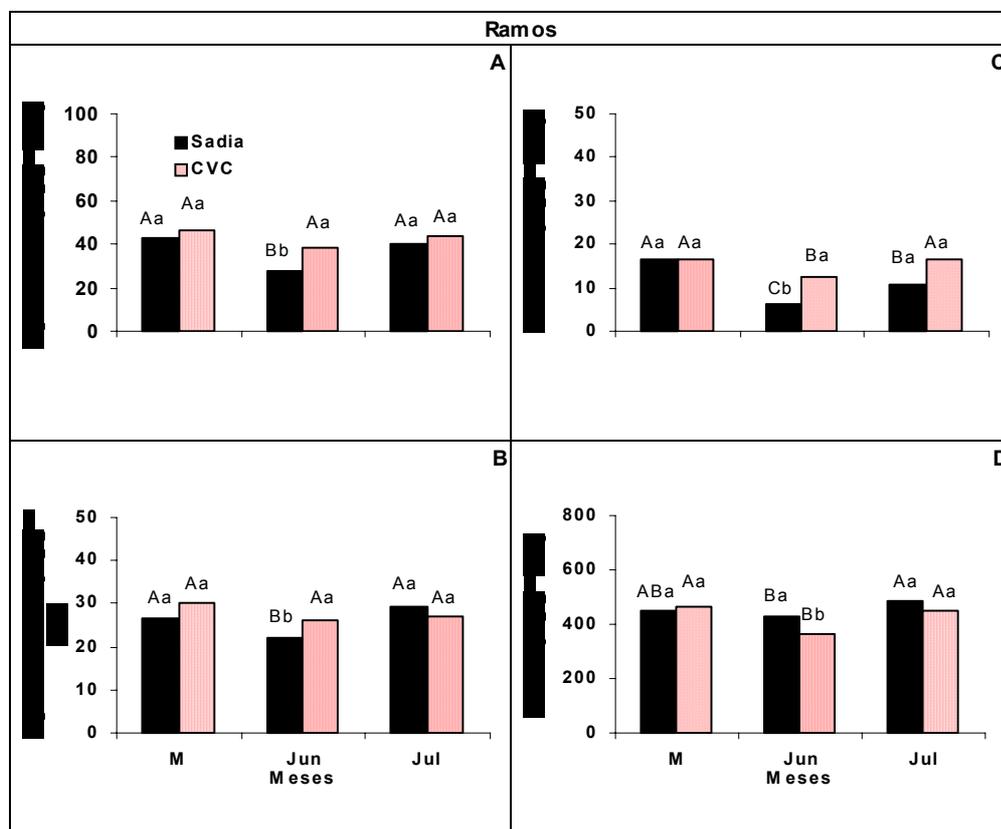


Figura 2. Teores de açúcares totais (A), açúcares redutores (B), sacarose (C) e amido (D) em ramos de laranjeiras ‘Pêra’ sadias e com Clorose Variegada dos Citros (CVC), durante o período de indução floral (maio – **M**, junho – **Jun**, e julho - **Jul**). Médias com as mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade. Letras maiúsculas referem-se aos testes comparativos entre meses para cada tratamento e as letras minúsculas aos testes comparativos entre tratamentos para cada mês de avaliação.

Em ramos, ao se fazer comparações entre os meses, apesar de pequenas oscilações, verificou-se que os teores de açúcar total e redutor nas plantas com CVC, mantiveram-se relativamente constantes (Figura 2A e 2B). Entretanto, os teores desses açúcares nas plantas sadias apresentaram quedas após o início do processo de indução floral, ou seja, maio, com

incidência de menores valores no mês de junho (Figura 2A e 2B). No mês seguinte, julho, ocorreu uma tendência de recuperação dos teores.

Com relação aos teores de sacarose nos ramos, tanto nas plantas sadias como nas com CVC, verificaram-se reduções dos teores após o mês de maio. Na passagem para o mês seguinte, junho, as reduções chegaram a patamares de 62 % em plantas sadias e 31 % nas plantas com CVC (Figura 2C).

Quando se fez comparações das concentrações dos teores de açúcares totais e redutores na raiz, entre plantas e durante o período de indução (Figura 3A e 3B), não se verificou variação discrepante entre as concentrações. Entretanto, com relação aos teores de sacarose nas raízes de plantas com CVC, ao longo dos meses observou-se uma tendência de aumento enquanto que, nas plantas sadias os teores mantiveram-se constantes. Quando se comprou plantas sadias e plantas doentes em cada mês, verificou-se que nos meses de junho e julho os teores foram maiores nas plantas doentes (Figura 3C).

Os teores de amido (Figura 3D) apresentaram quedas bem acentuadas no mês de junho, apresentando uma redução de 30 % nas plantas sadias e de 23 % nas plantas doentes. Em julho, os teores de amido nas raízes das plantas sadias mantiveram-se constantes em relação ao mês anterior, enquanto que nas plantas doentes ocorreu um aumento significativo (Figura 3D).

Quanto se comparou os teores de amido entre plantas sadias e doentes, isolando-se cada mês, verificou-se que no mês de junho, os teores foram maiores nas raízes das plantas sadias em relação aos teores nas raízes das plantas doentes. Todavia, no final do período de indução floral, ou seja, mês de julho, verificou-se que as plantas com CVC recuperaram mais rapidamente seu estoque de amido pois, elas apresentaram os maiores teores nos último mês de avaliação.

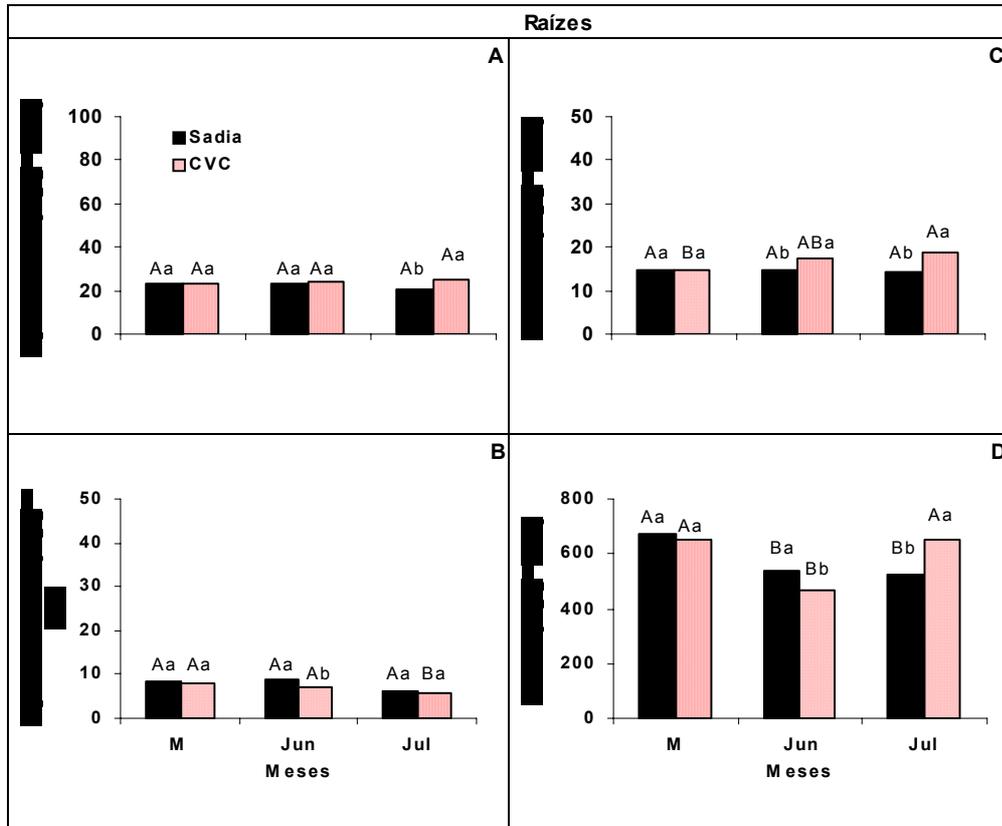


Figura 3. Teores de açúcares totais (A), açúcares redutores (B), sacarose (C) e amido (D) em raízes de laranjeiras ‘Pêra’ sadias e com Clorose Variegado dos Citros (CVC), durante o período de indução floral (maio – **M**, junho – **Jun**, e julho - **Jul**). Médias com as mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade. Letras maiúsculas referem-se aos testes comparativos entre meses para cada tratamento e as letras minúsculas aos testes comparativos entre tratamentos para cada mês de avaliação.

5.1.2. TROCAS GASOSAS

Quando se comparou as taxas de fotossíntese líquida (A), entre plantas sadias e doentes, nos horários entre 9:00 e 15:00 horas, durante o período de indução floral (Figuras 4A, 5A, 6A, 7A, 8A, 9A, e 10A), em geral, verificou-se que as plantas sadias realizaram mais eficientemente o processo de fotossíntese em comparação com as das plantas doentes uma vez que a taxa de assimilação de CO₂ foi, no geral, maior nas plantas livres da doença. Em geral, o

mesmo resultado foi encontrado para os outros processos como transpiração (E) e condutância estomática (g_s) (Figuras 3 a 9). A concentração interna de CO_2 foi semelhante em quase todas as medidas mensais entre os dois tipos de planta e que, somente em alguns pontos, a concentração interna de CO_2 das plantas saudias foi superior à das plantas doentes (Figuras 4 a 10).

Sabe-se que a temperatura e a radiação fotossinteticamente ativa são os dois fatores que exercem fortes influências sobre as trocas gasosas. Durante o período de indução, quando se fez comparações entre os tipos de plantas (Figuras 4 a 10), tanto a temperatura foliar como a radiação fotossinteticamente ativa, mantiveram-se relativamente constantes. Entretanto, quando fez comparações entre os meses, verificou-se uma tendência de queda nos dois parâmetros, pois, em geral, o mês de julho foi o que apresentou os menores valores.

À medida que as plantas de laranjeiras se aproximaram do processo de floração, ou seja, mês de julho, ocorreu um aumento significativo da fotossíntese tanto em planta saudias como nas plantas doentes. Entretanto, este aumento foi mais acentuado em plantas livres de CVC (Figuras 4A, 5A, 6A, 7A e 8A). As plantas saudias tiveram um aumento médio na taxa fotossintética de 22 %, enquanto que as plantas com CVC tiveram um aumento médio de 20 %.

Durante os meses do período de indução floral, fenômenos que dependem dos processos de abertura estomática como transpiração, concentração interna de CO_2 e condutância não sofreram alterações significativas que fossem capazes de afetar a fotossíntese. Em muitos casos, como no horário das 10:00 horas, mesmo com manutenção constante de alguns fatores determinantes da fotossíntese, como a transpiração e a concentração interna de CO_2 , as taxas de fotossíntese apresentaram tendência de elevação ao longo dos meses.

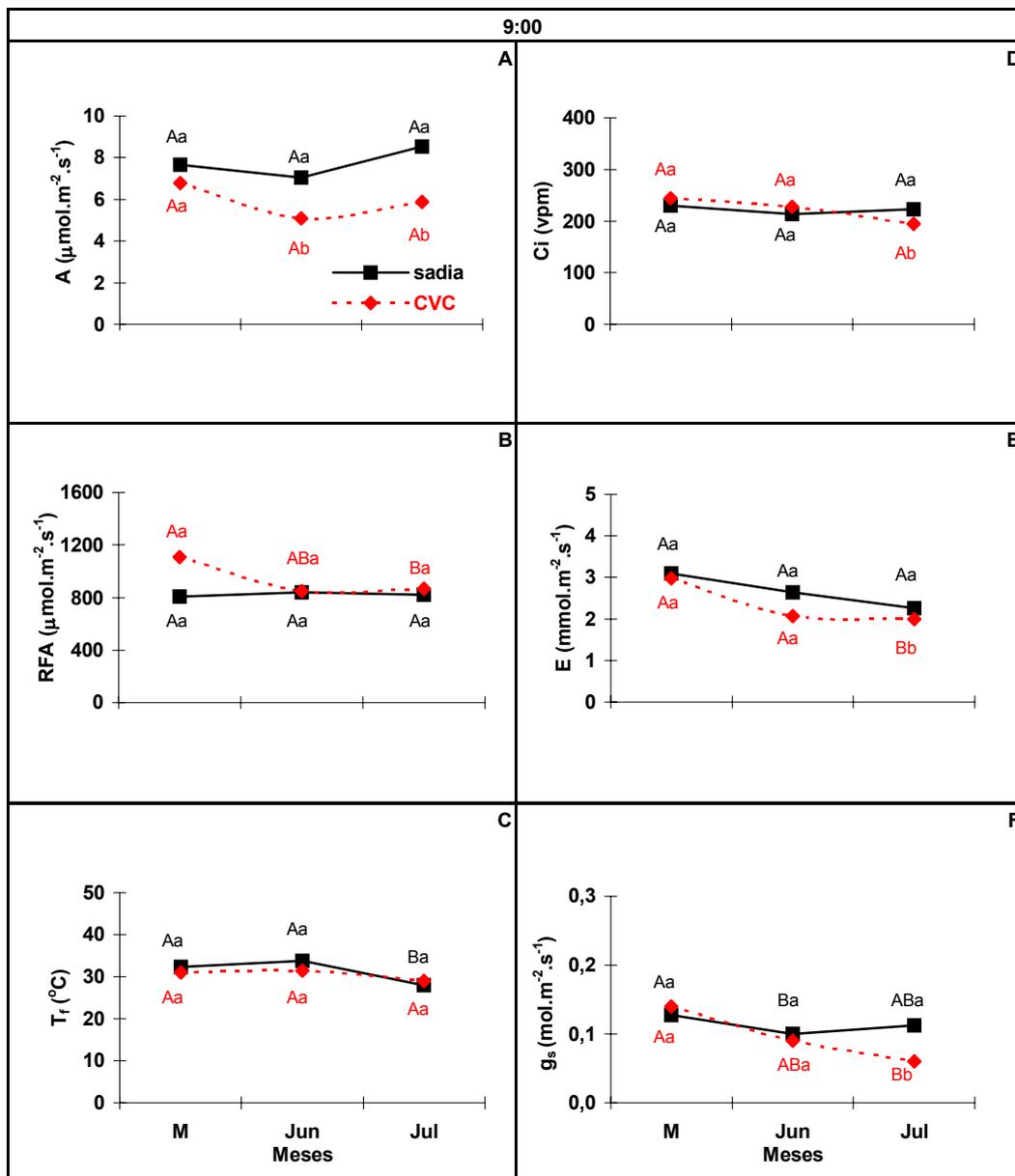


Figura 4. Taxa de assimilação de CO_2 (A), radiação fotossinteticamente ativa (RFA), temperatura foliar (T_r), concentração interna de CO_2 (Ci), transpiração (E) e condutância estomática (g_s) em laranjeiras ‘Pêra’ sadias e com Clorose Variegada dos Citros (CVC), durante o período de indução floral (maio – M, junho – Jun, e julho – Jul). Médias com as mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5 %. Letras maiúsculas referem-se aos testes comparativos entre meses para cada tratamento e as letras minúsculas aos testes comparativos entre tratamentos para cada mês de avaliação.

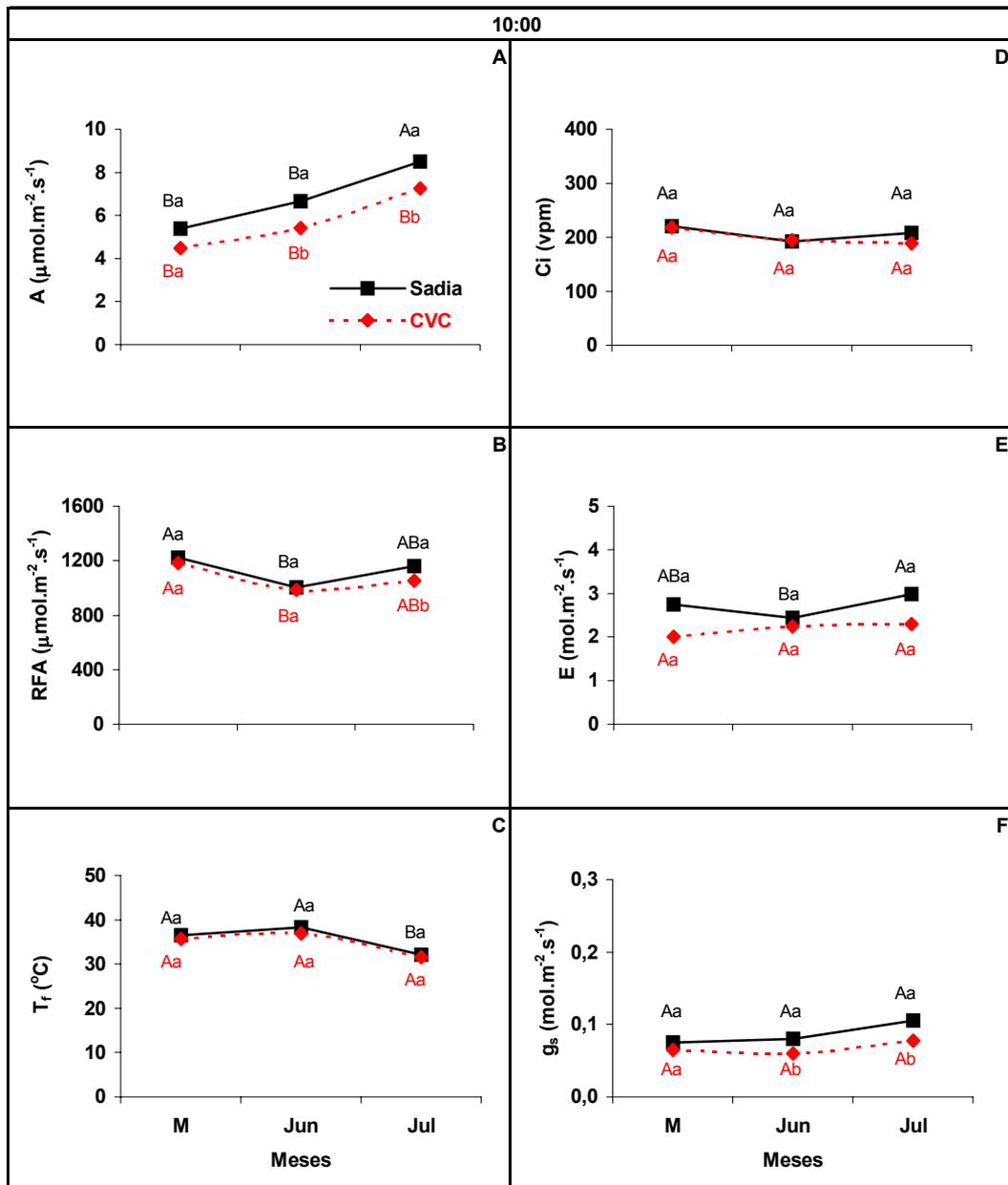


Figura 5. Taxa de assimilação de CO_2 (A), radiação fotossinteticamente ativa (RFA), temperatura foliar (T_f), concentração interna de CO_2 (Ci), transpiração (E) e condutância estomática (g_s) em laranjeiras ‘Pêra’ sadias e com Clorose Variegada dos Citros (CVC), durante o período de indução floral (maio – M, junho – Jun, e julho – Jul). Médias com as mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey a 5 %, de probabilidade. Letras maiúsculas referem-se aos testes comparativos entre meses para cada tratamento e letras minúsculas aos testes comparações entre tratamentos para cada mês de avaliação.

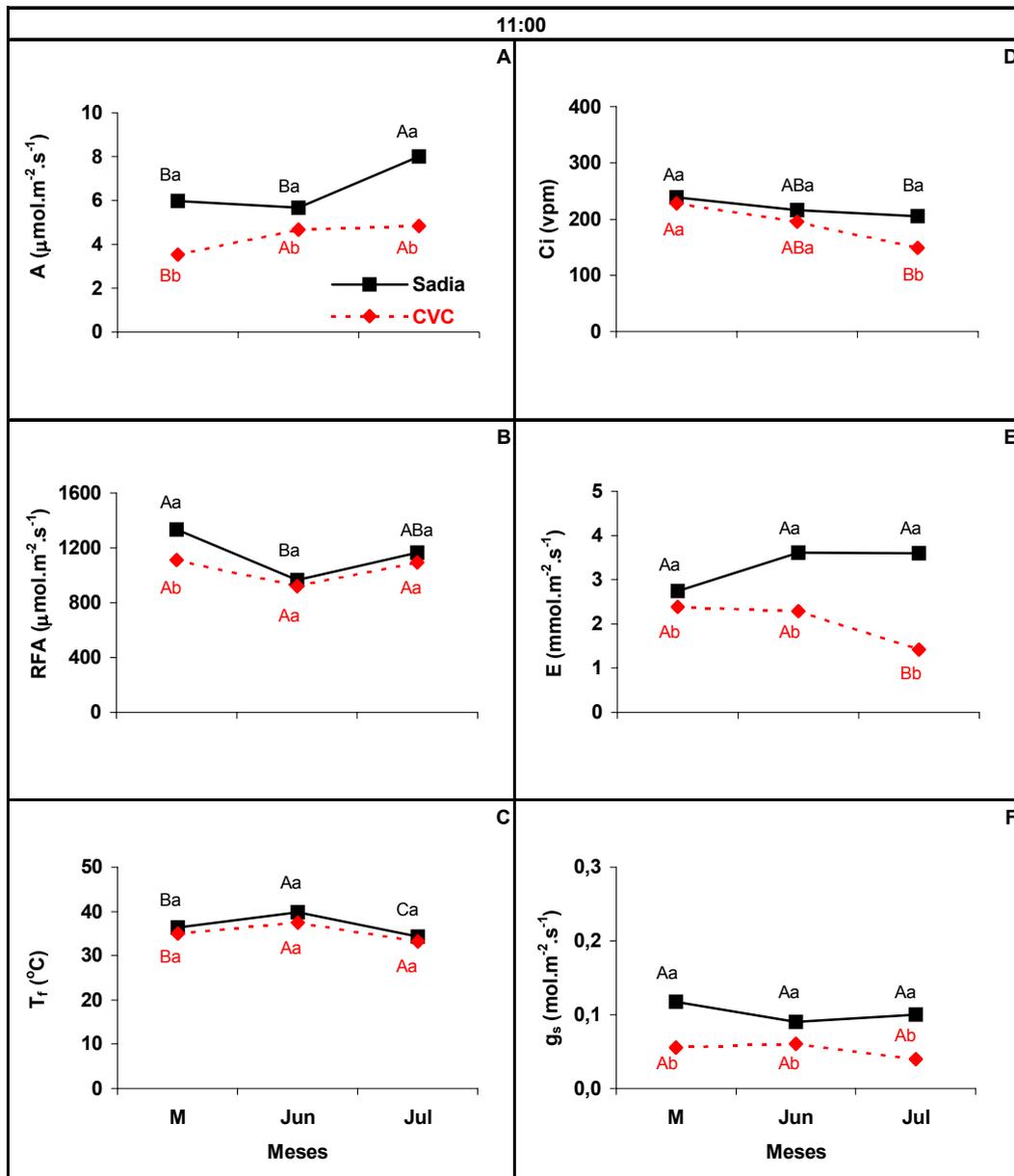


Figura 6. Taxa de assimilação de CO_2 (A), radiação fotossinteticamente ativa (RFA), temperatura foliar (T_f), concentração interna de CO_2 (Ci), transpiração (E) e condutância estomática (g_s) em laranjeiras ‘Pêra’ sadias e com Clorose Variegada dos Citros (CVC), durante o período de indução floral (maio – M, junho – Jun, e julho – Jul). Médias com as mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey a 5 %, de probabilidade. Letras maiúsculas referem-se aos testes comparativos entre meses para cada tratamento e letras minúsculas aos testes comparativos entre tratamentos para cada mês de avaliação.

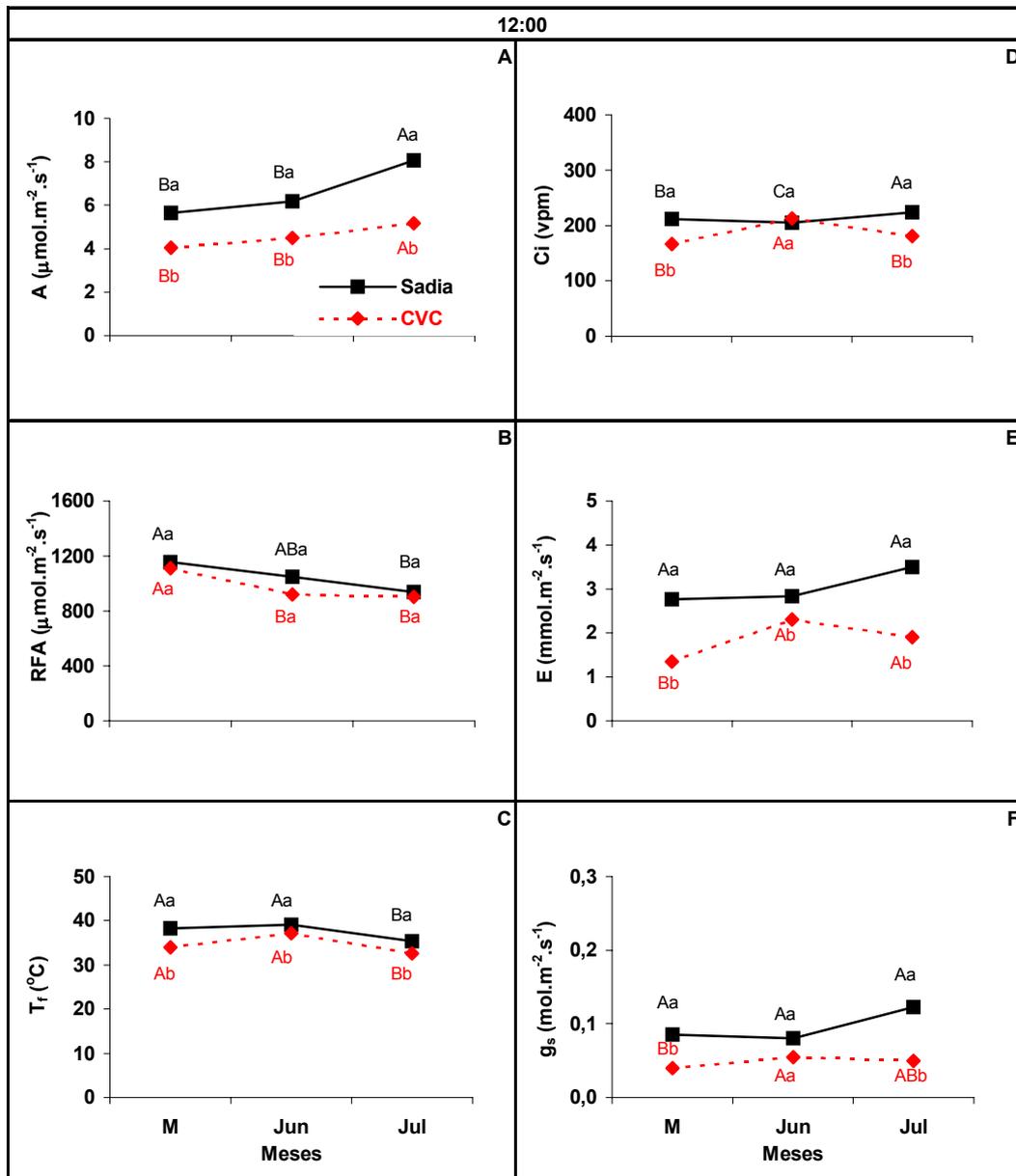


Figura 7. Taxa de assimilação de CO_2 (A), radiação fotossinteticamente ativa (RFA), temperatura foliar (T_f), concentração interna de CO_2 (Ci), transpiração (E) e condutância estomática (g_s) em laranjeiras ‘Pêra’ sadias e com Clorose Variegada dos Citros (CVC), durante o período de indução floral (maio – M, junho – Jun, e julho – Jul). Médias com as mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade. Letras maiúsculas referem-se aos testes comparativos entre os meses para cada tratamento e letras minúsculas aos testes comparativos entre tratamentos para cada mês de avaliação.

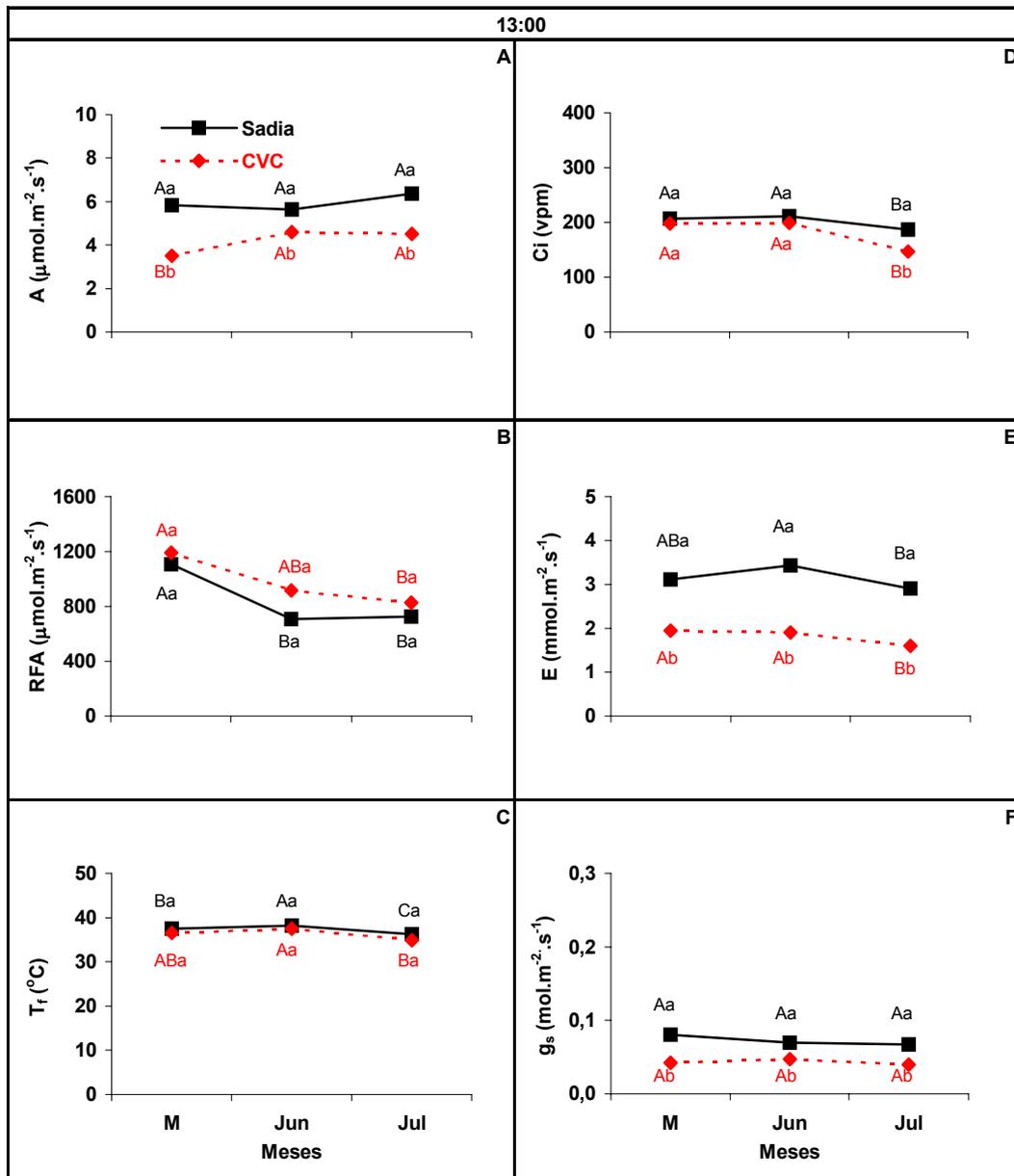


Figura 8. Taxa de assimilação de CO_2 (A), Radiação fotossinteticamente ativa (RFA), temperatura foliar (T_f), concentração interna de CO_2 (Ci), Transpiração (E) e condutância estomática (g_s) em laranjeiras ‘Pêra’ sadias e com Clorose Variegada dos Citros (CVC), durante o período de indução floral (maio – M, junho – Jun, e julho – Jul). Médias com as mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey a 5 %, de probabilidade. Letras maiúsculas referem-se aos testes comparativos entre os meses para cada planta e letras minúsculas aos testes comparativos entre tratamentos para cada mês de avaliação.

