

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

CAMILO LÁZARO MEDINA



**FOTOSSÍNTESE, RELAÇÕES HÍDRICAS E
ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS EM LARANJEIRA
'PÊRA' COM CVC E SUBMETIDA À DEFICIÊNCIA
HÍDRICA**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Eduardo C. Machado
CAMILO LÁZARO MEDINA
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia,
para a obtenção do título de Doutor em
Biologia Vegetal

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Caruso Machado

2002

i

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE Be
Nº CHAMADA T/UNICAMP
M468f
V _____ EX _____
TOMBO BCI 50868
PROC 16.837/02
C _____ DX _____
PREÇO R\$ 11,00
DATA 12/09/02
Nº CPD _____

CM00173038-B

BIB ID 256995

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

M468f **Medina, Camilo Lázaro**
Fotossíntese, relações hídricas e alterações em laranjeira "Pera" com
CVC e submetida à deficiência hídrica/Camilo Lázaro Medina. --
Campinas, SP:[s.n.], 2002

Orientador: Eduardo Caruso Machado

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Instituto
de Biologia

1. Fotossíntese. 2. Bioquímica. 3. Citros. I. Machado, Eduardo
Caruso. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Biologia. III. Título.

Data da Defesa: 18/07/2002

Banca Examinadora

Titulares

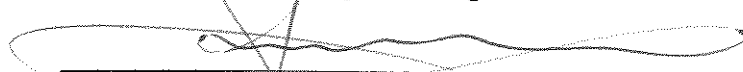
Prof. Dr. Eduardo Caruso Machado (Orientador)



Prof. Dr. Antonio Roberto Pereira



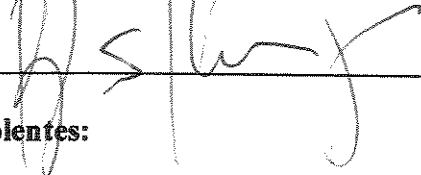
Prof. Dr. João Domingos Rodrigues



Prof. Dr. Paulo Mazzafera



Prof. Dr. Ricardo Ferraz de Oliveira



Suplentes:

Prof. Dr. Marcos Antonio Machado

Profª. Dra. Ana Maria Magalhães Andrade Lagôa

200243508

“A meio caminho entre a fé e a crítica está a estalagem da razão. A razão é a fé no que se pode compreender sem fé; mas é uma fé ainda, porque compreender envolve pressupor que há qualquer coisa compreensível”

(Fernando Pessoa)

Aos meus filhos Rodrigo e Guilherme

à Priscila

aos meus pais

aos meus irmãos

pelo amor

dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus por todas as coisas.

Ao Dr. Eduardo Caruso Machado, pela orientação brilhante, dedicação preciosa e amizade enriquecedora.

À Dra. Ana Maria Magalhães Andrade Lagôa, pela orientação inicial deste trabalho, apoio e incentivo.

Ao Dr. Marcos Antonio Machado, pela colaboração fundamental, sugestões importantes e incentivos para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Paulo Mazzafera, pelos ensinamentos, amizade e apoio essencial para a realização dos estudos bioquímicos.

À Dra. Priscila Fratin Medina pelo auxílio e sugestões importantes.

À colega Mara Menezes de Assis Gomes, pela amizade, apoio e valiosa colaboração durante a realização deste trabalho.

Ao colega Gustavo Habermann pela amizade e auxílio na obtenção dos dados.

À Dra. Maria Luiza Targon e Dra. Mariângela Cristofani pelo auxílio nas análises bioquímicas e sugestões.

Ao Dr. José Antonio Quaggio pelo incentivo e amizade.

Aos professores do Departamento de Fisiologia Vegetal pelos ensinamentos e amizade.

Ao Grupo de Consultores em Citros (GCONCI) pelo apoio e incentivo.

Aos colegas de curso Carlos, Cristininha, Fabiano, Kátia, Luciana, Malu, Marluce, Milton e Sandra, pela agradável convivência e incentivos.

Aos colegas, pesquisadores e funcionários do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento em Ecofisiologia e Biofísica e do Centro APTA “Sylvio Moreira” pela dedicação, apoio e colaboração.

Ao Centro de Pesquisa e Desenvolvimento em Ecofisiologia e Biofísica do Instituto Agrônomo pela oportunidade e apoio.

Ao Centro APTA Citros ‘Sylvio Moreira’ pela concessão do espaço, materiais e equipamentos necessários para realização dos experimentos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de estudos.

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

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

índice

Banca examinadora.....	iii
Agradecimentos.....	v
Índice.....	vii
Abreviaturas.....	xi
Resumo.....	xii
Summary.....	xv
1. Introdução.....	1
1.1. Clorose variegada dos citros.....	1
1.2. Hipóteses sobre os mecanismos de patogênese de <i>X. fastidiosa</i>	5
1.3. Objetivos.....	14
2. Capítulo I: Fotossíntese e relações hídricas em laranjeira ‘Pêra’ infectada com <i>Xylella fastidiosa</i>	15
2.1. Introdução.....	16
2.1.1. Trocas gasosas e relações hídrica em plantas infectadas com <i>X. fastidiosa</i>	16
2.1.2. Efeitos de fatores abióticos sobre a CVC.....	19
2.1.3. Objetivos.....	21
2.2. Material e Métodos	22
2.2.1. Trocas gasosas e relações hídricas em plantas com CVC e submetida à deficiência hídrica.....	22
2.2.1.1. Obtenção de plantas com CVC.....	22
2.2.1.2. Medidas da severidade da CVC.....	24
2.2.1.3. Tratamentos.....	26

2.2.1.4. Medidas de trocas gasosas e relações hídricas.....	27
2.2.2. Medidas sob condições controladas da taxa de assimilação de CO ₂ em plantas com CVC com diferentes graus de severidade dos sintomas foliares.....	29
2.3. Resultados.....	33
2.3.1. Transmissão de <i>X. fastidiosa</i> e evolução dos sintomas foliares.....	33
2.3.2. Efeito da deficiência hídrica sobre a severidade da CVC.....	33
2.3.3. Trocas gasosas e relações hídricas em plantas sadias e com CVC, 9 meses posteriores à inoculação.....	35
2.3.4. Trocas gasosas e relações hídricas em plantas sadias e com CVC, 16 meses posteriores à inoculação.....	37
2.3.5. Trocas gasosas e relações hídricas em plantas sadias e com CVC, 22 meses posteriores à inoculação.....	41
2.3.6. Trocas gasosas e relações hídricas durante o desenvolvimento da CVC	48
2.3.7. Eficiência intrínseca no uso da água.....	50
2.3.8. Relação entre o potencial da água na folha e a taxa de assimilação de CO ₂	50
2.3.9 Respostas da assimilação de CO ₂ e da condutância estomática em função do déficit de pressão de vapor entre a folha e a atmosfera (DPV _{f-ar}).....	53
2.3.10. Taxa de assimilação de CO ₂ sob condições controladas, em função do grau de severidade da CVC.....	53
2.4. Discussão.....	57
2.4.1. Transmissão de <i>X. fastidiosa</i> por encostia e evolução dos sintomas de CVC sob deficiência hídrica.....	57
2.4.2. Trocas gasosas e relações hídricas em plantas com CVC submetidas à deficiência hídrica.	58

2.4.3. Trocas gasosas e relações hídricas durante o desenvolvimento da CVC	64
2.4.4. Respostas da fotossíntese em função do DPV_{f-ar}	68
2.5. Conclusões.....	70
2.6. Apêndice.....	71
 3. Capítulo II: Alterações bioquímicas em laranja ‘Pêra’ infectada com <i>Xylella. Fastidiosa</i> ...	86
3.1. Introdução	87
3.1.1. Mecanismos de defesa da planta aos patógenos.....	87
3.1.2. Deficiência hídrica e mecanismos de defesa contra patógenos.....	89
3.1.4. Peroxidasas (EC 1.11.17).....	94
3.1.5. Objetivos.....	96
3.2. Material e Métodos.....	97
3.2.1. Experimento.....	97
3.2.2. Açúcares solúveis.....	100
3.2.3. Compostos fenólicos totais.....	100
3.2.4. Separação de compostos fenólicos.....	101
3.2.5. Aminoácidos livres totais.....	102
3.2.6. Identificação de aminoácidos livres e amônia por cromatografia líquida de alta eficiência.....	103
3.2.7. Atividade de peroxidase.....	105
3.2.8. Perfil eletroforético de peroxidase.....	107
3.3. Resultados e discussão.....	108
3.3.1. Trocas gasosas.....	108
3.3.2. Açúcares redutores.....	110

3.3.3. Aminoácidos.....	111
3.3.4. Compostos fenólicos.....	114
3.3.5. Atividade de peroxidases.....	117
3.4. Conclusões.....	120
4. Literatura citada.....	124

ABREVIATURAS

<i>A</i>	Taxa de assimilação de CO ₂ (μmol/m ² .s)
<i>E</i>	Taxa de transpiração (mmol/m ² .s)
<i>g_s</i>	Condutância estomática (mol/m ² .s)
<i>C_a</i>	Concentração de CO ₂ do ar (μmol/mol)
<i>C_i</i>	Concentração de CO ₂ interno (μmol/mol)
DPV	Déficit de pressão de vapor no ar (kPa)
DPV _{<i>f-ar</i>}	Déficit de pressão de vapor entre a folha e o ar (kPa)
<i>FFF</i>	Densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (μmol/m ² .s)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucliotídeo fosfato
Fv/Fm	Relação entre a fluorescências variável e máxima ou eficiência quântica máxima
RH	Umidade relativa
Rubisco	Ribulose-1,5-bifosfato-carboxilase/oxigenase
Ψ _{<i>a</i>}	Potencial da água (MPa)
Ψ ₆	Potencial da água medido às 6:00 horas (MPa)
Ψ ₁₄	Potencial da água medido às 14:00 horas (MPa)
EUA	Eficiência no uso da água (μmol CO ₂ /mmol H ₂ O)
T _{<i>ar</i>}	Temperatura do ar °C
T _{<i>f</i>}	Temperatura da folha °C

RESUMO

O Brasil é o maior produtor mundial de citros, porém a citricultura vem sofrendo perdas devidas à clorose variegada dos citros (CVC), doença causada pela *Xylella fastidiosa*, bactéria de colonização restrita ao xilema. Embora esteja muito distribuída pelo território nacional, há indicações de que a ocorrência de deficiência hídrica, freqüente em algumas regiões, pode aumentar a severidade da CVC. As folhas das plantas com CVC apresentam sintomas de deficiência hídrica, com decréscimos significativos nas taxas de assimilação de CO_2 (A) e de transpiração (E), na condutância estomática (g_s) e no potencial da água na folha (Ψ_s). Esses sintomas estão relacionados com o aumento da resistência do fluxo de água no xilema. Também há possibilidade da existência de outros mecanismos de patogenicidade interferindo na abertura dos estômatos e na eficiência fotossintética.

Em folhas de laranjeiras, com longo período de infecção por *X. fastidiosa*, há aumento na concentração de compostos fenólicos e na atividade de enzimas relacionadas aos mecanismos naturais de defesa contra patógenos. Embora não haja relatos sobre a participação dessas substâncias no início do desenvolvimento da doença, há a possibilidade que estas sejam importante barreira ao desenvolvimento da bactéria no xilema e que elas sejam influenciadas pela disponibilidade de carboidratos da planta e/ou pela deficiência hídrica.

Este trabalho foi dividido em dois capítulos. O objetivo do primeiro foi estudar a evolução dos sintomas foliares e as alterações nas trocas gasosas e relações hídricas de laranjeiras 'Pêra, promovidas ao longo do tempo pela CVC e sob a influência da deficiência hídrica. O experimento foi conduzido sob condições naturais com laranjeiras 'Pêra' (*Citrus sinensis* L. Osbeck) enxertadas em limoeiro 'Cravo' (*Citrus limonia*), plantadas em potes de 100 L e inoculadas com *X. fastidiosa* por encostia com plântulas doentes.

A CVC causou diminuição de forma gradativa em Ψ_a , A e g_s , mesmo na ausência de deficiência hídrica. Até os 9 meses posteriores à inoculação da bactéria, as reduções de Ψ_a , A e g_s foram restritas ao período da tarde e para os períodos da manhã, e da tarde aos 22 meses posteriores à inoculação (MPI). Aumento na razão entre a concentração interna e externa de CO_2 (C_i/C_a) e declínio na eficiência no uso da água (EUA) ocorreram apenas aos 22 MPI, indicando que houve perda da eficiência fotossintética em plantas com CVC. Houve semelhança ao longo do tempo de infecção, nas respostas de A em função de g_s e de A em função de Ψ_a , entre plantas sadias e doentes. Isto permitiu concluir que a menor eficiência fotossintética de plantas com CVC está principalmente relacionada ao menor Ψ_a , causado pela menor condutividade hidráulica no xilema, em consequência da colonização das bactérias.

A ocorrência da deficiência hídrica no início de desenvolvimento da doença aumentou os sintomas da CVC e reduziu Ψ_a , A e g_s , confirmando que a deficiência hídrica agrava os danos causados pela CVC.

A pequena capacidade fotossintética de plantas com CVC e a redução de A em função do aumento do DPV, podem tornar estas plantas menos adaptáveis em ambientes de maior demanda atmosférica. Isso, aliado aos prejuízos causados pelo déficit hídrico, justifica a maior severidade da doença em regiões de maior DPV e sujeitas à deficiência hídrica, como o centro e o norte paulista.

O objetivo do segundo capítulo foi avaliar alterações bioquímicas nas folhas, através da composição de açúcares solúveis, aminoácidos livres, compostos fenólicos e da atividade de peroxidases, no início da manifestação dos sintomas de CVC e sob a influência da deficiência hídrica.

A composição dos açúcares solúveis, aminoácidos livres, compostos fenólicos, a atividade e o perfil eletroforético de peroxidases não foram afetadas até os 9 MPI, embora

houvesse a presença de sintomas da doença e diminuições significativas de *A*, *E* e *g*_s. Houve diminuição na concentração de açúcares solúveis somente em folhas de plantas com CVC submetidas ao estresse hídrico. Aumento na atividade de peroxidases foi verificado somente em folhas com presença de sintomas mais avançados de clorose. Tais resultados indicam que os mecanismos de defesa das laranjeiras não são ativados no período inicial de desenvolvimento da CVC. Estes resultados também sugerem que o hábito da bactéria colonizar o xilema, causando desbalanço hídrico, deve ser o principal fator de sua patogenicidade. A deficiência hídrica diminuiu a atividade de peroxidases em folhas com sintomas de CVC, indicando que pode causar prejuízos nas defesas da plantas, sendo mais um fator que justifica o maior desenvolvimento da doença em regiões mais secas.

SUMMARY

Brazil is the largest producer of citrus fruits in the World. However, the citrus variegated chlorosis (CVC), a disease caused by the bacteria restrict to xylem *Xylella fastidiosa*, is causing many impairment in Brazilian citrus industry. Although this disease is disseminated, there are some indications that water deficiency may increase the severity of CVC in some regions. The leaves of CVC affected plants presents drought stress symptoms, associated with significant decrease on carbon dioxide assimilation (A) and transpiration rates (E), stomatal conductance (g_s) and leaf water potential (Ψ_a). These symptoms may be related to the increased water flow resistance through xylem vessels, although there are some possibilities of others bacterial pathogenicity mechanisms are interfering on g_s and photosynthesis efficiency.

Oranges trees with a long time infected by *X. fastidiosa*, increase the phenolic concentration and higher enzymes activities in leaves related to natural pathogens defenses. Although there are not studies about the presence of these reactions during the onset of disease development, it is possible that they may become an important barrier for xylem pathogen invasion and may be affected by water stress.

This work was organized in two chapters. The objective of the first part were were to study the development of symptoms, and to observe the variation on the gas exchanges, water relations induced by CVC, and drought stress by length of time. The experiment was carried under natural conditions with sweet orange 'Pêra' (*Citrus sinensis* L. Osbeck) on 'Rangpur' lime rootstock (*Citrus limonia*). The plants were grown in 100 L pots and the bacteria was inoculated by spliced approach grafting.

The CVC caused the decrease of Ψ_a , A and g_s , even without drought stress. Up to 9 months after the bacteria inoculation (MAI), these reductions were limited to afternoons and occurred during all day after 22 MAI. The raise of the ratio from internal and air CO_2 concentration (C_i/C_a) and the decrease of water use efficiency (WUE) was modified only after 22 MAI, and showed a decreased of photosynthesis efficiency. The responses of A vs. g_s , and A vs. Ψ_a were similar for CVC and healthy plants. It was concluded that lower photosynthesis efficiency from CVC plants was mainly related to the lower leaf water potential, resulting from the deficiency of xylem hydraulic conductivity.

The drought stress, applied in the beginning of disease development, increased the severity of the symptoms and decreased Ψ_a , A and g_s from CVC plants. This confirms that water deficiency increases CVC damages.

The lower photosynthesis efficiency of CVC plants and the reduction of A in function of the raise of the vapor pressure deficits (VPD) may be turn unfavorable for the adaptation for CVC plants to regions with higher demand of atmospheric. This fact, associated with the problems caused by drought stress, may be a justification for a higher CVC severity in regions with a high VPD and subjected to water deficiency, as the center and the north of the São Paulo State.

The second part was carried out with the objective of measuring alterations on the leaf composition of the soluble sugars, free amino acids, phenolics compounds and peroxidase activity at the begging symptoms of CVC, when the plants were submitted to water stress.

Until 9 MAI, the composition of soluble sugars, free aminoacids, phenolic compounds activity and electrophoresis pattern of peroxidases were not affected, although the experiment was carried out at begging of the symptoms and CVC had reduced A , E , and g_s . There was reduction of the soluble sugar concentration only in leaves with CVC submitted to drought

stress. The raise of the peroxidase activity was observed only in very symptomatic leaves. These results supports that the biochemical defenses are not induced during the onset of the development of CVC, and that the imbalance of water relations, caused by xylem bacteria colonization, may be main pathogenicity mechanism of *X. fastidiosa*. The water deficit reduced the peroxidase activity in leaves with symptoms, suggesting that the drought stress damages plant defenses and is one more factor that justifies the higher severity of CVC in drought regions.

1. INTRODUÇÃO

1.1 CLOROSE VARIEGADA DOS CITROS

A clorose variegada dos citros (CVC), causada pela bactéria *Xylella fastidiosa*, é atualmente uma das doenças mais graves da citricultura brasileira, devido a sua alta disseminação e significativos prejuízos causados à produção de frutos em variedades comerciais de laranja doce. Também é conhecida com o nome de “amarelinho”, devido às plantas apresentarem clorose foliar generalizada, principalmente na parte superior da copa (Rossetti, 2001). A queda na produtividade dos laranjais contaminados tem levado muitos citricultores à erradicação dos pomares, sendo que os prejuízos causados pela CVC já atingiram mais de cem milhões de dólares anuais (Fundecitrus, 1999).

As folhas das laranjeiras com CVC apresentam-se murchas durante o dia, havendo o desenvolvimento de manchas cloróticas que possuem pequenas pústulas de cor marrom claro na face abaxial (fig. 1). Os sintomas evoluem para necroses e abscisão foliar, morte de ramos e declínio no vigor das plantas. A CVC reduz a produção de frutos que ficam atrofiados, endurecidos, com maturação irregular (fig.2), tornando-se inadequados para a comercialização (Rossetti & De Negri, 1990).

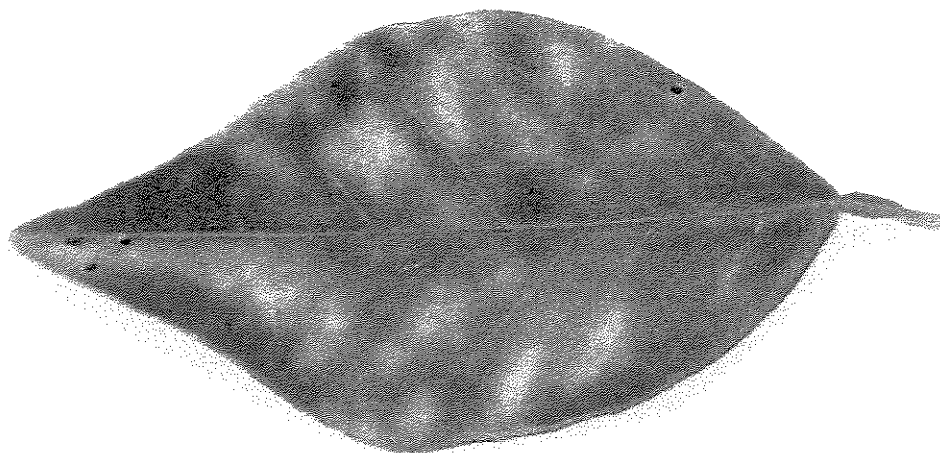


Figura 1. Folha de laranjeira 'Pêra' com sintomas característicos de Clorose Variegada dos Citros. Fonte: Fundecitrus (1999)

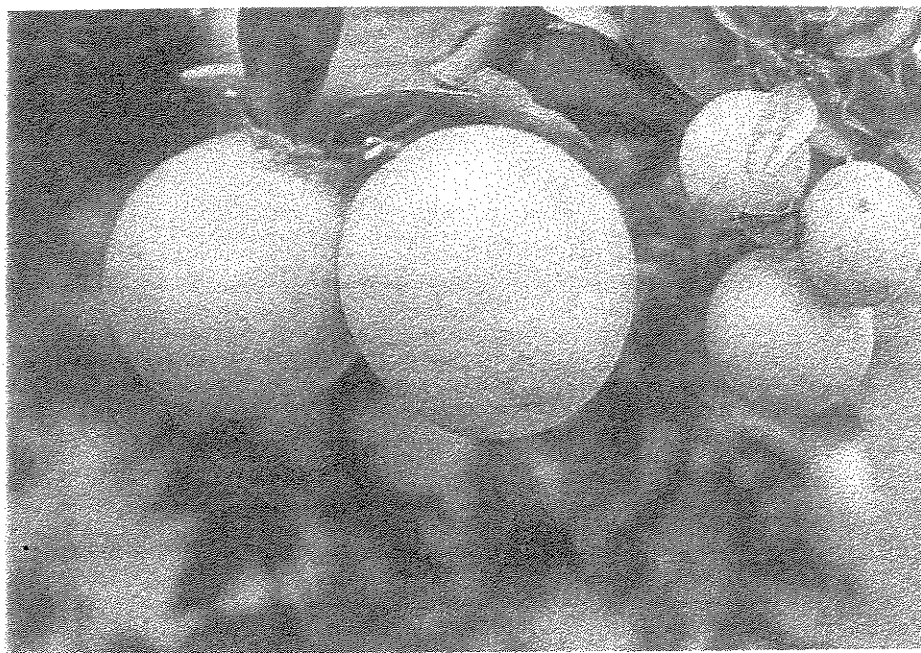


Figura 2. Ramos de laranjeiras com frutos normais (direita) e (esquerda) com sintomas característicos de CVC. Fonte: Rossetti (2001).

X. fastidiosa é uma bactéria com célula tipo bastonete, medindo 0,25 a 0,35 μm , Gram negativa, imóvel, aflagelada, oxidase negativa, catalase positiva, são aeróbicas estritas, não fermentativas, nutricionalmente fastidiosas com temperatura ótima para crescimento entre 26 e 28 °C e pH ótimo entre 6,7 e 6,9. É membro da sub-divisão Gama, ordem Lysobacterales, família Lysibacteriaceae, grupo Xanthomonas, gênero Xylella, com uma única espécie (Wells *et al.*, 1987). Considerada uma bactéria habitante exclusiva do xilema das plantas (XLB) com numerosos trabalhos referindo-a como endofítica. Essas bactérias crescem na seiva do xilema onde a concentração de produtos orgânicos é reduzida, embora contenha uma diversidade de aminoácidos, ácidos orgânicos e íons inorgânicos, predominantemente na forma monomérica, que são nutrientes essenciais para sua sobrevivência (Raven, 1984). Glutamina e asparagina ocorrem em altas concentrações no xilema, de forma similar à aparente exigência de altas concentrações de glutamina e ácidos orgânicos nos meios de cultura para *X. fastidiosa* (Davis *et al.*, 1980; Davis *et al.*, 1981; Chang, 1993). Em função da colonização dos vasos da conseqüente produção de gomas, pode ocorrer entupimento parcial ou total dos vasos (Hopkins, 1989) (fig.3).

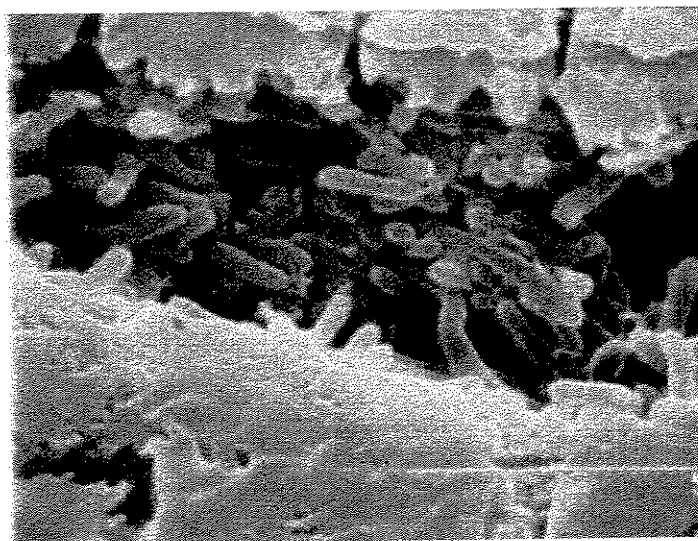


Figura 3. Xilema de laranjeira com colonização de *X. fastidiosa*. Fonte: J. E. O. Lima

A bactéria é transmitida por enxertia e por cigarrinhas da ordem Cicadelidae, razões pelas quais a doença se propagou intensamente (Chang *et al.*, 1993; Lopes, 1996). Muitas espécies de citros são hospedeiras, embora se verificam graves prejuízos apenas em laranjeiras doces.

A *X. fastidiosa* também é agente causal de muitas doenças em outras plantas, sendo conhecidos hospedeiros em 28 famílias de mono e dicotiledôneas (Hopkins, 1989). Em videiras é agente causal da doença de “Pierse” (PD); em pessegueiro a “phony peach disease” (PPD), nanismo em alfafa, requeima das folhas em ameixeira, pereira, amendoeira, plátanus e carvalho (Kitajima *et al.*, 1975; Mircetich *et al.*, 1976; French & Kitajima, 1978; Hearon *et al.*, 1980; Hopkins, 1983; Wells *et al.*, 1983; Raju *et al.*, 1983; Sherald *et al.*, 1985; Sherald *et al.*, 1987; Goheenn & Hopkins, 1988). Também foi constatada no Estado de São Paulo anomalia no cafeeiro associada à bactéria (Paradela *et al.*, 1995).

A incidência da doença tem uma relação proporcional à população de vetores bem como à presença de inóculos (Gottwald *et al.*, 1993; Laranjeira, 1997). Contudo a severidade da CVC parece não estar somente condicionada a presença do patógeno, vetores ou a suscetibilidade do hospedeiro: Hopkins (1989) considerou a *X. fastidiosa* como patógeno ocasional ou oportunista, onde a patogenicidade é agravada em decorrência de outros estresses para as plantas como, deficiência hídrica, outras doenças, danos no sistema radicular e superprodução de frutos (Hopkins & Thompson, 1984; Hopkins, 1985; Purcell & Hopkins, 1996).

Embora o seqüenciamento do genoma da *X. fastidiosa* causadora da CVC tenha sido concluído (Simpson *et al.*, 2000) e o esforço de centenas de pesquisadores no mundo inteiro, não há ainda medidas de controle satisfatórias que possam ser recomendadas para esse patossistema (Leite *et al.*, 2001).

Há dúvidas sobre os mecanismos de patogênese nas doenças causadas por *X. fastidiosa*. Há hipóteses que relacionam os prejuízos às obstruções do sistema vascular ou à presença de toxinas, ou mesmo ao desbalanço hormonal (Hopkins, 1989). Para esclarecer estes mecanismos é fundamental o estudo das alterações fisiológicas e bioquímicas das plantas infectadas.

1.2. HIPÓTESES SOBRE OS MECANISMOS GERAIS DE PATOGENICIDADE DE *X. fastidiosa*

1.2.1. OBSTRUÇÃO DOS VASOS DO XILEMA

Há indicações que o principal mecanismo de patogênese está relacionado com a indução de deficiência hídrica, devido ao bloqueio parcial ou total do xilema, que poderia explicar grande parte dos sintomas (Mollenhauer & Hopkins, 1974, 1976; Micertich *et al.*, 1976; Mollenaher *et al.*, 1976). A obstrução do sistema condutor de água é devida a deposições de gomas produzidas pela bactéria (Beckman & Halmos, 1962; Beckman *et al.*, 1974; Gardner *et al.*, 1983; Hopkins, 1985).

Para compreender a importância dos vasos condutores sobre o fluxo de seiva no xilema, é necessário considerar o diâmetro dos vasos lenhosos. A passagem de seiva no xilema pode ser descrita pela equação de Hagen-Poiseuille aplicada para o fluxo de um líquido em um tubo cilíndrico, ou seja:

$$J_v = - \pi r^4 \cdot \partial P / 8 \eta \partial x, \quad (1)$$

onde: r é o raio do cilindro, η é a viscosidade da solução e $\partial P / \partial x$ é o gradiente negativo de pressão hidrostática (Nobel, 1991). Esta equação estabelece que o fluxo é função do raio do capilar elevado à quarta potência. Quatro vezes no aumento no diâmetro de um vaso poderia

resultar em 256 vezes no acréscimo do fluxo (Zimmermann, 1983). Assim, danos ou obstruções de vasos largos causam queda significativa no transporte de água quando comparados com vasos pequenos. Os prejuízos no transporte são ainda maiores, pois os vasos com diâmetro mais largo são também os mais longos. Muitos casos de tolerância às doenças vasculares foram atribuídos a vasos pequenos e estreitos (Elgersma, 1973; Teackle *et al.*, 1975).

No entanto, para o estudo de susceptibilidade das plantas à obstrução do fluxo hidráulico, o comprimento do vaso e a localização relativa de seus terminais devem ser considerados, sendo que a intensidade do processo de bloqueio dependerá da anatomia de todo o sistema condutor de água (Wiebe *et al.*, 1984). Vasos terminam em outros adjacentes e a passagem de seiva ocorre por membranas e poros (Zimmermann, 1983). Desde que o fluxo se dá entre vasos através de membranas, o número e tipos de poros dos capilares nessas membranas são importantes na determinação do fluxo (Van Alfen, 1989). As dimensões dos poros nas membranas, através do qual a água deve fluir, são normalmente pequenos para permitir a passagem de bolhas de ar, resultantes de embolia ou de partículas como bactérias ou de esporos de fungos. A ação bacteriana sobre essas membranas, bem como as dimensões e formatos dos poros dos vasos ou traqueídeos, além de determinar papel importante na susceptibilidade das plantas às obstruções promovidas por patógenos ou macromoléculas no sistema condutor de água, também são importantes na regulação do embolismo (Van Alfen *et al.*, 1987; Sperry & Tyree, 1988).

Ramos de pessegueiros com PPD apresentaram menor condutividade hidráulica e redução na quantidade de vasos funcionais (Evert, 1987). Em videiras infectadas com *X. fastidiosa* a resistência ao fluxo forçado de água em vasos foi entre 60 e 200 vezes maior que em plantas sadias, sendo que os sintomas de PD foram relacionados com essa obstrução.

Ulmeiros também apresentaram maior resistência ao fluxo durante o verão, quando são aparentes os sintomas de requeima foliar (Hopkins, 1981; Kostka *et al.*, 1986; Goodwin *et al.*, 1988). Em condições de campo, laranjeiras ‘Natal’ e ‘Pêra’ com CVC apresentaram fluxo de seiva até 70% menor que as sadias (Oliveira *et al.*, 2000b).

A colonização e a patogenicidade de determinadas estirpes de bactérias causadoras de PD são dependentes do movimento sistêmico (Hopkins, 1989). O desenvolvimento da colônia de *X. fastidiosa* é limitado pelo comprimento dos vasos de xilema, sendo necessário o rompimento das suas membranas para a colonização dos vasos adjacentes (Zimmermann & McDonough, 1978). O mecanismo pelo qual a bactéria consegue essa quebra ainda não é totalmente esclarecido, mas poderia envolver enzimas que atuam sobre celulose, hemicelulose, substâncias pécicas ou proteínas. Nenhuma estirpe de PD, crescidas em meio líquido com vários substratos, apresentou essas atividades enzimáticas (Hopkins, 1985). No entanto, há possibilidade que as colônias bacterianas agregadas no tecido do hospedeiro produzam e concentrem as enzimas necessárias para o processo (Hopkins, 1989). Em outros patossistemas relatam-se a produção de moléculas sinalizadoras, “quorum-sensing molecules”, que atuam somente após um número de bactérias terem se agregado. Esses fatos conduzem à idéia de que se deve considerar a colônia bacteriana como organismo multicelular (Leite *et al.*, 2001). Essas enzimas não têm sido produzidas por algumas estirpes e podem justificar a perda de virulência da bactéria (Davis, 1989; Davis *et al.*, 1981; Hopkins, 1988; Purcell & Hopkins, 1996). A inibição da multiplicação e da translocação de estirpes de *X. fastidiosa* em cultivares resistentes de videiras, podem ser atribuídas às barreiras estruturais no xilema, inibidores químicos ou envelhecimento da população bacteriana, que resultam em perda de virulência (Mollenhauer & Hopkins, 1976; Huang *et al.*, 1986). Essa restrição à colonização da bactéria, seria feita por tiloses e gomas, produzidas pelo hospedeiro (VanderMolen *et al.*, 1977; Fry &

Milholland, 1990a). Cultivares susceptíveis de videiras não conseguem restringir a colonização sistêmica.

Contudo, a simples produção dessas substâncias não explica a resistência à doença e pode até contribuir para o entupimento do sistema vascular. A presença de várias obstruções parciais em todo o sistema vascular parece ser uma reação característica de susceptibilidade do hospedeiro à infecção por alguns patógenos vasculares (Elgersma, 1970; Davies *et al.*, 1980; Fry & Milholland, 1990 b). Beckman & Halmos (1962) propuseram que a susceptibilidade da bananeira à infecção com *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* foi relacionada à habilidade da planta em produzir gel e tiloses. Essa produção, entretanto, não foi eficaz para deter a colonização sistêmica. Assim, a presença de muitas “ilhas de resistência” levaram uma superprodução de tiloses e gel, obstruindo os vasos e provocando o desenvolvimento do estresse hídrico e de todos os sintomas. A grande produção de gel e de pectina pelo hospedeiro e a velocidade e magnitude de colonização de *X. fastidiosa*, que levam à obstrução dos vasos, poderiam explicar o desenvolvimento dos sintomas em cultivares susceptíveis de videira (Fry & Milholland, 1990a).

Polissacarídeos extracelulares (EPS) produzidos pelos patógenos teriam papel importante no bloqueio físico do xilema (Husain & Kelman, 1958; Katzen *et al.*, 1998; Dow & Daniels, 2000). EPS são polímeros de carboidratos secretados por um grande número de bactérias. Podem permanecer associados com a parede celular para formar uma cápsula de ligação ou podem ser liberados no meio onde a bactéria vive. Os EPS permitem que bactérias de vida livre possam se fixar em superfícies sólidas onde há acúmulos de nutrientes. As cápsulas de cobertura da célula bacteriana podem protegê-la contra dissecação ou outro estresse do ambiente ou auxiliar na adesão de nutrientes, além de possuírem capacidade de absorção de água (Durbin, 1991).

Os agregados de *X. fastidiosa* parecem estar ligados às paredes dos vasos por cordões produzidos pelas bactérias (Nyland *et al.*, 1973; Mollenhauer & Hopkins, 1974; Huang *et al.*, 1986). Os cordões assemelham-se a fibras de polissacarídeos que constituem o “glicocalyx” pelo qual se atribui a habilidade da bactéria se desenvolver em meios turbulentos (Costerton & Irwin, 1981). O EPS que constitui o “glicocalyx” foi denominado como goma fastidiana, pois apresenta características comuns à goma xantana produzida pelo fitopatógeno *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Dow & Daniels, 2000).

Em função de similaridades na capacidade patogênica entre *X. campestris* pv. *campestris* e *X. fastidiosa*, acredita-se que a patogenicidade da *X. fastidiosa* também dependa da regulação da produção da goma fastidiana, uma vez que mutações em genes reguladores da produção da goma xantana afetam a patogenicidade da *X. campestris* pv. *campestris* (Tang *et al.*, 1991, Leite *et al.*, 2000).

Alta resistência ao transporte da água, pode ser causada por EPS em concentrações baixas em alfafa (Dryden & Van Alfen, 1983; Van Alfen & Allard-Turner, 1979; Van Alfen *et al.*, 1987). A disfunção vascular nesse caso é resultado da obstrução de pequenos poros das membranas dos traqueídeos. Esses poros não têm o mesmo tamanho ao longo da planta, mas são maiores em ramos que em folhas jovens. Então, uma pequena molécula seria suficiente para obstruir os vasos nos primórdios foliares.

Essas informações podem esclarecer as divergências de opiniões se o bloqueio do sistema vascular é suficiente para induzir o estresse hídrico. Em amendoeiras com sintomas severos de crestamento foliar, apenas 15% dos vasos de xilema foram encontrados com as bactérias, sendo que a clorose, seguida de escaldadura marginal das folhas, frequentemente precedia a detecção da bactéria (Mircetich *et al.*, 1976). Em cortes seccionais de folhas de parreira com necrose marginal, sintomas característicos de PD, raramente em mais de 40% dos

vasos continham bactérias e muitos desses não estavam totalmente obstruídos (Mollenhauer *et al.*, 1974; Mollenhauer *et al.*, 1976).

Entretanto, em pessegueiros com PPD, onde não ocorre a murcha, não foi observada relação entre a condutividade radial, potencial de turgor e crescimento celular, sugerindo que deve haver outras hipóteses para explicar os mecanismos de patogenicidade de *X. fastidiosa* (Mircetich *et al.*, 1976; French & Stassi, 1978; Hopkins, 1981; Anderson & French, 1987; Evert, 1987).

1.2.2. FITOTOXINAS

Bactérias e fungos fitopatogênicos podem produzir toxinas em meio de cultura e/ou em seus hospedeiros. As fitotoxinas são metabólitos microbianos danosos às plantas mesmo em concentrações muito baixas. A maioria é constituída de pequenas moléculas de formas e estruturas variadas, sendo hábil em se difundir dentro do sítio de infecção e ser translocada na planta via apoplasto. Frequentemente esses compostos têm uma função na patogênese, principalmente se são produzidas nos primeiros estágios da infecção. Têm-se reproduzido os sintomas de certas doenças, por meio da aplicação de toxinas obtidas de culturas de bactérias patogênicas (Graniti, 1991).

Preparações fitotóxicas obtidas de estirpes de *X. fastidiosa* de PD produziram crestamento em folhas de videiras, amendoeiras e ameixeiras, característicos de PD. As fitotoxinas foram obtidas por culturas de bactéria lavadas com água. Cromatograficamente, através de coluna de Sephadex G-50, separou-se a atividade tóxica em duas frações; uma produziu murcha sem necrose, talvez feita por entupimento vascular devido ao alto peso molecular dos compostos e a outra, produziu somente necrose marginal típica de PD (Lee *et al.*, 1982). Contudo, Goodwin *et al.* (1988), observou que a fração tóxica dos tratamentos

utilizado por Lee, estava relacionada a componentes do meio de cultura. Três componentes do meio PD-2 produziram crestamento similar aos previamente atribuídos às toxinas.