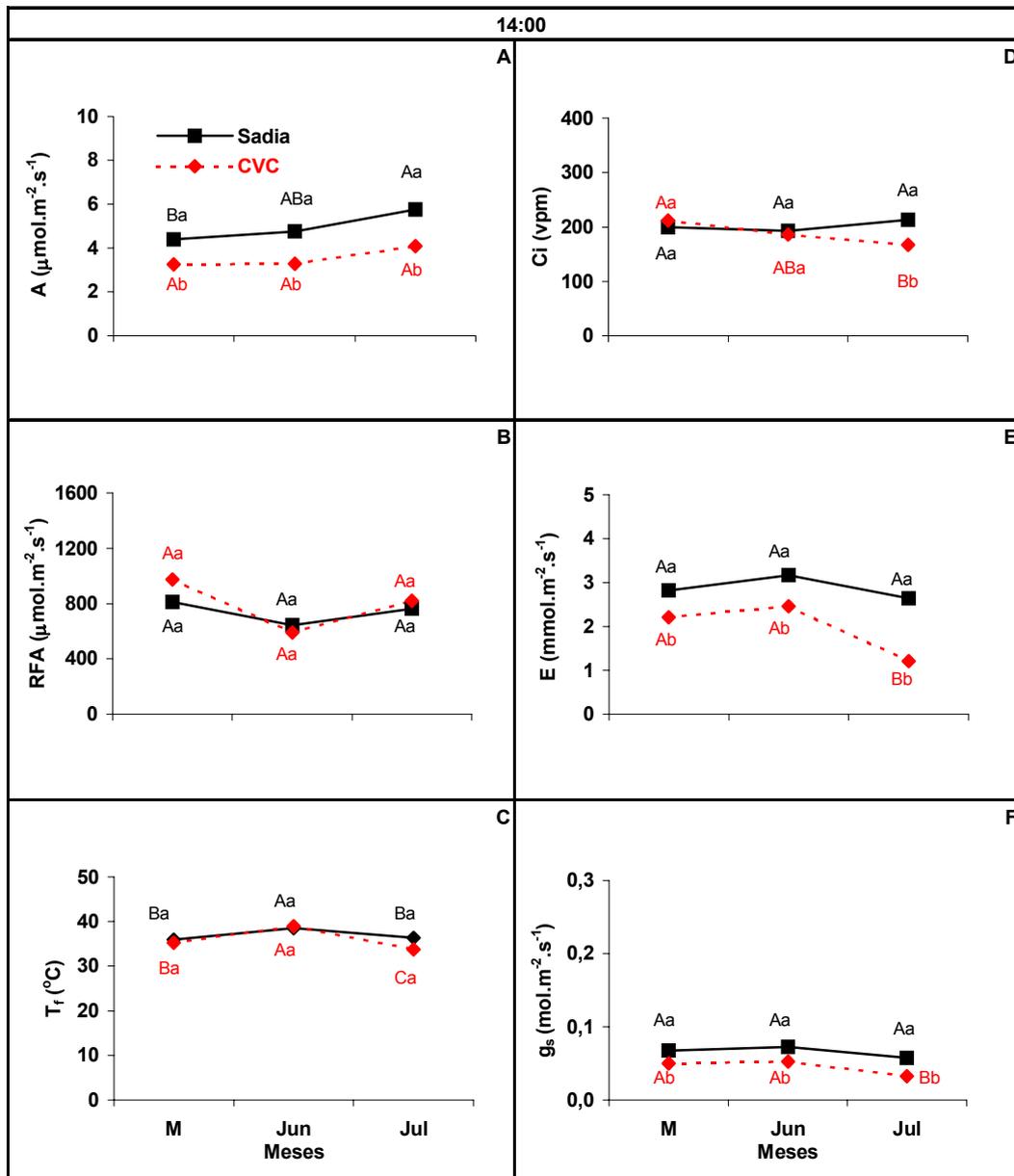


Figura 9. Taxa de assimilação de CO_2 (A), radiação fotossinteticamente ativa (RFA), temperatura foliar (T_f), concentração interna de CO_2 (Ci), transpiração (E) e condutância estomática (g_s) em laranjeiras ‘Pêra’ sadias e com Clorose Variegada dos Citros (CVC), durante o período de indução floral (maio – M, junho – Jun, e julho – Jul). Médias com as mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey a 5 %, de probabilidade. Letras maiúsculas referem-se aos testes comparativos entre os meses para cada tratamento e letras minúsculas aos testes comparativos entre tratamentos para cada mês de avaliação.

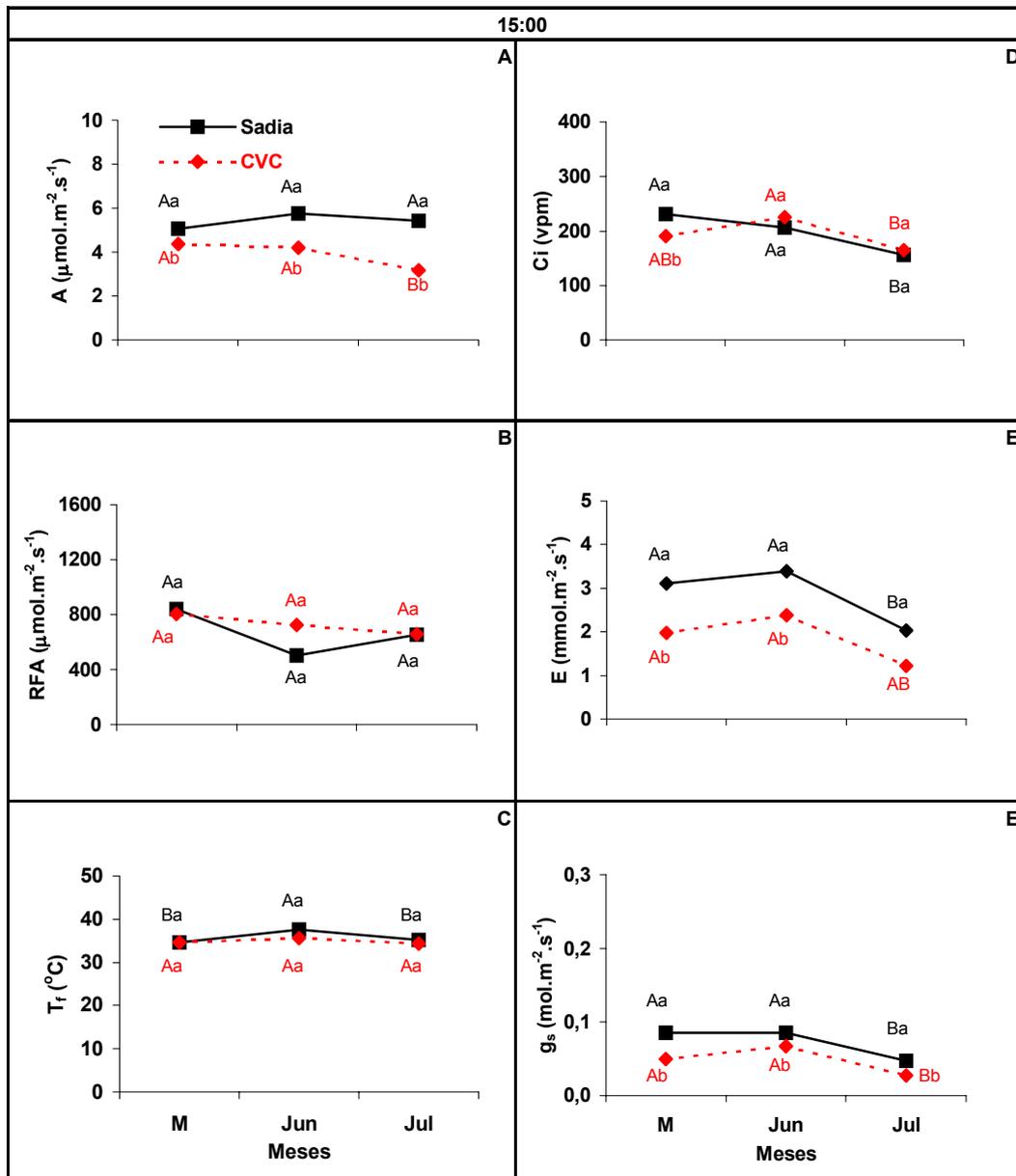


Figura 10. Taxa de assimilação de CO_2 (A), radiação fotossinteticamente ativa (RFA), temperatura foliar (T_f), concentração interna de CO_2 (Ci), transpiração (E) e condutância estomática (g_s) em laranjeiras ‘Pêra’ sadias e com Clorose Variegada dos Citros (CVC), durante o período de indução floral (maio – M, junho – Jun, e julho – Jul). Médias com as mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey a 5 %, de probabilidade. Letras maiúsculas referem-se aos testes comparativos entre os meses para cada tratamento e letras minúsculas aos testes comparativos entre tratamentos para cada mês de avaliação.

5.1.3. MACRONUTRIENTES

Quando se fez comparação dos teores de macroelementos entre plantas sadias e doentes, tanto em folhas novas como em folhas velhas, os resultados demonstraram que não ocorreram diferenças significativas entre as concentrações foliares de nitrogênio, fósforo, potássio e magnésio (Figuras 11D, 11E, 11F e 12D).

Tanto nas folhas velhas como nas novas de plantas sadias ou com CVC, os teores de nitrogênio entre os meses de maio a junho aumentaram. No mês seguinte, os teores mantiveram-se relativamente constantes. As menores concentrações de nitrogênio foram encontradas no mês de maio (Figura 11A e 11D).

Ao longo dos meses, verificou-se que os teores de fósforo e potássio, em geral, mantiveram-se relativamente constantes, tanto nas folhas velhas como nas novas das plantas sadias e doentes (Figura 11B, 11C, 11E e 11F).

Os teores de cálcio nas folhas novas das plantas sadias mantiveram-se constantes ao longo de todo período de indução floral. Nas plantas com CVC após o mês de maio foi verificado tendência de aumento da concentração foliar de cálcio (Figura 12A). Quando se compararam os teores de cálcio nas folhas novas entre os tratamentos, em cada mês, não foram verificadas diferenças significativas (Figura 12A).

Nas folhas velhas das plantas com CVC verificou-se ao longo dos meses que as concentrações foliares de cálcio mantiveram-se constantes enquanto que, nas plantas sadias as concentrações aumentaram em junho com posterior redução no mês seguinte. Nas comparações dos teores foliares de cálcio entre os tratamentos, verificou-se que as maiores concentrações foram encontradas nas folhas das plantas sadias (Figura 12C).

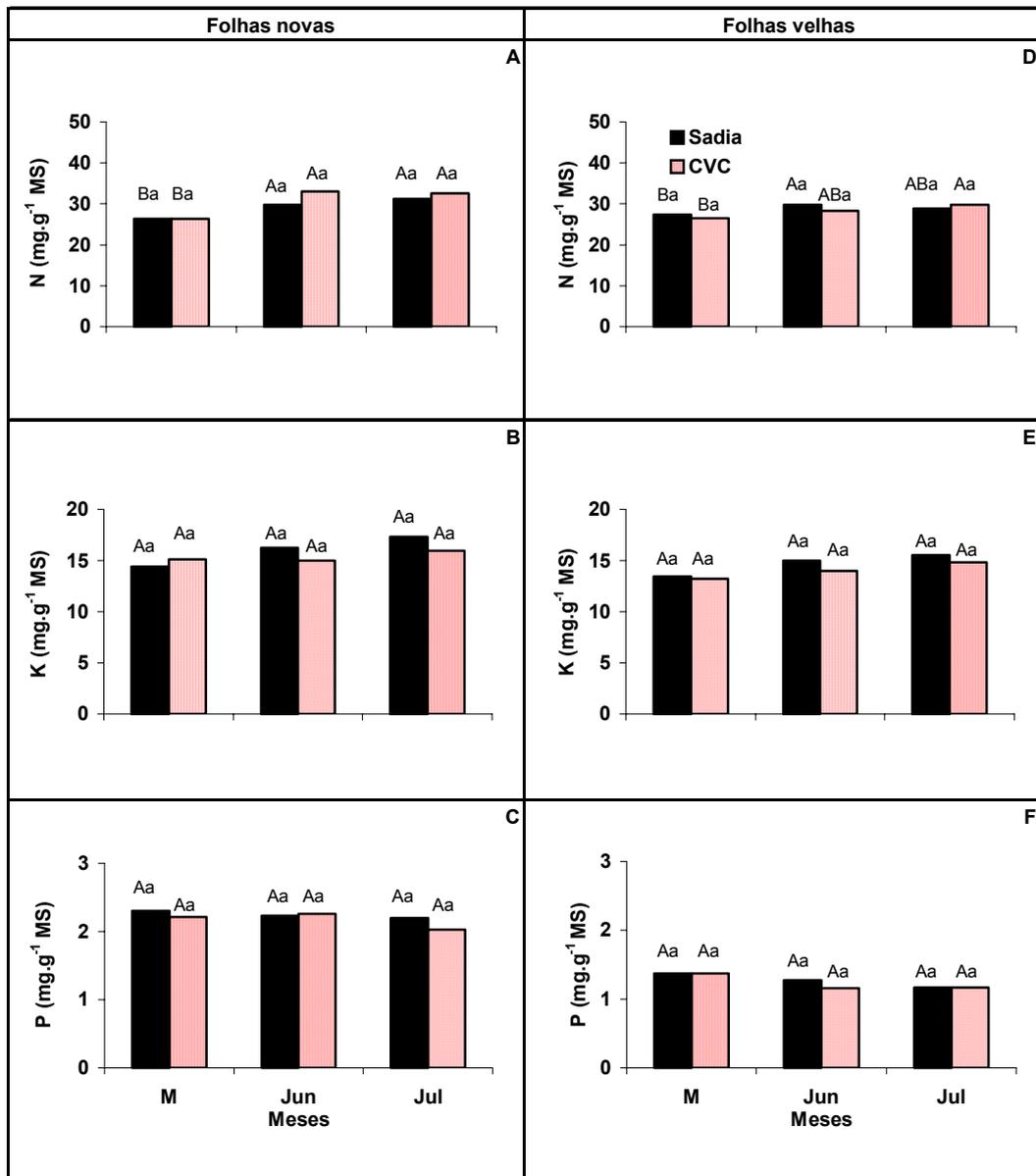


Figura 11. Teores de nitrogênio (N), potássio (K) e fósforo (P) em folhas de laranjeiras ‘Pêra’ sadias e com Clorose Variegada dos Citros (CVC), durante o período de indução floral (maio – M, junho – Jun, e julho - Jul). Médias com as mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade. Letras maiúsculas referem-se aos testes comparativos entre meses para cada tratamento e letras minúsculas aos testes comparativos entre tratamentos para cada mês de avaliação.

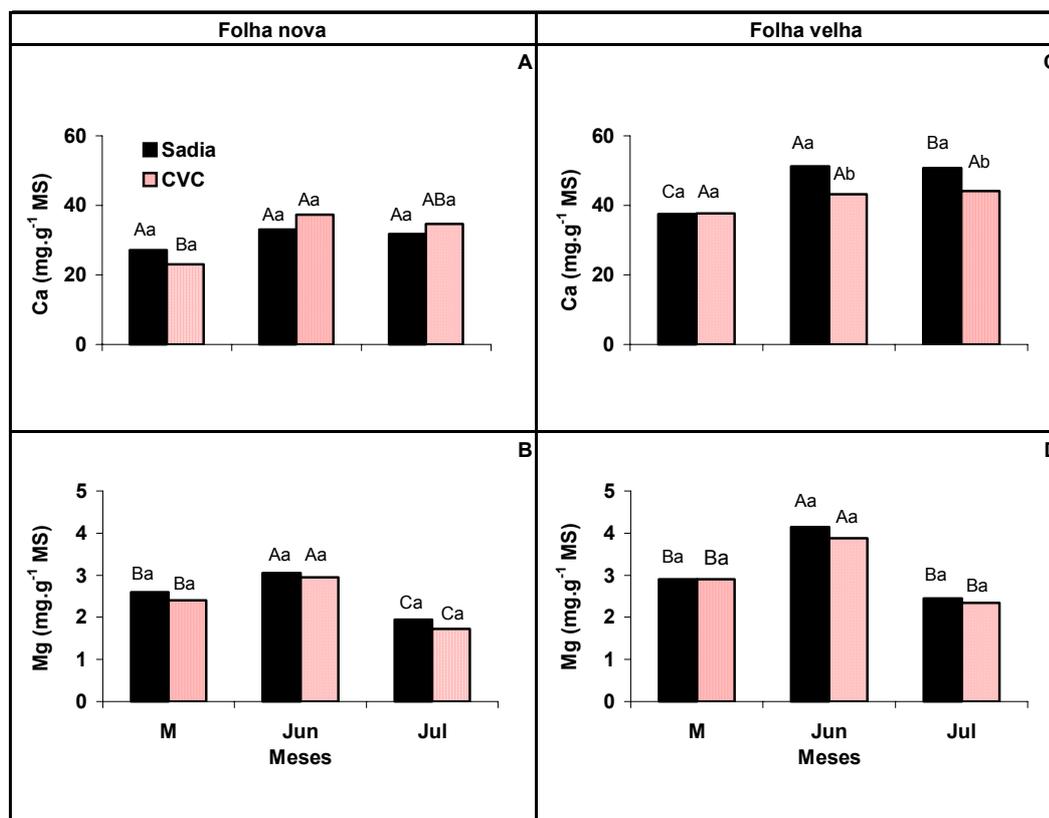


Figura 12. Teores de cálcio (Ca) e de magnésio (Mg) em folhas de laranjeiras ‘Pêra’ sadias e com Clorose Variiegada dos Citros (CVC), durante o período de indução floral (maio – M, junho – Jun, e julho - Jul). Médias com as mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade. Letras maiúsculas referem-se aos testes comparativos entre meses para cada tratamento e letras minúsculas aos testes comparativos entre tratamentos para cada mês de avaliação.

Com relação aos teores de magnésio nas folhas velhas e novas, tanto em plantas sadias como nas plantas doentes, encontraram-se variações significativas ao longo dos meses. Entretanto, as variações não acompanharam a seqüência de desenvolvimento e diferenciação dos meristemas e das gemas que ocorrem durante o processo de indução floral, pois, no mês de junho nos dois tratamentos e nos dois tipos de folhas ocorreram aumentos dos teores com redução no mês seguinte (Figuras 12B e 12D).

A incidência da doença parece não afetar a absorção, a translocação e o metabolismo foliar de magnésio (Figura 12) como de outros elementos como nitrogênio, potássio e fósforo (Figura 11), pois, os teores foliares das folhas saudias quando comparados com os das plantas com CVC não apresentaram diferenças significativas entre si.

5.1.4. MICRONUTRIENTES

Nos meses de junho e julho, os teores de boro nas folhas velhas das plantas com CVC foram maiores em comparação com os teores das plantas saudias (Figura 13D). Nas folhas novas, quando foram feitas comparações entre plantas saudias e com CVC, não foram encontradas diferenças significativas (Figura 13A).

As concentrações de boro nas folhas velhas e novas, ao longo dos meses, não apresentaram diferenças significativas, tanto nas plantas saudias como nas plantas doentes (Figuras 13A e 13D).

Nas comparações dos teores de cobre nas folhas velhas de plantas saudias e doentes, para cada mês, não se encontraram diferenças significativas (Figura 13B). Quando se compararam as médias das concentrações foliares, ao longo dos meses, constataram-se que os teores de cobre nas plantas saudias mantiveram-se constantes, enquanto que, nas plantas com CVC as maiores concentrações foliares foram encontradas no final do período de indução floral (Figura 13B).

Nas folhas novas, nos três meses do período de indução floral, os teores de cobre não apresentaram diferenças significativas quando se fez comparações entre as plantas saudias e com CVC (Figura 13B).

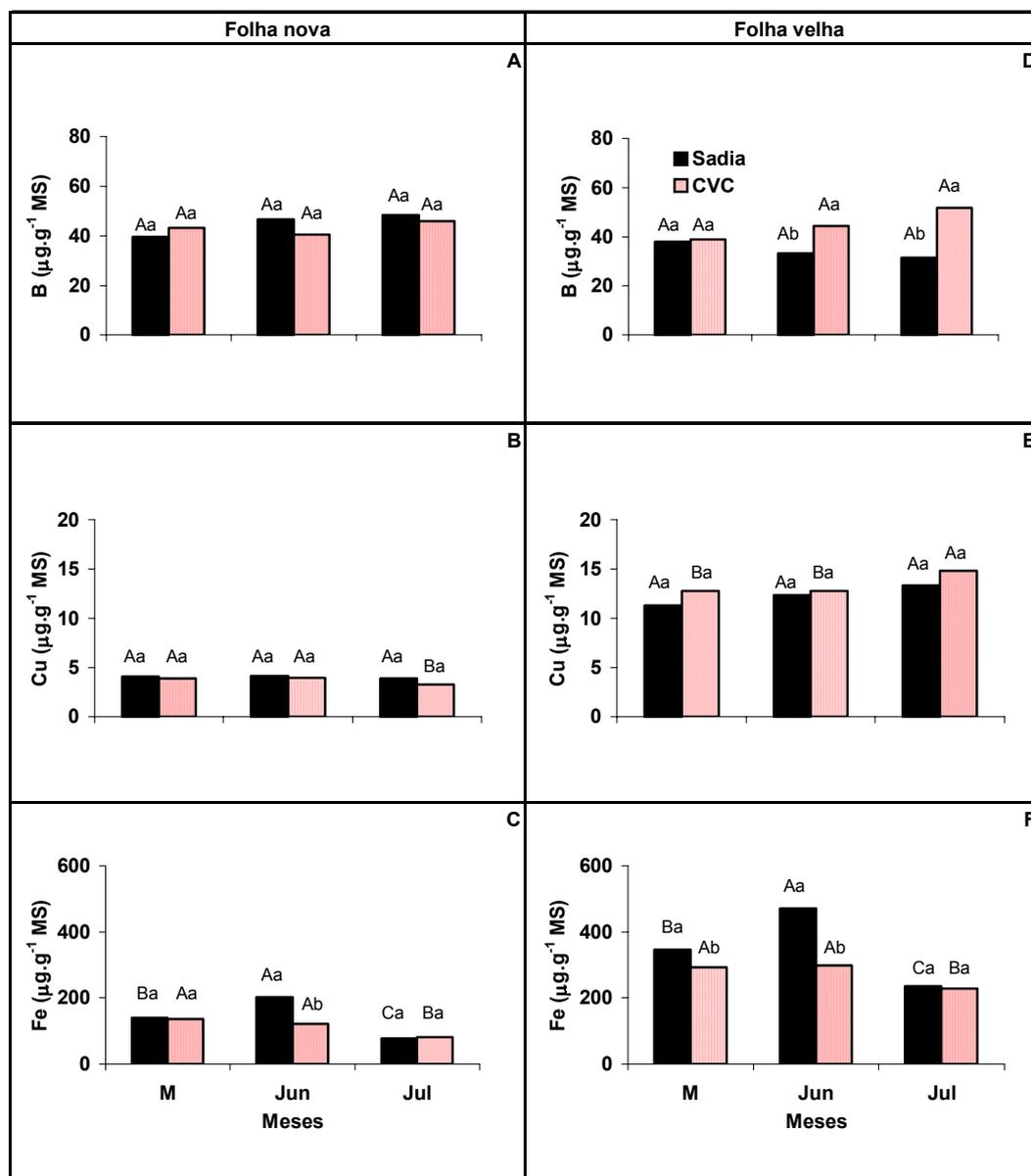


Figura 13. Teores de boro (**B**), cobre (**Cu**) e ferro (**Fe**) em folhas velhas e novas de laranjeiras ‘Pêra’ sadias e com Clorose Variegada dos Citros (CVC), durante o período de indução floral (maio – **M**, junho – **Jun**, e julho – **Jul**). Médias com as mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade. Letras maiúsculas referem-se aos testes comparativos entre meses para cada tratamento e letras minúsculas aos testes comparativos entre tratamentos para cada mês de avaliação.

Ao longo dos meses, os teores de cobre nas folhas novas das plantas sadias mantiveram-se constantes, enquanto que as plantas com CVC apresentaram queda nos teores desse elemento no mês de julho (Figura 13B).

Nos meses correspondentes ao período de indução floral, os teores de cobre foram bem reduzidos nas folhas novas de laranjeiras sadias e doentes quando comparado com os teores nas folhas velhas. Nas folhas novas os teores de cobre chegaram à níveis inferiores ao mínimo exigido para o crescimento normal das laranjeiras.

As concentrações foliares de ferro tanto nas folhas jovens como nas velhas variaram consideravelmente ao longo dos meses. Nas plantas sadias, os teores de ferro aumentaram significativamente até o mês de junho, apresentando queda no mês seguinte. As plantas com CVC mantiveram os teores constantes até o mês de junho, diminuindo no mês seguinte (Figura 13C e 13F).

Ao longo dos três meses, quando se fez comparações entre tratamentos, os teores de ferro nas folhas velhas das plantas sadias foram sempre maiores em relação aos teores encontrados nas folhas velhas das plantas doentes (Figura 13E) enquanto que, em folhas novas, somente em junho, foram verificadas diferenças significativas (figura 13C).

Os teores de manganês, no geral, tanto nas folhas velhas como nas folhas novas de plantas sadias foram constantes ao longo dos meses (Figura 14A e 14C). Apenas nas folhas velhas das laranjeiras sadias se verificou uma redução dos teores de Mn no início do processo de indução floral, ou seja, maio.

Semelhante aos teores de cobre nas folhas novas, ao longo de todos os meses correspondentes ao período de indução floral, os teores de manganês foram bem reduzidos nas folhas novas, quando comparado com os teores das folhas velhas. Em alguns meses, nas folhas tanto de laranjeiras sadias como doentes, os teores de manganês chegaram à níveis inferiores ao mínimo exigido para o crescimento normal das plantas.

Durante o período de indução os teores de zinco tanto nas folhas velhas como nas folhas novas das plantas saudias e doentes, ao longo dos meses, aumentaram significativamente no mês de junho, apresentando redução dos teores em seguida (Figura 14B e 14D). Quanto se comparou as médias dos teores foliares, entre os dois tratamentos, em cada mês, não foram verificadas diferenças significativas (Figura 14B e 14D).

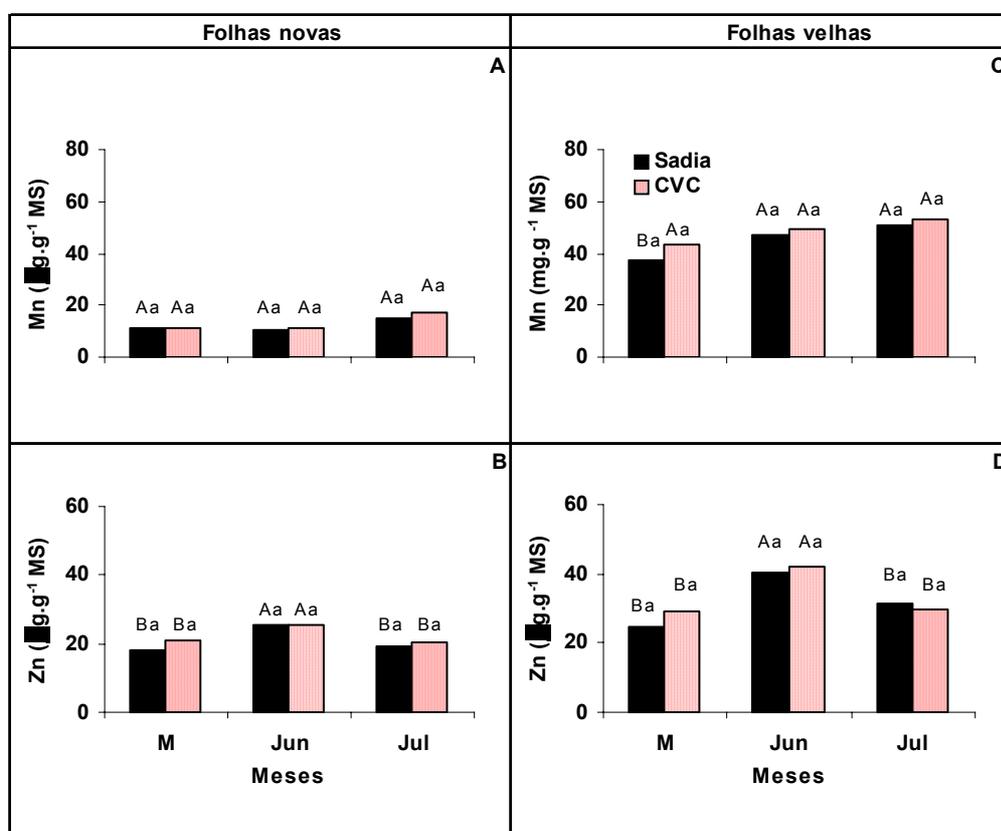


Figura 14. Teores de manganês (Mn) e zinco (Zn) em folhas de laranjeiras 'Pêra' saudias e com Clorose Variiegada dos Citros (CVC), durante o período de indução floral (maio – M, junho – Jun, e julho - Jul). Médias com as mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade. Letras maiúsculas referem-se aos testes comparativos entre meses para cada tratamento e letras minúsculas aos testes comparativos entre plantas para cada mês de avaliação.