Há algumas hipóteses de que os EPS, produzidos por patógenos poderiam ser fitotóxicos às plantas (Strobel & Hess, 1968; Van Alfen, 1989). Há também toxinas de murcha que poderiam atuar em doenças vasculares. Estas toxinas que, por definição, seriam aquelas que afetam o estado de água na planta. Van Alfen (1989) atribuiu a duas causas essenciais para a atuação das toxinas causando sintomas de murcha: (a) por afetar o potencial da água ao redor das células e/ou (b) por afetar as funções das membranas celulares. As toxinas que afetam o potencial da água extracelular seriam provocadas por moléculas que agiriam na abertura dos estômatos ou que aumentariam a resistência ao fluxo da água no xilema (Dimond, 1970; Milburn *et al.*, 1974; Ayers, 1978; Zimmerman, 1983). As toxinas que alteram (ou ferem) as membranas de ligação entre os vasos condutores promoveriam obstruções, provocando o embolismo, que pode ser a causa principal da diminuição da condutividade hidráulica causada por *X. fastidiosa* (MacCoy, 1982).

Em doenças vasculares, como a murcha do tomateiro, macromoléculas produzidas pelos patógenos, bem como substâncias viscosas resultantes da quebra enzimática das paredes celulares do hospedeiro, aumentam a resistência ao fluxo da água através do xilema e causam obstruções nos vasos. Toxinas poderiam danificar a integridade das membranas plasmáticas e alterar suas funções, causando perda irreversível de turgor. No entanto, seriam dificilmente translocadas em vasos obstruídos no qual o patógeno está crescendo. Assim, as murchas causadas por patógenos toxigênicos, estariam mais relacionadas à queda da condutividade da seiva no xilema, que a uma ação tóxica diminuindo a retenção celular de água (Van Alfen, 1979).

Machado *et al.* (1994) sugeriram que a redução no potencial da água nas folhas poderia ser devida a provável diminuição no fluxo de água, causada por obstruções nos vasos do xilema. Embora essas obstruções possam estar relacionadas às toxinas, Machado *et al.* (1994) observaram que os estômatos são funcionais em plantas com CVC, pois os mecanismos ativos de abertura e fechamento, permaneciam funcionais. Entretanto, Haberman (1999) observou, sob condições de laboratório, falta de sensibilidade dos estômatos ao déficit de pressão de vapor na atmosfera em folhas de laranjeiras com CVC, sugerindo que outros fatores podem estar agindo sobre os estômatos, além da redução no potencial da água.

1.2.3. DESBALANÇO HORMONAL

Hopkins (1989) questionou se a obstrução do xilema e as toxinas seriam as responsáveis pelos sintomas característicos de PPD em pessegueiros. Outra hipótese para o desenvolvimento de sintomas estaria relacionada com as alterações hormonais causadas pela colonização bacteriana no xilema.

A menor g_s , encontrado em laranjeiras com CVC e videiras com PD, poderia se relacionar à maior concentração de ácido abscísico (ABA) nas folhas, em função do estresse hídrico induzido pelas obstruções no sistema vascular. Em geral, ocorre em plantas submetidas ao estresse a elevação da concentração desse hormônio no apoplasto e nas folhas. O ABA está envolvido no fechamento estomático à medida que atua na abertura dos canais de íons e na atividade de bombeamento de prótons nas células guardas (Taiz & Zeiger, 1991). De fato, Goodwin *et al.* (1988b) observaram aumento na concentração de ABA nas folhas, em videiras com PD onde parte dos sintomas poderia estar relacionada ao acúmulo desse hormônio nos tecidos. Por outro lado em laranjeiras 'Pêra' com CVC, a concentração do ABA nas folhas foi

igual às plantas saudáveis, mesmo que as plantas com CVC tenham apresentando declínio no potencial da água e acentuada redução na abertura dos estômatos (Gomes, 2001).

French & Stassi (1978) também sugeriram que os sintomas de PPD indicam uma alteração nos níveis hormonais endógenos. Observaram que duas aplicações de ácido giberélico em pessegueiros anões com PPD estimularam um novo crescimento em quase todas as gemas terminais. Esses tratamentos resultaram em remoção parcial dos sintomas sem afetar a população da bactéria na árvore. Corroborando com essa teoria de desbalanço hormonal, paclobutrazol, um inibidor da biossíntese de ácido giberélico, causa diminuição de crescimento, florescimento abundante e aumenta o teor de clorofila, que são sintomas da PPD em pessegueiros (DeJong & Doyle, 1984; Erez, 1984). Alterações no metabolismo radicular foram citados como um fator de patogenicidade para PPD ligados aos efeitos hormonais (Hopkins, 1989).

Assim, além da perda de condutividade hidráulica do xilema, muitos fatores podem estar agindo em plantas com CVC que podem estar afetando as trocas gasosas e relações hídricas e na manifestação dos diversos sintomas presentes nas plantas. O esclarecimento destes mecanismos é muito importante para dar subsídios ao combate a esta importante doença da citricultura brasileira.

1.3. OBJETIVOS

Esta tese será apresentada em dois capítulos e tem os seguintes objetivos gerais:

Capítulo I:

- a) Estudar as trocas gasosas e relações hídricas de laranjeiras 'Pêra', ao longo do tempo de infecção com *X. fastidiosa* e sob a presença da deficiência hídrica.
- b) Investigar as causas da perda de eficiência fotossintética relacionadas à CVC.
- c) Avaliar o efeito da deficiência hídrica sobre a evolução da severidade dos sintomas.

Capítulo II:

- d) Estudar as alterações nas concentrações de açúcares solúveis, aminoácidos, compostos fenólicos e atividade de peroxidases em laranjeiras 'Pêra' com CVC e submetida à deficiência hídrica.

2. CAPÍTULO I

FOTOSSÍNTESE E RELAÇÕES HÍDRICAS EM LARANJEIRA ‘PÊRA’ INFECTADA COM *Xylella fastidiosa*

2.1. INTRODUÇÃO

2.1.1. TROCAS GASOSAS E RELAÇÕES HÍDRICAS EM PLANTAS INFECTADAS COM *X. fastidiosa*.

A CVC reduz a fotossíntese em laranjeiras. Esta redução está associada à perda de condutividade hidráulica do xilema causada pela colonização de *X. fastidiosa* no xilema, que causa uma diminuição do estado de hidratação das folhas e na abertura dos estômatos, limitando o acesso do carbono atmosférico aos sítios de fixação de CO₂ no mesófilo (Machado *et al.*, 1994).

No entanto, ainda há dúvidas se todos os sintomas das doenças causadas por *X. fastidiosa* têm origem apenas da perda de condutividade hidráulica do xilema (Hopkins, 1989). O comprometimento na eficiência fotossintética em folhas que não apresentam sintomas é uma indicação da possibilidade que outros mecanismos de patogenicidade estão agindo sobre a CVC (Machado *et al.*, 1994). Habermann (1999) constatou que houve diminuição da fotossíntese devido à queda em g_s , mas também constatou o comprometimento do metabolismo foliar fotossintético, através da diminuição da eficiência intrínseca da fotossíntese (razão A/C_i), relacionada com a diminuição da atividade de carboxilação no mesófilo em folhas de laranjeiras infectadas. Queiroz-Voltan & Paradela Filho (1999) encontraram destruição dos cloroplastos e diminuição dos espaços intercelulares do parênquima lacunoso, nas áreas das folhas de laranjeiras lesionadas pela doença, indicando a possibilidade de toxinas estarem agindo sobre os tecidos das plantas.

Porém, a queda de Ψ_a observada nas folhas das plantas com CVC, além de induzir a redução na abertura dos estômatos, também reduz A , EUA, bem como na atividade da Rubisco em laranjeiras (Vu & Yelenosky, 1988b; Chaves, 1995; Medina & Machado, 1998). A própria destruição dos cloroplastos encontrada em plantas com CVC por Queiroz-Voltan & Paradela

Filho (1999) pode ter origem no estresse hídrico, através da peroxidação de lipídeos e lixiviação de eletrólitos (Hewitt, 1949; Godwin *et al.*, 1988).

Plantas com CVC desenvolvem deficiências de N, Zn e K (Quaggio, 1988, Vitti *et al.*, 1989). Estas deficiências podem agir diretamente sobre a fotossíntese, visto que estes nutrientes são componentes fundamentais de enzimas, pigmentos ou ainda, ativadores ou catalisadores desses processos (Larcher, 2000). Deficiências de N e K desenvolvem sintomas de clorose, associados com perda de clorofila e danos estruturais de cloroplastos (Lavon *et al.*, 1999). Somente a enzima Rubisco constitui entre 30 e 50% de todo o nitrogênio foliar e forma aproximadamente 50% de toda proteína solúvel nas plantas (Lawlor, 1994).

Processos fotoinibitórios podem estar agindo sobre a eficiência fotossintética em plantas com CVC (Machado *et al.*, 2001). A eficiência e utilização da luz para cada fotossistema variam proporcionalmente com a capacidade de fixação do carbono nas reações que consomem o NADPH e ATP, gerados nos processos fotoquímicos. Uma redução na fixação do carbono causado por *X. fastidiosa*, reduzindo a regeneração dos aceptores de elétrons (NADP⁺ e ADP) pode resultar em excedente de energia luminosa, causando a fotoinibição. A disponibilidade de radiação e a temperatura do ambiente podem influenciar sobre o dano fotoinibitório que se manifesta através de alterações nas características da fluorescência, no rendimento quântico e na perda da capacidade para fixar CO₂ (Krause, 1988).

X. fastidiosa também afeta trocas gasosas e relações hídricas em outras espécies hospedeiras. Há redução em *g_s* em videiras com PD, embora este fato só ocorra nas horas mais quentes do dia (Goodwin *et al.*, 1988). A redução no crescimento, clorose marginal foliar marginal que evolui para necroses, maturação precoce dos cachos e outras alterações fisiológicas, foram associadas ao estresse hídrico provocado pela bactéria.

Em pessegueiros com PPD, Anderson & French (1987) observaram no meio do dia, redução de 15 a 25% em g_s , redução de 12 a 18% de A e declínio em Ψ_a entre 0,2 e 0,6 MPa. Outras alterações fisiológicas constatadas como, florescimento precoce, senescência foliar tardia, redução no tamanho dos frutos e internódios curtos com redução no crescimento apical, foram atribuídos aos bloqueios no xilema verificados pela redução de Ψ_a (Evert & Mullinix, 1983).

Para French & Stassi (1978), o declínio na fotossíntese em pessegueiros com PPD pode estar relacionada à queda de g_s , que por sua vez é causada pela redução do estado de hidratação das folhas. Também não houve sintomas de murcha, necrose ou abscisões foliares, normalmente associadas com uma redução no transporte hídrico vascular. Porém, a redução em Ψ_a foi insuficiente para explicar a diversidade de sintomas, já que não houve redução na condutividade hidráulica das raízes, ramos e potencial de turgor na copa.

Desta forma, toxinas, desbalanço hormonal e de nutrientes, menor condutividade hidráulica do sistema radicular e outros fatores podem estar agindo em conjunto e conduzindo ao depauperamento geral da planta (Mircetich *et al.*, 1976; French & Stassi, 1978; Hopkins, 1989). Dependendo do tempo de infecção pode-se observar alterações fisiológicas na planta, resultantes do próprio tempo de estresse e da desnutrição que os seus tecidos foram submetidos. Assim, é importante observar como estes processos ocorrem ao longo do desenvolvimento da doença e verificar como a eficiência fotossintética de plantas saudáveis e doentes está relacionada com o estado de hidratação das plantas ou com as deficiências minerais.

2.1.2. EFEITOS DE FATORES ABIÓTICOS SOBRE A CVC

Os fatores climáticos e edáficos podem exercer papel importante sobre o sistema patógeno-hospedeiro (Krüger, 1978; Huber, 1980; Bell, 1981; Kuc, 1987). A temperatura influencia a suscetibilidade do algodoeiro “Acala 4-42-77” à murcha causada pelo patógeno vascular *Verticillium albo atrum* (Bell & Presley, 1969) e a suscetibilidade do trigo ao ataque de *Puccinia graminis* (Mayama *et al.*, 1975). Tratos culturais e adubação parecem influenciar no desenvolvimento da CVC (Malavolta, 1993; Lima, 1996).

A predisposição à doenças é freqüentemente observada em plantas sob deficiência hídrica (Bertrand *et al.*, 1976; Schoeneweiss, 1983; Appel & Stipes, 1984). Boyer (1995) sugere que o decréscimo do potencial da água na planta diminui sua taxa de crescimento sem alterar, contudo, o desenvolvimento do patógeno. Isto permite uma colonização em maior extensão nos tecidos do vegetal. A diminuição na atividade fotossintética e de síntese de proteínas poderia causar queda na síntese de metabólitos e de enzimas importantes para a resistência às doenças. Shoeneweiss (1986) observou que a seca induz maior suscetibilidade das plantas às doenças por injúrias nos seus mecanismos de defesa.

Esta maior susceptibilidade de plantas aos patógenos, quando submetidas à deficiência hídrica, parece estar presente em patologias causadas por *X. fastidiosa*. Em videiras os sintomas do mal de ‘Pearse’ são agravados por estresses e nos EUA, esta doença está restrita às regiões mais quentes, localizadas ao sul da Flórida (Loomis, 1958). A deficiência hídrica aumenta a severidade de *X. fastidiosa* em *Parthenocissys quinquefolia* (McElrone *et al.*, 2001), embora os motivos dessa maior severidade não tenham sido esclarecidos.

A deficiência hídrica parece influenciar o desenvolvimento da CVC nos pomares paulistas (Salva *et al.*, 1995, Gravena *et al.*, 1997). Mapeamentos da distribuição da CVC apontam para maior severidade nas regiões norte e noroeste do Estado de São Paulo, onde há

maior período de deficiência hídrica, maior temperatura e demanda atmosférica (fig. 4). No entanto, essas observações ainda não foram metodicamente esclarecidas para a CVC.

Assim, devido ao avanço da CVC e aos graves prejuízos causados nos pomares brasileiros, os estudos das alterações provocados por *X. fastidiosa* nas trocas gasosas e relações hídricas em laranjeiras são muito importantes, pois auxiliam o esclarecimento dos mecanismos da infecção. Também é importante que se esclareça sobre a influência das condições climáticas e do déficit hídrico na evolução da doença, visto que há o predomínio do cultivo de citros sem irrigação no Estado de São Paulo e a presença de déficits hídricos em muitas regiões de cultivo (Ortolani *et al.*, 1991).

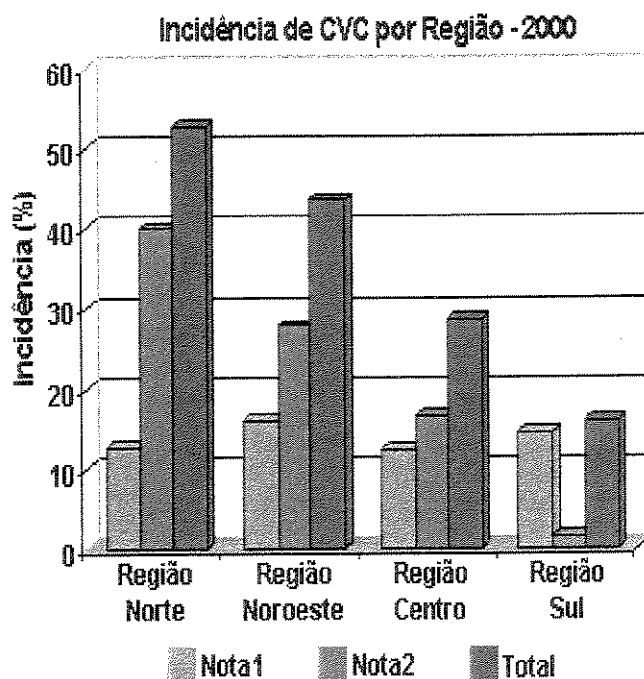


Figura 4. Incidência e severidade da CVC em diferentes regiões do Estado de São Paulo. Nota 1 refere-se às plantas com sintomas restritos às folhas e a Nota 2 refere-se a sintomas em folhas e frutos. Fonte Fundecitrus (1999).

2.1.3. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

- a) Estudar as trocas gasosas e relações hídricas de laranjeiras 'Pêra', ao longo do tempo de infecção com *X. fastidiosa* e sob a presença da deficiência hídrica.
- b) Investigar as causas da perda de eficiência fotossintética relacionadas à CVC.
- c) Avaliar o efeito da deficiência hídrica sobre a evolução da severidade dos sintomas.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1. TROCAS GASOSAS E RELAÇÕES HÍDRICAS EM PLANTAS COM CVC E SUBMETIDAS À DEFICIÊNCIA HÍDRICA

2.2.1.1. OBTENÇÃO DE PLANTAS COM CVC

O experimento foi instalado no Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Citros 'Sylvio Moreira' do Instituto Agrônomo (IAC), localizado em Cordeirópolis, Estado de São Paulo, Brasil.

Em maio de 1997 transplantaram-se 80 mudas de laranjeira 'Pêra' com dezesseis meses de idade e enxertadas em limoeiro 'Cravo' para vasos com volume de 100 litros, dispostos em 5 linhas de 16 plantas orientadas no sentido Norte-Sul. O espaçamento entre vasos foi de 0,5 metro e de 2 metros entre linhas. Os vasos foram mantidos em telado com dimensões de 20 x 12 x 2,8 m, possuindo uma antecâmara para evitar a passagem de insetos para o interior do telado. A tela de revestimento era de nylon com malha de 2 mm (Clarite, Equipesca-Campinas-SP). Desta forma, evitou-se a transmissão natural de *X. fastidiosa* por cigarrinhas (fig. 5).

O substrato para o desenvolvimento das plantas foi preparado com $\frac{1}{4}$ de areia, $\frac{1}{4}$ composto orgânico e $\frac{1}{2}$ de terra. Suas características químicas eram: pH em CaCl_2 de 5,6; 78 mg/dm^3 de P; 1,8, 12,2 e 4,3 mmol/dm^3 de K, Ca e Mg, respectivamente; 22 mmol/dm^3 de H + Al; 10,0, 0,4, 0,4, 2,0 e 1,5 mg/dm^3 de S-SO₄, B, Cu, Mn e Zn, respectivamente. Essas condições de fertilidades são consideradas adequadas para o desenvolvimento da planta cítrica (Grupo Paulista de Adubação e Calagem dos Citros, 1994).

As plantas foram adubadas com 50, 100 e 150 g de N por vaso no primeiro segundo e terceiro anos, respectivamente, fornecidos com nitrato de cálcio e em 6 parcelas bimestrais. K

foi fornecido em 2 adubações anuais, realizadas em setembro e dezembro, contendo 10 g do elemento fornecidas como cloreto de potássio. Adubações com sulfato de zinco, sulfato de manganês, ácido bórico, sulfato de cobre e molibdato de sódio no substrato, totalizaram 0,4 g de Zn, 0,4 g de Mn, 0,2 g de B, 0,4 g de Cu e 0,05 g de Mo por planta por ano. As concentrações de macro e micro nutrientes nas folhas obtidas por duas análises realizadas durante a evolução da doença, foram feitas no Centro de Solos e Recursos Naturais do IAC e estão apresentadas no Apêndice 1.

A irrigação foi feita através por gotejamento tipo 'espaguete' com vazão de 2 litros de água por hora. A irrigação ocorreu a cada dois dias, durante 4 horas ou até o início da drenagem dos vasos.