5.2. FLORAÇÃO E FRUTIFICAÇÃO

5.2.1. AÇÚCARES

No início da floração, agosto, mês em que ocorre normalmente a máxima produção de órgãos florais como botões florais e flores, verificou-se em geral, a ocorrência dos menores teores de todos os açúcares em comparação com os outros meses, tanto nas folhas das plantas sadias como nas com CVC (Figura 15). À medida que as plantas atingiram seu pleno desenvolvimento floral, no mês de setembro, as concentrações dos açúcares nas folhas aumentaram. Em outubro, verificaram-se tendências diferentes entre as concentrações foliares dos açúcares, os açúcares totais e redutores mantiveram-se relativamente constantes nas folhas das plantas com CVC enquanto que, nas folhas das plantas sadias os açúcares totais apresentaram aumento e os redutores mantiveram-se constantes (Figura 15A e 15B). Neste mesmo mês, os teores de sacarose aumentaram nas folhas plantas sadias, e naquelas com CVC (Figura 15C). Já os teores de amido na folhas das plantas sadias mantiveram-se constantes em outubro enquanto que, as plantas com CVC apresentaram tendência de queda (Figura 15D).

Em geral, quando se compararam os teores de açúcares entre os tratamentos, tanto para os açúcares solúveis como para o amido, verificou-se que nos meses de setembro e outubro, meses em que provavelmente ocorre uma redução da demanda por carboidratos, as concentrações foliares foram iguais para os dois tratamentos (Figura 15), a única exceção ocorreu com os teores de sacarose que foram maiores nas folhas das plantas sadias. Todavia, em agosto, mês no qual normalmente ocorre uma grande demanda por açúcares as concentrações foliares foram maiores nas plantas doentes.

Nos ramos, de agosto a setembro, ocorreram aumentos gradativos dos teores de açúcares totais e redutores em plantas sadias e com CVC (figuras 16A e 16B). Porém no início

do desenvolvimento dos frutos, mês de outubro, verificou-se uma redução dos teores. Tendências semelhantes foram verificadas para o teor de sacarose nas plantas sadias (Figura 16C). Já nas plantas com CVC, o teor de sacarose manteve-se constante entre os meses de setembro e outubro (Figura 16C).

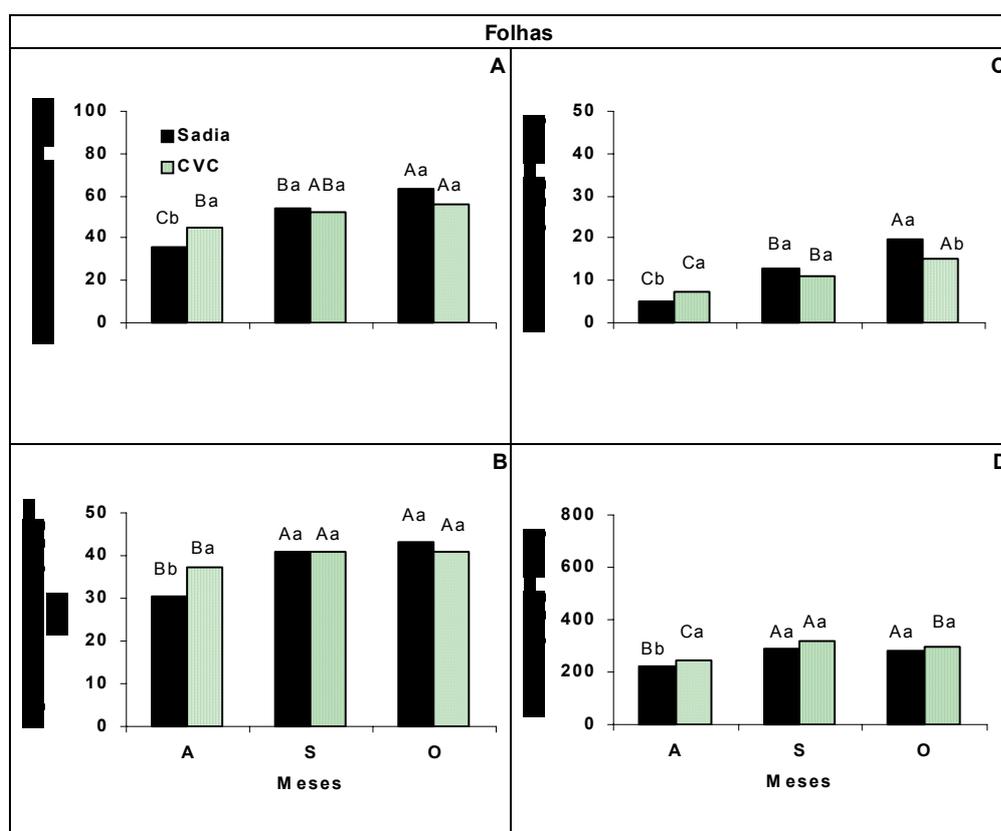


Figura 15. Teores de açúcares totais (A), redutores (B), sacarose (C) e amido (D) em folhas de laranjeiras ‘Pêra’ sadias e com Clorose Variegada dos Citros (CVC), durante o período de floração e frutificação (agosto - A, setembro - S e outubro - O). Médias com as mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade. Letras maiúsculas referem-se aos testes comparativos entre os meses para cada tratamento e letras minúsculas aos testes comparativos entre plantas para cada mês de avaliação.

Quando se fez comparações dos teores de açúcares totais, redutores e sacarose entre plantas, para cada mês, verificou-se que as plantas sadias apresentaram, no geral, maiores teores em comparação com as plantas com CVC (Figura 16A, 16B e 16C).

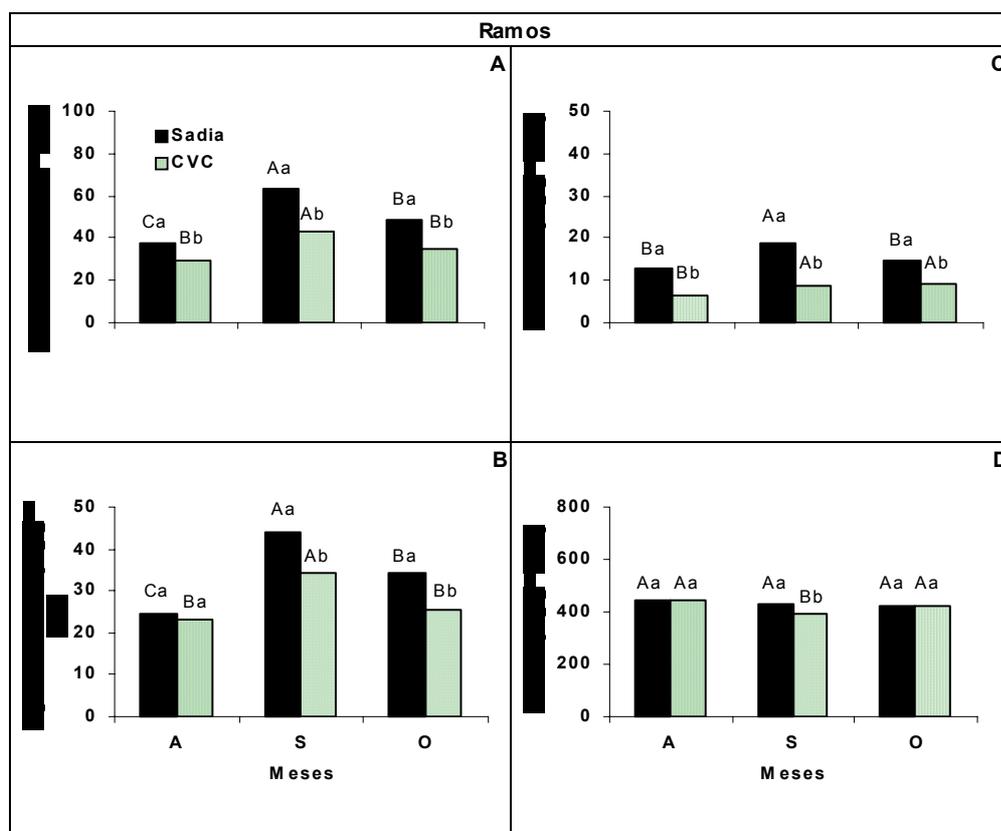


Figura 16. Teores de açúcares totais (A), redutores (B), sacarose (C) e amido (D) em ramos de laranjeiras ‘Pêra’ sadias e com Clorose Variegada dos Citros (CVC), durante o período de floração e frutificação (agosto - A, setembro - S e outubro - O). Médias com as mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade. Letras maiúsculas referem-se aos testes comparativos entre os meses para cada tratamento e letras minúsculas aos testes comparativos entre plantas para cada mês de avaliação.

Os teores de amido nos ramos (Figura 16D), mantiveram-se relativamente constantes durante todo o período de floração e início do período de frutificação. Somente no mês de setembro verificou-se uma redução das concentrações nas plantas doentes.

Nas raízes das plantas sadias e doentes os teores de açúcares solúveis totais e sacarose, aumentaram durante o estágio inicial de desenvolvimento dos frutos, ou seja, mês de outubro (Figura 17A e 17C), enquanto que os teores de açúcares redutores nas folhas das plantas sadias já estavam mais altos em setembro, nas plantas com CVC não houve variação ao longo dos meses (Figura 17B). Tendência diferente foi detectada para a concentração de amido que diminuiu no final do período de floração e início do desenvolvimento dos frutos (Figura 17D).

Na comparação dos teores de amido nas raízes das plantas doentes e sadias, verificou-se que a incidência da doença não causou nenhum problema quanto à sua estocagem e metabolismo pois, as concentrações não diferiram entre os tratamentos, para cada mês avaliado. Todavia, os outros açúcares apresentaram alternâncias de suas concentrações nas raízes, quando se fez comparações entre os tratamentos, para cada mês. Os açúcares totais e sacarose apresentaram diferenças significativas somente em outubro, enquanto que, os açúcares redutores apresentaram diferenças entre os tratamentos nos meses de agosto e setembro.

5.2.2. PRODUÇÃO DE BOTÕES FLORAIS, FLORES, INFLORESCÊNCIAS E BROTOS VEGETATIVOS

Nos primeiros dez dias do período de floração, a produção de botões florais foi praticamente igual entre plantas sadias e doentes (Figura 18A). Porém, neste mesmo período nas plantas sadias, o número de flores (Figura 18B), inflorescências (Figura 18C) e frutos (Figura 19A) foram maiores em relação às plantas doentes.

Durante os meses de agosto e setembro, período correspondente aos cinquenta dias de avaliação, as plantas dos dois tratamentos atingiram a máxima produção de órgãos reprodutivos e vegetativos (Figura 18 e 19).

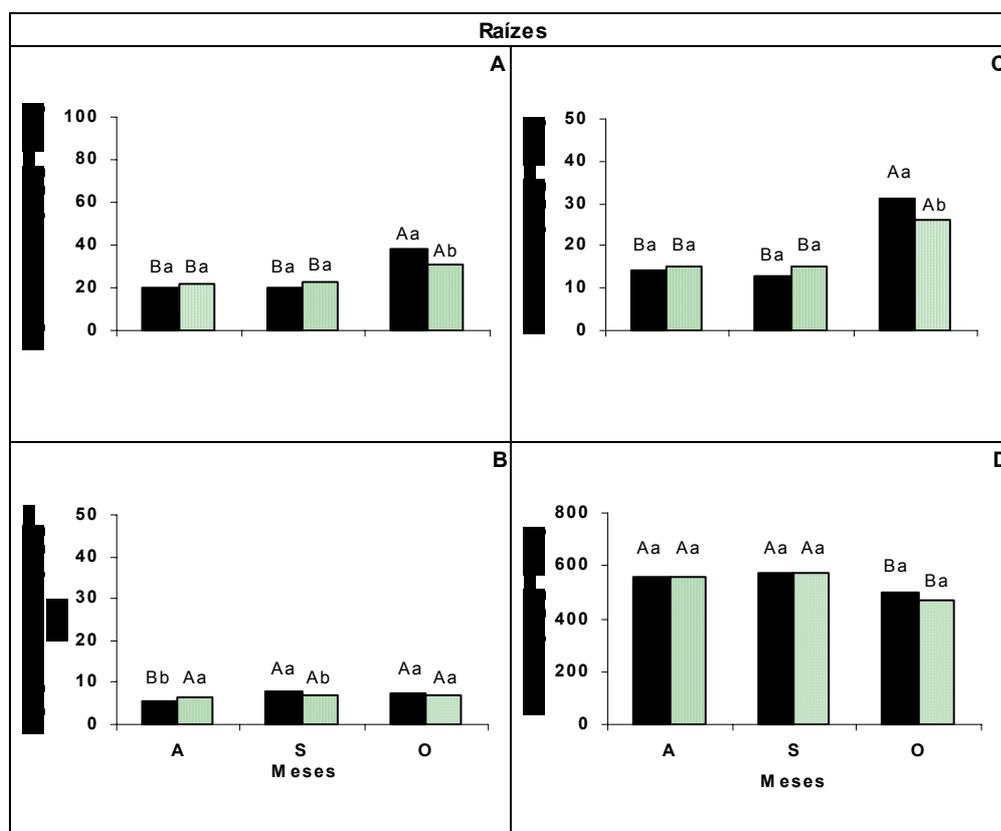


Figura 17. Teores de açúcares totais (A), redutores (B), sacarose (C) e amido (D) em raízes de laranjeiras ‘Pêra’ sadias e com Clorose Variegada dos Citros (CVC), durante o período de floração e frutificação (agosto - A, setembro - S e outubro - O). Médias com as mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade. Letras maiúsculas referem-se aos testes comparativos entre os meses para cada tratamento e letras minúsculas aos testes comparativos entre plantas para cada mês de avaliação.

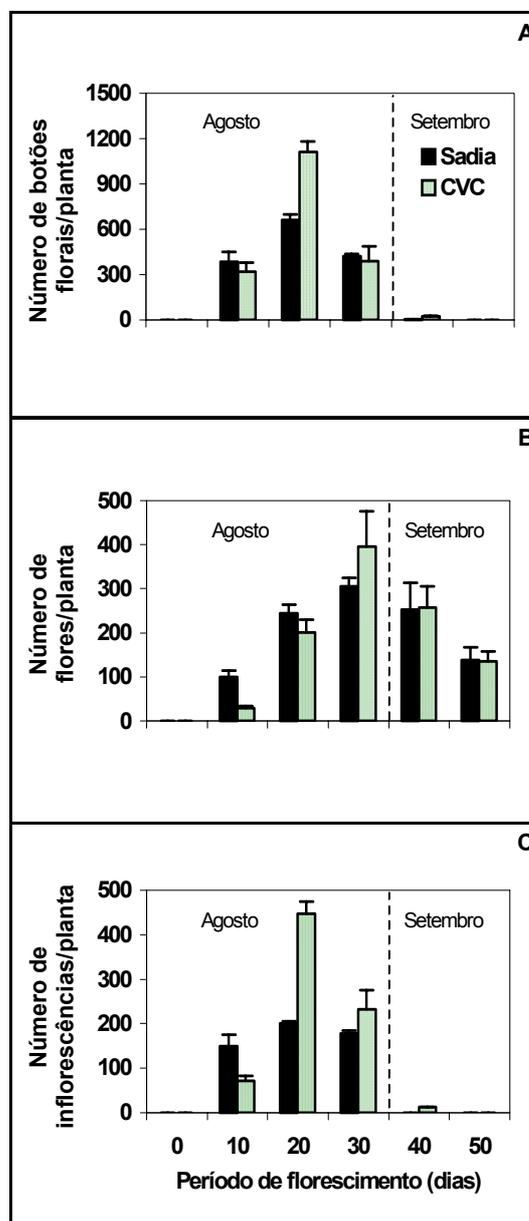


Figura 18. Quantidade de botões forais (A), flores (B) e inflorescências (C) em laranjeiras ‘Pêra’ sadias e com Clorose Variegado dos Citros (CVC), durante o período de floração. Os dados foram coletados entre os meses de agosto e setembro, começando a contagem a partir do décimo dia de agosto. As barras representam os erros padrão da média.

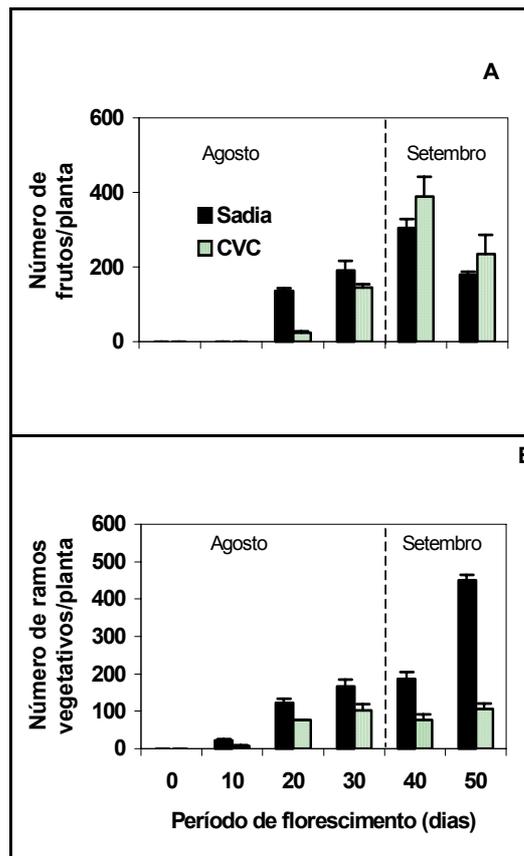


Figura 19. Quantidade de frutos (A) e ramos vegetativos (B) em laranjeiras ‘Pêra’ sadias e com Clorose Variegada dos Citros (CVC), durante o período de floração. Os dados foram coletados entre os meses de agosto e setembro, começando a contagem a partir do décimo dia de agosto. As barras representam os erros padrão da média.

Tanto nas plantas sadias como nas plantas com CVC, aos vinte dias do início do período de floração observou-se a produção máxima de botões florais e inflorescências, aos trinta dias a produção máxima de flores e aos quarenta dias a produção máxima de frutos (Figura 18 e 19). Por último, aos cinquenta dias a partir do início da floração observou-se a produção máxima de brotações vegetativas (Figura 19).

Ao final do período de avaliação da floração as plantas sadias apresentaram um índice percentual de abortamento floral de 54 %, enquanto que nas plantas com CVC o índice foi de 65 % (Figura 18B). Com relação a brotação de ramos vegetativos, as plantas sadias foi 76 % maior que nas plantas com CVC, ou seja, para cada ramo produzido pelas plantas doentes as plantas sadias produziram quatro (Figura 19B).

O percentual de fixação de frutos nas plantas sadias foi de 48 %, enquanto que nas plantas com CVC, este percentual foi de 61 % (Figura 19A).

Quando se particularizou e se comparou a produção máxima de órgão reprodutivos em plantas sadias e com CVC, durante o período de floração e frutificação, verificou-se que as plantas doentes apresentaram a maior produção de órgãos florais em comparação com as plantas sadias (Figura 20A, 20B, 20C e 21A). Todavia, quando se analisou a produção de órgãos vegetativos, verificou-se o inverso, ou seja, as plantas sadias com maior brotação vegetativa, enquanto que as plantas com CVC apresentaram baixa quantidade de brotos vegetativos produzidos (Figura 21 B).

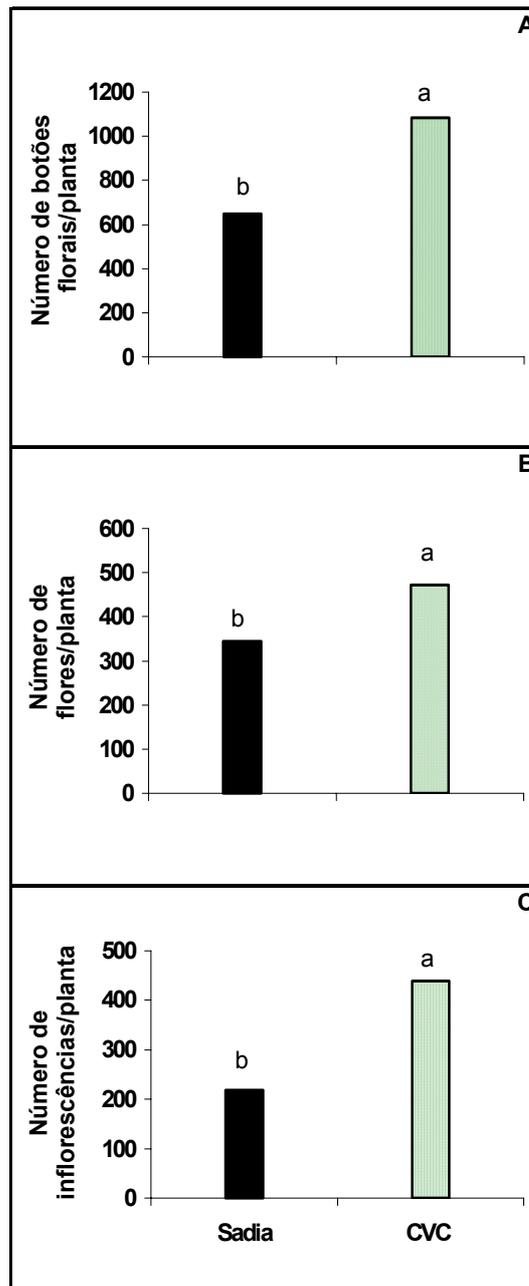


Figura 20. Picos máximos de produção de órgãos florais em laranjeiras ‘Pêra’ sadias e com Clorose Variegada dos Citros (CVC), obtidos a partir do início do período de floração e frutificação, aos 20 dias para botões florais (A), aos 30 dias para flores (B) e aos quarenta dias para frutos (C). As médias que apresentarem as mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade.

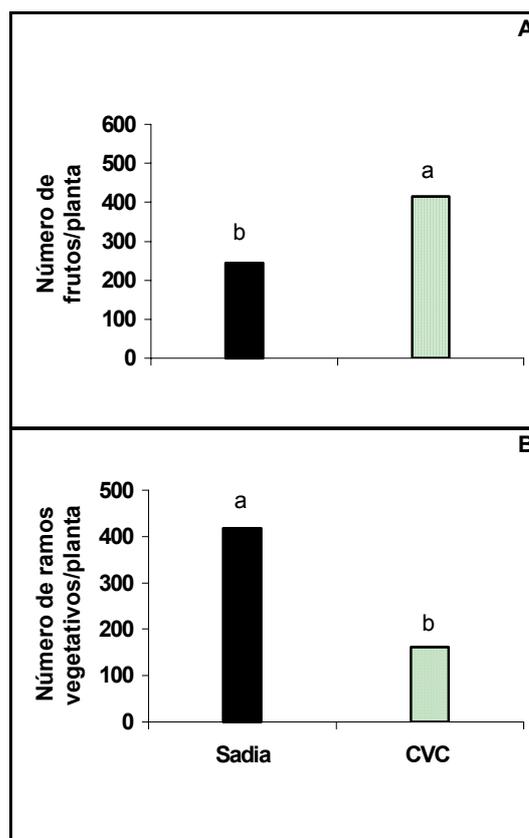


Figura 21. Picos máximos de produção de órgãos florais e vegetativos em laranjeiras ‘Pêra’ sadias e com Clorose Variegada dos Citros (CVC), obtidos a partir do início do período de floração e frutificação, aos 20 dias para inflorescências (A), aos 50 dias para ramos vegetativos (B). As médias que apresentarem as mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade.

4.2.3. TROCAS GASOSAS

Ao longo dos meses, durante o período de floração e de início de frutificação, verificou-se que as taxas de fotossíntese foram sempre superiores nas plantas sadias em relação às plantas com Clorose Variegada dos Citros (Figura de 22 a 28). Além da fotossíntese, vários fatores reguladores da atividade fotossintética como concentração interna de CO_2 (Ci), condutância estomática (g_s) e transpiração, também, no geral, apresentaram

atividades superiores em plantas sadias (Figuras 22 a 28). Entretanto, quando as plantas sadias não apresentaram resultados superiores aos das plantas com CVC, no mínimo a eficiência nos processos que determinam as trocas gasosas foram iguais entre os dois tratamentos, apenas em setembro foi que se verificou nos horários das 9:00 e 15:00 valores maiores para a concentração interna de CO₂ nas plantas doentes.

Analisando as figuras 22 a 28, verificou-se após o mês de setembro, alterações significativas dos parâmetros determinantes das taxas fotossintéticas como transpiração e condutância estomática. Em alguns casos, verificou-se uma tendência uniforme, em outros as projeções alteraram-se sensivelmente, ou seja, se a tendência era de aumento, após setembro, a tendência passou a ser de queda.

Após o horário das 10:00 os dados mostraram que a taxa de fotossíntese manteve-se relativamente constante e mais alta, nos meses de agosto e setembro, épocas de máxima produção de flores (Figuras 24 a 28). Neste dois meses praticamente não se verificou diferenças significativas entre as taxas fotossintéticas para os dois tratamentos (Figuras 22 a 28).

Em setembro e outubro, nos horários entre 10:0 e 14:00 horas, quando as plantas passaram da fase de florescimento para a fase de desenvolvimento inicial dos frutos, verificou-se uma tendência de queda dos parâmetros que determinaram as trocas gasosas, ou seja, quedas da concentração interna de CO₂, transpiração e condutância estomática (Figura de 23 a 28).

Entre os meses de agosto a outubro, observou-se que ocorreu um aumento da radiação solar incidente sobre as plantas cultivadas na casa de vegetação. Esse aumento da radiação provavelmente deve ter contribuído para o aumento da temperatura em mais ou menos 2 °C (Figura 29A e 29B).

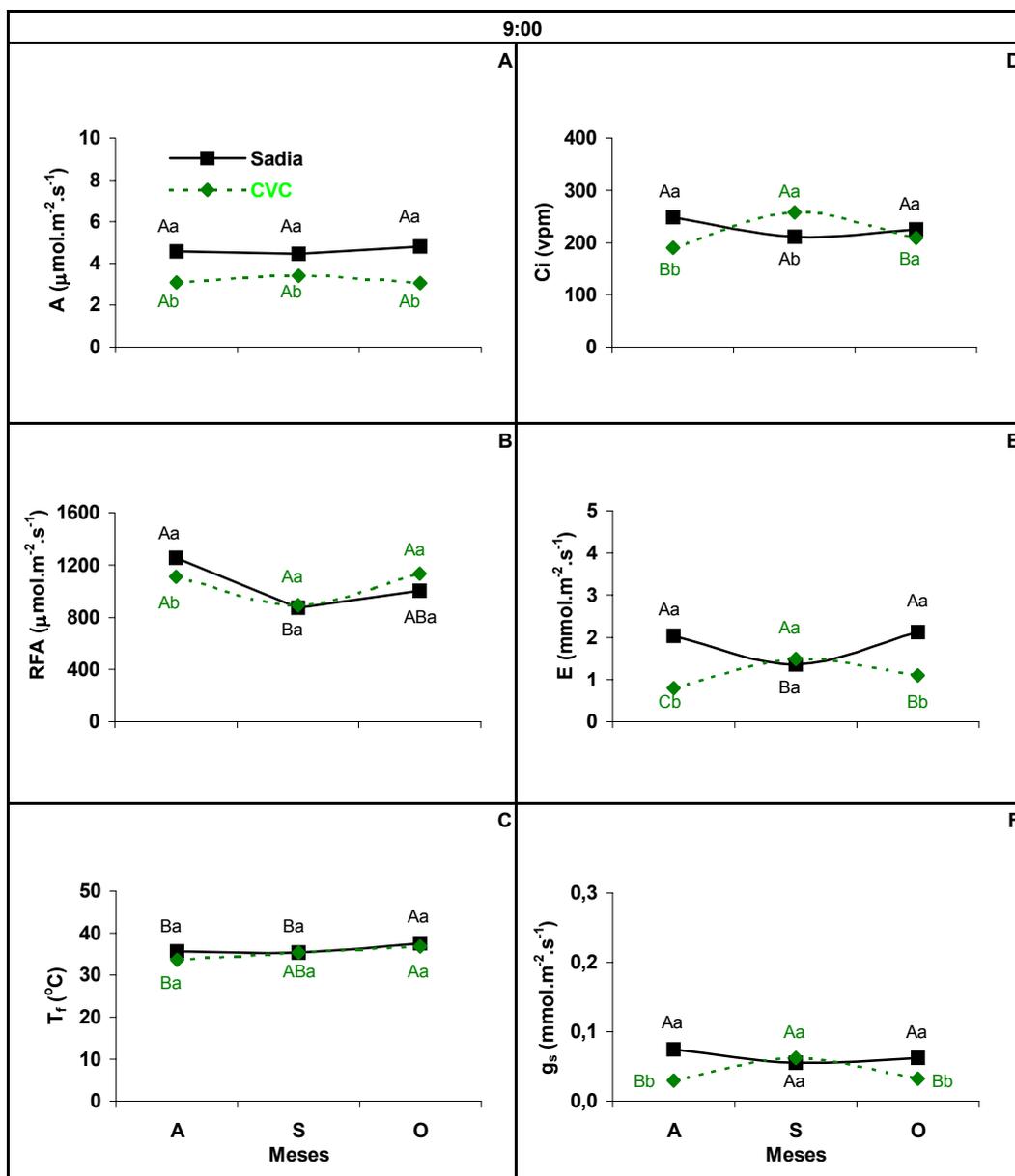


Figura 22. Taxa de assimilação de CO_2 (A), radiação fotossinteticamente ativa (RFA), temperatura foliar (T_f), concentração interna de CO_2 (Ci), transpiração (E) e condutância estomática (g_s) em laranjeiras ‘Pêra’ sadias e com Clorose Variegada dos Citros (CVC), durante o período de floração e frutificação (agosto - A, setembro - S e Outubro - O). Médias com as mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade. Letras maiúsculas referem-se aos testes comparativos entre os meses para cada tratamento e letras minúsculas aos testes comparativos entre plantas para cada mês de avaliação.

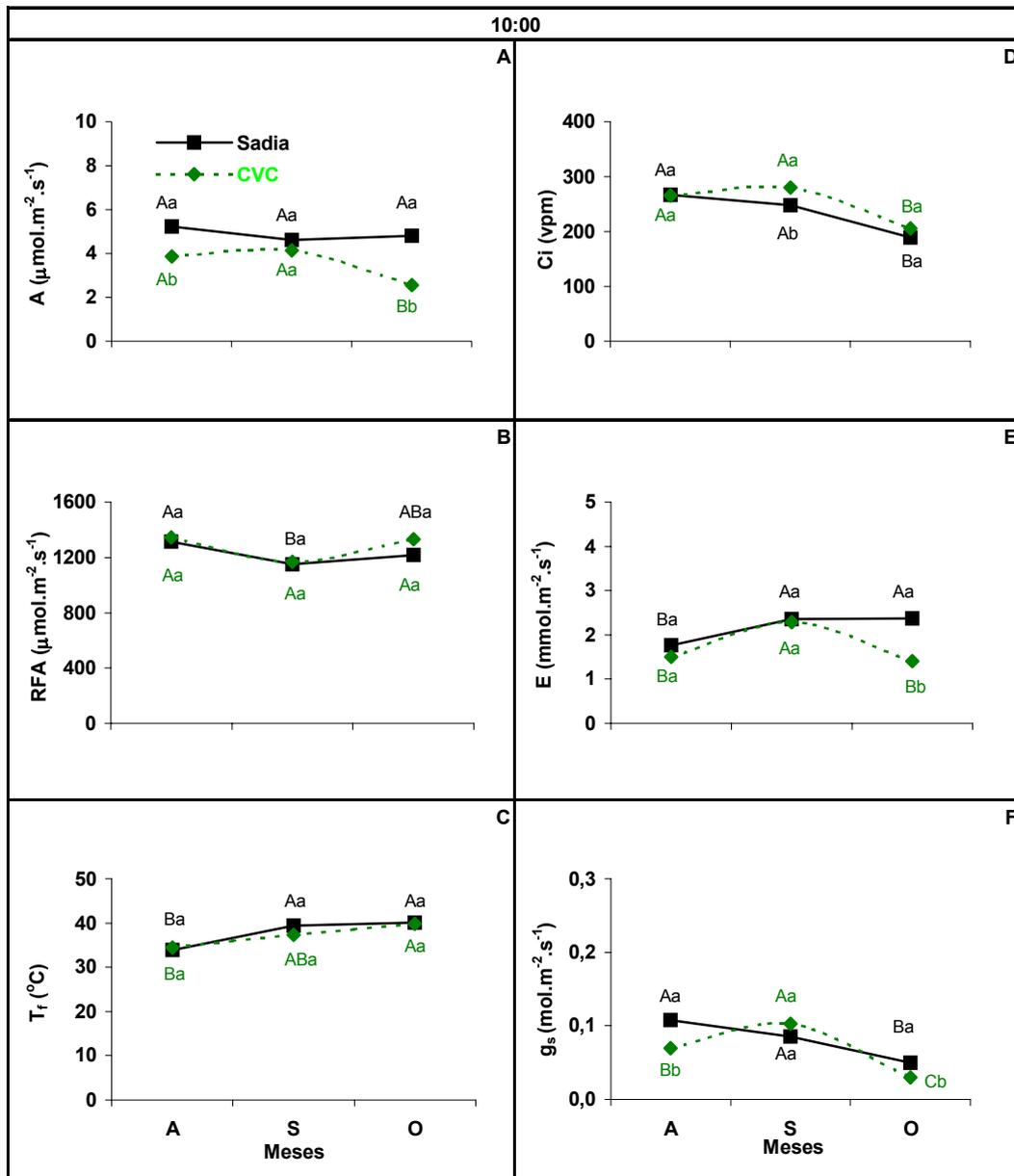


Figura 23. Taxa de assimilação de CO_2 (A), radiação fotossinteticamente ativa (RFA), temperatura foliar (T_f), concentração interna de CO_2 (Ci), transpiração (E) e condutância estomática (g_s) em laranjeiras ‘Pêra’ sadias e com clorose variegada dos citros (CVC), durante o período de floração e frutificação (agosto - A, setembro - S e Outubro - O). Médias com as mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5 % de probabilidade. Letras maiúsculas referem-se aos testes comparativos entre os meses para cada tratamento e letras minúsculas aos testes comparativos entre plantas para cada mês de avaliação.

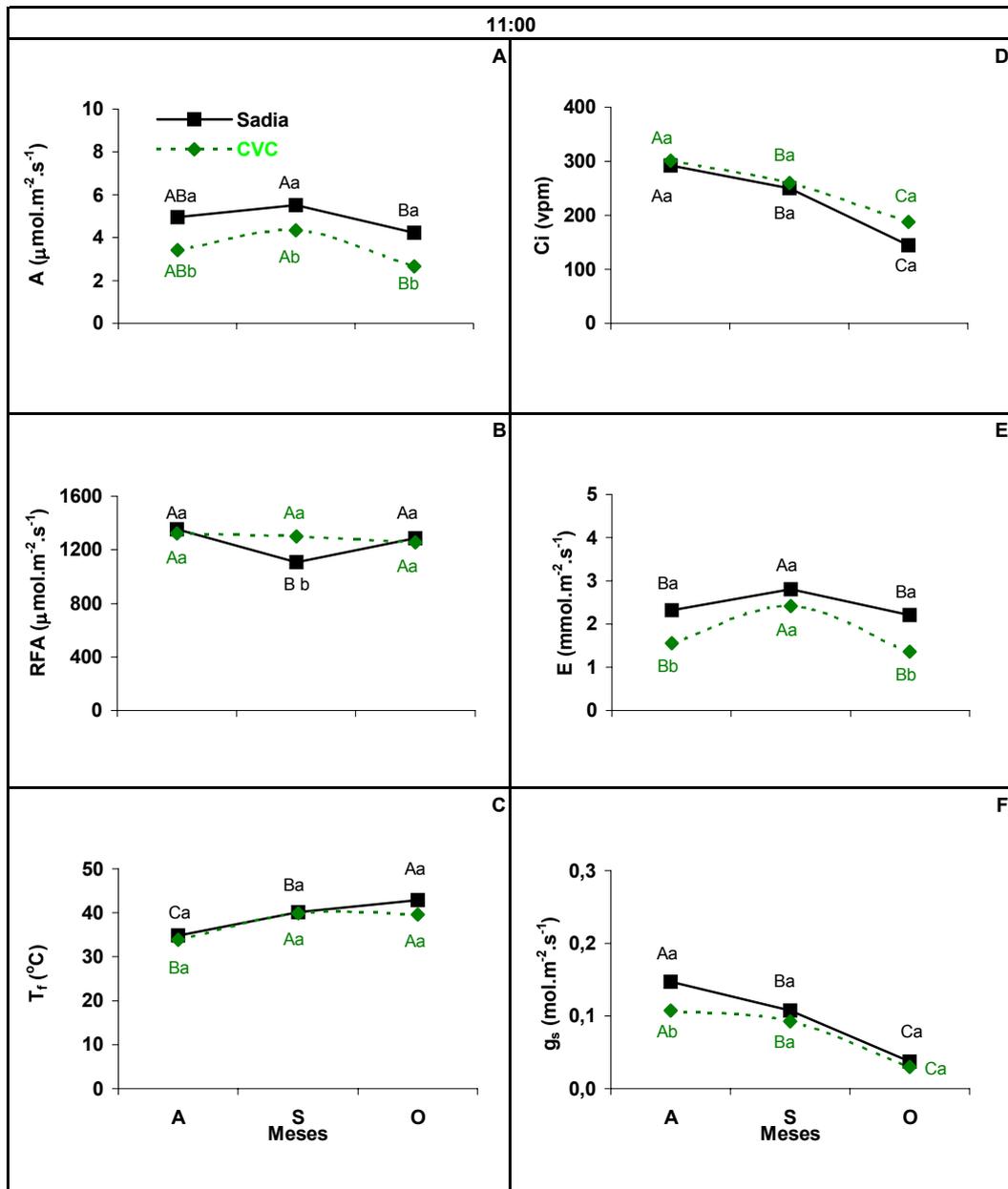


Figura 24. Taxa de assimilação de CO_2 (A), radiação fotossinteticamente ativa (RFA), temperatura foliar (T_f), concentração interna de CO_2 (C_i), transpiração (E) e condutância estomática (g_s) em laranjeiras ‘Pêra’ sadias e com clorose variegada dos citros (CVC), durante o período de floração e frutificação (agosto - A, setembro - S e Outubro - O). Médias com as mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5 % de probabilidade. Letras maiúsculas referem-se aos testes comparativos entre os meses para cada tratamento e letras minúsculas aos testes comparativos entre plantas para cada mês de avaliação.

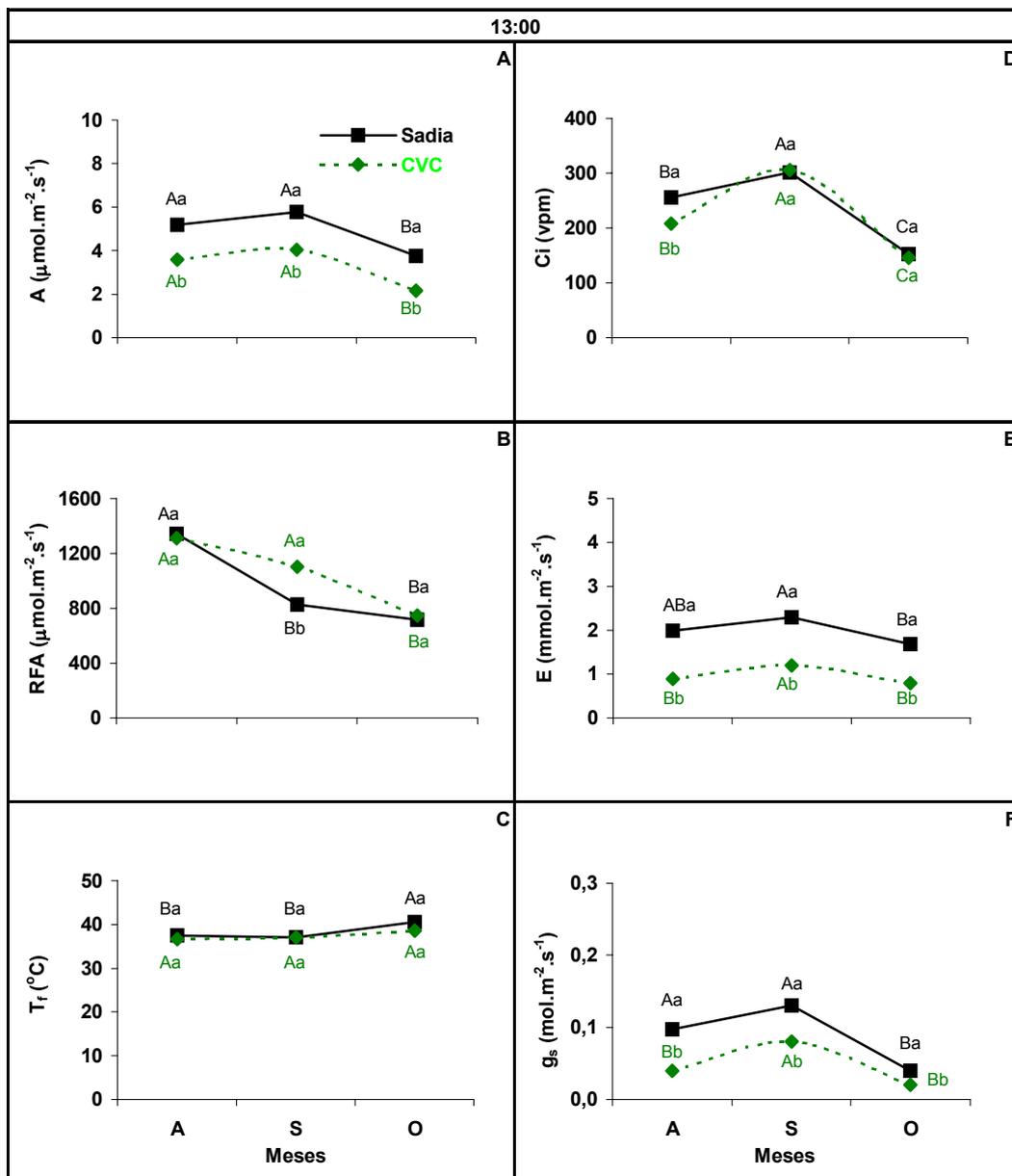


Figura 25. Taxa de assimilação de CO_2 (A), radiação fotossinteticamente ativa (RFA), temperatura foliar (T_f), concentração interna de CO_2 (Ci), transpiração (E) e condutância estomática (g_s) em laranjeiras ‘Pêra’ sadias e com clorose variegada dos citros (CVC), durante o período de floração e frutificação (agosto - A, setembro - S e Outubro - O). Médias com as mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5 % de probabilidade. Letras maiúsculas referem-se aos testes comparativos entre os meses para cada tratamento e letras minúsculas aos testes comparativos entre plantas para cada mês de avaliação.

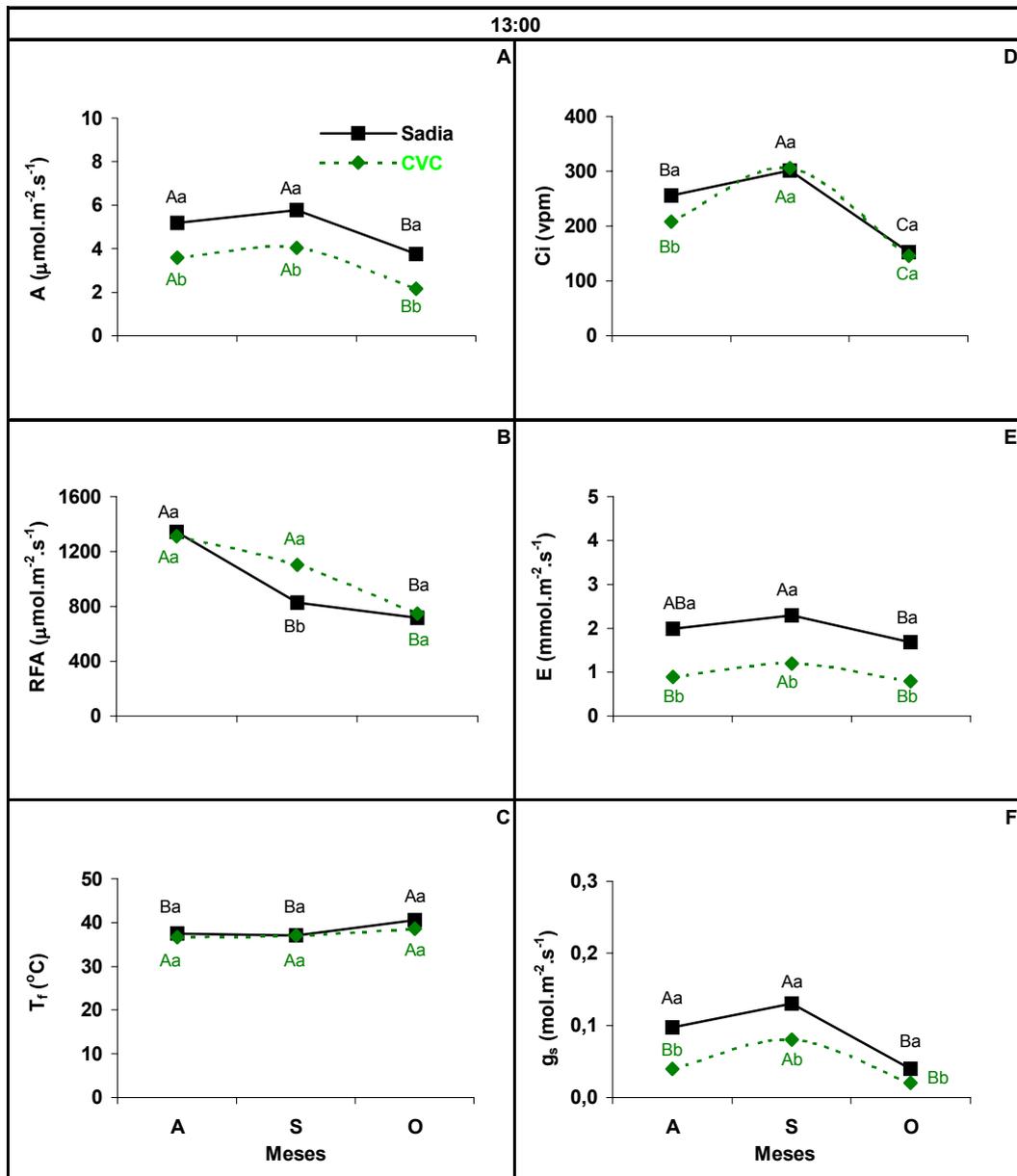


Figura 26. Taxa de assimilação de CO_2 (A), radiação fotossinteticamente ativa (RFA), temperatura foliar (T_f), concentração interna de CO_2 (Ci), transpiração (E) e condutância estomática (g_s) em laranjeiras ‘Pêra’ sadias e com clorose variegada dos citros (CVC), durante o período de floração e frutificação (agosto - A, setembro - S e Outubro - O). Médias com as mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5 % de probabilidade. Letras maiúsculas referem-se aos testes comparativos entre os meses para cada tratamento e letras minúsculas aos testes comparativos entre plantas para cada mês de avaliação.

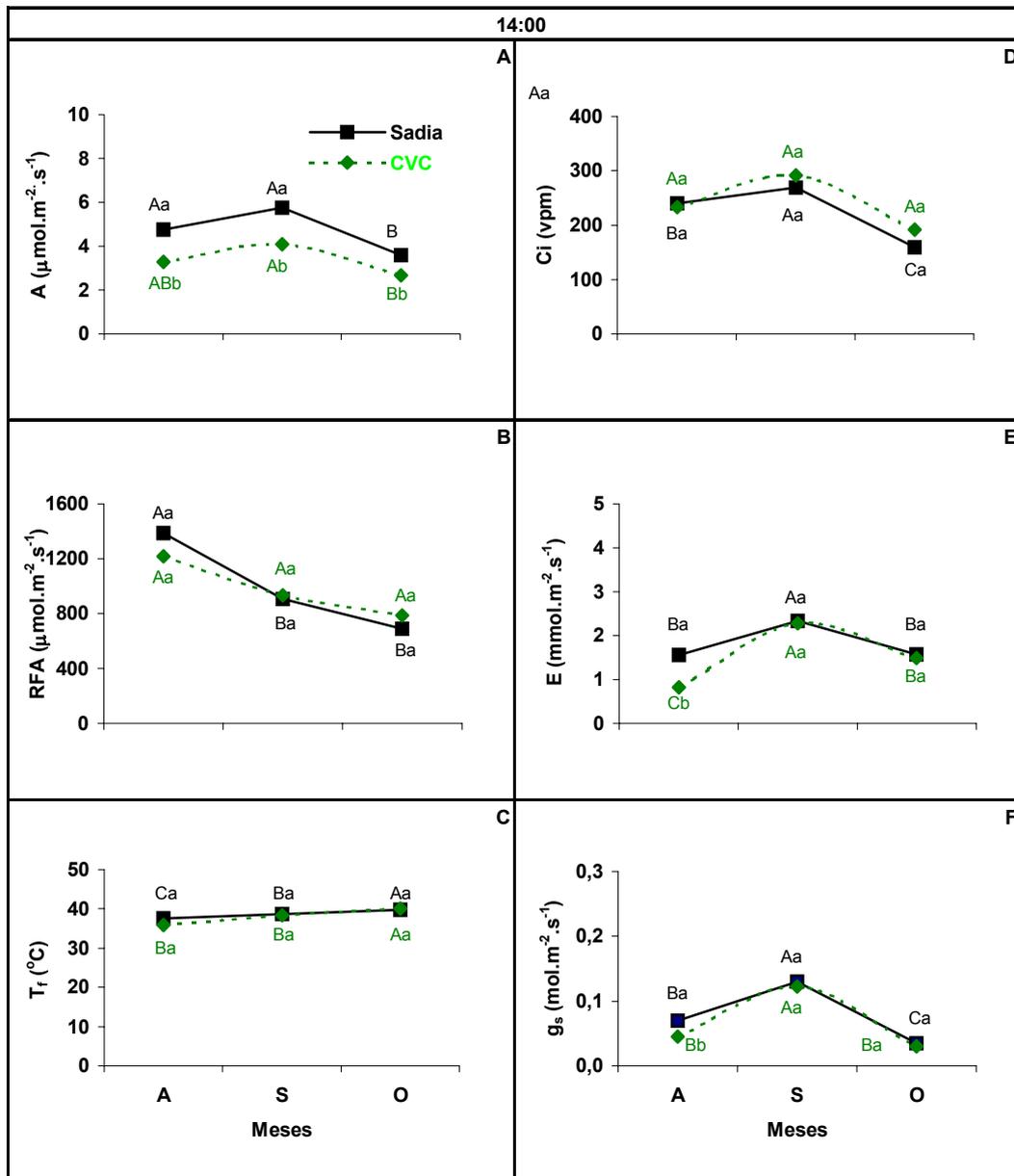


Figura 27. Taxa de assimilação de CO_2 (A), radiação fotossinteticamente ativa (RFA), temperatura foliar (T_f), concentração interna de CO_2 (C_i), transpiração (E) e condutância estomática (g_s) em laranjeiras ‘Pêra’ sadias e com clorose variegada dos citros CVC. Médias com as mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5 % de probabilidade. Letras maiúsculas referem-se aos testes comparativos entre os meses para cada tratamento e letras minúsculas aos testes comparativos entre plantas para cada mês de avaliação.

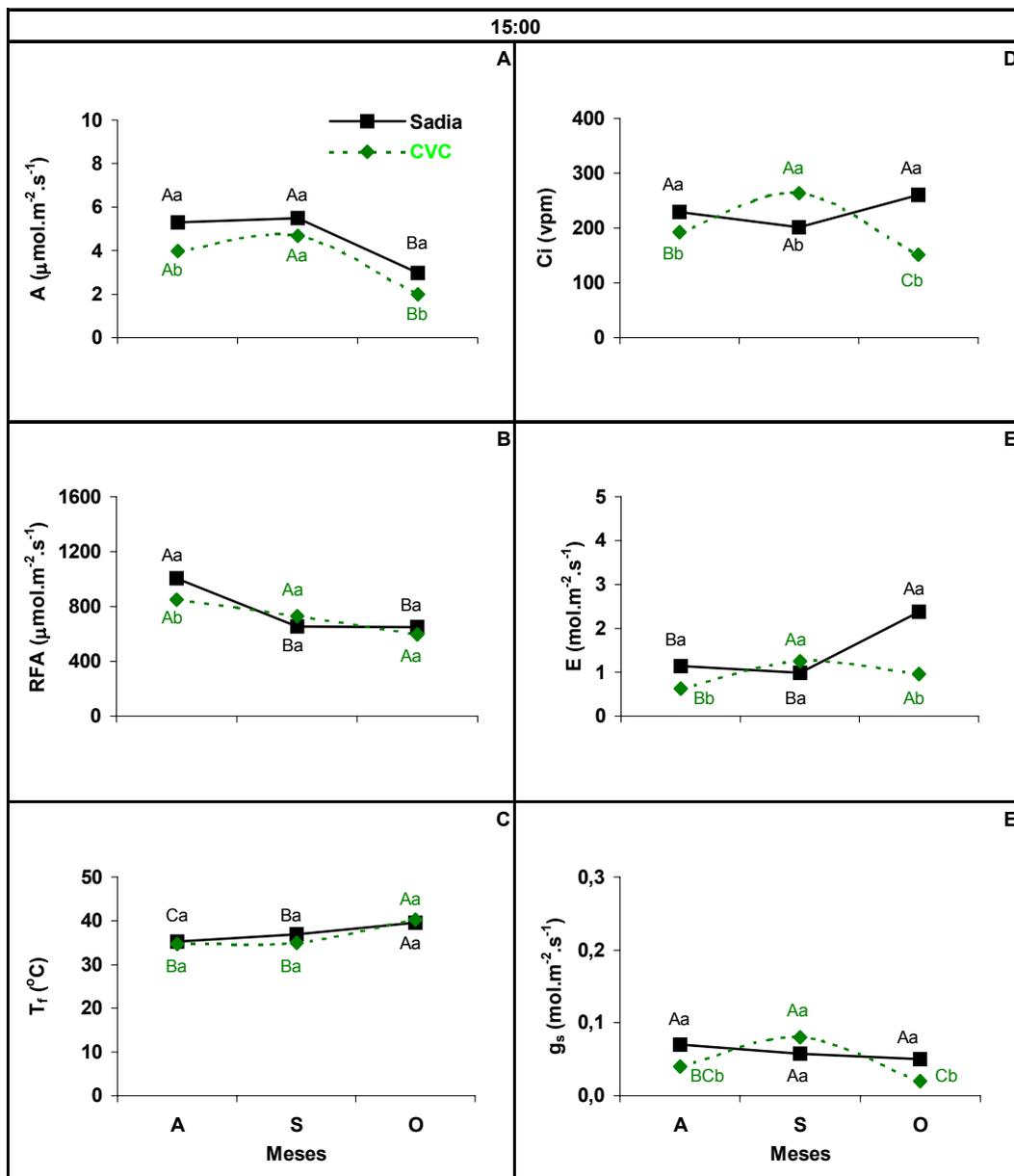


Figura 28. Taxa de assimilação de CO_2 (**A**), radiação fotossinteticamente ativa (**RFA**), temperatura foliar (**T_f**), concentração interna de CO_2 (**C_i**), transpiração (**E**) e condutância estomática (**g_s**) em laranjeiras ‘Pêra’ sadias e com clorose variegada dos citros (CVC), durante o período de floração e frutificação (agosto - **A**, setembro - **S** e Outubro - **O**). Médias com as mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5 % de probabilidade. Letras maiúsculas referem-se aos testes comparativos entre os meses para cada tratamento e letras minúsculas aos testes comparativos entre plantas para cada mês de avaliação.

Em outubro, mês em que praticamente não se verifica nenhuma presença de flores e botões florais, as taxas de assimilação de CO₂, a transpiração e a condutância estomática atingiram os menores índices, principalmente entre 10:00 e 14:00 h.

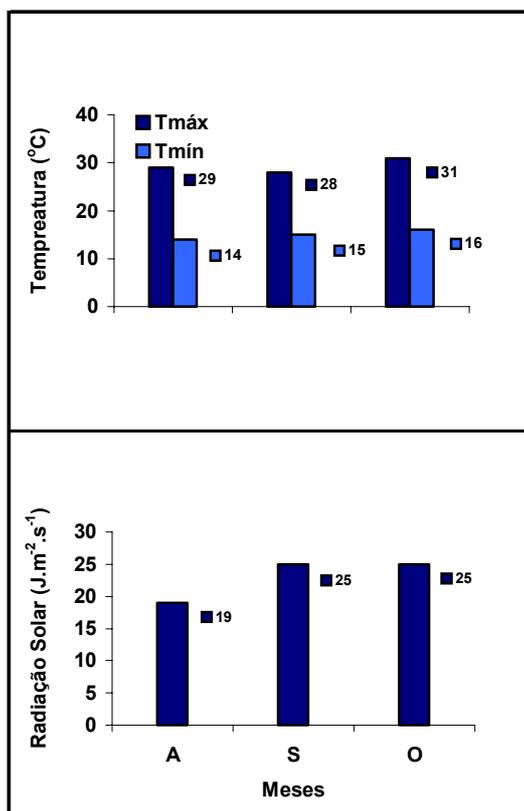


Figura 29. Variação da radiação solar incidente e da temperatura do ar na casa de vegetação durante o período de floração e frutificação de laranjeiras ‘Pêra’.

5.2.4. MACRONUTRIENTES

Em setembro e outubro, durante o período de floração, nas folhas novas das plantas sadias, os teores de nitrogênio atingiram seus valores máximos. Entretanto, nas plantas com CVC, foram encontrados os menores teores de nitrogênio em setembro (Figura 30A).

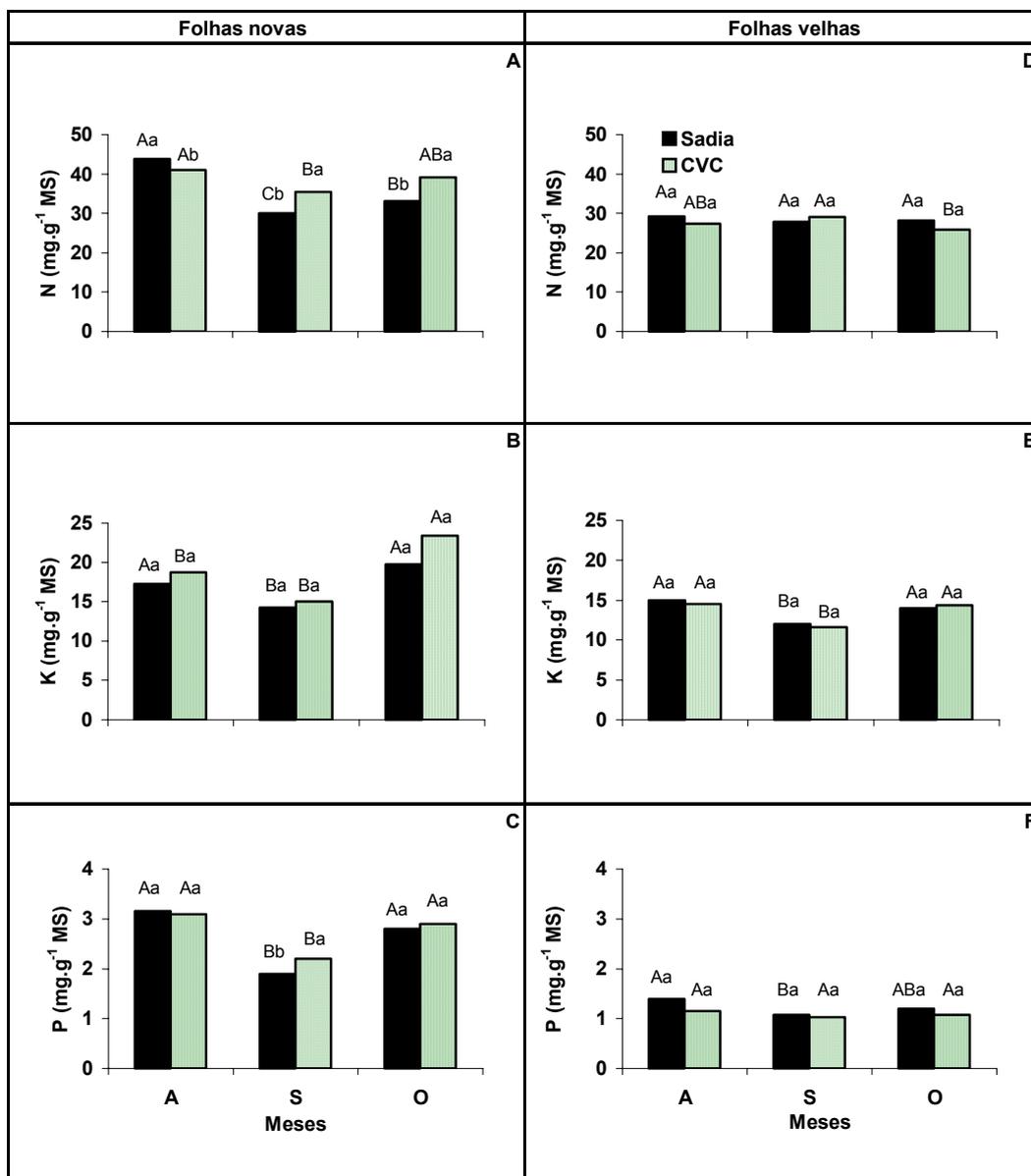


Figura 30. Teores de nitrogênio (N), potássio (K) e fósforo (P) em folhas de laranjeiras ‘Pêra’ sadias e com Clorose Variegada dos Citros (CVC), durante o período de floração e frutificação (agosto - A, setembro - S e Outubro - O). Médias com as mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade. Letras maiúsculas referem-se aos testes comparativos entre meses para cada tratamento e letras minúsculas aos testes comparativos entre plantas para cada mês de avaliação.