A inoculação de *X. fastidiosa* em plantas sadias foi feita através da encostia com plântulas doentes. Esta encostia foi realizada no tronco, logo abaixo dos ramos principais da copa em metade das oitenta plantas disponíveis em julho de 1997 (fig. 6). As plântulas utilizadas para transmissão, foram obtidas através de garfagem de ramos de laranjeira 'Pêra' com sintomas típicos de CVC em cavalos de limoeiro 'Cravo'. Para tanto, esses cavalos, aos dois meses após a semeadura, foram mantidos em "tubetes" contendo 250 mL de substrato composto por ¼ de matéria orgânica originária de turfa, ¼ de casca de pinos e ½ de vermiculita expandida. Os tubetes foram irrigados individualmente enquanto fixados no ramo da laranjeira. A retirada do tubete do ramo da laranjeira com CVC ocorreu após 30 dias, quando houve a constatação do sucesso da garfagem.

Para constatação da presença da bactéria na planta inoculada, utilizou-se o exame de reação de polimerase em cadeia (PCR) estabelecido por Pooler & Hartung (1995), realizado em folhas localizadas acima e próximas da região da encostia.

2.2.1.2. MEDIDAS DA SEVERIDADE DE CVC

Em Abril de 1999 e Abril de 2000, a severidade dos sintomas foliares de CVC foi avaliada em 600 folhas de 3 ramos sorteados de cada repetição. Para tanto, utilizou-se a escala diagramática proposta por Amorim *et al.* (1993) (fig. 7). Após essa determinação, foram estabelecidas quatro classes de severidade, de acordo com a área do limbo foliar ocupada pelos sintomas: classe 1: entre 1 e 10 %; classe 2, entre 10 e 20 %; classe 3, entre 20 e 30%; classe 4, mais que 30% do limbo foliar com sintomas. A análise dos resultados foi feita pelo teste F e comparados pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.



Figura 5. Experimento instalado sob telado à prova de infestação de cigarrinhas. Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Citros ‘Sylvio Moreira’, Instituto Agrônomo. Cordeirópolis - SP.



Figura 6. Transmissão de *X. fastidiosa* através da encostia com plantas doentes.(A): tubete com plântula inoculadora com CVC.

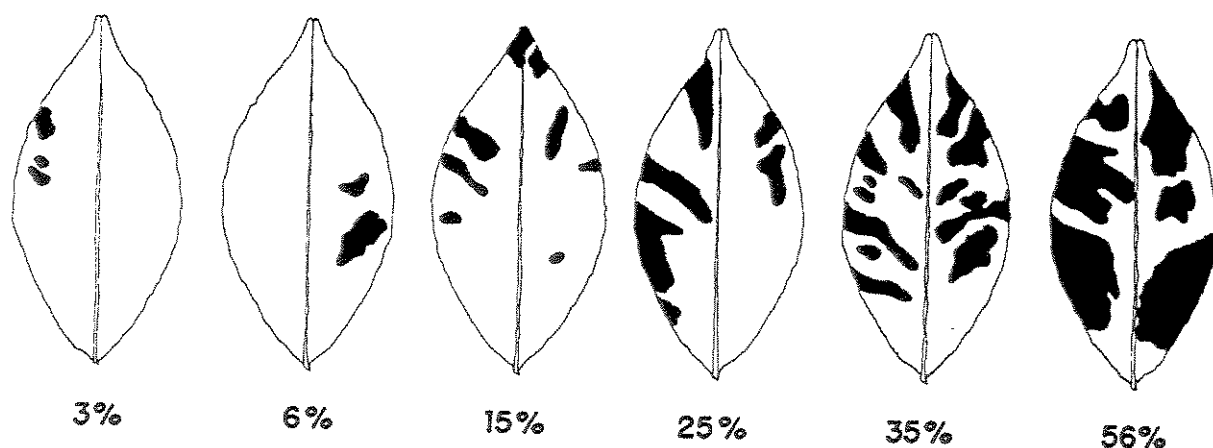


Figura 7. Escala diagramática para avaliação da severidade da CVC (Amorim *et al.*, 1993).

2.2.1.3. TRATAMENTOS

Após a constatação dos primeiros sintomas de CVC nas plantas inoculadas foram feitos os seguintes tratamentos, com cinco repetições dispostas em blocos completos:

- Plantas sadias (Sadias) e doentes (CVC) sem deficiência hídrica.
- Plantas doentes com um ciclo de deficiência hídrica (CVC I), aplicado em março de 1998, ou seja, nove meses posteriores à inoculação (9 MPI).
- Plantas sadias com um ciclo de deficiência hídrica (Sadia I), aplicado em março de 1998.
- Plantas doentes com dois ciclos de deficiência hídrica (CVC II), aplicados em março (9 MPI) e em outubro de 1998 (16 MPI).
- Plantas sadias com dois ciclos de deficiência hídrica (Sadias II), aplicados em março e em outubro de 1998.
- Plantas doentes com três ciclos de deficiência hídrica (CVC III), aplicados em março e outubro de 1998 e abril de 1999.

•Plantas sadias com três ciclos de deficiência hídrica (Sadias III), aplicados em março e outubro de 1998 e abril de 1999.

Os ciclos de deficiência hídrica foram impostos pela suspensão da irrigação, até que a taxa de assimilação de CO₂ fosse aproximadamente nula, quando as plantas foram novamente irrigadas.

2.2.1.4. MEDIDAS DE TROCAS GASOSAS E DE RELAÇÕES HÍDRICAS.

Durante o desenvolvimento dos déficits hídricos, mediu-se diariamente no período da manhã (entre 8:00 e 9:00 horas), ao redor do meio dia (entre 12:00 e 13:00 horas) e no período da tarde (entre 15:00 e 16:00 horas), *A*, *g_s* e *E*, com um analisador portátil de fotossíntese por radiação infra-vermelho, com câmara de ¼ de litro com ventilador (IRGA, modelo Li- 6200 LiCOR, Lincoln, NE), de acordo com método descrito por Vu *et al.* (1986). As medidas foram feitas em folhas totalmente expandidas, com 6 a 8 meses de idade, expostas à radiação solar, com no máximo 3% do limbo apresentando lesões características de CVC. Também, foram feitas medidas após a re-irrigação das plantas para observar os efeitos imediatos da deficiência hídrica sobre a recuperação de plantas sadias e doentes.

A temperatura da folha (°C) foi medida com termopar cobre-constantan e FFF foi medido em µmol/m².s com um quantômetro LI-190SA (LiCor-Lincoln-NE), ambos acoplados na câmara de medição do IRGA LI-6200.

Dados de temperatura e de umidade relativa do ar foram obtidos em uma estação meteorológica automática, localizada a 500 metros do experimento (dados fornecidos de 10 em 10 minutos).

Para cálculo do déficit de pressão de vapor entre o ar e a folha (DPV_{l-ar}) considerou-se que:

$$DPV_{f-ar} = (es_{ar} - ea_{ar}) - ea_f, \quad (2)$$

sendo que,

$$ea_{ar} = (es_{ar} \times RH)/100, \quad (3)$$

$$es_{ar} = 0,61078 \exp [17,269 \times T_{ar} / 237,3 + T_{ar}] \text{ e} \quad (4)$$

$$ea_f = 0,61078 \exp [17,269 \times T_f / 237,3 + T_f], \quad (5)$$

onde, ea_{ar} é a pressão atual de vapor do ar, es_{ar} é pressão saturante de vapor do ar e ea_f é pressão atual de vapor da folha em kPa; RH, umidade relativa; es_{ar} e ea_f foram calculados pela equação de Murray, na qual T_{ar} e T_f são, respectivamente, a temperatura do ar e da folha, em °C.

Durante a aplicação dos tratamentos, Ψ_a foi medido diariamente às 6:00 (Ψ_6) e 14:00 horas (Ψ_{14}) com uma câmara de pressão utilizando técnica descrita por Kaufmann (1968). Para tanto, foram utilizadas folhas semelhantes e próximas àquelas onde foram feitas medidas de trocas gasosas. Elas foram previamente cobertas com filme plástico umedecido. Logo a seguir, a folha foi cortada com lâmina, em corte único e rápido no pecíolo junto ao ramo e colocada na câmara de pressão, contendo papel úmido no seu interior. A leitura era anotada assim que houvesse a visualização do esudato de seiva, com auxílio de uma lente com capacidade de aumento da imagem em dez vezes. Foram realizadas quatro medidas por tratamento.

Para análise dos resultados de A , gs e Ψ_6 ou Ψ_{14} ao longo dos dias, em cada ciclo de deficiência hídrica utilizou-se a análise de variância (teste F). O delineamento experimental foi o de blocos casualizados em esquema fatorial, considerando-se como causas da variação os tratamentos, os dias de medidas, os horários, os blocos e as interações entre os primeiros três

fatores. As médias dos resultados foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade ($P < 0,05$).

A respostas de A em função de g_s (eficiência intrínseca no uso da água) foi feita para todas as medidas obtidas entre os tratamentos irrigados e sob estresse. A análise dos resultados foi feita através do teste T, para a angulação obtida das regressões lineares a partir da origem (com cinco repetições).

Para as respostas de A em função de DPV_{l-ar} , Ψ_6 e Ψ_{14} , considerou-se apenas as leituras nos tratamentos irrigados, com FFF acima de $700 \mu\text{mol/m}^2.\text{s}$, suficiente para a saturação lumínica da fotossíntese (Syvertsen, 1984).

A análise comparativa de A , g_s , EUA e C_i/C_a em função do tempo de infecção entre laranjeiras sadias e com CVC, foram feitas com os tratamentos irrigados aos 9, 16 e 22 MPI, Utilizou-se, nestas comparações, a média dos dados medidos em plantas irrigadas no período da manhã (média das medidas feitas entre às 9:00 e 10:30 horas) e no período da tarde (média entre às 12:00 e 14:00 horas), somente quando o FFF fosse igual ou superior a $700 \mu\text{mol/m}^2.\text{s}$. e ao longo de cada período de observação. Para o estudo de C_i/C_a considerou-se a concentração de CO_2 na atmosfera de $360 \mu\text{mol/mol}$. A análise desses resultados foi feita pelo teste F, com delineamento experimental totalmente casualizado e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade ($P < 0,05$).

2.2.2. MEDIDAS SOB CONDIÇÕES CONTROLADAS DA TAXA DE ASSIMILAÇÃO DE CO_2 EM PLANTAS COM CVC COM DIFERENTES GRAUS DE SEVERIDADE DOS SINTOMAS FOLIARES

As medidas da taxa de fotossíntese em folhas com diferentes graus de severidade de CVC, em dois níveis de DPV (0,7 kPa e 2,7 kPa), foram feitas em quarenta plantas de laranjeira 'Pêra' com dezoito meses de idade, cultivadas em sacolas plásticas com substrato Rendimax

(Eucatex). Utilizaram-se folhas com os seguintes graus de severidade de CVC, de acordo com a escala diagramática proposta por Amorim *et al.* (1993): 0, 3, 6, 15, 25 e 35%. As plantas foram transferidas às 7:00 h para aclimação em câmaras de crescimento tipo fitotron (ILKA) com FFF de $350 \mu\text{mol/m}^2.\text{s}$, temperatura de 28°C e déficit de pressão de vapor (DPV) de 0,7 kPa e 2,7 kPa (fig. 8). Após 2 horas de aclimação foram realizadas medidas de A em folhas completamente expandidas, de mesma idade, com um medidor portátil de fotossíntese por radiação infravermelha (LI-6400, Licor - Lincoln Nebraska). Durante as medidas, as folhas foram submetidas a FFF de $1000 \mu\text{mol/m}^2.\text{s}$, fornecida pela própria câmara do LI-6400 (fig. 9). O DPV dentro da câmara de medição do LI-6400 foi mantido semelhante às condições do fitotron, através de controles de temperatura e de umidade relativa da câmara do LI-6400 e pelo fornecimento de ar com umidade conhecida, através de um aparelho gerador de ponto de orvalho (LI-610 Dew Point Generator- Licor- Lincoln Nebraska). O ar gerado pelo LI-610 era enviado para um reservatório de 10 litros e deste para o LI-6400.

Houve dez medidas para cada índice de severidade, que foram comparados pelo teste T, ao nível de 5% de probabilidade.

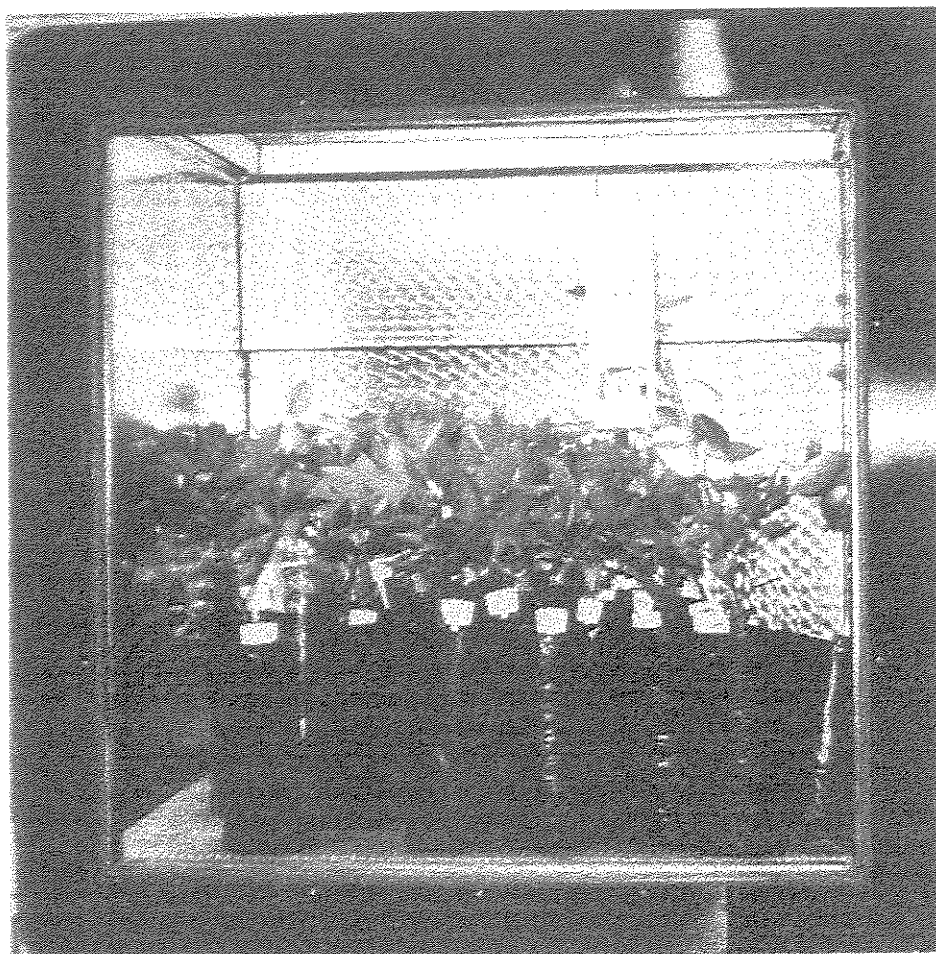


Figura 8. Vista da câmara de crescimento (ILKA) com as laranjeiras 'Pêra' utilizadas para medidas da taxa de assimilação de CO_2 em folhas com crescentes níveis de severidade da CVC.

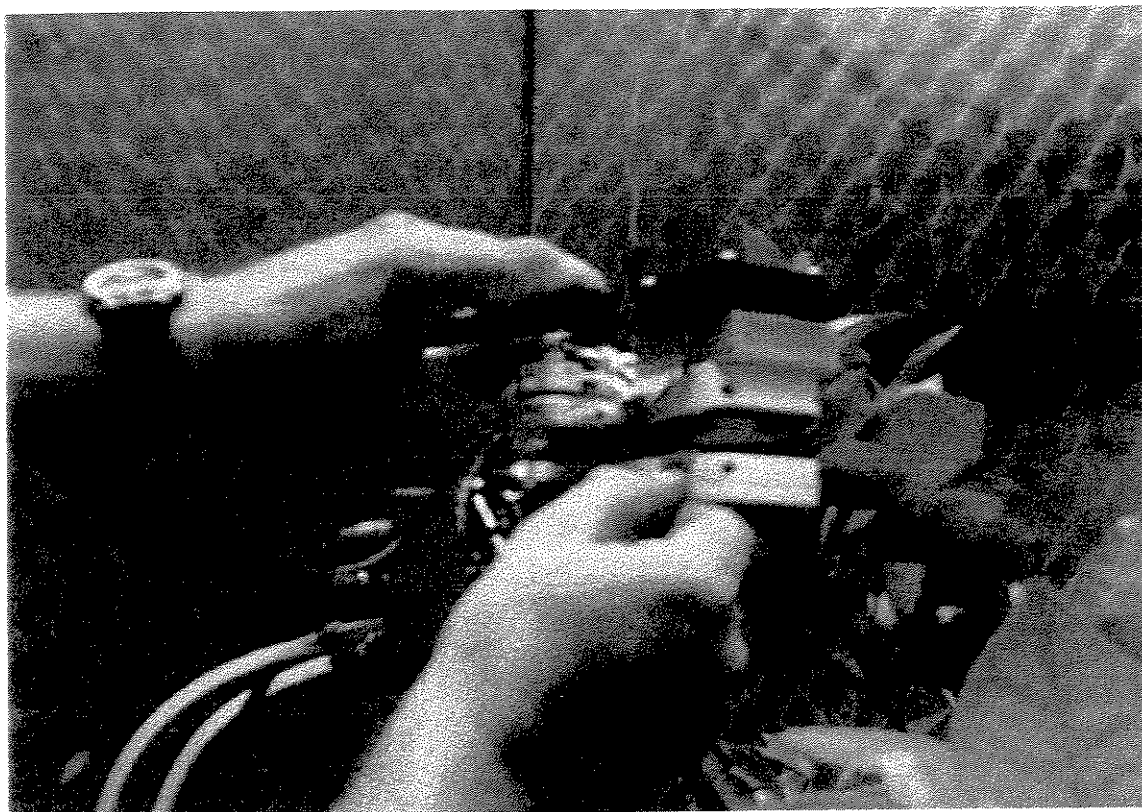


Figura 9. IRGA 6400 com fonte de luz utilizado para medidas de trocas gasosas em folhas de laranjeiras 'Pêra' com diferentes níveis de severidade de CVC.

2.3. RESULTADOS

2.3.1 TRANSMISSÃO DE *X. fastidiosa* E EVOLUÇÃO DOS SINTOMAS FOLIARES

A presença de *X. fastidiosa* foi detectada pelo exame PCR, após dois meses da inoculação por encostia, em apenas uma planta (2,5% das plantas inoculadas). Após cinco meses (6/01/98), a bactéria foi detectada em 21 plantas (52,5% das plantas inoculadas). Neste intervalo, as plantas não apresentaram nenhum sintoma de clorose. Contudo, havia sintomas de murcha em algumas folhas isoladas. Em fevereiro de 1998, observou-se em nove plantas a presença de sintomas caracterizados por pequenos pontos de clorose em folhas isoladas. Em março de 1998 (nove meses posteriores à inoculação) constatou-se a presença de bactéria em 38 das plantas inoculadas (95%) sendo que 21 delas já apresentavam os sintomas de clorose iniciais. Dentre essas plantas, 20 foram escolhidas para a aplicação dos tratamentos.

2.3.2. EFEITO DA DEFICIÊNCIA HÍDRICA SOBRE A SEVERIDADE DA CVC

Em abril de 1999, aos 22 meses após a inoculação (22 MPI) de *X. fastidiosa*, observou-se que a deficiência hídrica não influenciou a severidade da CVC, embora os resultados mostrassem uma tendência para maior severidade nos tratamentos CVC I e CVC II (fig. 10). Esta influência foi constatada somente em abril de 2000 (34 MPI), ou seja, os tratamentos que sofreram estresse, CVC I e CVC II, apresentaram maior porcentagem de folhas com sintomas e com maior severidade. Não se observou diferença entre as plantas que sofreram um ou dois ciclos de deficiência hídrica.

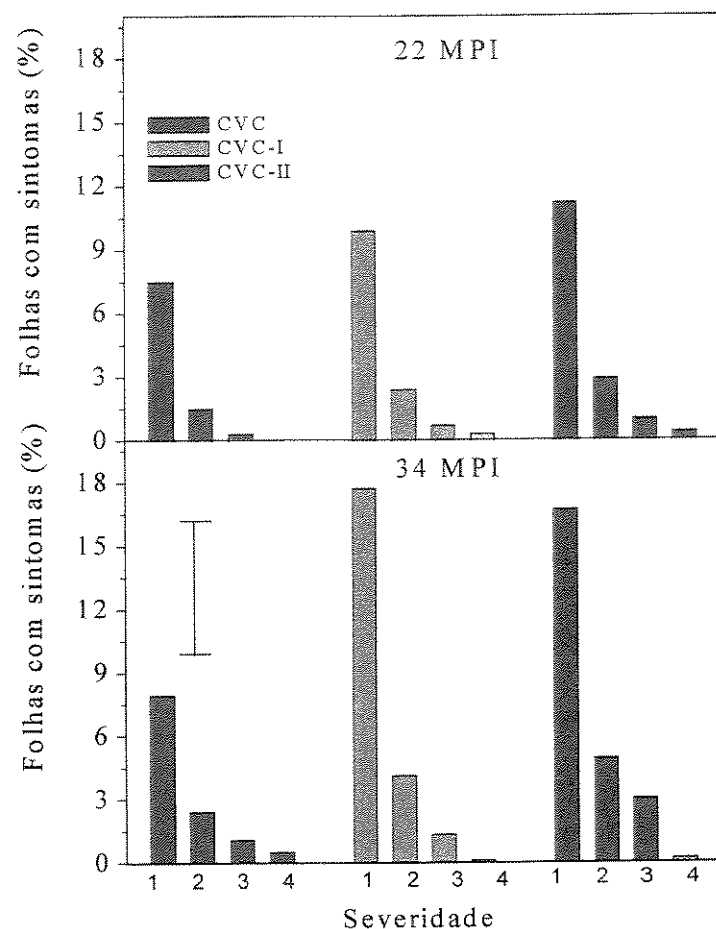


Figura 10. Incidência e severidade de CVC em laranjeiras 'Pêra' com CVC irrigadas (CVC) e em plantas submetidas a um e dois ciclos de deficiência hídrica (CVC I e CVC II) aplicados respectivamente em março e outubro de 1998, aos 22 e 34 meses posteriores à inoculação com *X. fastidiosa* (MPI). Valores de severidade indicam a % da área do limbo com sintomas de cloroses e necroses indo de um a 10% (classe 1), entre 10 e 20% (classe 2), entre 20 e 30% (classe 3) e mais de 30% (classe 4). Barra indica a diferença mínima significativa pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

2.3.3. TROCAS GASOSAS E RELAÇÕES HÍDRICAS EM PLANTAS SADIAS E COM CVC, 9 MESES POSTERIORES À INOCULAÇÃO.

2.3.3.1 PLANTAS IRRIGADAS

Nove meses posteriores à inoculação, Ψ_6 foi semelhante entre as plantas sadias e com CVC, ao redor de $-0,3$ MPa (fig. 11). No entanto, Ψ_{14} foi menor nas plantas com CVC, isto é, ao redor de $-1,2$ MPa e as plantas sadias ao redor de $-0,8$ MPa.

Neste período, as folhas em que foram feitas as medidas ainda não apresentavam sintomas, contudo a CVC reduziu A e g_s . Essa redução ocorreu ao meio dia e à tarde (fig. 12). A redução em A pela CVC esteve próxima a 30%, tanto ao meio dia quanto à tarde e a redução em g_s foi significativa apenas ao meio dia e situou-se também ao redor de 30 %.

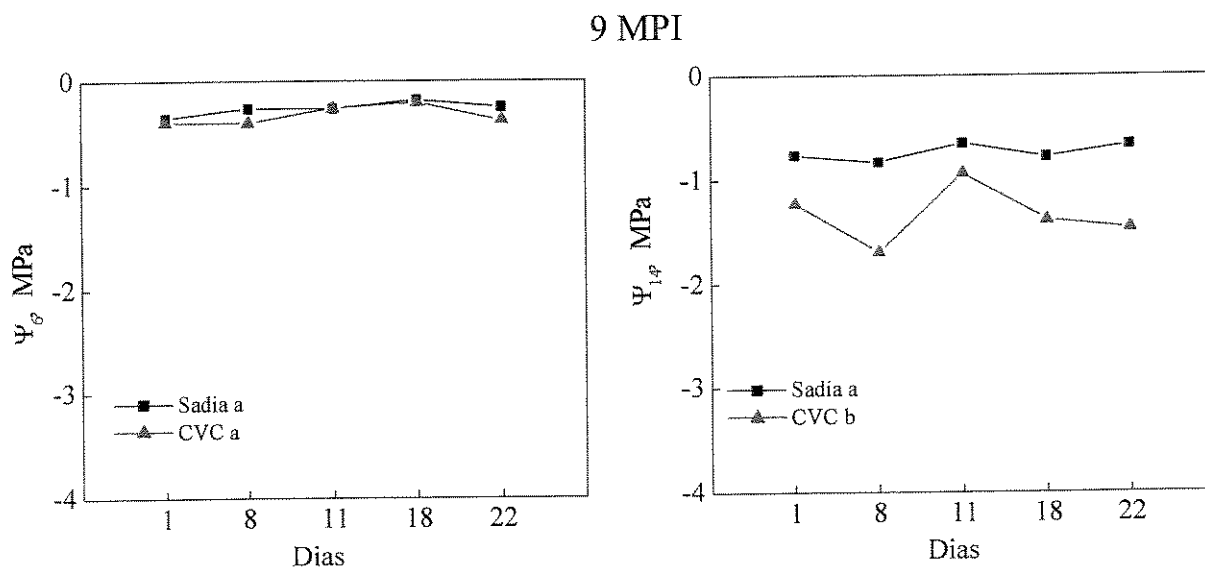


Figura 11. Potencial da água medido às 6:00 horas (Ψ_6) e às 14:00 horas (Ψ_{14}) em folhas de laranjeiras 'Pêra' sadias e com CVC irrigadas, nove meses posteriores à inoculação com *X. fastidiosa* (MPI). Tratamentos seguidos de letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$), dentro do horário analisado e por todos os dias de observação.

9 MPI

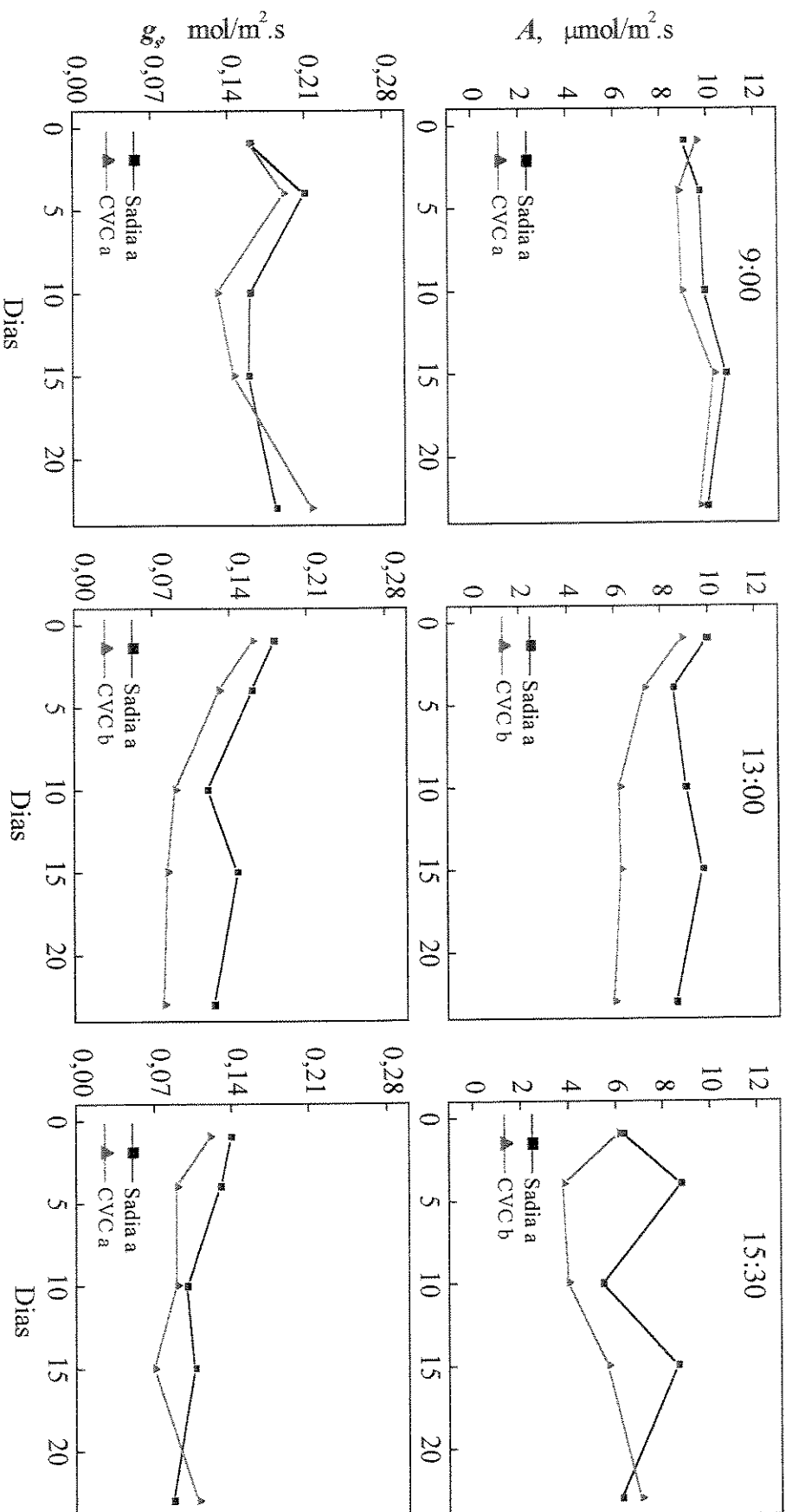


Figura 12. Taxa de assimilação de CO_2 (A) e condutância estomática (g_s) de folhas de laranjeira 'Pêra' sadia e com CVC, medidas em março de 1998, nove meses posteriores à inoculação com *X. fastidiosa* (MPI). Tratamentos seguidos de letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$), dentro do horário analisado e por todos os dias de observação.

2.3.3.2. PLANTAS SUBMETIDAS AO PRIMEIRO CICLO DE DEFICIÊNCIA HÍDRICA

Durante o primeiro ciclo de deficiência hídrica, que se desenvolveu durante 11 dias, observou-se que houve queda de Ψ_a das plantas Sadias I e CVC I. Ψ_6 mínimo situou-se ao redor de $-2,8$ MPa e, para Ψ_{14} , próximo a $-3,1$ MPa (fig. 13).

No décimo primeiro dia, A foi próximo a zero para todos os tratamentos, quando então todos os vasos foram re-irrigados. Após esta re-irrigação, houve a recuperação rápida do potencial da água nas folhas para ambos os tratamentos, que se igualaram às medidas anteriores ao estresse hídrico. As recuperações de A e de g_s ocorreram gradativamente em 14 dias. Também foi possível verificar que após a recuperação das plantas, Ψ_{14} , A , g_s foram menores no tratamento CVC I com relação ao tratamento Sadia I.

2.3.4. TROCAS GASOSAS E RELAÇÕES HÍDRICAS EM PLANTAS SADIAS E COM CVC 16 MESES POSTERIORES À INOCULAÇÃO

2.3.4.1. PLANTAS IRRIGADAS

Houve semelhança nos valores de Ψ_6 para todos os tratamentos. No entanto, as plantas Sadia e Sadia I (que haviam recebido um primeiro ciclo de deficiência hídrica em março de 1998), apresentaram valores de Ψ_{14} semelhantes e maiores que os dos tratamentos CVC e CVC I (fig. 14).

Embora tenha ocorrido semelhança em Ψ_6 entre os tratamentos CVC e CVC I, a deficiência hídrica imposta anteriormente, aos nove meses posteriores à inoculação, reduziu Ψ_{14} cujas medidas ficaram ao redor de $-1,3$ MPa para CVC e $-1,6$ MPa para as plantas CVC I. Tais resultados sugerem que Ψ_a nas plantas doentes pode ser modificado pela ocorrência de deficiência hídrica em períodos anteriores.

9 MPI

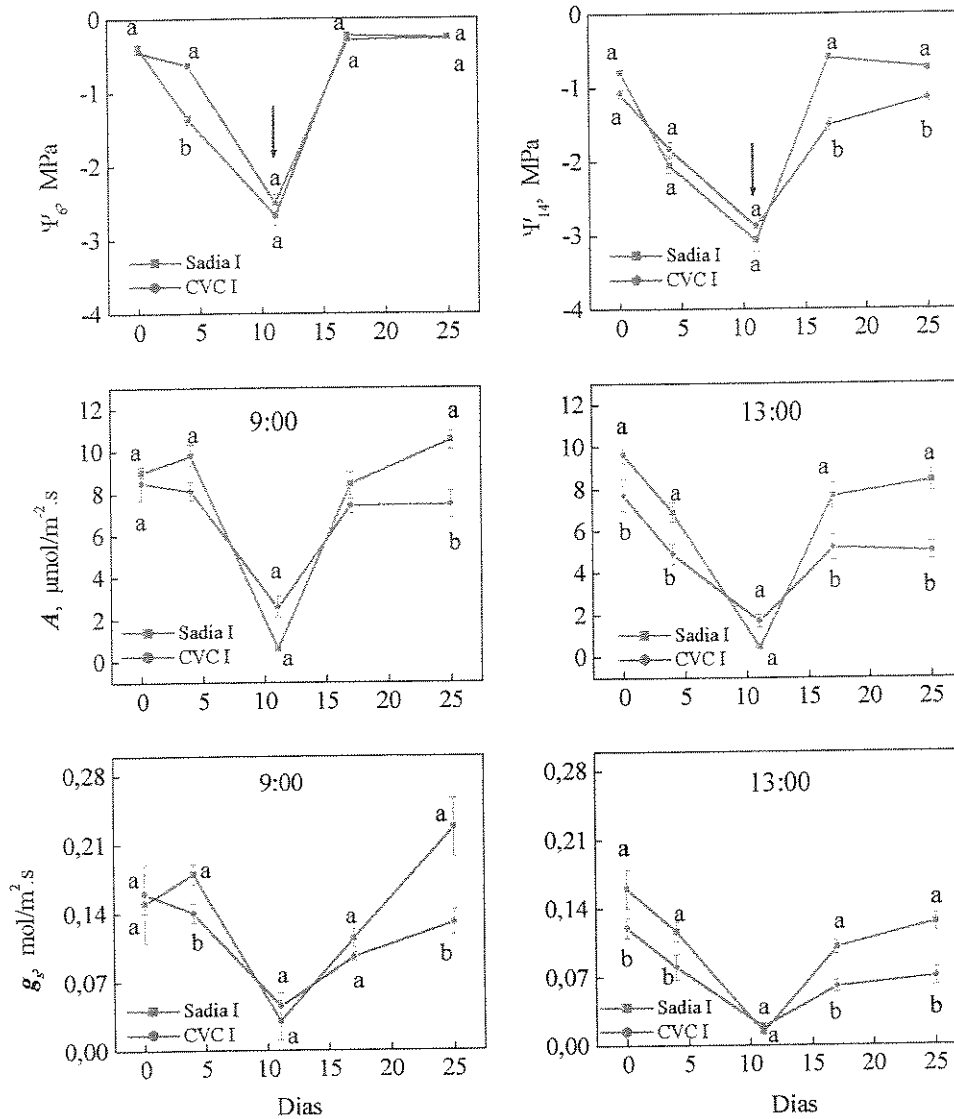


Figura 13. Potencial da água medido às 6:00 horas (Ψ_6) e às 14:00 horas (Ψ_{14}), taxa de assimilação de CO₂ (A) e condutância estomática (g_s) em folhas de laranjeira 'Pêra' sadias e com CVC, submetidas à deficiência hídrica, medidos em março de 1998, nove meses posteriores à inoculação com *X. fastidiosa* (MPI). Seta indica a re-irrigação dos tratamentos. Medidas seguidas com letras diferentes diferem entre si pelo teste T ($P < 0,05$), dentro do dia analisado.

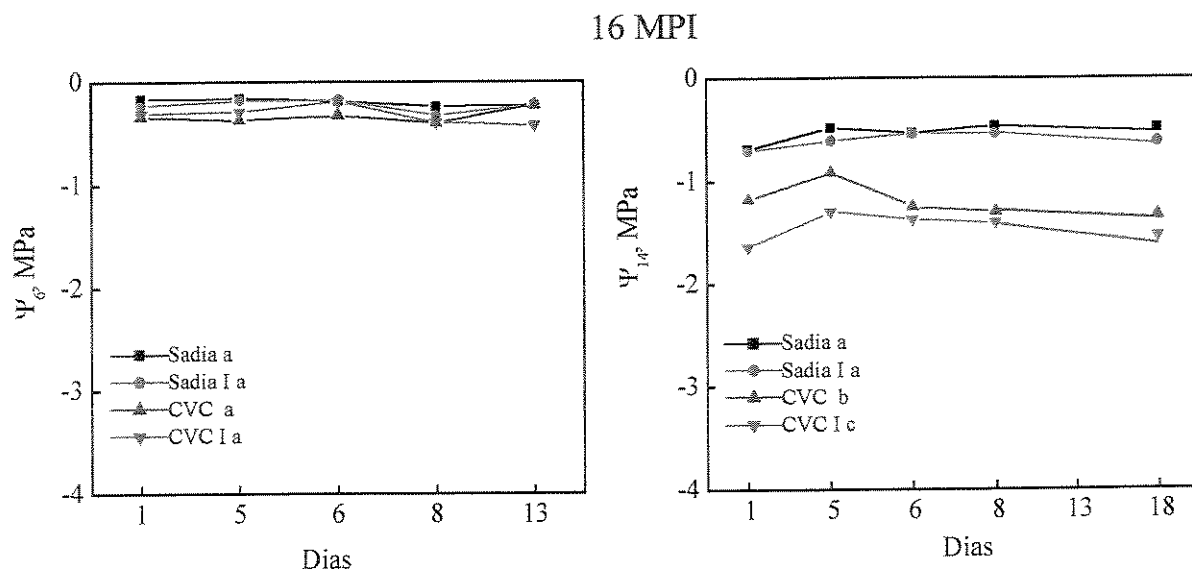


Figura 14. Potencial da água medido às 6:00 horas (Ψ_6) e às 14:00 horas (Ψ_{14}) em folhas de laranjeiras ‘Pêra’ sadias e com CVC irrigadas e em plantas que sofreram um ciclo de deficiência hídrica, 9 meses posteriores à inoculação com *X. fastidiosa* (MPI) (Sadia I e CVC I). Tratamentos seguidos de letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$), dentro do horário analisado e por todos os dias de observação.

Os tratamentos Sadia e Sadia I apresentam semelhança quanto a A e g_s , indicando que houve total recuperação da fotossíntese das plantas sadias que sofreram estresse. Por outro lado, as plantas doentes CVC e CVC I apresentaram menores A e g_s que as plantas sadias, em todos os horários medidos (fig. 15).

O tratamento CVC I apresentou ao longo do período, nas medidas da tarde, A 50% menor com relação ao tratamento com CVC. Essa redução em A sugere que o estresse sofrido, na fase inicial de desenvolvimento da doença aos 9 MPI, agravou os prejuízos causados pela CVC.