Os teores foliares de nitrogênio ao longo dos meses mantiveram-se constantes nas folhas velhas das plantas sadias e nas folhas infectadas com CVC os teores apresentaram queda em outubro em comparação com o mês de setembro (Figura 30D).

Quando se fez comparações dos teores de nitrogênio nas folhas novas, entre laranjeiras sadias e com CVC, para cada mês, verificou-se que em agosto os teores foram maiores nas folhas das plantas sadias, ocorrendo o inverso em setembro e outubro.

Os dados mostraram que a incidência da doença não afetou concentração foliar de nitrogênio nas folhas velhas uma vez que não se constataram diferenças significativas entre os dois tratamentos (Figura 30D).

Em outubro foram encontrados os maiores teores de potássio nas folhas novas das plantas de laranjeiras, com percentual superior em relação a setembro de 28 % nas plantas sadias e de 36 % nas plantas com CVC (Figura 30B). Para cada mês de avaliação não foram verificadas diferenças significativas entre plantas sadias e doentes.

Com relação aos teores de potássio nas folhas velhas das plantas sadias e doentes foram verificadas quedas em setembro, com conseqüente aumento no mês seguinte (Figura 30E). Semelhante ao que aconteceu nas folhas novas, nos meses de agosto a setembro não foram verificadas diferenças significativas entre os tratamentos.

Com relação aos teores de fósforo nas folhas novas, os resultados mostraram que em setembro, foram encontradas as menores concentrações para os dois tratamentos, quando comparados com os meses de agosto e outubro. Quando se fez comparações entre plantas sadias e doentes, foram observadas apenas no mês de setembro diferenças significativas (Figura 30 C).

Os teores de fósforo nas folhas velhas das plantas com CVC foram iguais ao longo dos meses, ao passo que, nas plantas sadias as concentrações foliares caíram em setembro (Figura

30F). Quando se fez comparações entre os tratamentos, em cada mês, não se verificaram diferenças significativas.

Ao longo dos meses, os teores de cálcio não se alteraram nas folhas novas das plantas sadias, porém nas folhas novas das plantas doentes ocorreram quedas no final do período florescimento e frutificação (Figura 31A). A incidência da CVC parece não afetar os teores de cálcio nas folhas novas pois, não ocorreram diferenças significativas quando se compararam os tratamentos em cada mês de avaliação (Figura 31 A).

Durante todos os meses que compreenderam a fase experimental, somente em outubro, foi que se verificou aumento dos teores de cálcio nas folhas velhas para os dois tratamentos (Figura 31C). Quando foram feitas comparações entre os teores de cálcio nas folhas velhas das plantas sadias com os das plantas com CVC, para cada mês, apenas em outubro foi que se detectou diferenças significativas entre os dois tratamentos (Figura 31C).

Os teores de magnésio tanto nas folhas novas das plantas sadias como nas folhas novas das plantas doentes aumentaram significativamente no mês de outubro (Figura 31B). Todavia, quando as concentrações foliares foram comparadas em cada mês apenas em setembro os teores de magnésio foram maiores nas folhas novas das plantas doentes (Figura 31B).

Os dados apresentados neste trabalho mostraram que, em agosto, mês em que as plantas estavam em plena produção e crescimento dos órgãos florais, ocorreram as menores concentrações de magnésio nas folhas velhas das plantas sadias e doentes (Figura 31D).

Ao longo dos meses, durante o período de floração e frutificação, verificaram-se aumentos gradativos dos teores de magnésio nas folhas velhas das plantas sadias e doentes, atingindo as maiores concentrações em outubro. Entretanto, apenas em outubro foram verificadas diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 31D).

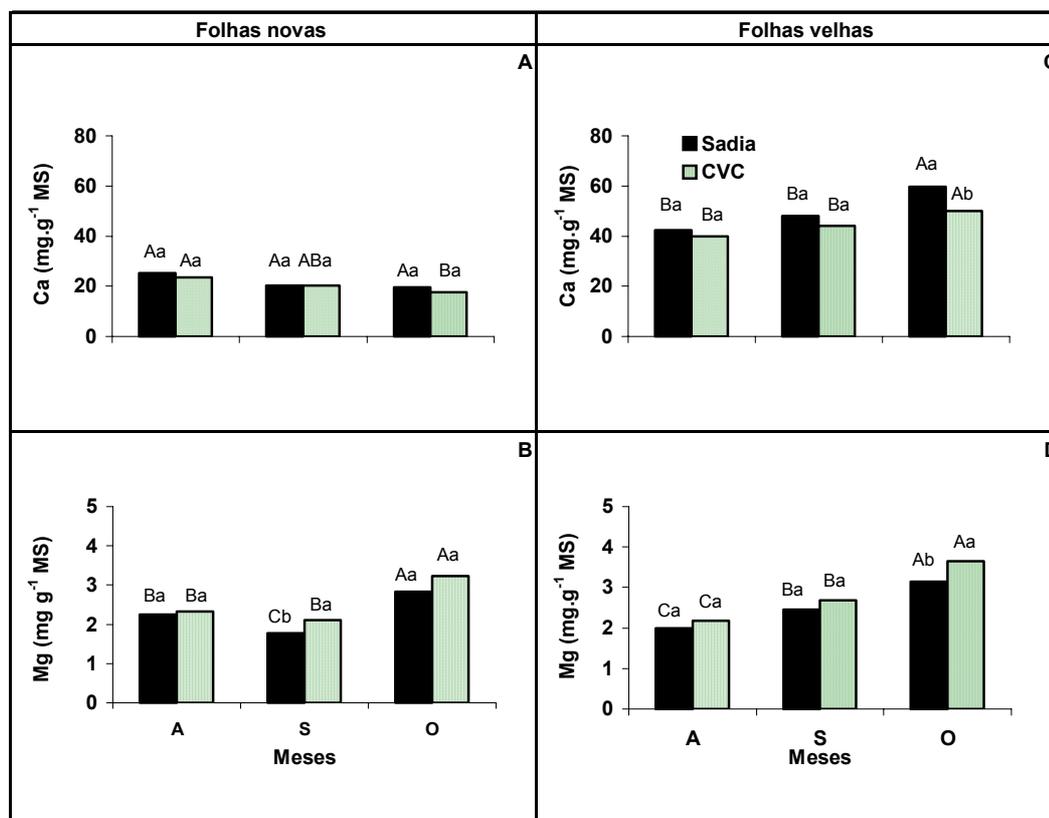


Figura 31. Teores de cálcio (Ca) e magnésio (Mg) em folhas de laranjeiras ‘Pêra’ sadias e com Clorose Variegada dos Citros (CVC), durante o período de floração e frutificação (agosto - A, setembro - S e Outubro - O). Médias com as mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade. Letras maiúsculas referem-se aos testes comparativos entre meses para cada tratamento e letras minúsculas aos testes comparativos entre plantas para cada mês de avaliação.

5.2.5. MICRONUTRIENTES

Nas folhas novas das plantas doentes e sadias observou-se queda nos teores de boro no mês de setembro e aumento dos teores no mês seguinte (Figura 32A). Em agosto, quando se compararam plantas sadias e doentes, verificou-se que os teores de boro foram superiores nas plantas sadias, enquanto que, nos outros meses, os teores nas folhas das plantas sadias foram inferiores ao das plantas doentes (Figura 32A).

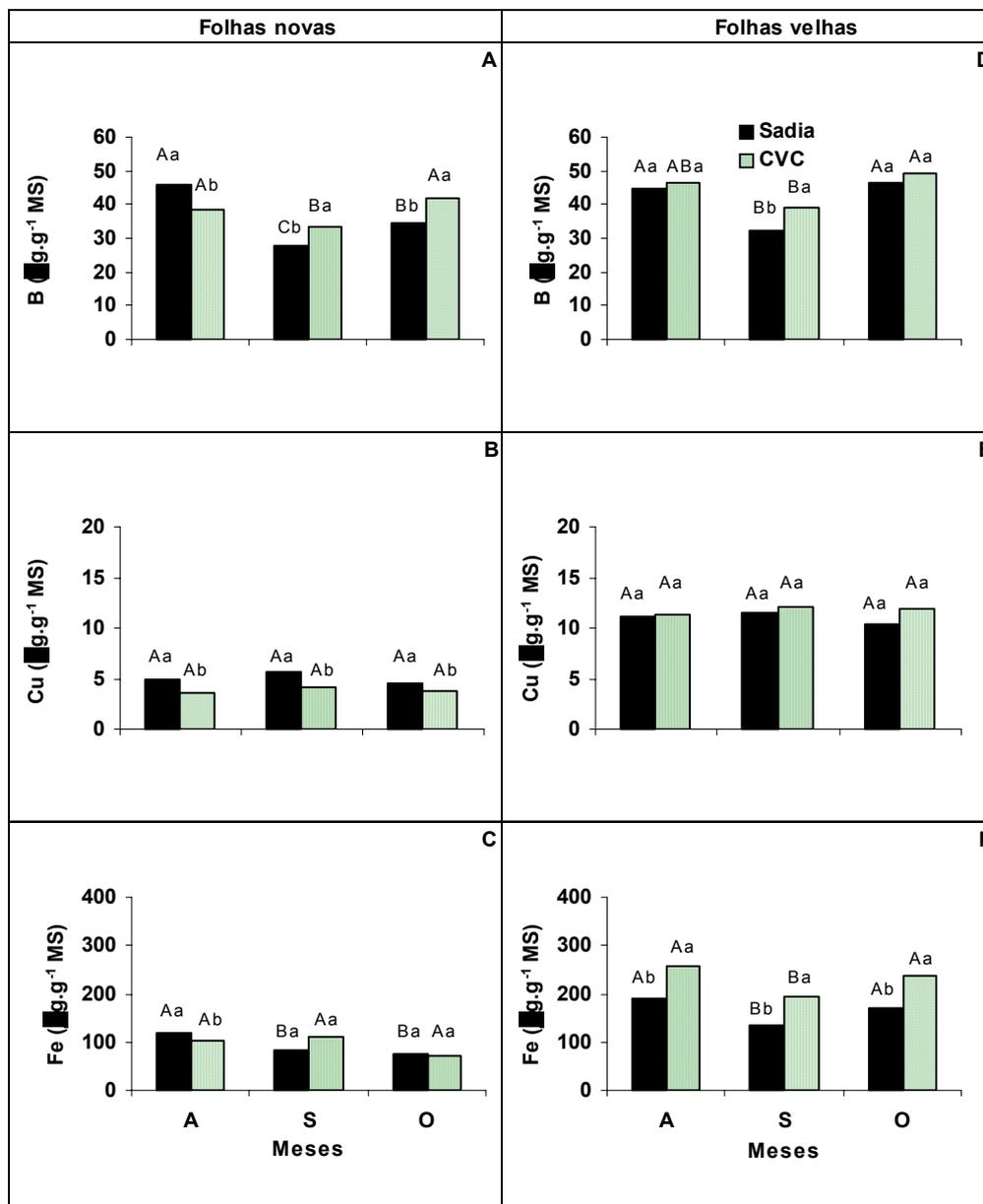


Figura 32. Teores de boro (**B**), Cobre (**Cu**) e ferro (**Fe**) em folhas de laranjeiras ‘Pêra’ sadias e com Clorose Variiegada dos Citros (CVC), durante o período de floração e frutificação (agosto - **A**, setembro - **S** e Outubro - **O**). Médias com as mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade. Letras maiúsculas referem-se aos testes comparativos entre meses para cada tratamento e letras minúsculas aos testes comparativos entre plantas para cada mês de avaliação.

Os teores de boro nas folhas velhas das plantas sadias diminuíram em setembro, final do período de floração, aumentando no mês seguinte, início do desenvolvimento do fruto (Figura 32D). Nas plantas doentes verificou-se que os teores foliares de boro mantiveram-se constantes entre os meses de agosto e setembro, aumentando de setembro a outubro.

Em agosto e outubro, quando foram comparados os teores de boro nas folhas velhas, entre plantas sadias e doentes, constatou-se que não ocorreram diferenças significativas, embora no mês de setembro os teores nas folhas velhas das plantas doentes tenham sido maiores que nas plantas sadias (Figura 32D).

Os teores de cobre nas folhas novas das plantas sadias foram sempre maiores em relação às folhas das plantas doentes. Ao longo dos meses, verificou-se que os teores de cobre foram mantidos constantes (Figura 32B).

Com relação à concentração de cobre nas folhas velhas de laranjeiras, verificou-se que os teores mantiveram-se constantes ao longo dos meses, tanto em plantas sadias como em plantas doentes. Quando se comparou os teores de cobre nas plantas sadias com os teores das plantas doentes, em cada mês, não se constataram diferenças significativas entre os mesmos (Figura 32E).

Nas folhas novas das plantas doentes, ao longo dos meses, os teores de ferro mantiveram-se constantes, já nas folhas novas das plantas sadias constatou-se uma tendência de queda a partir de agosto. Os dados apresentados neste trabalho mostraram que apenas no mês de agosto, foi constatada a existência de diferenças significativas entre os tratamentos, mostrando que os teores de ferro foram maiores nas folhas novas das plantas sadias (Figura 32C).

Com relação aos teores de ferro nas folhas velhas, quando se fez comparações entre plantas, verificou-se que os teores desse elemento foram sempre maiores nas plantas doentes.

Ao longo dos meses, os teores tanto nas plantas sadias quanto nas plantas com CVC, apresentaram queda no mês de setembro com posterior aumento no mês seguinte (Figura 32F).

Constatou-se que, em folhas novas e velhas de plantas sadias ou com CVC, as concentrações de manganês foram constantes ao longo do período de floração e frutificação (Figura 32A e 32C). De acordo com os dados obtidos neste trabalho, pode-se supor que a infecção causada pela bactéria *Xylella fastidiosa* não afetou os teores de manganês nas folhas novas e velhas, pois não se verificaram diferenças significativas entre os tratamentos.

Nas folhas novas, os teores de zinco foram bem semelhantes quando se fez comparações entre os tratamentos, para cada mês do período de florescimento e frutificação. Ao longo dos meses, os aumentos e as quedas também foram bem semelhantes entre plantas sadias e com CVC, ou seja, de forma geral, de agosto a setembro aumento e de setembro a outubro queda (Figura 33B).

Os teores de zinco nas folhas velhas de plantas sadias ou doentes mantiveram-se constantes ao longo de todo o período de floração e frutificação (Figura 33D). Quando foram feitas comparações dos teores foliares entre os tratamentos, em cada mês, não foram verificadas diferenças (figura 33D).

5.2.6. HORMÔNIOS

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que não ocorreram alterações das concentrações dos fitorreguladores nos órgãos florais de laranjeiras, entre os tratamentos, podendo-se supor que a incidência da CVC provavelmente não interfere nas concentrações do ácido 3-indol acético e do ácido abscísico tanto nos botões florais como nas flores de

laranjeiras, pois, verificou-se que os teores tanto do ABA como do AIA nos órgãos florais foram bem semelhantes entre as plantas doentes e saudáveis, (Figura 34).

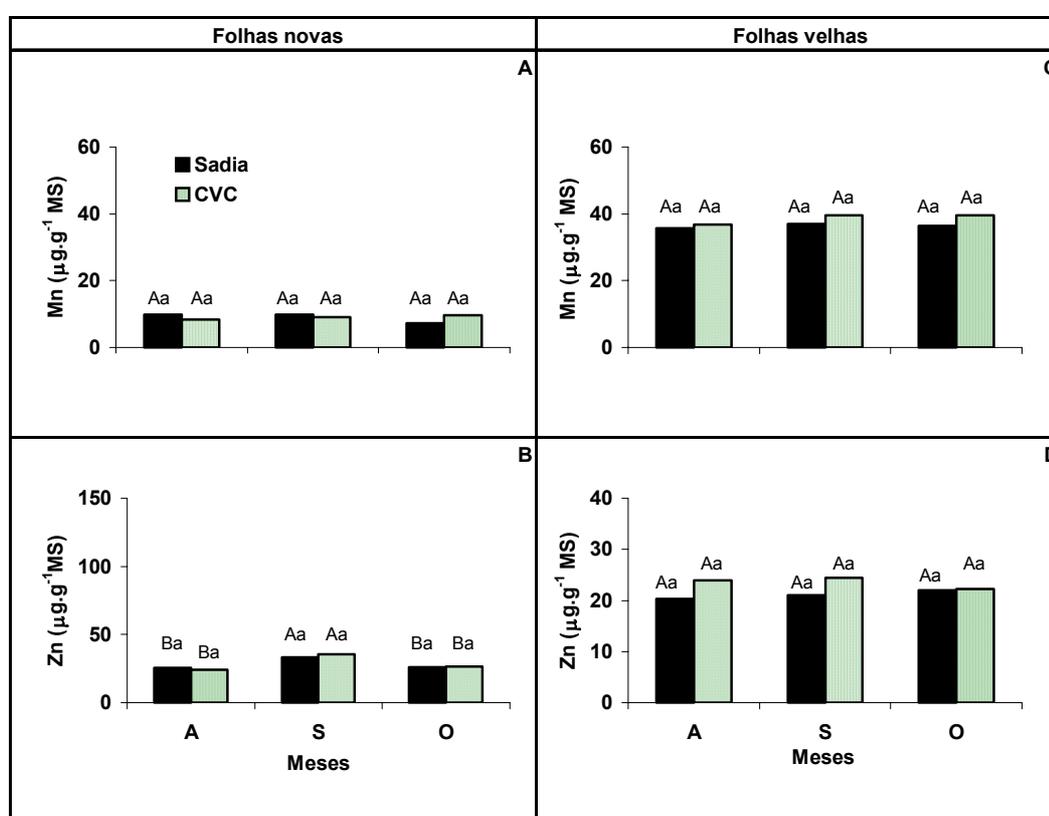


Figura 33. Teores de manganês (Mn) e zinco (Zn) em folhas de laranjeiras 'Pêra' saudáveis e com Clorose Variegada dos Citros (CVC), durante o período de floração e frutificação (agosto - A, setembro - S e Outubro - O). Médias com as mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade. Letras maiúsculas referem-se aos testes comparativos entre meses para cada tratamento e letras minúsculas aos testes comparativos entre plantas para cada mês de avaliação.

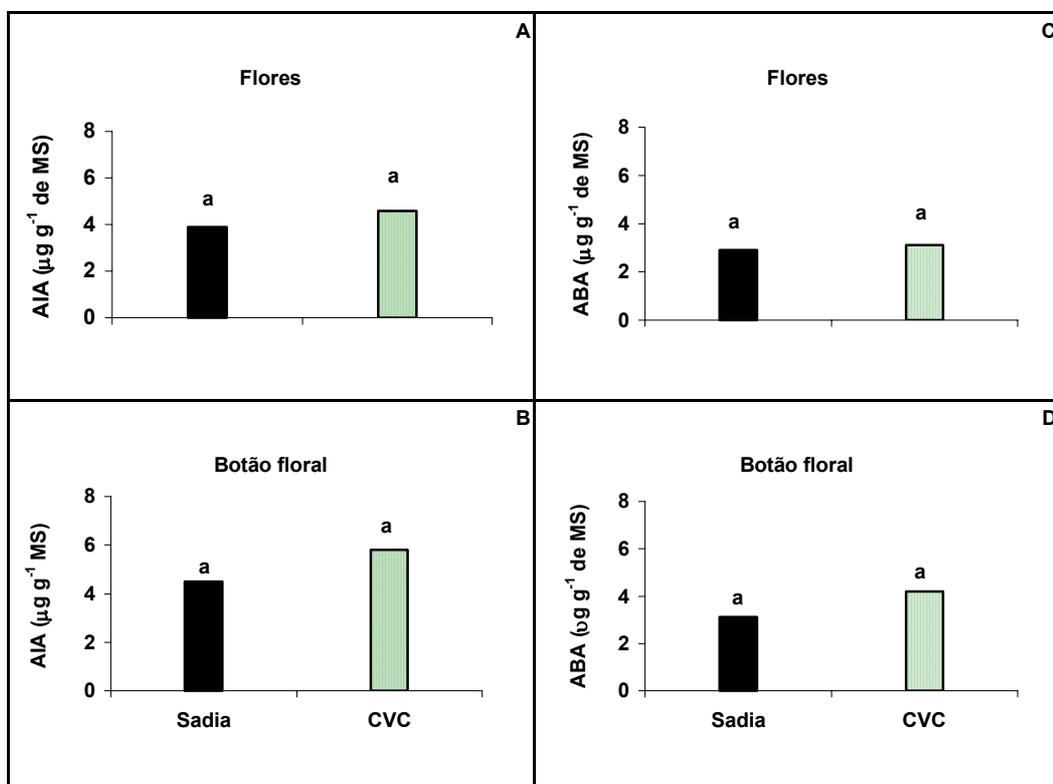


Figura 34- Teores dos fitorreguladores ácido abscísico (ABA) e ácido 3-indol acético (AIA) em órgão florais de laranjeiras ‘Pêra’ sadias e com Clorose Variegada dos Citros (CVC). Os resultados apresentados representam médias de cinco repetições. As médias que apresentarem as mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5 % de probabilidade.

6. DISCUSSÃO

6.1. PERÍODO DE INDUÇÃO FLORAL

6.1.1. AÇÚCARES

Os carboidratos exercem papéis importantes durante todo o ciclo de vida de uma planta. Durante as fases que abrangem o processo reprodutivo, grandes quantidades de carboidratos são utilizados no processo de formação e desenvolvimento de flores e frutos. A utilização dos carboidratos pelas plantas vai depender de inúmeros fatores como alterações das condições ambientais, ocorrência de estresses entre outros (Acosta *et al.*, 1995; Bolding *et al.*, 2003; Ito *et al.*, 2003).

No presente trabalho, verificaram-se durante o período de indução floral, decréscimos das concentrações foliares de sacarose tanto nas folhas das plantas sadias como nas com CVC, provavelmente provocadas pelo aumento da demanda por carboidratos que normalmente ocorre no final deste período.

Goldshimidt (1982), verificou que a quantidade de açúcares solúveis em árvores de citros sem florescimento foi sempre maior quando comparada com árvores em pleno florescimento. Os dados apresentados neste trabalho com relação aos teores de sacarose nas folhas das plantas sadias e com CVC foram semelhantes aos apresentados no trabalho de Sanz *et al.* (1987), em que os teores de sacarose nas folhas novas mantiveram-se baixos no final do período de indução (Figura 1C).

Com relação aos teores de açúcares redutores nas folhas, foi evidenciado que provavelmente estes açúcares foram metabolizados em quantidades superiores nas folhas de

laranjeiras sadias durante o período de indução floral pois, verificou-se menores concentrações foliares em comparação com laranjeiras doentes (Figura 1B).

Em laranjeiras, durante junho e julho, meses cuja demanda por carboidratos deve ter aumentado significativamente, verificou-se que os teores dos açúcares redutores nas folhas foram maiores nas plantas doentes em relação às plantas sadias. Como as plantas sadias apresentaram um maior equilíbrio com relação a produção de órgãos florais e de brotos vegetativos, talvez este fato tenha contribuído para um maior fluxo destes açúcares para o desenvolvimento dos novos órgãos.

As doenças em geral podem alterar o metabolismo dos carboidratos nas plantas, de diferentes formas. Essas alterações vão depender, basicamente das interações patógeno-hospedeiro e do estágio de evolução da doença. Gomes (2001), verificou que em plantas com déficit hídrico, as concentrações de açúcares redutores, sacarose e amido foram muito variáveis durante o período de avaliação e quando se fez comparações entre plantas sadias e doentes, no segundo ciclo de estresse (plantas com aproximadamente ± 3 anos de idade), os teores foliares destas substâncias foram bem semelhantes.

Com base nos dados encontrados neste trabalho, pode-se presumir que as plantas doentes apresentaram uma maior limitação ao fluxo de água nos vasos do xilema, uma vez que seu potencial hídrico foi menor em comparação com o das plantas sadias (Apêndice 4). Com um potencial hídrico menor em relação às plantas sadias, as células das plantas doentes presumivelmente apresentaram uma maior concentração de solutos que, dependendo da intensidade da doença e da hora do dia, esse potencial pode ser cada vez menor e as concentrações de soluto cada vez maior.

Com menor potencial hídrico, provavelmente devem ocorrer dois eventos importantes nas laranjeiras primeiro, é a redução do fluxo de açúcares no floema e o segundo refere-se ao aumento das concentrações de solutos através da redução do conteúdo de água nas células, o

que provavelmente implicou no aumento dos teores destes açúcares nas folhas das plantas doentes.

Ao longo do período de indução floral, as oscilações apresentadas nos teores de amido, tanto nas folhas das plantas sadias como nas das plantas doentes não indicaram efeitos dos processos metabólicos que ocorrem no período de indução pois, as tendências não seguem um padrão uniforme de queda ou aumento à medida que as diversas reações metabólicas são intensificadas para o preparo do florescimento.

Nos meses de maio e junho (Figura 1D), os teores de amido nas folhas foram maiores nas plantas sadias em comparação com as doentes, resultados semelhantes aos encontrados por Gomes (2001). Como as taxas de fotossíntese nas plantas doentes foram, geralmente, menores em relação às plantas sadias, isto pode ter acarretado um menor teor de amido armazenado nos cloroplastos durante o início do processo de indução floral.

Nos ramos das plantas sadias (Figura 2), todos os açúcares avaliados apresentaram reduções dos teores no mês de junho, o que reforça a hipótese de que, provavelmente, neste mês ocorreu uma maior demanda por carboidratos e uma maior ativação dos processos metabólicos necessários à indução e à formação posterior dos órgãos florais. Fato semelhante aconteceu com os teores de sacarose e amido nos ramos das plantas doentes. Provavelmente os açúcares foram utilizados no processo de diferenciação das gemas como também na redução do potencial osmótico das plantas pois neste mês observaram-se as menores temperaturas noturnas, durante o período de indução floral.

De acordo com os dados neste trabalho, pode-se inferir que, dependendo do estágio da doença e do grau de infecção, os danos causados pela bactéria *Xylella fastidiosa* em laranjeiras pode variar ao longo do seu ciclo de vida.

A CVC parece não afetar os teores de açúcares quando as plantas não passam por surtos de alta demanda ou não estão num estágio avançado de infecção da doença pois, nos

meses de maio não se verificaram diferenças significativas dos teores de açúcares encontrados nos ramos de plantas sadias e doentes. Todavia, em junho (Figura 2), mês em que provavelmente ocorreu um maior requerimento por açúcares solúveis para finalização do processo de diferenciação dos meristemas, as maiores concentrações foram encontradas nos ramos das plantas de laranjeiras sadias. Esta evidência comprova a hipótese de que há limitação ao fluxo de carboidratos nas plantas com CVC.

Os teores de açúcares solúveis (sacarose e açúcares redutores) nas raízes foram os menos afetados durante o período de indução floral pois, ao longo dos meses, ocorreram pequenas variações independentemente das plantas estarem ou não com CVC (Figura 3B e 3C). Com relação aos teores de amido, tanto nas raízes das plantas sadias como nas raízes das plantas doentes, no mês de junho, ocorreram reduções significativas (Figura 3D).

6.1.2. TROCAS GASOSAS

Ao longo dos meses, as tendências de aumento da atividade fotossintética até o final do período de indução floral foram comuns para as plantas sadias e com CVC. Os aumentos provavelmente ocorreram devido ao aumento gradativo da demanda por carboidratos. Um outro fator que deve ter contribuído para o aumento da taxa de fotossíntese foi a alteração da condição ambiente de temperatura e radiação que apresentaram índices diferentes dos considerados comuns para a época do ano.

As laranjeiras sadias e doentes apresentaram as máximas taxas fotossintéticas em julho, provavelmente devido a este mês anteceder o processo de formação e desenvolvimento floral, o que deve exigir um aumento da disponibilidade de vários compostos como açúcares, aminoácidos, ácidos graxos, entre outros compostos e elementos químicos. Os aumentos das

demandas por carboidratos em julho devem estar correlacionados diretamente com a diferenciação dos meristemas responsáveis pela produção de novos órgãos: reprodutivos e vegetativos (Bodson e Outlaw, 1985, Bernier, 1988).

Entre os vários processos que presumivelmente ocorrem nos meristemas no final do período de indução floral, tem-se a maximização do processo de divisão celular, ativação e supressão de expressão gênica, biossíntese de macromoléculas como carboidratos, proteínas lipídeos entre outros (Bernier *et al.*, 1993; Coen & Carpenter, 1993, Huala & sussex, 1993; Meeks-Wagner, 1993).

Shirashankara & Mathai (2002) verificaram que a fotossíntese diminuiu em mangueiras durante o período de florescimento. Estes autores justificando tal resultado explicam que neste período ocorreu déficit hídrico nas plantas. Todavia, Monselise & Lens (1980), trabalhando com macieira, verificaram elevação da taxa de fotossíntese durante o período de iniciação floral, tal fato foi justificado pelo incremento da demanda por carboidratos induzida pelo aumento do número de drenos, principalmente pelos meristemas em processo de diferenciação.

Quando se compararam as atividades fotossintéticas entre os tratamentos, verificou-se que estas foram maiores nas plantas sadias em comparação com as plantas doentes. Fato semelhante foi observado nos processos que interagem e influenciam a fotossíntese, no caso a transpiração e a condutância. A concentração interna de CO₂, em alguns meses, foram maiores nas plantas sadias porém, com maior frequência não ocorreram diferenças significativas entre as plantas sadias e doentes.

Durante o período de indução, as taxas de fotossíntese líquida em laranjeiras sadias foram maiores que nas plantas doentes. Este fenômeno deve ter ocorrido devido a um menor fluxo de água nos vasos do xilema das plantas doentes que, presumivelmente causaram distúrbios tanto na condição osmótica das células da parte aérea como naquelas localizadas em

regiões próximas às áreas da câmara sub-estomática. Além disso, o fluxo de gás entre os meios externo e o interno das câmaras sub-estomáticas foi afetado pela incidência da doença principalmente em condições de alta temperatura e radiação. Alguns trabalhos encontraram resultados semelhantes quando se compararam as trocas gasosas entre laranjeiras em condições normais de potencial de água e aquelas com condições de deficiência hídrica (Medina *et al.*, 1998; Medina *et al.*, 1999; Machado *et al.*, 2001; Machado *et al.*, 2002).

A transpiração é um importante fator que interfere nos processos que envolvem as trocas gasosas nas plantas. Como laranjeiras doentes têm uma limitação ao fluxo de água, foi verificado, em maior frequência dos resultados que, sua transpiração foi menor com relação às plantas saudáveis. Este fato deve ter ocorrido devido à redução da condutância estomática decorrente de uma menor abertura estomática.

Machado *et al.* (1994) a redução da taxa de fotossíntese nas plantas com CVC pode estar correlacionada com a presença de necroses nas folhas das plantas doentes, o que diminui a área ativa de fotossíntese pois, em geral, patógenos vasculares afetam os processos difusivos das plantas hospedeiras. Em muitos trabalhos foi verificado que as relações hídricas de plantas doentes podem ser afetadas por distúrbios no funcionamento de estômatos, aumentando a resistência ao fluxo e/ou absorção de água pelas raízes, tornando as plantas hospedeiras mais sensíveis à deficiência hídrica. Há casos em que, mesmo em condições de teor de umidade do solo adequado, plantas hospedeiras apresentaram sintomas de deficiência hídrica (Machado, 1994; Machado *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 2003, Medina, 2002).

Os dados encontrados neste trabalho indicaram que a redução das atividades referentes à condutância estomática influenciou diretamente a fotossíntese das plantas doentes pois, segundo Machado *et al.* (1994), a queda da taxa de fotossíntese deve estar relacionada com a menor condutância estomática em função da perda da turgescência das células das folhas doentes.

Gomes *et al.* (2003) trabalhando com a mesma espécie de planta porém, em meses diferentes aos do período de indução floral, verificaram resultados semelhantes aos apresentados neste trabalho pois, quando se comparou a fotossíntese entre plantas sadias e doentes verificou-se que tanto a fotossíntese como a condutância estomática foram maiores nas plantas sadias.

6.1.3. MACRONUTRIENTES

Apesar da relevante importância do nitrogênio para crescimento e florescimento da plantas, principalmente na produção de biomoléculas como ácidos graxos, proteínas, clorofilas, amidas, ureídios e vários outros compostos (Sugimoto *et al.*, 1998; Ahmad *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 2001), verificou-se que nos meses que antecederam o florescimento, junho e julho, o teor desse nutriente manteve-se constante nas folhas novas e velhas das plantas sadias e com CVC (Figura 11A e 11D). Este resultado sugere que a translocação do N das folhas velhas para o desenvolvimento e diferenciação dos meristemas provavelmente aconteceu de forma lenta durante a fase do processo de indução.

Segundo Marschner (1995) dependendo da planta, do seu estágio de desenvolvimento e do órgão, o conteúdo de nitrogênio foliar ótimo para o crescimento da planta varia entre 20 a 50 mg.g⁻¹ de matéria seca foliar. Agusti (2000) relata que os níveis foliares ótimos para o crescimento das variedades ‘Clemetina’ e ‘Satsuma’ estão entre 24 e 28 mg.g⁻¹ de matéria seca foliar. Os resultados deste trabalho mostraram ao longo dos meses que, tanto nas folhas novas como nas velhas de laranjeiras sadias ou doentes, os teores de nitrogênio mantiveram-se em níveis ótimos em todos os meses (Figura 11A e 11D). Estes dados indicam que as plantas de

laranjeira mantiveram seus níveis foliares de nitrogênio ótimos, mesmo quando as plantas exigem uma maior quantidade para seu metabolismo, como o caso do período de indução floral.

Sanz *et al.* (1987), trabalhando com plantas de laranjeiras, verificaram que a transporte do nitrogênio ocorreu de forma lenta nas plantas durante o período de indução floral. Os valores médios para o teor de nitrogênio nas folhas foram de $0,35 \text{ mg.cm}^{-2}$, apresentando pequenas variações ao longo dos meses. Resultados semelhantes foram encontrados neste trabalho, indicando que a translocação de nitrogênio das folhas velhas para desenvolvimento das folhas novas e diferenciação dos meristemas ocorreram de forma lenta, tanto nas plantas saudias como nas com CVC, durante o período de indução floral.

De acordo os resultados obtidos neste trabalho (Figura 14A e 14D), pode-se supor que a absorção e o acúmulo de nitrogênio nas folhas velhas e novas das laranjeiras não foram afetadas pela infecção causada pela CVC pois, não verificaram-se diferenças significativas entre os teores desse elemento, tanto nas folhas novas como nas velhas das plantas saudias e doentes. Os resultados indicaram que, dependendo do estágio de infecção da doença, muitos processos nas plantas como os fisiológicos e os bioquímicos podem não ser alterados, mesmo com a bactéria se alojando nos vasos do xilema.

O potássio, segundo Marschner (1995), é o cátion mais abundante no citoplasma e um dos íons que mais contribui para o potencial osmótico das células em espécies glicófitas. Como outros cátions o potássio é responsável pela ativação e muitas vezes pela indução da alteração conformacional de várias enzimas. Segundo Lavon *et al.* (1995) a deficiência de potássio em folhas de laranjeiras provoca um aumento na atividade tanto de amilases como de invertases ácidas. Os mesmos autores constataram que a deficiência de potássio afeta a produção de matéria seca e os teores de açúcares solúveis. Em folhas de laranjeiras que

apresentavam deficiência de potássio, foi verificada uma redução do teor de amido em torno de 50 %, enquanto que os teores de açúcares redutores aumentaram em 30 %.

Os resultados apresentados neste trabalho indicaram que, como aconteceu com o nitrogênio, a atividade referente à diferenciação dos meristemas, para produção das flores não influenciaram os teores foliares de potássio durante todo o período de indução floral.

De acordo com Agusti (2000), os níveis foliares ótimos de potássio para o crescimento podem variar entre 6,0 e 10,0 mg.g⁻¹ de matéria seca, para algumas variedades de laranjeiras. Teores foliares acima de 13,0 mg.g⁻¹ são considerados excessivos. Por outro lado, Marschner (1995) considera que os níveis ótimos de potássio para o crescimento das plantas estão entre 13 e 18 mg.g⁻¹ de matéria seca. Os teores de potássio encontrados, tanto nas folhas novas e velhas das plantas saudáveis e com CVC, durante todo o período de indução floral, estiveram em um padrão ótimo para o desenvolvimento das plantas, ou seja, entre 12 e 20 mg.g⁻¹ de matéria seca foliar, de acordo com Marschner (1995).

A ocorrência da CVC em laranjeiras com quatro anos de idade não deve ter afetado a absorção e o acúmulo de potássio nos tecidos foliares, pois, não foram observadas diferenças significativas entre os teores deste elemento encontrados nas folhas novas e velhas das laranjeiras saudáveis, quando comparados com os apresentados pelas folhas doentes (Figura 11B e 11E). Este resultado foi semelhante ao verificado por Medina (2002) e diferente daquele comentado por Quaggio (1988), que usualmente as plantas com CVC apresentam deficiência de potássio. Provavelmente tenha ocorrido alguma alteração no transporte de potássio como também de outros elementos químicos da raiz para a parte aérea, provocada pela presença da bactéria que é dependente de vários fatores como composição química do solo, idade da plantas, estágio de evolução da doença entre outros.

Apesar de ser um elemento muito importante para os processos de divisão celular, ativação de enzimas, biossíntese de carboidratos bem como produção de bases nitrogenadas

(Marschner, 1995), o fósforo também participa de substâncias estruturais como membranas, ácidos nucleicos e lipídeos. Provavelmente, esses fatores sejam responsáveis pela translocação lenta deste elemento para o desenvolvimento de novos drenos (Abdalla *et al.*, 1986; Marschner, 1995; Agusti, 2000). No presente trabalho, verificou-se que os teores de fósforo mantiveram-se relativamente constantes durante o todo o período de indução floral (Figura 11C e 11F), indo ao encontro do comentado por Marschner (1995) e Agusti (2000). Os dados indicaram que o metabolismo de fósforo nas plantas de citros não foi influenciado durante o período de indução floral.

Como os teores de fósforo nas folhas nas velhas e novas foram semelhantes entre plantas sadias e com CVC, para cada mês de avaliação, talvez, em estádios mais avançados da doença, possa ocorrer algum problema de absorção e transporte não só deste elemento como de outros macro e micronutrientes.

O cálcio é um elemento muito importante na conformação estrutural das plantas, pois ele entra na formação de macromoléculas como as encontradas nas membranas e paredes celulares. Durante o período de indução floral, não se verificaram alterações dos teores de cálcio, tanto nas folhas novas como nas velhas, que pudessem ser relacionadas como interferência do processo de indução, visto que, os maiores teores deste elemento foram encontrados no mês de julho (Figura 12 A e 12C).

Lavon *et al.* (1995) constataram que a deficiência de cálcio pode afetar tanto a atividade de amilases como a concentração de amido e açúcares solúveis na folha. Em folhas de planta de limão rugoso com deficiência de cálcio verificou-se um aumento da concentração foliar de amido em quase 100 %, o que deve ter provocado um aumento na atividade de amilases na mesma proporção.

Nas folhas velhas, de acordo com dados apresentados neste trabalho, verificou-se que os teores de cálcio foram afetados pela incidência da CVC pois, nos meses de junho e julho

constatou-se que os teores deste elemento foram maiores nas folhas velhas das plantas sadias. Todavia, quando se avaliaram os teores de cálcio nas folhas novas não foram verificadas diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 12A e 12C). O maior teor cálcio nas folhas velhas das plantas sadias pode ser decorrente de uma maior transpiração pois, em órgãos com maior intensidade de fluxo de vapor d'água ocorre um maior acúmulo de cálcio nos tecidos (Marshner, 1995). Neste trabalho foi observado que, nas folhas velhas das plantas sadias as taxas de transpiração foram geralmente maiores que o das plantas doentes.

Segundo Marschner (1995) o aumento da concentração de cálcio no apoplasto provocou um aumento no conteúdo de cálcio nas folhas velhas com taxa de transpiração elevada. Contudo, esse fenômeno não ocorreu em órgãos com baixa transpiração, como foi o caso de frutos novos e tubérculos supridos de metabólitos predominantemente via floema.

Oscilação dos teores de cálcio nas folhas novas, entre os tratamentos, provavelmente devem ocorrer pois, órgãos em estádios iniciais de desenvolvimento normalmente apresentam uma maximização de todos os processos metabólicos o que, de certa forma pode reduzir o efeito dos danos causados pela CVC. Órgãos vegetativos em estádios iniciais de desenvolvimento são, presumivelmente, muito competitivos por metabólitos, sendo fortes drenos, este fato pode amenizar os problemas para a realização dos diversos eventos metabólicos necessários ao seu desenvolvimento inicial que são dependentes de cálcio.

A variação do suprimento e da concentração de cálcio na planta pode alterar o florescimento, principalmente em plantas que florescem com a variação do fotoperíodo. Foi constatado que plantas de *Lemma paucicostata*, quando cultivadas em altas concentrações de cálcio, tiveram seu florescimento reduzido (Khurana *et al.*, 1988; Takeno, 1993; Digonnet *et al.*, 1997).

Os teores de cálcio nas folhas velhas da plantas sadias e doentes mantiveram-se no nível ótimo para o desenvolvimento das plantas, ou seja, entre 25 e 50 mg g⁻¹ de matéria seca

(Marschner, 1995; Agusti, 2000). Apenas em maio, os teores de cálcio tanto nas folhas novas das plantas saudáveis como doentes, ficaram abaixo dos níveis considerados adequados para o desenvolvimento das plantas.

Os teores de magnésio nas folhas novas e velhas foram bem semelhantes, quanto se fez comparações entre plantas saudáveis e doentes (Figura 12B e 12D). Os resultados indicaram que a incidência da doença não afetou absorção, o metabolismo e a acumulação de magnésio.

Foram observados aumentos dos teores de magnésio no período de maio a junho, tanto nas folhas novas como nas folhas velhas, nos dois tratamentos (Figura 12B e 12D). Uma possível explicação para este fato é que, tanto as plantas doentes como as saudáveis podem ter aumentado a absorção e estocagem de magnésio nas folhas em junho. Entretanto, como julho é um mês em que, provavelmente deve ter ocorrido uma intensa atividade metabólica e conseqüente aumento da demanda de magnésio nas folhas velhas, esses fatores devem ter contribuído para uma redução dos teores foliares de magnésio. Nas folhas novas, os aumentos das concentrações foliares de magnésio possivelmente aconteceram, devido: primeiro ao aumento na absorção deste macronutriente, ocorrido no mês de junho e segundo ao possível aumento da sua remobilização das folhas velhas para as folhas novas.

Ao longo dos meses, tanto nas folhas novas como nas folhas velhas das plantas saudáveis e doentes, os teores de magnésio mantiveram-se no nível ótimo para o desenvolvimento das plantas (Figura 12B e 12D). Segundo Marschner (1995) e Agusti (2000), os teores foliares considerados ideais para o desenvolvimento das plantas variam entre 2,5 e 5 mg g⁻¹ de matéria seca.

6.1.4. MICRONUTRIENTES

Apesar do boro participar de processos metabólicos importantes durante a formação dos órgãos de uma planta como síntese da parede celular, do ácido 3-indol acético, dos fenóis e no metabolismo de ácidos nucléicos, verificou-se que suas concentrações tanto nas folhas novas como nas velhas, dos dois tratamentos, durante o período de indução floral mantiveram-se constantes (Figura 13A e 13D). Diante desses resultados, pode-se inferir que durante o período de indução, não houve aumento da demanda por boro. Uma vez que, durante todo o período de indução floral, os teores de boro nas folhas novas, não apresentaram diferenças significativas entre os dois tratamentos. Supõe-se que os danos causados pela CVC não afetaram o transporte de boro para a parte aérea como observado para outros nutrientes, pois os teores de B nas folhas novas de laranjeiras como CVC estavam dentro da faixa ótima de 36 a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sugerida por Raji *et al.*, (1997).

Contudo, devido aos menores teores de boro verificados nas folhas velhas das laranjeiras sadias em junho e julho, em comparação com os teores encontrados nas folhas velhas das laranjeiras doentes (Figura 13D), supõe-se que nas plantas sadias ocorreu maior translocação deste elemento para que se tenha a finalização do processo de diferenciação dos meristemas.

Os teores de cobre nas folhas novas das plantas sadias e doentes foram relativamente constantes durante os meses que compreenderam o período de indução floral (Figura 13B). Tal resultado sugere que a incidência da bactéria nos vasos do xilema das plantas não alterou a absorção radicular e o transporte deste elemento para as folhas novas das plantas infectadas com CVC. Apenas, em julho, nas folhas novas das plantas com CVC, verificou-se uma diminuição dos teores de cobre que, possivelmente, pode ter sido provocada pela

intensificação do processo de diferenciação dos meristemas que resultaram na formação dos órgãos florais, tendo como consequência um menor transporte de micronutriente para a folha.

Neste trabalho, apesar da manutenção dos teores constantes durante o período de indução floral, alguns pesquisadores citam que o cobre é um elemento muito importante para o florescimento pois, seu maior ou menor teor no solo pode influenciar a percentagem de produção de órgãos florais nas plantas (Graves *et al.*, 1978, Rodrigues *et al.*, 1981). Durante o florescimento o cobre é bastante exigido, principalmente para o desenvolvimento de algumas partes das flores como ovário e grãos de pólen (Marschner, 1995).

Durante o período de indução floral não deve ter ocorrido redução na absorção e acumulação de cobre nas folhas velhas das plantas sadias, tendo em vista que, as concentrações foliares mantiveram-se constantes ao longo dos meses (Figura 13E). Todavia, nas folhas velhas das plantas doentes verificou-se em julho, a ocorrência de um aumento dos teores de cobre, provavelmente provocado pelo maior armazenamento desse micronutriente nas folhas. Semelhante às folhas novas, não foram verificadas diferenças significativas entre os tratamentos para cada mês avaliado.

De acordo com dados encontrados no trabalho de Malavolta e Prates (1994), os teores foliares de cobre encontrados neste trabalho para as folhas novas e velhas das plantas sadias e com CVC, mantiveram-se entre os níveis adequados para o desenvolvimento das plantas, ou seja, entre 10 e 30 μg^{-1} de MS. Entretanto, foram verificadas nas folhas novas de laranjeiras sadias e doentes baixos teores de cobre chegando a atingir níveis de deficiência nas plantas. A menor concentração de cobre nas folhas novas das laranjeiras sadias e doentes pode ter sido causada pela redução do transporte deste micronutriente para as folhas novas em decorrência do desvio no fluxo, sendo este direcionado para os meristemas em processo de diferenciação.

A queda dos teores de ferro, nas folhas novas das plantas doentes e sadias em julho, pode ser um indicativo da redução do transporte desse micronutrientes da raiz para as folhas

novas. Este fato possivelmente ocorreu devido a uma maior demanda exercida pelos meristemas.

Entre os três meses que abrangem o período de indução floral, julho é o que antecede ao período de desenvolvimento e crescimento das flores, das inflorescências e dos brotos vegetativos. Portanto, neste mês deve ocorrer maior demanda por ferro que deve estar associada ao aumento das atividades metabólicas e ativação dos processos morfogenéticos que irão resultar no desenvolvimento floral.

A incidência da bactéria afetou a acumulação e o metabolismo do ferro nas folhas novas e velhas (Figura 13C e 13F). Apenas em junho, verificou-se o decréscimo dos teores de ferro nas folhas novas das plantas doentes em comparação com as plantas saudas. Já nas folhas velhas, a doença afetou os teores de ferro em maio e junho, quando novamente os teores nas folhas das plantas saudas foram maiores que os das doentes. De acordo com os dados apresentados neste trabalho, pode-se presumir que em alguns meses a CVC pode provocar uma redução da absorção de ferro pela raiz, reduzindo as concentrações nas folhas novas e velhas.

Mesmo com oscilações dos teores de ferro nas folhas novas e velhas das plantas saudas e doentes, ao longo dos meses, verificou-se que as concentrações foliares mantiveram-se em níveis ótimos para o crescimento das plantas (Malavolta & Prates, 1994; Raij *et al.*, 1997; Agusti, 2000), ou seja, entre 50 e 120 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de matéria seca. Em alguns casos, principalmente nas folhas velhas das plantas saudas, as concentrações foliares chegaram ao nível de excesso, encontrando-se concentrações maiores que 200 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de matéria seca (Aguti, 2000). Estas altas concentrações de ferro detectadas nas plantas de laranjeira, presumivelmente foram provocadas pelo alto teor deste elemento nos solo.

Apesar das plantas terem passado por modificações no seu metabolismo ao longo do período de indução floral, não se verificaram alterações nos teores de manganês nas folhas novas das plantas sadias e doentes (Figura 14A). Nas folhas velhas a única alteração foi verificada nas plantas doente que, em maio, apresentaram as menores concentrações foliares de manganês nas folhas (Figura 14C). Todavia, este decréscimo não deve ter uma relação direta com o período de indução floral pois, em julho, quando provavelmente deveria ocorrer maior demanda por manganês, os teores foliares mantiveram-se relativamente altos em comparação a maio.

Os dados mostraram que os teores de manganês nas folhas velhas, durante o período de indução, mantiveram-se nos intervalos considerados adequados para o crescimento das plantas, ou seja, entre 26 a 60 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de matéria seca (Malavolta e Prates, 1994; Agusti, 2000). Entretanto, com relação aos teores de manganês nas folhas novas de laranjeiras, supõe-se que durante o período de indução floral ocorreram alteração no transporte deste elemento da raiz para as folhas novas, pois os teores ficaram muito próximos aos níveis foliares considerados inadequados para o crescimento de laranjeiras (Malavolta e Prates, 1994; Agusti, 2000). Provavelmente, os meristemas em processo de diferenciação tenham alterados a prioridade de fluxo de manganês, sendo este direcionado para desenvolvimento e diferenciação dos meristemas.

Apesar das plantas estarem infectadas com a bactéria *X. fastidiosa*, verificou que os danos provocados pela doença não foram capazes de prejudicar a absorção, o transporte e a acumulação de manganês nas folhas novas e velhas (Figura 14A e 14C).

De acordo com os resultados encontrados neste trabalho deve ter ocorrido uma maior demanda por zinco, possivelmente no início e final do período de indução pois, constataram-se reduções das suas concentrações nas folhas novas e velhas, em maio e julho (Figura 14B e 14D). Esta queda pode estar correlacionada com o fato do zinco ser um microelemento

importante na integridade de membranas, síntese e, conseqüentemente, conteúdo de proteínas, do ácido 3-indol acético e metabolismo de carboidratos. Períodos em que a plantas apresentem uma grande demanda por metabólitos, como é o caso dos processos que resultam na diferenciação dos meristemas, provavelmente deve ocorrer um aumento na concentração de zinco nas folhas.

Durante o período de indução foi possível observar que os teores de zinco nas folhas velhas mantiveram-se nos intervalos considerados adequados para o crescimento das plantas, ou seja, entre 26 a 70 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de matéria seca (Malavolta & Prates, 1994; Agusti, 2000). Todavia, com relação aos teores de zinco nas folhas novas de laranjeiras nos meses de maio e junho, verificou-se que, provavelmente ocorreram as maiores demandas e conseqüentemente redução do transporte de zinco para o crescimento das folhas novas, uma vez que, os teores de zinco em maio e junho ficaram abaixo dos níveis foliares considerados adequados para o crescimento da plantas de laranjeiras (Malavolta & Prates, 1994; Agusti, 2000).

6.2. PERÍODO DE FLORAÇÃO E FRUTIFICAÇÃO

6.2.1. AÇÚCARES

As condições ambientais como temperatura solo, déficits hídricos e baixas temperaturas são muito importantes na determinação da época de brotação, sendo também responsáveis, em grande parte, pela intensidade e distribuição da floração em laranjeiras (Agusti 2000). Os estímulos indutores associados aos mecanismos receptores e a suas interações com outros fatores exógenos e endógenos a planta, agem diretamente nos processos

de determinação do florescimento. Como fatores endógenos à planta pode-se citar que o balanço de carboidratos em laranjeiras pode determinar alterações nos padrões de colheitas, tendo um papel direto e inequívoco sobre a formação das flores (Goldschmidt & Colomb, 1982; Goldschmidt *et al.*, 1985; Agustí 2000).

A partir dos dados apresentados neste trabalho, pode-se supor que ocorreu uma intensa demanda por carboidratos nas folhas das plantas sadias e doentes durante o período de floração que, normalmente ocorre entre os meses de agosto a setembro. Em agosto quando se verificou a maior produção de órgãos florais, todos os açúcares analisados nas folhas dos dois tratamentos apresentaram os menores teores (Figura 15). Nos meses seguintes, com a redução do número de flores e botões florais, ocorreu a elevação dos teores dos açúcares nas folhas. Este aumento nos meses de setembro a outubro deve ter ocorrido devido à redução do número de drenos por planta. Resultados semelhantes podem ser vistos no trabalho de Sanz *et al.* (1987), que ao fazer a avaliação dos teores de carboidratos em folhas novas verificaram os menores teores de açúcares no período de desenvolvimento dos órgãos florais.

Apesar da taxa de fotossíntese ter-se mantida relativamente constante durante os meses em que ocorreu o processo de floração, ou seja, agosto e setembro (Figura 26A), verificou-se que os teores de sacarose, de açúcares redutores e de amido foram baixos em agosto. Este fenômeno, provavelmente ocorreu porque as plantas de citros devem ter mantido um estoque regulador de açúcares nas folhas, proveniente da elevação da taxa de fotossíntese ocorrida no final do período de indução (Figura 5A).

Semelhante ao período de indução, quando se avaliou as oscilações dos teores de açúcares nas folhas, ramos e raízes ocorridas durante o florescimento, verificaram-se que as limitações apresentadas pelas plantas com CVC para execução de determinadas atividades metabólicas, ficam mais evidentes quando os eventos morfo-fisiológicos exigem uma

maximização de determinada atividade metabólica como, por exemplo, a biossíntese e o fluxo de sacarose.

Em agosto, as plantas sadias apresentaram menores teores devido, provavelmente a uma maior demanda por carboidratos pois, apesar de terem uma menor produção de órgãos florais em comparação com as plantas com CVC, a produção de ramos vegetativos foi cerca de 75% maior em relação à das plantas doentes. Segundo Agusti (2000) a produção de órgãos florais está diretamente correlacionada com a produção de órgãos vegetativos pois, foi verificado que as estruturas florais competem com os brotos vegetativos em desenvolvimento, por vários metabólitos como carboidratos, aminoácidos, nutrientes com nitrogênio, entre outros compostos.

Vemmos (1995), trabalhando com plantas de maçã, verificou que ocorre um aumento gradativo da demanda por carboidratos à medida que as fases do período de floração ocorriam. Este mesmo autor verificou aumentos gradativos dos teores de carboidratos em todas as partes das flores até o desenvolvimento das flores de macieira.

Em setembro, os frutos começaram o processo de desenvolvimento e durante essa fase, normalmente ocorre uma pequena demanda por açúcares e outros compostos devido ao processo inicial de formação de estruturas como os vasos condutores no pedicelo e os ‘gomos’ que, são responsáveis pelo transporte e acumulação de compostos solúveis como açúcares. Essas estruturas tornarão viável o fluxo e acumulação de compostos necessários para crescimento dos frutos. Goldschmidt *et al.* (1996) mostraram que a acumulação de açúcares nos gomos ou “sacos formadores de sucos” é baixa durante a fase inicial do desenvolvimento dos frutos, aumentando gradativamente à medida que o fruto se desenvolve. O mesmo fato ocorre com a acumulação de água e de matéria seca nos gomos.

Nos ramos, tanto nas plantas sadias como nas doentes, em agosto, observaram-se baixos teores de açúcares redutores e sacarose (Figura 16B e 16C). Estes baixos teores

provavelmente ocorreram devido a um menor transporte de açúcares nos ramos provocado pela conseqüente mobilização de carboidratos para o crescimento dos órgãos florais. Pode-se supor que os ramos também contribuem para o fornecimento de açúcares para o desenvolvimento dos frutos pois, a redução verificada em agosto pode ser um indicativo deste processo. Esta colocação fundamenta-se no trabalho de Goldschmidt & Golomb (1982) que verificaram diferenças significativas nos teores de amido e açúcares solúveis em ramos de árvores de citros com e sem florescimento. De acordo com os dados apresentados no trabalho de Goldschmidt & Golomb (1982) verificou-se que teor de amido e açúcares solúveis em ramos de plantas sem flores foi superior em comparação com os ramos com flores.

De acordo com os resultados obtidos, pode-se inferir que provavelmente em setembro, quando se verificou uma redução acentuada do número de órgãos florais, deve ter ocorrido uma redução da demanda por açúcares para o desenvolvimento das estruturas reprodutivas pois, verificou-se em geral, a ocorrência de aumentos das concentrações de açúcares nos ramos. Tanto nas plantas sadias como doentes, setembro, correspondeu ao período final do florescimento, no mês seguinte, com os frutos no estágio inicial de desenvolvimento, em geral, ocorreram quedas dos teores dos açúcares nos ramos, presumivelmente devido ao aumento do fluxo de carboidratos para o crescimento dos frutos, ocasionando uma redução da concentração de açúcares nos vasos e uma menor acumulação destes nos tecidos, resultados semelhantes foram encontrados por Guardiola *et al.* (1984).

A partir dos resultados apresentados neste trabalho, pode-se supor que o amido nos ramos das plantas de laranjeira 'Pêra' não é metabolizado em grandes quantidades para o desenvolvimento das flores e para o desenvolvimento inicial dos frutos, pois estes teores, nos ramos das plantas sadias e doentes, mantiveram-se constantes ao longo do período de floração e frutificação.

Os dados indicaram que as plantas com CVC, provavelmente apresentaram problemas no transporte de açúcares através dos ramos, ocasionados principalmente pela elevação da demanda exercida pelas flores e frutos e pela limitação ao fluxo de água no xilema pois, os teores de açúcares nos ramos das plantas sadias, em quase todos os meses foram maiores em comparação com os ramos das doentes.

Nas raízes das plantas sadias ou doentes, os teores de sacarose foram baixos no início do processo de floração, ou seja, mês de agosto (Figura 17C). Esta redução não caracterizou o metabolismo e transporte de reservas da raiz para a parte aérea pois, os teores de amido mantiveram-se constantes ao longo dos meses de agosto e setembro, período correspondente a floração. Como os teores de amido não se alteraram durante à floração e as concentrações de sacarose só aumentaram após setembro (Figura 17C e 17D), provavelmente, deve ter ocorrido uma supressão parcial do transporte da sacarose da parte aérea para o sistema radicular.

No período inicial do desenvolvimento dos frutos, em outubro, verificou-se uma redução do teor de amido na raiz com respectivo aumento dos teores de sacarose. Presumivelmente, o aumento do teor de sacarose ocorreu devido à remobilização do amido de reserva na raiz pois, neste mesmo mês, foi verificada uma redução das taxas de fotossíntese, tanto nas plantas sadias como nas plantas doentes. Com a redução da fotossíntese, deve ter ocorrido uma redução na produção de triose fosfato e, conseqüentemente, de sacarose nas células do mesofilo. Uma das possibilidades para suprir esta parcial deficiência da produção de fotoassimilados é a remobilização de reservas da raiz (Figura 17).

O maior efeito da incidência da doença foi nos teores de sacarose no mês de outubro, quando se verificou a superioridade dos teores nas raízes das plantas sadias.

6.2.2. PRODUÇÃO DE BOTÕES FLORAIS, FLORES, INFLORESCÊNCIAS E BROTOS VEGETATIVOS

Durante o período de floração correspondente aos meses de agosto a setembro, as plantas com CVC produziram um maior número de botões e flores em comparação com as plantas saudáveis.

As plantas com os estágios mais avançados da doença eram as que apresentavam a maior produção de flores, inflorescências e frutos. Entretanto, foi significativa a baixa produção de brotos vegetativos nas plantas doentes em comparação com as plantas saudáveis. Além dos efeitos adversos da incidência da doença CVC, provavelmente a limitação à produção de ramos vegetativos também esteja condicionada a um reduzido crescimento do sistema radicular e da disponibilidade de alguns compostos como açúcares.