16 MPI

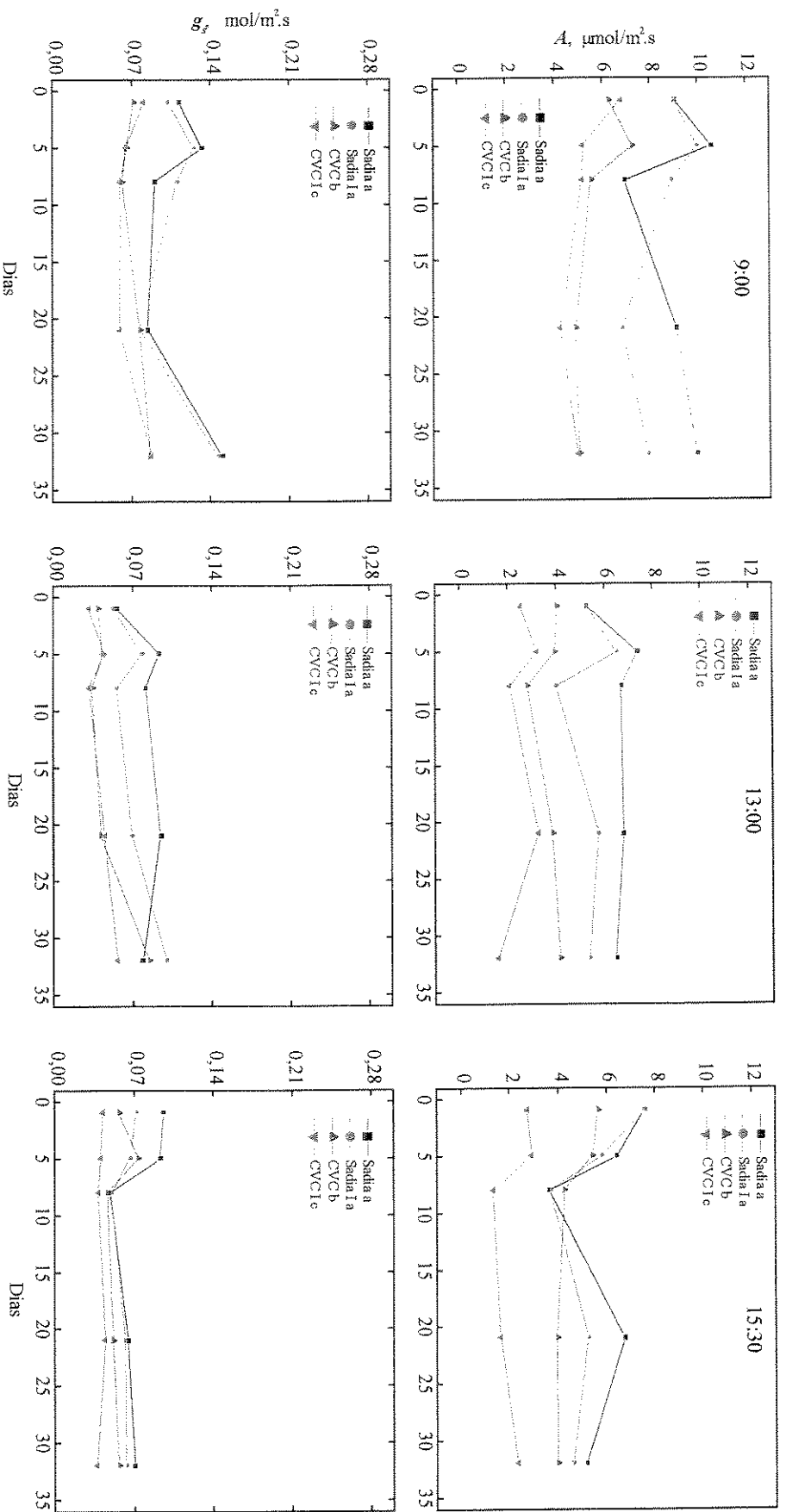


Figura 15: Taxa de assimilação de CO₂ (A) e condutância estomática (g_s) em folhas de laranja 'Pêra' sadia e com CVC irrigadas e que sofreram deficiência hídrica em março de 98 (Sadia I e CVC I) medidas aos 16 MPI com *X. fastidiosa*, em outubro de 1998. Tratamentos seguidos de letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$), dentro do horário analisado e por todos os dias de observação.

2.3.4.2. PLANTAS SUBMETIDAS AO SEGUNDO CICLO DE DEFICIÊNCIA HÍDRICA

Durante o período de suspensão da irrigação, que se estendeu por 12 dias em outubro de 1998, Ψ_6 para o tratamento CVC II atingiu - 2,0 MPa e Ψ_{14} -2,2 MPa (fig. 16). Após a reirrigação, houve recuperação do potencial da água para os tratamentos, atingindo valores próximos aos encontrados antes da aplicação da deficiência hídrica. Aos 12 dias sem irrigação, A e g_s atingiram valores próximo à zero para os tratamentos Sadia II e CVC II. A recuperação de A e de g_s após a reirrigação ocorreu de forma semelhante para ambos os tratamentos, atingindo valores semelhantes aos encontrados antes da aplicação do déficit hídrico.

2.3.5. TROCAS GASOSAS E RELAÇÕES HÍDRICAS EM PLANTAS SADIAS E COM CVC, 22 MESES POSTERIORES À INOCULAÇÃO

2.3.5.1. PLANTAS IRRIGADAS

Os valores de Ψ_6 , Ψ_{14} , A e g_s das plantas Sadia I e II foram semelhantes aos do tratamento sadia (resultados não mostrados). Ou seja, conforme também demonstrado anteriormente, não ocorreu efeito residual do estresse hídrico nas variáveis medidas nas plantas sadias.

Ψ_6 e Ψ_{14} do tratamento Sadia foram maiores que os respectivos potenciais da água dos tratamentos CVC, CVC I e CVC II (fig. 17). Entre os tratamentos doentes, Ψ_6 foi semelhante contudo, Ψ_{14} foi maior para as plantas doentes que não sofreram deficiência hídrica (CVC) e semelhantes entre aquelas com um (CVC I) ou dois ciclos de deficiência hídrica (CVC II).

16 MPI

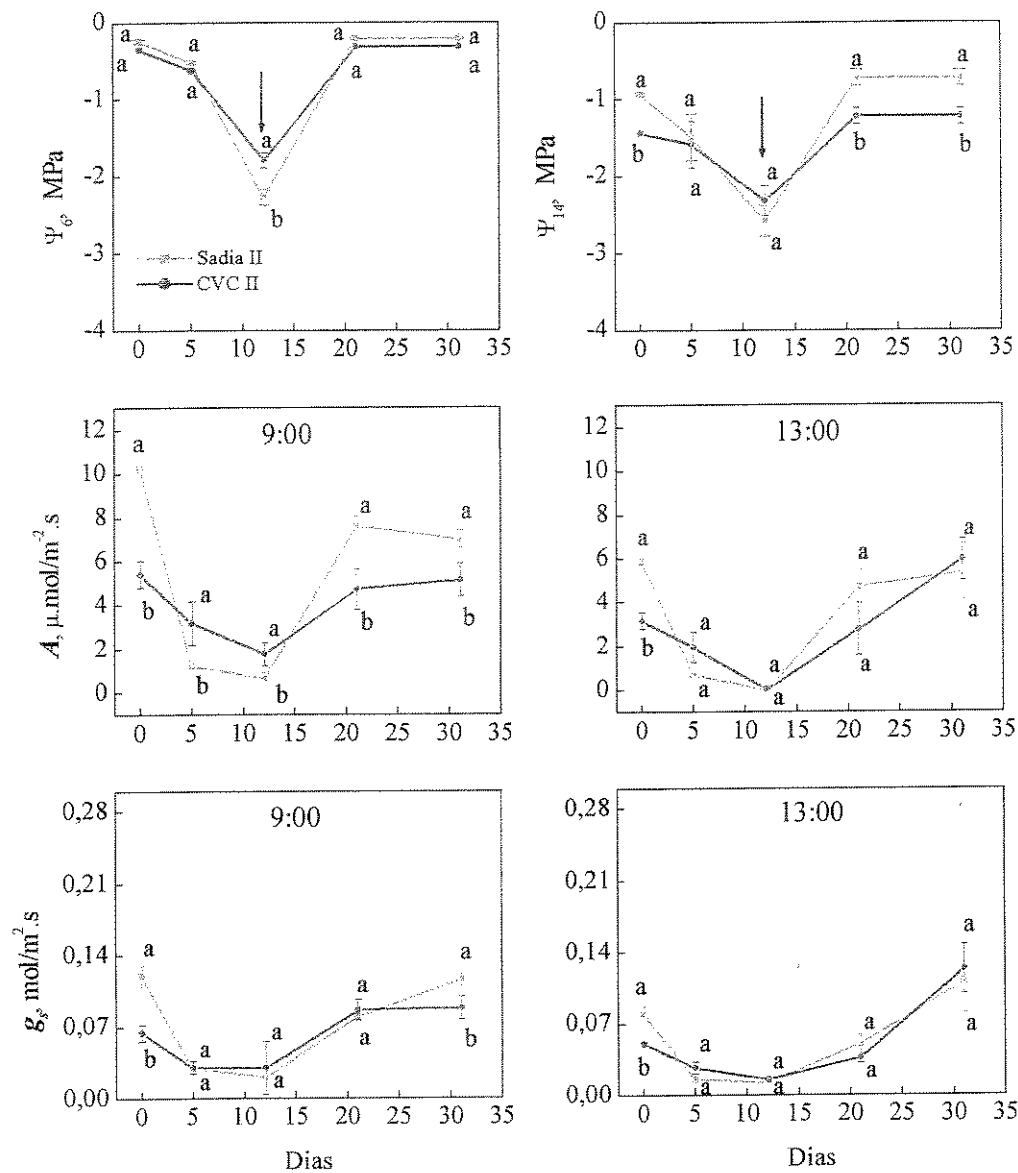


Figura 16. Potencial da água medido às 6:00 horas (Ψ_6) e às 14:00 horas (Ψ_{14}), taxa de assimilação de CO_2 (A) e condutância estomática (g_s) em folhas de laranjeira 'Pêra' sadias e com CVC submetidas ao segundo ciclo de deficiência hídrica, medidos em outubro de 1998, 16 MPI com *X. fastidiosa*. Seta indica a re-irrigação dos tratamentos. Medidas seguidas com letras diferentes diferem entre si pelo teste T ($P < 0,05$), dentro do dia analisado.

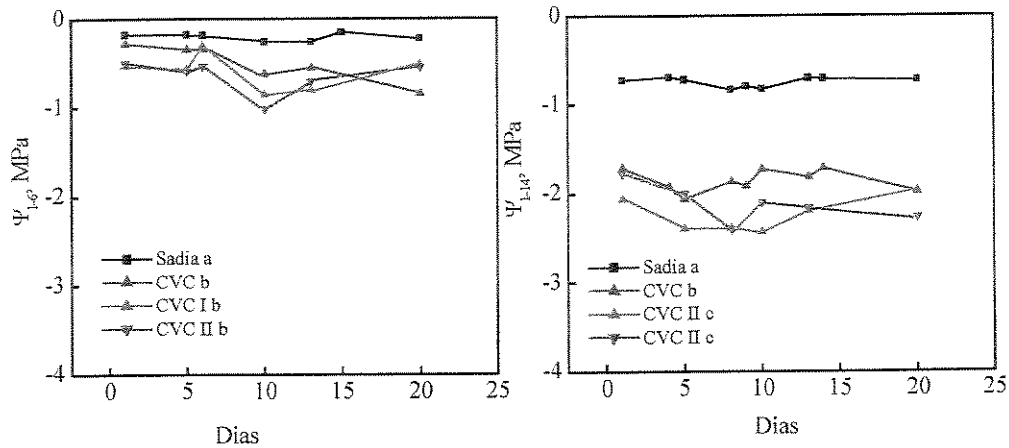


Figura 17. Potencial da água às 6:00 horas (Ψ_6) e às 14:00 horas (Ψ_{14}) em folhas de laranjeiras 'Pêra' sadias e com CVC irrigadas e com um ou dois ciclos de deficiência hídrica (CVC I ou CVC II), aplicados em março e outubro de 1998, respectivos aos 9 e 16 MPI com *X. fastidiosa*. Tratamentos seguidos de letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$), dentro do horário analisado e por todos os dias de observação.

Para as plantas sadias, os valores de A e de g_s foram diferentes entre os dias e os horários das medidas. Nos primeiros 10 dias de observação, os valores de A foram maiores que os demais dias. Também, os valores de A foram maiores pela manhã (fig. 18). Essas respostas também foram observadas para os tratamentos com CVC. Estas variações estão relacionadas com a variação das condições climáticas (Ver apêndice 2).

O tratamento CVC apresentou A e g_s maiores que as plantas que sofreram um ou dois ciclos de deficiência hídrica (CVC I e CVC II), embora esta diferença fosse notada apenas ao meio dia e à tarde.

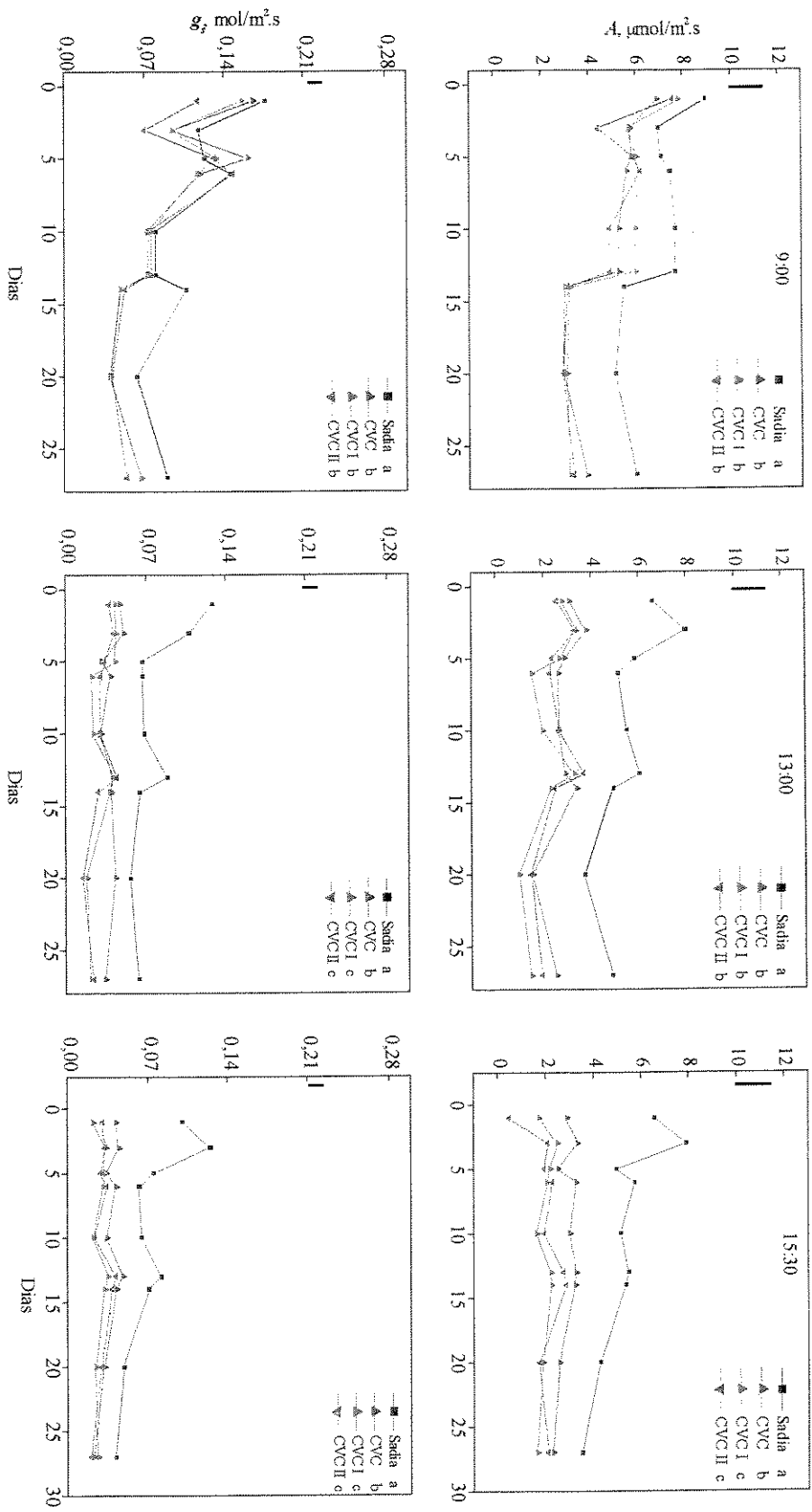


Figura 18. Taxa de assimilação de CO₂ (A) e condutância estômática (g_s) em folhas de laranja 'Pêra' sadia e com CVC irrigadas e que sofreram deficiência hídrica em março de 98 (CVC I) e em outubro de 98 (CVC II), respectivo aos 9 e 16 MPI com *X. fastidiosa*, medidos em abril de 1999. Tratamentos seguidos de letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) no horário de observação. Barra indica a diferença mínima significativa entre os dias observados.

2.3.5.2. PLANTAS SUBMETIDAS AO TERCEIRO CICLO DE DEFICIÊNCIA HÍDRICA

Houve declínio mais rápido no potencial da água na folha do tratamento Sadia III (fig. 19) e o Ψ_6 atingiu $-3,7$ MPa após 10 dias da suspensão da irrigação. O tratamento CVC III atingiu valor semelhante de Ψ_6 somente após 15 dias de suspensão da irrigação. Esse mesmo tipo de resposta ocorreu para o potencial da água medido às 14 horas.

Após 10 dias de indução da deficiência hídrica, A e g_s atingiram valores próximos a zero para o tratamento Sadia III, e após 15 dias para CVC III (fig. 19). A recuperação de A e g_s após a re-irrigação não ocorreu para ambos os tratamentos, ficando abaixo das medidas obtidas antes do estresse. Não foi possível comparar estatisticamente os resultados, entre as plantas sadias e doentes, pelo menor tempo de recuperação que as plantas doentes foram submetidas. Contudo, essas medidas se aproximaram, daquelas obtidas pelas plantas dos tratamentos Sadia e CVC I ou CVC II no mesmo período (fig. 18).

O consumo diário de água das plantas sadias foi maior e pôde ser observado pela variação da umidade do substrato ao longo dos dias (fig. 20). Esse maior consumo de água poderia ser justificado pela maior taxa de transpiração das plantas sadias (fig. 21).