Ao se fazer as coletas das raízes para determinação dos teores de açúcares, durante a fase experimental, ficou evidente que o sistema radicular das plantas com CVC foi bastante afetado visto que, aparentemente houve uma significativa redução do crescimento das raízes principalmente das secundárias. A redução do sistema radicular das plantas com CVC provavelmente foi provocada devido aos problemas no fluxo de fotoassimilados no floema para suprimento das raízes das plantas com CVC.

Diante das limitações das condições de desenvolvimento e crescimento nas plantas com CVC como distúrbios no transporte de água e nutrientes inorgânicos do sistema radicular para a parte aérea e entre órgão da parte aérea, redução do potencial hídrico nas laranjeiras doentes, deve ter ocorrido um maior direcionamento das suas reservas para a produção de flores e frutos, mesmo porque seria difícil suprir um grande número de frutos e o crescimento de um grande número de brotos vegetativos.

De acordo com os dados apresentados neste trabalho, foi possível observar que a produção e fixação de frutos foram maiores nas plantas com CVC (Figura 19A). De acordo com os resultados obtidos por Fonfria *et al.* (1995) e Ruiz *et al.* (2001) foi observado também neste trabalho que, quanto maior a produção de flores por laranjeiras, maior o número de frutos fixados. Isto provavelmente deve ter acontecido pois, considerando-se que as plantas de citros têm uma faixa percentual de fixação de frutos de 0,5 a 2,5 %, caso ocorra um aumento de produção de flores, deve haver uma maior produção de frutos por planta. Entretanto, sabe-se que o aumento do número de frutos por plantas não implica em um aumento da qualidade dos mesmos (Fonfria *et al.*, 1995; Agusti, 2000; Ruiz *et al.*, 2001).

As diferenças verificadas neste trabalho entre plantas sadias e doentes, com relação à produção e crescimento de ramos vegetativos, foram altamente significativas. A produção de brotos vegetativos nas plantas sadias foi bem superior em relação às plantas doentes. Com esta elevada produção de brotos vegetativos, provavelmente nas plantas sadias houve limitação ao fluxo de compostos como fotoassimilados, aminoácidos e minerais para o desenvolvimento dos órgãos reprodutivos. Esse fato pode ter contribuído para uma redução na produção de botões florais e flores nas plantas sem CVC.

Segundo Guardiola *et al.* (1982) e Fonfria *et al.* (1995) um fator importante que influencia o tamanho do fruto é a competição entre os órgãos em crescimento. Quanto maior o número de um determinado órgão em crescimento maior será a competição por elementos minerais e fotoassimilados, limitando o crescimento do outro órgão.

Visualmente, foi possível perceber que a velocidade de crescimento dos frutos nas plantas sadias foi muito maior em comparação à dos frutos das plantas doentes. Este fenômeno ocorreu, provavelmente, devido às plantas sadias apresentarem maior disponibilidade de água, fotoassimilados, nutrientes e outros compostos necessários ao crescimento.

6.2.3. TROCAS GASOSAS

A sacarose é um dos primeiros produtos sintetizados a partir do produto final da fotossíntese em plantas superiores, é também um dos compostos mais transportados para o crescimento e desenvolvimentos de tecidos drenos como folhas novas, flores, frutos em desenvolvimento. As interações entre a fotossíntese e o estágio de crescimento e desenvolvimento das plantas são importantes pois, podem determinar alterações nos processos bioquímicos e de formação dos órgãos nas plantas, sejam eles vegetativos ou reprodutivos (Bondson *et al.*, 1977; Micallef *et al.*, 1995; Bagnall & King, 2001).

Durante o período de floração e início de frutificação, em agosto e setembro, tanto nas plantas sadias como nas plantas doentes, a fotossíntese manteve-se constante em quase todos os horários. Tal fato indica que nestes meses ocorreu uma maior utilização de carboidratos estocados na folhas pois não se verificou aumento da atividade fotossintética, apesar das plantas estarem em intensa produção e crescimento de órgãos reprodutivos e vegetativos.

Em geral, a transpiração aumentou entre os meses de agosto e setembro, enquanto que, a fotossíntese manteve-se constante, indicando que a atividade fotossintética pode suportar um aumento do fluxo de água das câmaras sub-estomáticas para o meio externo, sem alterar-se de forma significativa. Este aumento da transpiração deve ter ocorrido provavelmente devido ao aumento da temperatura que ocorreu ao longo dos meses, tanto nas folhas como no ambiente.

Uma certa constância foi observada na condutância estomática e na concentração interna de CO₂ durante os meses de agosto e setembro. Entretanto, em outubro, foi comum a redução tanto da fotossíntese como de outros fatores determinantes da trocas gasosas. Esta diminuição em outubro deve ter sido provocada principalmente devido à ação de alguns

fatores como: o desenvolvimento inicial dos frutos, à redução do número de drenos por planta, à maturação das folhas da nova brotação e ao aumento da temperatura na casa de vegetação.

Resultado encontrados no trabalho de Bodson *et al.* (1977) sugerem que a fotossíntese exerce papel importante na processo de floração em plantas de dias longos como *Sinapis alba*. Experimentos com trocas gasosas têm mostrado que a capacidade de síntese e utilização do produto final (triose fosfato) da fotossíntese pode determinar alterações dos fatores que atuam nas determinações das taxas fotossintéticas (Bodson & Outlaw, 1977).

6.2.4. MACRONUTRIENTES

Alguns pesquisadores relatam que a deficiência de nitrogênio durante os estádios iniciais do crescimento pode afetar a iniciação e o desenvolvimento das folhas e flores (Lowat *et al.*, 1988; Cabrera, 1995). De acordo com os dados apresentados no trabalho de Ma (1997), o florescimento em plantas de *Lupinus angustifolius* com deficiência de nitrogênio foi retardado de 4 a 14 dias.

Possivelmente, as quedas observadas, em setembro, nos teores de nitrogênio, de potássio e de fósforo nas folhas novas das laranjeiras sadias e doentes, nas fases finais do desenvolvimento das flores (Figura 30A , 30B e 30C), devam se atribuídas à redução do transporte desses macronutrientes das raízes para as folhas novas, provocada principalmente pelo direcionamento de parte do fluxo destes macronutrientes para suprir o intenso crescimento das estruturas reprodutivas como pétalas, sépalas, ovário, estames, entre outros.

Considerando o aumento verificado nos teores dos macronutrientes nitrogênio, fósforo e potássio nas folhas novas em outubro quando comparado com setembro, pode-se supor que deve ter ocorrido uma diminuição da demanda provocada pela redução do número de botões florais, flores, frutos.

Com relação à interferência da CVC nas concentrações foliares de nitrogênio das folhas novas, verificou-se que durante o mês de maior demanda (agosto), os teores de N foram maiores nas plantas saudias, ao passo que durante a frutificação os teores foram maiores nas plantas doentes (Figura 30A). Os resultados indicaram que o nível de interferência da doença sobre os processos metabólicos das plantas de citros depende dos estádios de desenvolvimento das plantas, do grau de infecção provocado pela bactéria e do nível de demanda apresentado pelas plantas.

Nas folhas novas das plantas doentes, em setembro e outubro, os teores de nitrogênio foram maiores em relação aos das plantas saudias (Figura 30A). Provavelmente, este fato deve ter ocorrido devido à ocorrência de uma menor competição entre os drenos nas plantas doentes, considerando que as mesmas, apesar de apresentarem um número maior de órgãos florais, a produção de brotos vegetativos foi bem menor em relação às plantas saudias.

Com relação aos resultados apresentados neste trabalho, é possível pressupor que tanto o acúmulo como a translocação de potássio para as folhas novas não foram afetados pela presença da bactéria, fato este comprovado pela não existência de diferenças significativas (Figura 30B).

Para teores de fósforo, verificou-se que apenas em setembro nas folhas novas das laranjeiras constatou-se a ocorrência de diferenças significativas entre os tratamentos, sendo que as folhas novas das plantas doentes apresentaram maiores teores em relação às plantas saudias. Este fato deve ter ocorrido porque as plantas saudias apresentaram durante o período de floração e frutificação um maior número de drenos e conseqüentemente deve ter ocorrido uma maior demanda por este elemento (Figura 30C).

Durante o período de floração e frutificação, não ocorreram variações dos teores de nitrogênio nas folhas velhas das plantas saudias (Figura 30D). Apenas nas folhas velhas das plantas com CVC foi que se verificou, em outubro, uma pequena redução dos teores (Figura

30D). Resultados semelhantes foram encontrados por Sanz *et al.* (1987) que, ao avaliarem os teores foliares de nitrogênio nas folhas de laranjeiras durante o período de floração e frutificação, observaram pouca variação nos seus teores. Esses autores concluíram que esses resultados estavam diretamente relacionados com a ocorrência de um lento processo de remobilização do nitrogênio das folhas velhas de citros para o crescimento dos órgãos reprodutivos durante o período de floração e frutificação.

De acordo com resultados apresentados neste trabalho supõe que a ocorrência da CVC não afetou o transporte e o metabolismo do nitrogênio nas folhas velhas de laranjeiras. Tal suposição é suportada pelas comparações mensais onde não foram encontradas diferenças significativas plantas sadias e com CVC em agosto, mês em que foram encontradas as maiores produções de órgãos florais.

Tem sido reportado que mudanças no conteúdo de potássio na plantas para uma condição próxima a de deficiência pode afetar de forma severa o crescimento e o processo reprodutivo das plantas. O efeito do alto conteúdo de potássio inclui o aumento da matéria seca das plântulas, redução na elongação dos internódios e supressão da dominância apical. Durante a fase reprodutiva, baixos conteúdos de potássio podem causar redução do tamanho do fruto em laranjeiras (Wakhloo, 1975, Bondad & Linsangan, 1979; Sing, *et al.*, 1997).

Com relação às concentrações foliares de potássio observadas durante os meses que compreenderam o período de floração e frutificação, tanto nas folhas velhas das laranjeiras sadias como nas doentes, foram encontradas quedas dos teores em setembro, seguidas de aumentos das concentrações foliares no mês seguinte (Figura 30E). A redução dos teores de potássio nas folhas velhas em setembro pode estar relacionada com a translocação deste macronutrientes para as flores em formação.

Quando se compararam os teores de potássio nas folhas velhas da plantas sadias com os apresentados pelas plantas com CVC, em cada mês, não foram verificadas diferenças

significativas entre as plantas. O mesmo resultado foi encontrado para os teores de fósforo. Este fato ratifica os resultados encontrados no período de indução, os quais indicaram que a incidência da bactéria *Xylella fastidiosa*, no geral, não afeta o fluxo e acumulação de minerais nas folhas.

Com relação aos teores de fósforo nas folhas velhas das plantas sadias observados ao longo dos meses, verificou-se uma queda de agosto a setembro. Tal queda foi provocada, possivelmente, pelo processo de remobilização deste macronutriente para suprir as flores, as folhas novas dos brotos vegetativos em desenvolvimento e aquelas encontradas nas inflorescências. Nas plantas doentes, os teores mantiveram-se constantes, provavelmente devido a uma menor drenagem deste elemento para os órgãos anteriormente citados.

Diante dos resultados obtidos pode-se supor que a idade das laranjeiras e o estágio de evolução da doença devem ter contribuído para que os processos de infecção se desenvolvessem de forma menos severa. Embora percebeu-se visualmente que as plantas com CVC apresentavam crescimento reduzido da parte aérea, redução sistema radicular e área foliar. Entretanto, estas alterações ocorridas na estrutura da planta não se refletiram de forma prejudicial na concentração de elementos na folha, como foi o caso do P e K.

Segundo Agusti (2000) o cálcio é um macronutriente muito importante para o processo de floração, principalmente por estar envolvido no desenvolvimento do pistilo e, durante a fecundação das flores, ser importante no desenvolvimento do tubo polínico.

Durante o florescimento, os teores de cálcio nas folhas novas das plantas sadias e doentes mantiveram-se constantes, porém, em outubro, as folhas de plantas com CVC apresentaram queda nos teores de cálcio (Figura 31A). A estabilidade do conteúdo de cálcio nas folhas durante o período de floração pode ser um indicativo da pouca interferência dos eventos metabólicos e morfofisiológicos no fluxo desse macronutriente para as folhas novas.

Os teores de cálcio nas folhas velhas das plantas sadias e doentes, durante o desenvolvimento floral (agosto e setembro), mantiveram-se constantes e em concentrações inferiores quando comparados com as encontradas durante o período inicial de desenvolvimento dos frutos, que normalmente ocorre em outubro (Figura 31C). Os dados indicaram que durante a floração ocorreu maior transporte deste macronutriente da raiz para o flores e ramos novos em desenvolvimento, resultando na diminuição do fluxo de cálcio para as folhas velhas. Ao longo do período inicial de frutificação, devido à redução do número de drenos, verificou-se um aumento da concentração foliar de cálcio nas folhas velhas das laranjeiras sadias e doentes.

A incidência da bactéria *Xylella fastidiosa* em laranjeiras não afetou o fluxo de cálcio para o crescimento das folhas novas e flores, semelhante ao observado para os outros macronutrientes apenas durante o desenvolvimento inicial dos frutos é que se verificou a interferência da CVC sobre as concentrações foliares de cálcio, provocando uma redução dos teores nas folhas, em comparação com as os teores encontrados nas folhas velhas das plantas sadias.

A redução dos teores de cálcio nas folhas velhas das laranjeiras doentes quando comparadas com as sadias, no mês de outubro, deve ter ocorrido devido a um menor transporte deste elemento da raiz para as folhas velhas, provocado provavelmente pela desenvolvimento das colônias da bactéria *X. fastidiosa* nos vasos do xilema durante o processo de infecção.

Com relação ao magnésio, verificou-se que esse elemento é um dos mais afetados durante o processo de floração pois, em agosto, as concentrações encontradas nas folhas novas e velhas foram muito baixas, situando-se em patamares inferiores ao ideal para o desenvolvimento de laranjeiras (Figura 31B e 31D). De acordo com Agusti (2000) para as variedades ‘Clementino’ e ‘Satsuma’, teores foliares ótimos estão em torno de 2,5 a 4,5 mg.g⁻¹

de matéria seca foliar. Em outubro, mês em que ocorreu a redução no número de drenos e conseqüentemente menor requisição por nutrientes, verificou-se aumento da concentração foliar de magnésio nas folhas novas e velhas à níveis superiores ao nível máximo considerado adequado para o desenvolvimento das plantas. Possivelmente, durante o processo de formação da flor deve ter ocorrido uma maior translocação de magnésio das folhas velhas para as flores em desenvolvimento.

O metabolismo de carboidrato é importante no processo de desenvolvimento das flores e o magnésio é um elemento relevante para o metabolismo de carboidratos. Ele atua diretamente no sistema de transporte de sacarose das células dos órgãos fontes para as células companheiras e desta para os vasos do floema (Marshner, 1995).

A presença da bactéria *Xylella fastidiosa* nas plantas de laranjeiras parece não ter interferido no transporte de magnésio da raiz para a parte aérea e também no processo de remobilização de folhas maduras para os órgãos florais. Nas folhas novas e velhas, em agosto, quando ocorre o maior pico de produção floral, os teores de magnésio em plantas sadias e doentes foram semelhantes, não se verificando diferenças significativas entre os dois tratamentos (Figura 31B e 31D). Nos outros meses verificou-se que nos dois tipos de folhas, quando os teores não foram iguais, as folhas da plantas com CVC apresentaram os maiores teores.

6.2.5. MICRONUTRIENTES

Durante o período de floração, independente do tratamento, houve a intensificação do translocação de boro para os órgãos florais em desenvolvimento, um vez que, de agosto a setembro, foram verificados decréscimos acentuados dos seus teores nas folhas novas e velhas (Figura 32A e 32D). Estes resultados são justificados pelo fato de que, quando as plantas

sadias e doentes passaram para a fase de desenvolvimento dos frutos, na qual o número de drenos sofre uma redução acentuada devido à grande queda de flores, os teores de boro aumentaram significativamente.

A partir dos dados apresentados neste trabalho, supõe-se que a presença da bactéria nos vasos do xilema deve ter interferido no transporte de boro nas plantas doentes. Pois, durante o florescimento e frutificação, as plantas com CVC, em geral, apresentaram maiores teores em relação as plantas sadias (Figura 32A e 32D). O menor teor de boro nas folhas das plantas sadias provavelmente ocorreu devido a um maior fluxo deste elemento para suprir os órgãos florais e à elevada produção de brotos vegetativos.

Diferente do boro, os teores de cobre nas folhas velhas e novas das plantas de laranjeiras sadias e doentes, não foram alterados durante o período reprodutivo, uma vez que, as plantas mantiveram as concentrações foliares constantes ao longo dos meses de agosto a outubro. Pode-se então pressupor que este elemento é transportado das raízes para os órgãos drenos em pequenas quantidades para as flores, frutos e brotos vegetativos em desenvolvimento.

A presença da bactéria nas laranjeiras deve ter limitado o transporte de cobre das raízes para as folhas novas, provavelmente devido a um desvio do fluxo deste micronutriente para a produção de órgãos reprodutivos.

Em alguns trabalhos foi verificado que o teor de cobre nas folhas é importante para o processo de floração. A medida que se aumentou a disponibilidade de cobre para a planta maior foi a sua absorção e acumulação e maior foi a percentagem de florescimento em espécies do gênero *Lemma* (Tanaka *et al.*, 1982a,b).

O efeito do ferro sobre o florescimento tem sido estudado por vários pesquisadores (Maheshwari & Gupta, 1967; Mori, 1984; Tanaka *et al.*, 1987). Esses autores constaram que em algumas espécies de plantas do gênero *Lemma*, quando cultivadas em meios de cultura,

com concentrações crescentes de ferro houve um aumento no percentual de florescimento das plantas.

Os dados apresentados neste trabalho com relação aos teores foliares de ferro sugerem que as plantas laranjeiras sadias apresentaram maior transporte, via sistema radicular, deste micronutriente para o desenvolvimento dos órgãos reprodutivos e brotos vegetativos pois, seus teores foram reduzidos a partir de agosto.

Quando se compararam mensalmente as concentrações de ferro entre folhas novas das sadias com as das plantas com CVC constatou que somente em agosto foram verificadas diferenças significativas (Figura 32C). O menor teor de ferro nas folhas novas das plantas doentes pode ser um indicativo que o transporte deste micronutriente, a partir das raízes, foi reduzido em virtude da produção de botões florais e flores.

Os teores de ferro nas folhas velhas das plantas doentes foram bem superiores aos das plantas sadias (Figura 32F). Esta redução dos teores nas plantas sadias deve estar relacionada com a ocorrência de uma maior demanda por ferro para o desenvolvimento dos cloroplastos (Maschner, 1995). Considerando que o ferro é um elemento importante na formação dos cloroplastos, principalmente por fazer parte das estruturas das proteínas como os citocromos e por estar relacionado com a ativação de enzimas no estroma, pode-se então deduzir que, com a maior produção de folhas, maior o número de cloroplasto por planta e, conseqüentemente, maior o demanda por ferro.

Como em setembro corresponde a época de finalização do processo de florescimento, pode-se presumir que a queda dos teores de ferro verificada neste mês, nas folhas velhas das plantas sadias e doentes, foi devido a uma elevada quantidade desse micronutriente utilizada pelas plantas para finalizar o desenvolvimento das flores (Figura 32F).

Com relação aos teores de manganês, observou-se que a demanda por este elemento durante o período de floração foi muito alta pois, verificou-se que as concentrações foliares

das laranjeiras sadias e doentes ao longo dos meses nas folhas novas, foram muito baixas quando comparadas com as encontradas nas folhas velhas dos dois tratamentos (Figura 33A e 33C).

Possivelmente a presença da bactéria nas de laranjeiras doentes, durante o período de floração e frutificação, não deve ter afetado o conteúdo deste elemento nas folhas novas e velhas. Tal afirmativa é baseada nas comparações entre plantas sadias e doente, onde não se verificaram diferenças entre os teores para os dois tratamentos.

Em setembro e outubro, quando se teve flores em estádios plenos de desenvolvimento e frutos iniciando o crescimento respectivamente, os teores foram menores em relação a setembro tanto nas folhas novas das plantas sadias como nas doentes. Tal fato sugere um maior fluxo de zinco durante as fases iniciais do desenvolvimento das flores e dos frutos (Figura 33B).

Os teores de zinco nas folhas velhas das plantas sadias e doentes não foram alterados durante a floração e frutificação das laranjeiras estudadas pois, as plantas durante o período de floração e frutificação mantiveram os teores desse elemento em níveis adequados para seu crescimento e desenvolvimento. A incidência da doença não afetou os teores de zinco nas folhas velhas da plantas doentes uma vez que, nos meses de agosto, setembro e outubro não foram verificadas diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 33D).

6.2.6. HORMÔNIOS

As auxinas são muito importantes no desenvolvimento florais. Plantas de *Arabidopsis* tratadas como ácido naftilfitalâmico (NPA) apresentaram um desenvolvimento floral anormal. Muitas evidências sugerem que o AIA esteja envolvido na regulação do desenvolvimento dos frutos (Taiz e Zaiger, 1998). Apesar da importância deste fitorregulador para o

desenvolvimento de flores e frutos, verificou-se que incidência da CVC não afetou as concentrações deste fitorregulador nos botões florais e flores das plantas de laranjeiras.

Gomes (2001) trabalhando com déficit hídrico, verificou que no terceiro ciclo de deficiência hídrica, ao se comparar os teores foliares de AIA entre plantas sadias e plantas com CVC irrigadas, não ocorreram diferenças significativas entre os tratamentos.

A acumulação de ABA na folha normalmente está associada a situações de estresse, entretanto, pouco se sabe sobre a interação deste regulador de crescimento com possíveis incidências de doenças. Em folhas de videira infectadas pela bactéria *X. fastidiosa*, verificou-se um aumento de ABA em comparação às plantas doentes (Goodwin *et al.*, 1988). Os resultados apresentados neste trabalho mostraram que as concentrações de ABA nos botões florais e flores de laranjeiras doentes foram iguais aos das plantas sadias. A partir dos resultados obtidos neste trabalho, pode-se sugerir que os danos causados pela bactéria às laranjeiras durante o período de indução floral, floração e frutificação não interferiram no metabolismo do ABA durante o crescimento dos botões florais e flores. Resultados semelhantes foram encontrados por Gomes *et al.* (2003), quando se avaliaram os teores de ABA nas folhas em que, não foram verificadas diferenças significativas entre plantas sadias e plantas infectadas com CVC.

7. CONCLUSÕES

1. Os açúcares solúveis são importantes para a formação e o desenvolvimento dos órgãos reprodutivos em laranjeiras.

2. A presença da bactéria *Xylella fastidiosa* nos vasos do xilema provocou limitações ao fluxo de carboidratos na laranjeira durante o processo reprodutivo.

3. A CVC provocou reduções significativas das taxas fotossintéticas durante todo o período de indução, floração e frutificação, provavelmente devido à redução do transporte de água nos vasos do xilema.

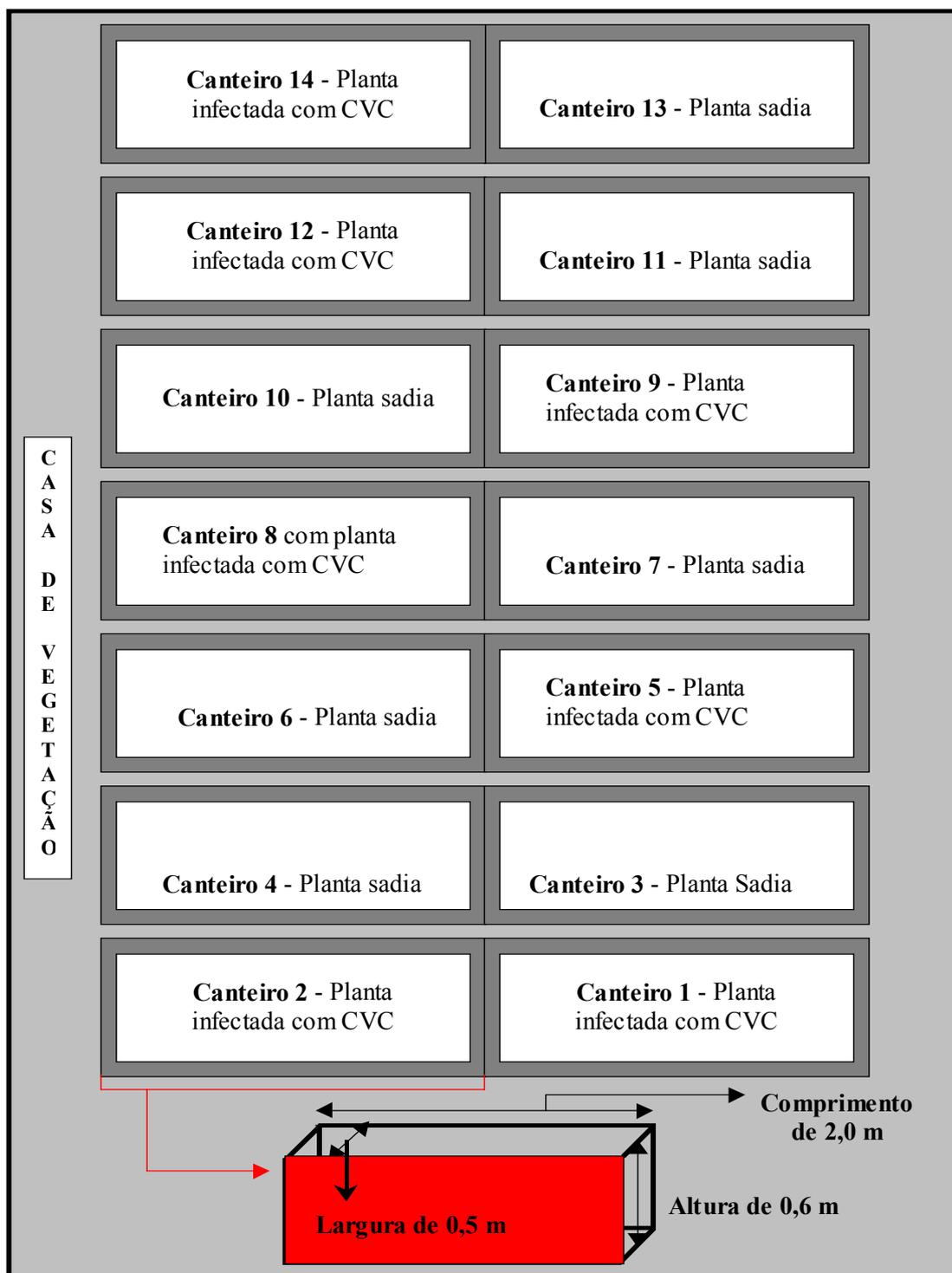
4. Durante o período de indução floral, floração e frutificação a infecção causada pela CVC afetou o transporte e a translocação de alguns macro e micronutrientes nas laranjeiras com CVC.

5. A infecção causada pela presença da bactéria nos vasos do xilema não alterou a concentração do ácido abscísico e do ácido 3-indol acético nos órgãos florais de plantas doentes.

8. APÊNDICE

Apêndice 1

Figura 1. Demonstração da disposição das plantas cultivadas nos canteiros em casa de vegetação durante a etapa experimental. Nas mesma figura verifica-se as medidas de cada canteiro.



Apêndice 2

Tabela 1. Resultado da análise de solo para as amostras retiradas dos canteiros de 1 a 7 (C₁ a C₇), antes do plantio das laranjeiras.

Determinações			Amostras de solo						
Sigla	Descrição	Unidade	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
M. O.	Mat. Orgânica	g.dm ⁻³	32	34	24	46	32	29	50
PH	Solução CaCl ₂		6,3	6,5	6,5	6,9	6,0	6,9	7,0
P	Fósforo Resina	mg.dm ⁻³	151	145	101	285	109	120	323
K	Potássio	mmol _c .dm ⁻³	11,4	9,0	4,8	12,8	9,6	7,0	11,6
Ca	Cálcio	mmol.dm ⁻³	58	65	49	98	43	96	115
Mg	Magnésio	mmol.dm ⁻³	22	24	14	29	20	20	19
H+Al	Ac. Potencial	mmol _c .dm ⁻³	18	15	16	12	22	13	12
S.B.	Soma Bases	mmol _c .dm ⁻³	91,4	98,0	67,8	139,6	72,6	123,0	145,6
CTC	Cap. Troca Cat.	mmol _c .dm ⁻³	109,6	112,8	84,2	151,8	95,1	136,3	157,6
V	Sat. Bases	%	83	87	81	92	76	90	92
B	Boro	mg.dm ⁻³	0,46	0,33	0,23	0,44	0,56	0,29	0,28
Cu	Cobre	mg.dm ⁻³	5,2	6,2	4,2	7,5	4,3	4,5	5,4
Fe	Ferro	mg.dm ⁻³	37	32	20	43	31	21	34
Mn	Manganês	mg.dm ⁻³	17,6	16,8	11,3	22,1	17,4	11,1	17,1
Zn	Zinco	mg.dm ⁻³	26,9	30,9	21,8	48,7	16,5	23,2	38,9

*Determinação via método IAC de análise de solo (Raij *et al.*, 2001)

Apêndice 3

Tabela 1. Resultado da análise de solo para as amostras retiradas dos canteiros de 8 a 14 (C₈ a C₁₄), antes dos plantio das laranjeiras

Determinações			Amostras de solo						
Sigla	Descrição	Unidade	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14
M. O.	Mat. Orgânica	g.dm ⁻³	31	34	34	40	43	41	34
PH	Solução CaCl ₂		6,3	6,6	6,1	6,2	6,6	6,4	6,4
P	Fósforo Resina	mg.dm ⁻³	149	166	166	197	275	163	126
K	Potássio	Mmol.dm ⁻³	6,5	11,7	9,2	9,3	11,4	9,3	6,7
Ca	Cálcio	Mmol.dm ⁻³	64	74	55	80	90	79	84
Mg	Magnésio	Mmol.dm ⁻³	32	22	21	21	27	28	19
H+Al	Ac. Potencial	Mmol _c .dm ⁻³	18	16	22	22	16	18	18
S.B.	Soma Bases	Mmol _c .dm ⁻³	104,5	107,7	85,2	110	128,4	116,3	109,7
CTC	Cap. Troca Cat.	Mmol _c .dm ⁻³	122,7	124,1	107,7	132,8	144,8	134,5	127,9
V	Sat. Bases	%	85	87	79	83	89	86	86
B	Boro	mg.dm ⁻³	0,75	0,36	0,64	0,42	0,40	0,51	0,55
Cu	Cobre	mg.dm ⁻³	4,5	4,4	6,0	5,8	6,0	5,5	6,6
Fe	Ferro	mg.dm ⁻³	29	29	29	27	39	28	23
Mn	Manganês	mg.dm ⁻³	14,8	16,2	18,9	27,1	21,3	21,9	21,4
Zn	Zinco	mg.dm ⁻³	20,1	17,8	21,3	16,6	24,5	17,3	20,0

*Determinação via método IAC de análise de solo (Raij *et al.*, 2001)

Apêndice 4

Figura 2. Potencial hídrico medido antes do amanhecer, durante o mês de junho.