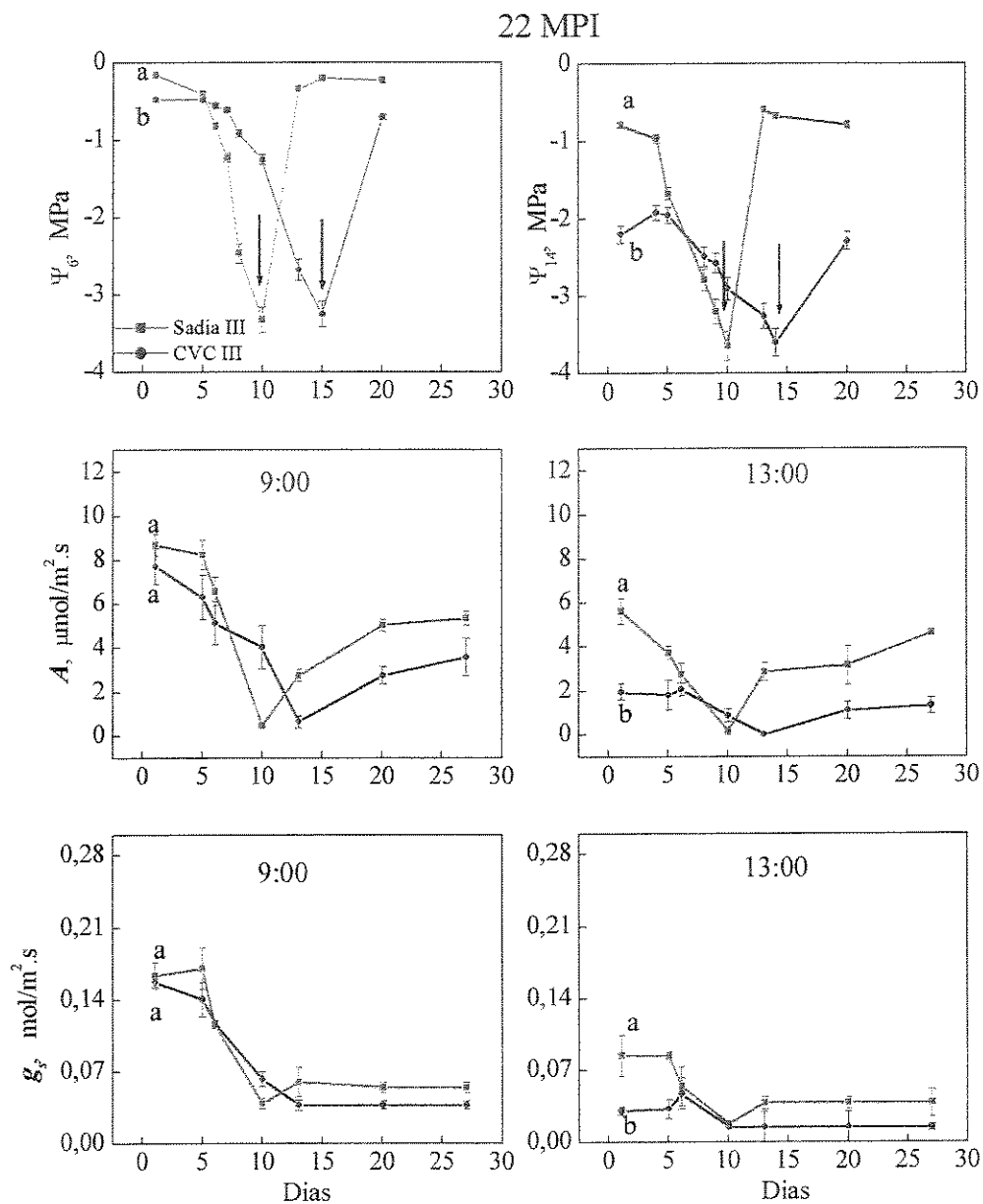


Figura 19. Potencial da água medido às 6:00 horas (Ψ_6) e às 14:00 horas (Ψ_{14}), taxa de assimilação de CO_2 (A) e condutância estomática (g_s) em folhas de laranjeira 'Pêra' sadias e com CVC submetidas ao terceiro ciclo de deficiência hídrica, medidos em abril de 1999, aos 22 MPI com *Xylella fastidiosa*. Seta indica a re-irrigação dos tratamentos. Medidas seguidas com letras diferentes diferem entre si pelo teste T ($P < 0,05$), dentro do dia analisado.

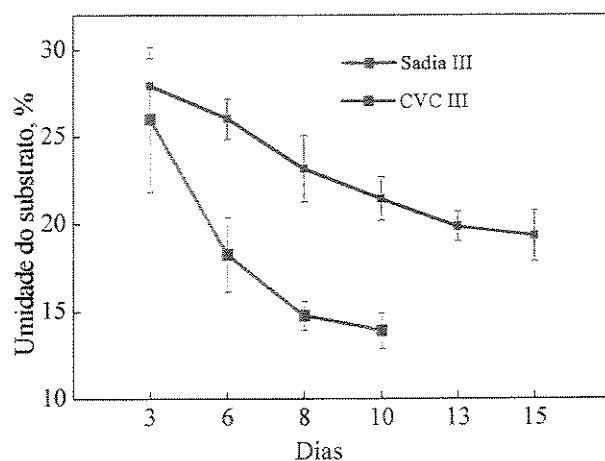


Figura 20. Variação do teor de umidade do substrato em vasos de laranjeira 'Pêra' sadia (Sadia III) e com clorose variegada dos citros (CVC III) aos 22 MPI com *X. fastidiosa*, durante a suspensão da irrigação.

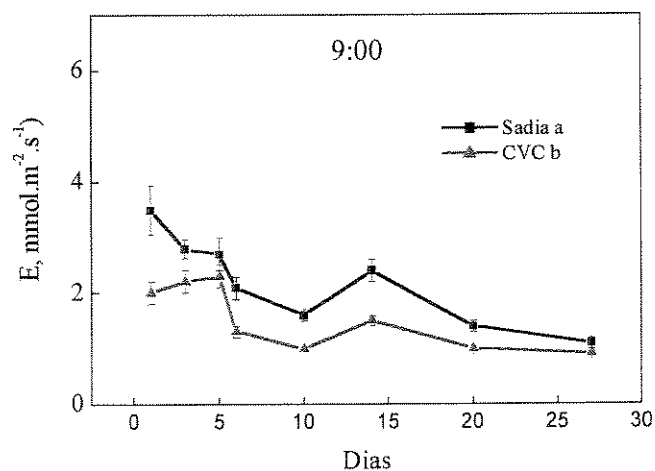


Figura 21. Taxa de transpiração (E) em plantas irrigadas sadias e com clorose variegada dos citros aos 22 MPI com *X. fastidiosa*. Tratamentos com letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ao longo do período analisado ($P < 0,05$).

2.3.6. TROCAS GASOSAS E RELAÇÕES HÍDRICAS DURANTE O DESENVOLVIMENTO DA CVC

1.3.6.1. FOTOSÍNTESE, EFICIÊNCIA NO USO DA ÁGUA, RAZÃO C_i/C_a

A fig. 22 mostra os efeitos da *X. fastidiosa* sobre A , g_s , EUA e C_i/C_a em plantas irrigadas, no período entre 9 e 22 MPI, na parte da manhã e da tarde.

Aos 9 meses de infecção a CVC reduziu A (fig. 22). Esta redução restringiu-se ao período da tarde. Também não houve diferença em g_s , EUA e C_i/C_a . As temperaturas das folhas foram: $T_f = 29,6 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,8$ e $29,1 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,5$ no período da manhã e $35,2 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,4$ e $35,3 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,3$ no período da tarde, para plantas sadias e com CVC, respectivamente.

Após 16 MPI, a CVC promoveu uma redução em A e em g_s nos dois períodos analisados. Essas reduções, entretanto, não afetaram EUA ou a razão C_i/C_a . As medidas também foram feitas com T_f semelhantes entre os tratamentos sendo de $32,6 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,5$ e $33,0 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,6$ no período da manhã e $38,7 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,5$ e $39,1 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,4$ no período da tarde, respectivamente para plantas sadias e com CVC.

Após 22 MPI a CVC reduziu A , g_s e EUA nos dois períodos do dia. Também houve acréscimo em C_i/C_a para as plantas doentes. Estas diferenças também ocorreram sob T_f semelhantes entre os tratamentos sendo de $32,1 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,7$ e $31,4 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,4$ no período da manhã e $35,5 \pm 0,4$ e $36,6 \pm 0,4 \text{ }^\circ\text{C}$ no período da tarde, respectivamente para plantas sadias e com CVC.

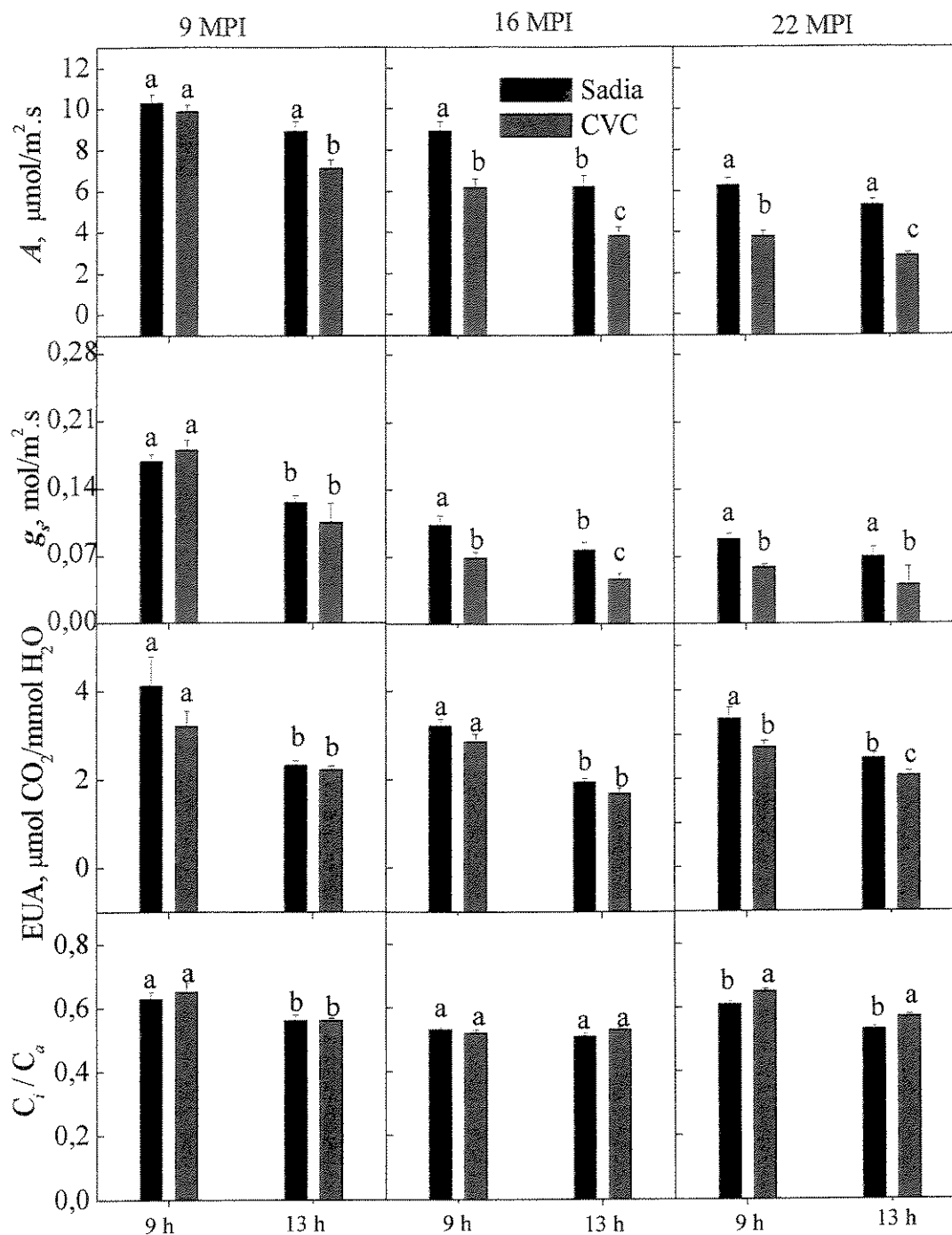


Figura 22. Taxa de assimilação de CO_2 (A), condutância estomática (g_s), eficiência no uso da água (EUA) e razão entre a concentração foliar interna de CO_2 e externa (C_i/C_a), com medidas feitas sob saturação lumínica, em folhas de plantas sadias e com CVC aos 9,16 e 22 MPI com *X. fastidiosa*. Tratamentos seguidos com letras diferentes diferem entre si pelo teste Tukey ($P < 0,05\%$) dentro do horário analisado.

2.3.7. EFICIÊNCIA INTRÍNSECA NO USO DA ÁGUA

As plantas dos tratamentos Sadia e CVC apresentaram a mesma eficiência intrínseca no uso da água, tanto nas medidas feitas aos 16 quanto aos 22 MPI. Os coeficientes angulares foram semelhantes. Isto sugere que para um mesmo g_s , as plantas com CVC possuem A semelhante ao das plantas sadias. Entretanto, nas plantas doentes os valores de g_s concentraram-se entre 0 e 0,1 mol/m².s e para as plantas sadias, entre 0,05 e 0,2 mol/m².s (fig. 23).

As taxas de assimilação de CO₂ em outubro de 98 (16 MPI) foram maiores que em abril de 99 (22 MPI). Essa maior taxa de assimilação de CO₂ aos 16 MPI ocorreu sob mesma abertura estomática, tanto para plantas do tratamento Sadia como CVC.

2.3.8. RELAÇÃO ENTRE O POTENCIAL DA ÁGUA NA FOLHA E A TAXA DE ASSIMILAÇÃO DE CO₂

Houve redução em A em função do decréscimo do potencial da água nas folhas tanto para o tratamento CVC quanto para o Sadia (fig. 24). A aproximou-se de zero para ambos os tratamentos, quando o potencial da água atingiu - 3,2 MPa.

Contudo, de acordo com o horário das medidas, as respostas de A em relação ao Ψ_a nas folhas foram diferentes entre os tratamentos Sadia e CVC. Quando relacionou-se valores de A , medidos ao redor das 9 horas da manhã, com Ψ_6 , as plantas com CVC apresentaram A inferior, principalmente nos potenciais maiores, tanto aos 16 quanto aos 22 MPI (fig 24 A e B). Quando relacionou-se valores de A , medidos por volta das 13 horas, e Ψ_{14} , não houve diferença entre as plantas sadias e com CVC (fig. 24 C e D).

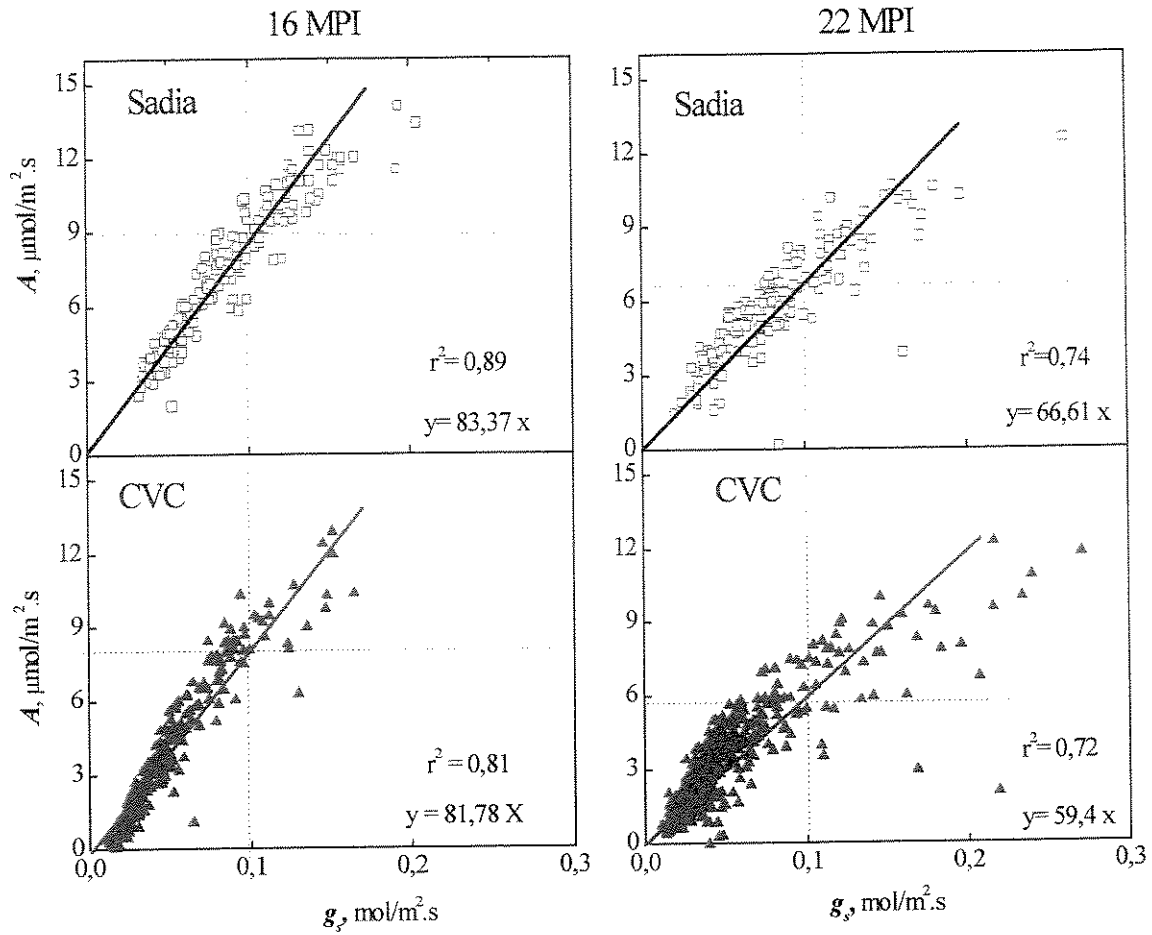


Figura 23. Relação entre a assimilação de CO₂ (A) e a condutância estomática (g_s) em laranjeiras ‘Pêra’ sadias (Sadia) e com clorose variegada dos citros (CVC), aos 16 e 22 MPI com *X. fastidiosa*, respectivamente, em outubro de 1998 e abril de 1999.

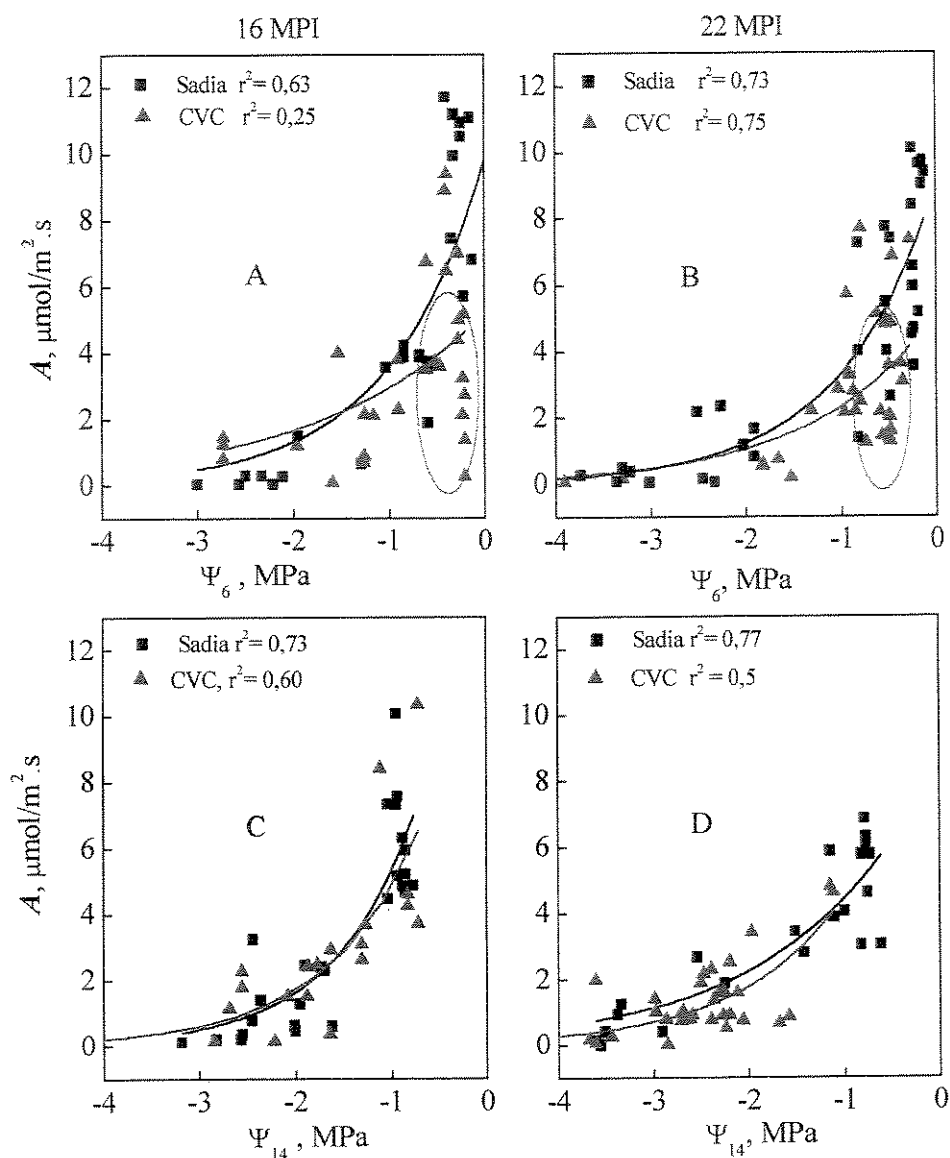


Figura 24. Taxa de assimilação de CO₂ (A) em função do potencial da água medido às 6:00 e às 14:00 horas (Ψ_6 e Ψ_{14} , respectivamente) em plantas sadias e com CVC, em outubro de 1998, 16 (A e C) e 22 (B e D) MPI com *X. fastidiosa*. Detalhe circular apresenta valores de potencial em que houve diferenças em A entre plantas sadias e com CVC.