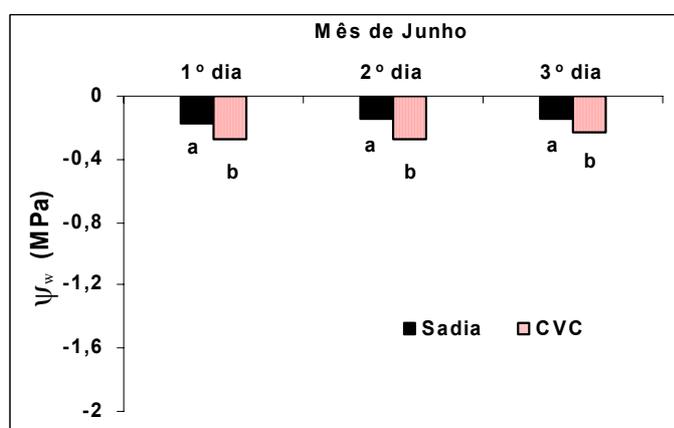
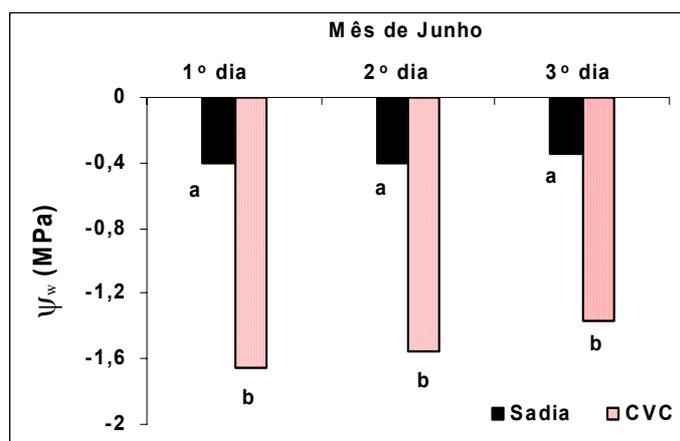


Figura 3. Potencial hídrico medido ao meio dia, durante o mês de junho.



9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdalla, K.M., Meligi, M.A., Hussien, A.H. & Ahmed, T., 1986. A. Mineral aspects of floral development in citrus. 1. Changes in floral nitrogen, potassium and phosphorus. *Acta Horticulturae* 175:199-207.
- Abecitrus, 2003. Home page da Associação Brasileira dos Exportadores de cítricos <http://abecitrus.com.br>.
- Acosta, J.F., Rodriguez, R., Gonzalez, J.L., Nieves, N., Blanco, M.; Escalona, M., Borroto, C. G., Gozalez, A. & Garcia, A., 1995. Efecto del estresse hidrico y las aplicaciones de urea sobre la inducion floral de los citricos. *Revista Brasileira de Fruticultura* 17: 59-70.
- Agusti, M., 2000. Citricultura. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, 415 p.
- Agusti, M., Almeida, V. & Pons, J., 1992. Effects of girdling on alternate bearing in citrus. *Journal of Horticultural Science* 67:203-210.
- Ahmad, A., Abrol, Y.P. & Abdin, M.Z., 1999. Effect of split application of sulphur and nitrogen on growth and yield attributes of *Brassica* genotypes differing in time of flowering. *Canadian Journal of Plant Science* 79:175-180
- Aldrich, J.H., 1992. Distribution of *Xylella fastidiosa* within roots of peach. *Plant Disease* 76:885-888.
- Amaral, J.D., 1977. Os citrinos. Livraria Clássica, Lisboa, 753 p.
- Amaro, A.A., Maia, M.L. & Ghilardi, A.A., 1998. Custos de produção na atual conjuntura da citricultura. IN: Seminário Internacional de Citros – tratos culturais, Bebedouro, Brasil, Anais pp. 481-499.
- Amorim, L. Bergamin, F.O., Palazzo, D.A., Bassanezi, R.B., Fodoy, C.V. & Torres, G.A.M., 1993. Clorose Variegada dos Citros: uma escala diagramática para avaliação da severidade da doença. *Fipatologia Brasileira* 18:174-180.

- Andersen, P.C. & French, N.J., 1987. Biophysical characteristics of peach trees infected with phony peach disease. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* 31:25-40.
- Bagnall, D.J. & King, W., 2001. Phytochrome, photosynthesis and flowering of *Arabidopsis thaliana*: photophysiological studies using mutants and transgenic lines. *Australian Journal Plant Physiology* 28:401-408.
- Bataglia, O.C., Furlani, A.M.C., Teixeira, J.P.F., & Gallo, J. R. 1983. Métodos de análise química. *Bol. Téc. Inst. Agron., Campinas*, 78, 48 p.
- Bereta, M.J.G., Kens, Derrick, K., Lee, R.F., Harakava, R. & Ricci, A., 1997. Testes para detecção da bactéria *Xylella fastidiosa* em citros. *Laranja* 113-122.
- Bernier, G., 1988. The control of floral evocation and morphogenesis. *Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology*, 39:175-219.
- Bernier, G. Havelange, A., Houssa, C., Petitjean, A. & Lejeune, P., 1993. Physiological signals that induce flowering. *The Plant Cell* 5:1147-1155.
- Bodson, M. & Outlaw, Jr.W., 1985., Elevation in the sucrose conten of the shoot apical meristem of *Sinapis alba* at floral evocation. *Plant Physiology* 79:20-24.
- Bodson, M., King, R.W., Evans, R.W. & Bernier G., 1977. The role of photosynthesis in flowering on the long-day plant *Sinapis alba*. *Australian Journal Plant Physiology* 4:467-478.
- Bolding, H., Smith, G.S. & Klages, K., 2003. Seasonal concentration of non-structural carbohydrates of five *Actinidia* species in fruit, leaf and fine root tissue. *Annals of Botany* 85:469-476.
- Bondad, N.D. & Linsangan, E., 1979. Flowering in mango induced with potassium nitrate. *Hortscience* 14:528-528.
- Cabrera, R.I., Evans R.T. & Paul, J.L., 1995. Nitrogen partition in rose plants over a flowering cycle. *Scientia Horticulturae* 63:67-76.

- Coen, E. S. & Carpenter, R. 1993. The metamorphosis of flowers. *The Plant Cell* 5:1175-1181.
- Davies, F. S. & Albrigo, L. G., 1994. History, distribution and uses of citrus fruit. IN: _____. *Citrus*. Wallingford: CAB International, 1994. p.1-11.
- Davenport, T. L., 1983. daminozide and gibberellin effect on floral induction of *Citrus latifolia*. *Hortscience* 18:947-949.
- De Negri, J.D., 1990. Clorose Variegada dos Citros: nova anomalia afetando pomares de São Paulo e Minas gerais. Com. Tec. N°82, Ext. Rural, CATI, Campinas. 6p.
- Di Giorgi, F., 1991. Influencia climática na produção de laranja. *Laranja* 2:163-192.
- Digonnet, C., Aldon, D., Leduc, N., Dumas, C. & Rougier, M., 1997. First evidence of a calcium transient in flowering plants at fertilization. *Development* 124:2867-2874.
- Donadio, L.C. & Moreira, C.S., 1997. Clorose Variegada de citros. 1ª e., Bebedouro. 162 p.
- Elt-Otmani, M., Lovatt, C.J., Coggins, Jr., C.W. & Agusti, M., 1995. Plant growth regulators in citriculture: Factors regulating endogenous levels in *Citrus* tissue. *Critical Reviews in plants Sciences* 14:367-412.
- El-Sayed, A.A., & Shaaban, M.M., 1999. Monthly monitoring of the nutrient status in citrus leaves as a guide for proper fertilization. *Journal for Scientific Research Agricultural Sciences* 4:17-30.
- Erickson, L.G., 1968. The general physiology of citrus. IN: *The citrus industry*. (Reuther, W., Batchelor, L. D., Weber, H. J. eds), v.2, University of California, Riverside pp.86-122.
- Erner, Y., 1992. Carbohydrate content associated with bud differentiation. *HortiScience* 27:489-716.
- Figueiredo, J.O. 1980. Variedade copa de valor comercial. In: RODRIGUES, O., VIEGAS, F. C. P. (Coods). *Citricultura Brasileira*. Campinas: Fundação Cargill, 1:241-278.
- Fonfria, M.A., Orenge, V.A., Alcaina, M.A., Ferrer, M.J. & Romero, V.E., 1995. Desarrollo y tamaño final del fruto em los agrios. *Generalitat Valenciana, Valencia*, 80 p.

- Fundecitrus, 2003. Home page do Fundo Paulista de defesa da citricultura
<http://fundecitrus.com.br>.
- Garcia-Luiz, A., Almela, V.; Moneri, C., Augusti, M. & Guardiola, J.L., 1986. Inhibition of flowering in vivo by existing fruits and applied growth regulators in Citrus unshiv. *Physiologia Platarum* 66:515-520.
- Gohen, A.C., Nyland, G. & Lone, S.K., 1973. Association of a rickettsia like organism with Pierce's disease of grapevines on alfafa dwarf on heat therapy of the disease in grapevines. *Phytopathology* 63:341-345.
- Goldschmidt, E.E. & Monselise, S.P., 1972. Hormonal control of flowering in citrus trees and other woody perennials. IN: *Plant Growth Substances* (Carr, D. J., ed), Springer, Heidelberg, pp.758-766.
- Goldschmidt, E.E., 1982. The carbohydrate balance of reserves for flowering and fruiting. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 107:206-208.
- Goldschmidt, E.E. & Golomb, A., 1982. The carbohydrate balance of alternate-bearing citrus tree and significance of reserves for flowering and fruiting. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 107:206-208.
- Goldschmidt, E.E., Aschkennazi, N., Herzano, Y., Shaffer, A.A. & Monselise, S.P., 1985. A role for carbohydrate levels in the control of flowering in citrus. *Scientia Horticulturae* 29:159-166.
- Gomes, M.M.A., 2001. Relações hídricas e conteúdo de ácido abscísico e ácido 3-indol em laranjeiras 'Pera' com clorose variedade dos citros. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, tese de Doutorado.
- Gomes, M.M.A., Lagoa, A.M.M.A., Machado, E.C. & Medina, C.L., 2003. Abscisic acid and indole-3-acetic acid contents in orange trees infected by *Xylella* and submitted to cycles of water stress. *Plant Growth Regulation* 36:263-270.

- Goodwiin, P.H., DeEway, 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.* 32:17-32.
- Goodwiin, P.H., De Way, 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.
- Graves, C.J., Adams, P. & Winson, G.W., 1978. The regulation of flowering by copper in *Chrysanthemum morifolium*. *Annals of Botany*42:1241-1243.
- Guardiola, J.L., 1977. Varietal response to nutrition. IN: International Citrus Congress, florida, Estados Unidos p.26-30.
- Guardiola, J.L., Monerri, C. & Agusti, M., 1982. The inhhhibitory effect of gibberellic acid on flowering in *Citrus*. *Physiologia plantarum* 55:136-142.
- Guardiola, J.L., Garcia-Mari, F. & Agusti, M. 1984. Competition and fruit set in the Washington navel orange. *Physiologia plantarum*, 62:297-302.
- Guardiola, J.L., 1992. Florescimento e produtividade dos citrus. *Laranja & Cia* 33:4-6.
- Habermann, G., 1999. Trocas gasosas e relações hídricas em laranjeiras-doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck cv. Pera) com clorose variegada dos citrus (CVC). Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Brasil, tese de Mestrado.
- Hall, A.E., Khairi, M.M.A. & Asbell, C.W., 1977. Air and soil temperature effects on flowering of Citrus. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 102:261-263.
- Hoad, G.V., 1995. Transport of hormones in the phloem of higher plants. *Pant Growth Regulation.* 16:173-182.
- Hopkins, D.L., 1989. *Xylella fastidiosa*: xilem-limited bacterial pathogen of plants. *Annual Review of Phytopathology* 27:271-290.

- Huala, E. & Sussex, I.M., 1993. Determination and cell interaction in reproductive meristems. *The Plant Cell* 5:1157-1165.
- Ito, A., Hayama, H. & Kashimura, Y., 2003. Sugar metabolism in bud during flower bud formation: a comparison of the Japanese pear [*Pyrus pyrifolia* (Burm.) Nak.] cultivars possessing different flowering habitats. *Scientia Horticulturae* 96:163-175.
- Jordan, B.R., 1993. *The molecular biology of flowering*. CAB, Wallingford, 266 p.
- Júnior, R.P.L. & Leite, R.M.V., 1991. Associação da *Xylella fastidiosa* com a clorose variegada de citros. *Summa Phytopathologica*. 17:7.
- Kalil, G.P.C., Terra, M.M., Filho, A.N.K., Macedo, J.L.V. & Pires, E.J.P., 1999. Anelamento e ácido giberélico na frutificação da uva 'Maria' sem sementes. *Scientia Agrícola* 56:1-15.
- Khairi, M.M.A. & Hall, A.E., 1976. Effect of air and soil temperature on vegetative growth of *Citrus*. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 101:337-341.
- Khatibu, A.I., Carpenter, A. Makame, M.H. & Saleh, M.M., 1985. Climatic effects on the flowering and fruiting of wood perennial fruit trees in Zanzibar. *Acta Horticulturae* 153:7-61.
- Khurana, J.P., Tamot, B.K. & Maheshwari, S.C., 1988. Effect of calcium chloride levels on salicylic induced flowering in *Lemna paucicostata* 6746. *Biochem. Physiol. Pflanzen* 183:515-520.
- Kojima, K., Yamada, Y. & Yamamoto, M., 1994. Distribution of ABA and AIA within a developing Valencia orange fruit and its parts. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 63:335-339.
- Kojima, K., 1996. Changes of abscisic acid, indole-3-acetic acid and gibberellin-like substances in the flowers and developing fruitlets of citrus cultivar 'Hyuganatsu'. *Scientia Horticulturae*. 65:263-272.

- Kojima, K., Yamamoto, M., Goto, A. & Matsumoto, R., 1996. Changes in ABA, AIA and Gas contents in reproductive organs of Satsuma Mandarin. *Journal Japan Society Horticulture Science* 65:237-243.
- 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.). *Scientia Horticulturae* 79:185-194.
- Laranjeiras, F.F., 1997. Dez anos de clorose variegada dos citros: o que sabemos?. *Laranja*, v.18, p.123-141.
- Lavon, R., Goldschmidt, E.E., Salomon, R. & Frank, A., 1995. Effect of potassium, magnesium, and calcium deficiencies on carbohydrate pool and metabolism in citrus leaves. *Journal American Society Horticultural Science* 120:54-58.
- Lejeune, P., Bernier, G., Requier, M.C. & Kinet, J.M., 1993. Sucrose increase during induction in the phloem sap collected at the shoot of the long day plant *Sinapis alba* L. *Planta* 190:71-74.
- Lens, F., 1966. Flower and fruit development in 'Valencia Late' orange as affected by type of inflorescence and nutritional status. *Hortic. Res.* 6:65-78.
- Lima, J.E.O., 1990. Florescimento e frutificação em citrus. *Laranja* 10:243-253.
- Lomas, T., & Burd, P., 1983. Prediction of the commencement and duration of the period of citrus. *Agric. Meteorol.* 28:387-396.
- Lord, E.M.C. & Eckard, K.J., 1987. Shoot development in *Citrus sinensis* L. (Washington Navel Orange) II alteration of development of flowering shoots after GA₃ treatment. *Botanical Gazette*. 148:17-22.
- Lowatt, C., Zheng, Y. & Hake, K.D. 1988. Demonstration of a change in nitrogen metabolism influencing flower initiation in Citrus. *Israel Journal of Botany*, 37:181-188, 1988.

- Ma, Q., Longnecker, N & Dracup, M., 1997. Nitrogen deficiency slow leaf development and delays flowering in narrow-leafed lupin. *Annals of botany* 79:403-409.
- Machado, M.A., 1997. Clorose variegada dos citros: Pesquisa em desenvolvimento. *Laranja* 18:143-154.
- Machado, E.C., Medina, C.L., gomes, M.M.A. & Habermann, G., 2002. Fotossínteses, condutância estomática e potencial da água na folha em laranja 'Valência' em diferentes meses. *Scientia Agricola* 59:53-58.
- Machado, E.C., Oliveira, R.F., Medina, C.L., Souza, R.P., Ribeiro, R.V., Silva, J.A.B., Stuchi, E.S. & Pavan, L.C., 2001. Respostas fisiológicas em laranja 'Natal' com clorose variegada dos citros (CVC) sob irrigação em condições de campo, em diferentes meses do ano. IN: VIII Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal. Ilhéus, Brasil, anais, cd-rom.
- Machado, E.C., Quaggio, J.A., Lagoa, A.M.M.A., Ticelli, M. & Furlani, P.R., 1994. Trocas gasosas e relações hídricas em laranjeiras com clorose variegadas dos citros. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* 6(1):53-57.
- Malavolta, E. & Prates, H.S., 1994. Seja o doutor dos seus citros. *Informações Agronômicas*, n. 65, 16 p.
- Malavolta, E., Prates, H.S., Vitti, G.C. & Pinto, W.B.S., 1993. Novas observações sobre "amarelinho" ou clorose variegada de citros. *Laranja* 1:177-200.
- Marinho, C.S., 1994. Manejo para a produção exteoporânea de frutos de tangoreira (*Citrus sinensis* (L.) Osbec x *Citrus reticulata* Blanco cv Murcote). Universidade Federal de Lavras, Lavras, Brasil, Tese de Mestrado.
- Medina, C.L. & Machado, E.C., 1998. Trocas gasosas e relações hídricas em laranja 'Valência' enxertada sobre limoeiro 'Cravo' trifoliata sob deficiência hídrica. *Bragantia* 57:15-22.

- Medina, C.L. & Machado, E.C., 1998., Gomes, M.M.A., 1999. Condutância estomática, transpiração e fotossíntese em laranjeiras 'Valência' sob deficiência hídrica. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*. 11:29-30.
- Marschner, H., 1995. Mineral nutrition of the higher plants. 2 ed., San Diego, Academic Press, 862 p.
- Masheshwari, S. C. & Gupta, S. 1967. Induction of flowering in *Lemma paucicostata*, a short-day plant, by chelating agents and iron. *Planta* 77:95-98.
- Medina, C.L., Nunes, W.C., Machado, M.A. & Machado, E.C., 1998. Transmission of *Xylella fastidiosa* by spliced approach grafting IN: XIV Internatinal Organization of Citrus Virologists, Campinas, Sp, Brasil, resumos, p. 25.
- Medina, C.L., 2002. Fotossíntse, relações hídricas e alterações bioquímicas em laranjeira 'Pera' com CVC e submetida à deficiência hídrica. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, Tese de Doutorado.
- Meeks-Wagner, R., 1993. Gene expression in the early floral meristem. *The Plant Cell*, 5:1167-1174.
- Mircetich, S.M., Love, S.K.; Moller, W.J. & Nyland, G., 1976. Etiology of almond leaf scorch disease and transmission of the causal agent. *Phytopathology* 66:17-24.
- Micallef, B.J., Haskins, K.A., Vanderveer, P.J., Roh, K. & Shewmaker, C.K., Sharkey, T.D., 1995. Altered photosynthesis, flowering, and fruiting in transgenic tomato plants that in increased capacity for sucrose synthesis. *Planta* 196:327-334.
- Monselise, S.P. & Halevy, A.H., 1964. Chemical inhibition and promotion of citrus flower bund induction. *Proceeding of American society for Horticultural Science* 84:141-145.
- Monselise, S.P. & Goren, R., 1978. The role of internal factors and exogenous controls in flowering, peel growth, and abscission in citrus. *HortScience* 13:134-139.

- Monselise, S.R. & Lenz, F., 1980. Effect of fruit load on photosynthetic rates of budded apple trees. *Gartenbauwissenschaft*. 45, 220-224.
- Monselise, S.P., Goldschmidt, E.E. & Colomb, A. 1981 Alternate bearing in citrus and ways of control. IN: International Society of Citriculture, Proceeding of American society for Horticultural Science 1:239-242.
- Monselise, S.P., 1986. Citrus. IN: Monselise, S. P. (ed). Academic Press, Florida, p.87-108.
- Mori, M., 1984. Effects of ferrous and phosphate ions on flowering in *Lemna pasciscotata* 6746 in diluted hutner's medium. *Plant and Cell Physiology* 25:929-933.
- Moss, G. I., 1971. Effect of fruit on flowering in relation to biennial bearing in sweet orange (*Citrus sinensis*). *J. Hort. Sci.* 46:177-184.
- Moss, G.I., 1976. Temperature effects on flower initiation in sweet orange (*Citrus sinensis*). *Aust. J. Agric. Res.* 27:399-407.
- Nelson, S., 1944. A photometric adaptation of the Somogy method for determination of glucose. *Journal Biology Chemical* 153:375-380.
- Nir, I., Goeren, R. & Leshem, B., 1972. Effects of water stress gibberellic acid and 2-chloroethyltrimethylammoniumchloride (CCC) on flower differentiation in "Eureka" lemon trees. *Journal of American Society for Horticultural Science* 97:774-748.
- Ogata, T., Ueda, Y., Shiozaki, S., Horiuchi, S. & Kawase, K., 1995. Effects of gibberellin synthesis inhibitors on flowers setting of Satisuma Madarin. *Journal Japan Society Horticulture Science*. 64:251-259.
- Paramasivam, S., Alva, A.K., Hostler, K.H., Easterwood, G.W. & Southwel, J. S., 2000. Fruit nutrient accumulation of four orange varieties during fruit development. *Journal fo Plant nutrition*. 23:313-327.
- Paradela-Filho, O., Sugimori, M.H. Ribeiro, J.J.A., Garcia-Junior, A. Bereta, M.J., Harawa, R., Machado, M.A., Larajeiras, F.F., Neto, J.R. & Berian, L.O.S., 1995. Primeira

- constatação em cafeeiro no Brasil da *Xylella fastidiosa* causadora da Clorose Variegada dos citros. Laranja 16:135-136.
- Paradela-Filho, O., Sugimori, M.H. Ribeiro, J.J.A., Garcia-Junior, A. Bereta, M.J., Harakawa, R., Machado, M.A., Larajeiras, F.F., Neto, J.R. & Berian, L.O.S., 1997. Constatação da *Xylella fastidiosa* em cafeeiro no Brasil. Summa Phytopathologica 23:46-48.
- 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., 1999. Caracterização de estruturas anatômicas de citros de cafeeiro infectado com *Xylella fastidiosa*. Laranja 20:55-76.
- Raij, B.V., Cantarella, H., Quaggio, J.A. & Furlani, A.M.C., 1997. Recomendação de adubação e calagem para o estado de São Paulo. Boletim Técnico, IAC, 2ª. Ed., n. 100, Campinas, 285 p.
- Raij, B.V., Andrade, J.C., Cantarella, H., Quaggio, J.A., 2001. Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais. Instituto Agrônomo de Campinas, 285 p.
- Reddy, R.V.S., Rao, M.S., Ramavatharam, N & Reddy, K. S., 1991. Chemical composition of sweet orange. Indian Journal of Agricultural Science 61:207-209.
- Reuther, W.I., 1973. Climate and citrus in flower behavior. IN: The citrus industry (Reuther, W. I. ed.). University California, Riverside 3:280-337.
- Rodrigues, M.V.M., Gomes-Ortega, M. & Alvarez-Tinaut, M. C.1981. Boron, copper, iron, manganese and zinc contents in leaves of flowering sunflower plants (*Helianthus annuus*, L.), grown with different boron supplies. Plant and Soil 62:461-464.
- Rossetti, A.H. & De Negri, D., 1990. Clorose variegada dos citros CVC. Laranja 11:1-14.
- Rossetti, V., 1991. Clorose Variegada de Citros CVC. IN: Citricultura Brasileira (Rodrigues, O., Vegas, F. Pompeu JR., J., Amaro, A.A.), Fundação Cargill. Campinas, 941 p.

- Ruiz, T., Gracia-luiz, A., Moneri, C. & Guardiola, J.L., 2001. Carbohydrates availability to fruitlet abscission in *Citrus*. *Annals of Botany* 87:805-812.
- Sagee, O. & Erner, Y., 1991. Gibberellins and abscisic acid contents during flowering and fruit set of “Shamouti” orange. *Science Horticulturae* 48:29-39.
- Saidha, T., Goldschmidt, E.E. & Monselise, S.P., 1985. Endogenous cytokinins from developing “Shamouti” orange fruits derived from leafy and leafless inflorescences. *Science Horticulturae* 26:35-41.
- Salisbury, F.B. & Ross, C.W., 1991. *Plant Physiology*. Wadsworth. California, 682 p.
- Salva, R.A., Roberto, S.R. & Carlos, E.F., 1995. Situação da clorose variegada dos citros no Estado de São Paulo. *Laranja* 16:1166-1175.
- Sanz, A., Moneri, C., Gonzalez-Ferrer, J. & Guardiola, J. L., 1987. Changes in carbohydrates and mineral elements in Citrus leaves during and fruit set. *Physiologia Plantarum* 69:93-98.
- Sale, P. 1998. Seasonal changes in the nutritional status of citrus leaves and leaf sampling in New Zealand. *Orchardist* 71:65-68.
- Sema, A., Kar, P.L. & Sanyal, D., 1999. Influence of flushes, age of leaf and types of shoot on the fluctuations of leaf micro-nutrients levels in Assam lemon. *Horticultural Journal* 12:13-19.
- Shirashankara, K.S. & Mathai, C.K., 2000. Inhibition of photosynthesis by flowering in mango (*Mangifera indica* L.). A study by gas exchange methods. *Scientia Horticulturae* 83:205-212.
- Sing, C.S., Patiram, Ram, M., Prasad, R.N. & Chandra, A. Leaf nutrient status of fruiting terminals of mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) orchards for diagnosis. *Journal of Hill Research*. 10:158-160.

- Sing, K.P., Ramachandran & Uma, S., 1997. Growth, flowering, corn yield and corn-rot incidence as affected by level and frequency of potassium application in gladiolus (*Gladiolus grandiflorus*). *Indian Journal of Agricultural Sciences* 67:404-406
- Schlenk, H. & Gellerman, J.L., 1960. Esterification of fatty acids with diazomethane on a small scale. *Anal. Chem.* 32:213-222.
- Somogy, M. 1952 Notes on sugar determination. *Journal Biology.* 195:19-23.
- Souza, M., 1979. Adubação de plantas cítricas. *Informe Agropecuário* 5:26-31.
- Storey, R. & Treeby, M.T., 2002. Nutrient uptake into navel oranges during fruit development. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 77:91-99.
- Sugimoto, T., Nomura, K., Masuda, R., Sueyoshi, K. & Oji, Y., 1998. Effect of nitrogen application at the flowering stage on the quality of soybean seeds. *Journal Of Plant Nutrition* 21:2065-2075
- Taiz, L. & Zeiger, E., 1998. *Plant Physiology*. 2^a ed. The Benjamin/Cumming Publishing, Company Inc., California. 695 p.
- Takeno, K., 1993. Evidence for the involvement of calcium ions in the photoperiodic induction of flowering in *Pharbitis nil*. *Plant Cell Physiology.* 34:221-225.
- Tanaka, O., Nasu, Y., Takimoto, A. & Kugimoto, M., 1982a. Absorption of copper by *Lemna* as influenced by some factors which nullify the copper effect on flowering and growth. *Plant and Cell Physiology* 23:1291-1296.
- Tanaka, O., Nasu, Y., Yanase, D., Takimoto, A., Kugimoto, M. & Kogimoto, M., 1982b. PH dependence on the copper on flowering, growth and chlorophyll content on *Lemna paucicostata* 6746. *Plant and Cell Physiology* 23:1479-1482.
- Tanaka, O., Nasu, Y., Sonomyama, A., Maehara, Y., Kobayashi, T., Nawafune, H. & Kugimoto, M., 1987. Effects of exogenous amino acids on iron uptake in relation to their

- effects on photoperiodic flowering in *Lemma paucicostata* 6746. *Plant Cell Physiology* 28:697-702.
- Vemmos, S. N., 1995. Carbohydrate changes in flower, leaves, shoots and spur of Cox's Orange Pippin apple during flowering and fruit setting periods. *Journals of Horticultural Science* 10:889-900.
- Villafane, V.E., Munos, F.J.E. & Torres, H.R., 1989. Floracion crecimiento y maduracion de la Naranja Valle Washington *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. *Acta Agronomia* 34:142-149.
- Voguel, A.I., 1956. *Practical organic chemistry*. Longman, New York, 1188 p.
- Wakhloo, J.L., 1975. Studies on the growth, flowering, and production of female sterile flower as affected by different levels of foliar potassium in *Solanum sisymbriifolium* Lam. *Journal of Experimental Botany*. 26:425-432.
- Xu, G., Wolf, S. & Kafafi, U., 2001. Effect of varying nitrogen form and concentration during growing season on sweet pepper flowering and fruit yield. *Journal of Plant nutrition* 24:1099-1116.
- Yamanishi, O.K., 1994. Effect of spring day/night temperature on flower development, fruit set and fruit quality on strangulated Pummelo trees. return bloom, fruit quality and yield of pummelo trees grown in a plastic house. *Journal Japan Society Horticulture Science* 63:493-504.
- Yamanishi, O.K., 1995. Trunk strangulation and winter heating effects on carbohydrate level and its relation with flowering, fruiting and yield of 'Tosa Butan' pummelo grown in a plastic house. *Journal of Horticultural Science* 70:85-95.
- Yamanishi, O.K. & Hasegawa, K., 1995. Trunk strangulation responses to the detrimental effect of heavy shade on fruit size and quality of "Tosa Buntan" pummelo. *Journal Japan Society Horticulture Science* 70:875-887.

- Yamanishi, O.K., Nakajima, Y. & Hasegawa, K., 1995. Effect of trunk strangulation degree in late on return bloom, fruit quality and yield of pummelo trees grown in a plastic house. *Journal Japan Society Horticulture Science* 64:31-40.
- Zeevaart, J.A.D., 1976. Physiology of flower formation. *Annual Review of Plant Physiology*. 27:321-348.