2.3.9. RESPOSTAS DA ASSIMILAÇÃO DE CO₂ E DA CONDUTÂNCIA ESTOMÁTICA EM FUNÇÃO DO DÉFICIT DE PRESSÃO DE VAPOR ENTRE A FOLHA E A ATMOSFERA (DPV_{f-ar})

Houve redução em A e g_s com a elevação do DPV_{f-ar} para todos os períodos analisados (figs. 25 e 26). Aos 9 MPI, a relação entre A e g_s em função do DPV_{f-ar} apresentou coeficiente angular semelhante tanto para as plantas sadias quanto para as plantas com CVC ($P < 0,01$). Também foram próximos os valores de A sob um mesmo DPV_{f-ar}, embora houvesse tendência para diminuição no tratamento CVC. Aos 16 e aos 22 MPI, os coeficientes angulares também foram iguais ($P < 0,01$), mostrando semelhança entre as respostas das medidas de plantas doentes e sadias. Contudo, sobre um mesmo DPV_{f-ar} as plantas sadias apresentaram aos 16 MPI A 44 % maior, e aos 22 MPI 53% maior do que as plantas com CVC. Essa superioridade na assimilação também ocorreu em proporções semelhantes em g_s .

Aos 22 MPI, A e g_s nas plantas com CVC foram menores quando comparados ao início da infecção e a resposta ao DVP_{f-ar} foi menor à medida que houve a evolução da doença. Isto manteve valores semelhantes de g_s à 0,05 mol/m².s e A ao redor de 2,5 µmol/m².s, no intervalo entre 5,0 e 2 kPa.

2.3.10 TAXA DE ASSIMILAÇÃO DE CO₂ SOB CONDIÇÕES CONTROLADAS, EM FUNÇÃO DO GRAU DE SEVERIDADE DE CVC

Sob DPV de 0,7 kPa e temperatura do ambiente mantida a 28 °C, A declinou gradativamente com a evolução dos sintomas foliares (fig. 27). Quando se aumentou o DPV para 2,7 kPa, houve redução na assimilação para todos os graus de severidade, embora esta redução não tenha sido significativa para a planta sadia.

Para uma severidade maior que 3, correspondendo a aproximadamente 3% do limbo com sintomas de clorose, sob DPV de 2, 7 kPa, A permaneceu próximo a 1 µmol/m².s.

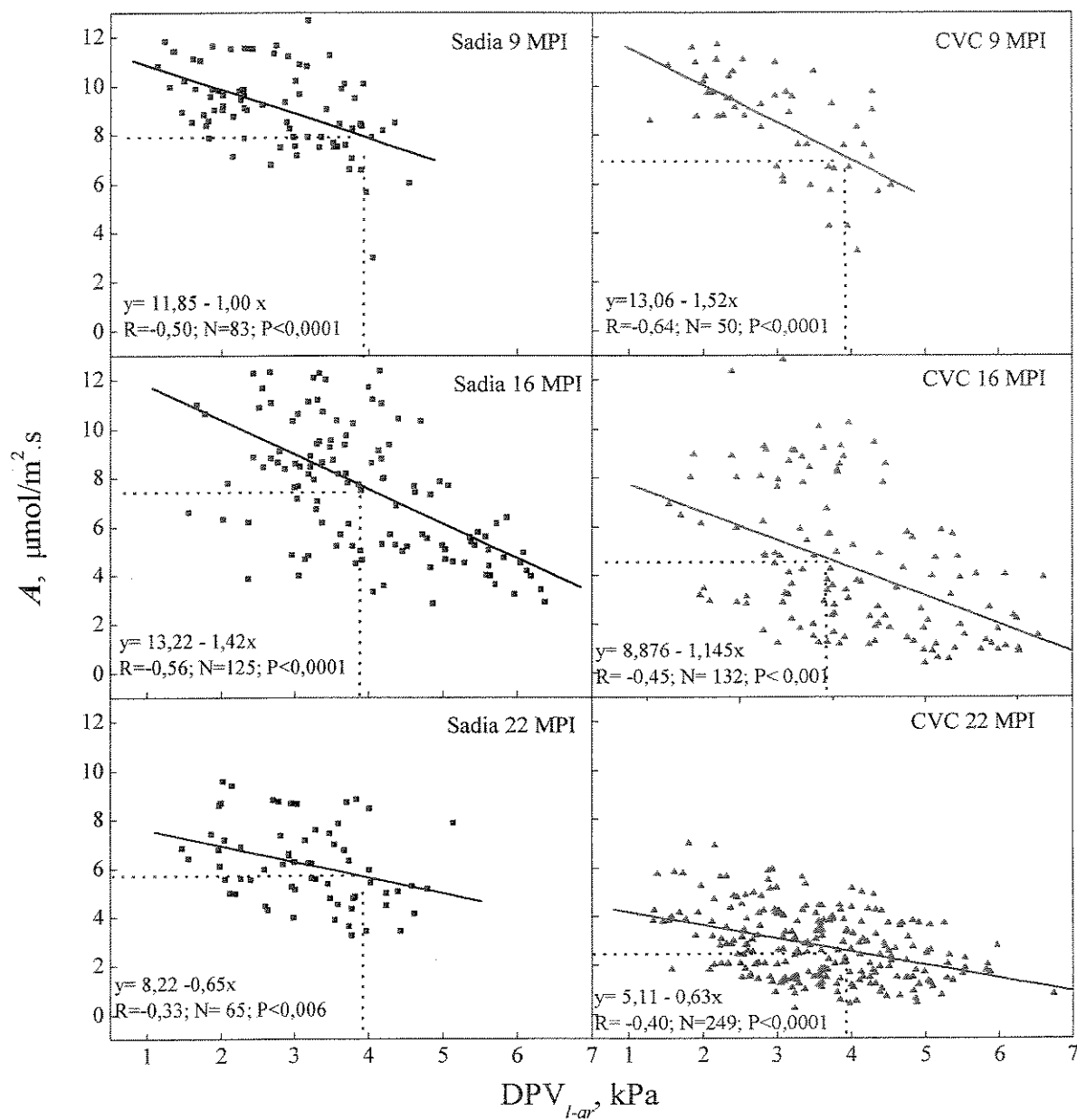


Figura 25. Taxa de assimilação de CO₂ (A) em função do déficit de pressão de vapor entre o ar e a folha (DPV_{l-ar}) medidas em plantas sadias e com CVC, em março e outubro de 1998 e abril de 1999, respectivamente aos 9, 16 e 22 MPI com *X. fastidiosa* (MPI).

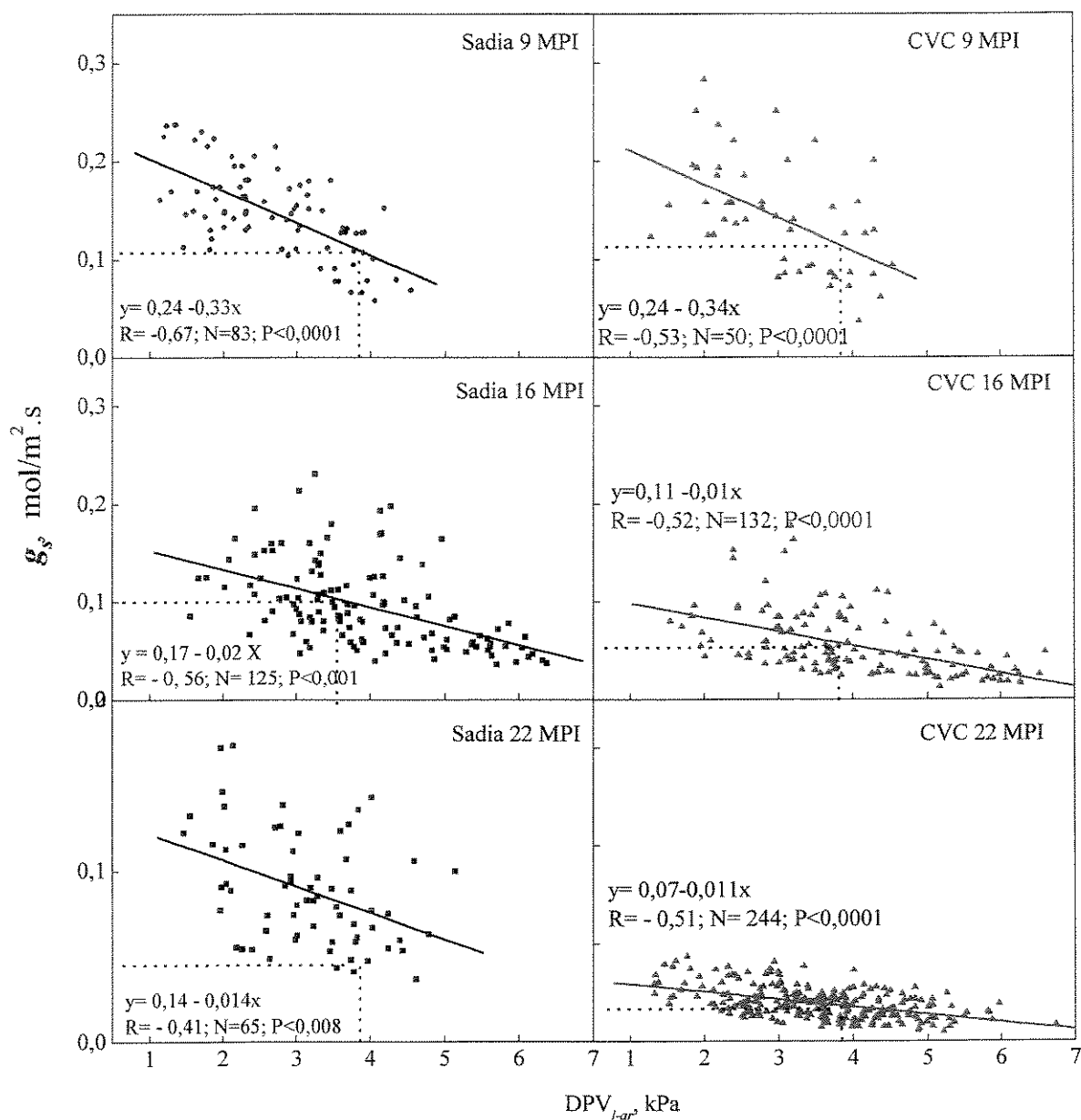


Figura 26. Condutância estomática (g_s) em função do déficit de pressão de vapor entre o ar e a folha (DPV_{l-ar}) medidas em plantas sadias e com CVC, em março e outubro de 1998 e abril de 1999, respectivamente aos 9, 16 e 22 MPI com *X. fastidiosa* (MPI).

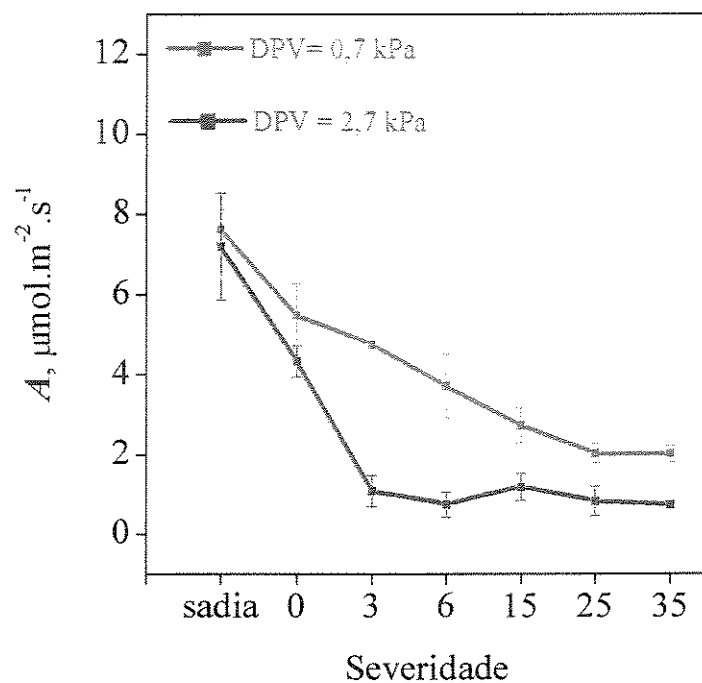


Figura 27. Taxa de assimilação de CO_2 (A) em folhas de laranjeiras 'Pêra' sadias e com CVC com diferentes níveis de severidade, medidas em condições controladas e sob baixo (0,7 kPa) e alto (2,7 kPa) déficit de pressão de vapor do ar (DPV).

2.4. DISCUSSÃO

2.4.1 TRANSMISSÃO DE *X. fastidiosa* POR ENCOSTIA E EVOLUÇÃO DOS SINTOMAS DE CVC SOB DEFICIÊNCIA HÍDRICA.

A constatação da infecção pela *X. fastidiosa* em 95% das plantas inoculadas e a manifestação de sintomas em mais de 50% delas aos 9 MPI, demonstraram que o método de inoculação por encostia plântulas doentes foi eficiente (fig. 6). A encostia cria um sistema vascular comum entre as plantas, permitindo a passagem contínua da bactéria da plântula inoculadora para a planta sadia.

A severidade da doença evoluiu no período de 8 a 34 MPI, desde pequenas manchas cloróticas em folhas isoladas, até ser constatada na maioria dos ramos e atingir o nível de severidade 4 em algumas folhas (mais de 30% do limbo infectado). Isto ocorreu independente da presença da deficiência hídrica (fig.10).

A deficiência hídrica aplicada nas plantas no início da manifestação dos sintomas (9 MPI) induziu maior severidade de sintomas às plantas com CVC aos 34 MPI. McElrone *et al.* (2001) observaram que, *Parthenocissus quinquefolia*, uma liana de folhas decíduas e nativa da América do Norte, observaram que, quando era infectada com *X. fastidiosa* e submetida à deficiência hídrica, era afetada mais severamente. Embora não tenham estudado os motivos pelos quais a deficiência hídrica aumentou a severidade, McElrone *et al.* (2001) sugeriram que uma maior colonização dos tecidos tenha ocorrido sob estresse. Outras observações têm corroborado esta hipótese, à medida que a severidade dos sintomas em folhas de plantas infectadas com *X. fastidiosa* está relacionada ao grau de colonização do xilema (Hopkins, 1989; Purcell & Hopkins, 1996, Oliveira *et al.*, 2000a).

Não houve diferença significativa na severidade entre os tratamentos com um ou dois ciclos de deficiência hídrica. Uma hipótese para esta igualdade seria que a deficiência hídrica aplicada aos 9 MPI, ou no início do desenvolvimento da doença e estabelecimento do patógeno nos tecidos da planta, tenha sido mais importante que outros subseqüentes, quando o xilema já estava colonizado em maior extensão. Entretanto, mesmo que o tratamento CVC I tenha ficado dos 9 aos 34 MPI sem sofrer um novo ciclo de deficiência hídrica, houve evolução dos sintomas.

McElrone *et al.* (2001) sugeriram que a irrigação poderia ser uma alternativa para diminuir os danos das plantas infectadas com *X. fastidiosa*, principalmente sob condições de deficiência hídrica. Contudo, embora tenha ocorrido maior severidade da CVC nas plantas submetidas ao estresse, a irrigação não evitou a evolução dos sintomas.

A maior severidade da doença nos tratamentos CVC I e CVC II pode apontar para uma das prováveis causas do maior depauperamento das plantas em locais com maior frequência de déficits hídricos, conforme se observa nas regiões Centro e Norte do Estado de São Paulo (Ortolani *et al.*, 1991).

2.4.2 TROCAS GASOSAS E RELAÇÕES HÍDRICAS EM PLANTAS COM CVC SUBMETIDAS À DEFICIÊNCIA HÍDRICA.

Aos 9 e 16 MPI, o potencial da água nas folhas medido às seis horas da manhã (Ψ_6) foi semelhante entre as plantas sadias e doentes irrigadas. Entretanto, o potencial medido à tarde (Ψ_{14}) das plantas com CVC foi menor que nas plantas sadias (fig. 11, 14 e 17). Estes resultados podem ser explicados, de uma maneira simplificada, pela equação abaixo, que demonstra que o potencial da água nas folhas (Ψ_a) é dependente da capacidade de transporte da água no xilema:

$$\Psi_a = \Psi_s - (R_s + R_p) (g_a \times g_s / g_a + g_s) M_w / \mathcal{R} T_a (\text{DPV}_{\text{f-ar}}) \quad (6)$$

onde: Ψ_s é o potencial da água no solo, R_s e R_p são, respectivamente, a resistência hidráulica do solo junto à raiz e das raízes para a copa; g_a e g_s são as condutâncias da camada limite e a dos estômatos; M_w é o peso molecular da água; $\mathcal{R}$ é a constante universal dos gases; T_a é a temperatura do ar e $\text{DPV}_{\text{f-ar}}$ é o déficit de pressão de vapor entre o ar e a folha (Tardieu & Simonneau, 1998).

Durante a noite o potencial da água nas folhas tendeu a se equilibrar com o potencial de água no solo, determinando a semelhança no estado de hidratação entre as plantas sadias e doentes às 6:00 horas. Esta semelhança no estado de hidratação deve ter sido favorecida pela cutícula cerosa e espessa das folhas dos citros, que possui alta resistência à difusão de vapor d'água (Goldschmidt & Koch, 1996). Ainda, os dados sugerem que até os 16 MPI, a CVC não interferiu no processo de absorção de água pelas plantas.

Aos 22 MPI, todos os tratamentos inoculados tiveram Ψ_6 menores que as plantas sadias (fig. 17). A queda em Ψ_6 com o avanço da infecção pode ter várias origens, como a não recuperação durante a noite.

Os potenciais da água menores nas plantas com CVC podem ser devido à desidratação mais rápida das folhas, com relação às plantas sadias, ou devido à maior resistência ao transporte da água no xilema (R_p) das plantas com CVC. A primeira hipótese é improvável, visto que a condutância estomática (g_s) das plantas com CVC é menor, implicando em menor taxa de transpiração (figs. 12, 15 e 18). Por outro lado, a segunda hipótese é provável, visto que se constatou que o fluxo de seiva em laranjeira 'Natal' e 'Pêra' com CVC foi reduzido em até 70% (Oliveira *et al.*, 2000).

A maior resistência hidráulica do sistema vascular já foi medida em outras patologias causadas por *X. fastidiosa*, como em pessegueiros, videiras e ulmeiros (Hopkins, 1981; Kostka

et al., 1986; Evert, 1987; Goodwin *et al.*, 1988). Essa maior resistência no xilema é devido à produção de EPS produzido pela bactéria (Beckman & Halmos, 1962; Beckman *et al.*, 1974; Gardner *et al.*; 1983, Hopkins, 1985; Leite *et al.*, 2000).

Além da obstrução física dos vasos do xilema, pode haver obstruções dos poros nas membranas de ligação entre traqueídeos, perda de função das membranas ou a formação de embolia, que poderiam justificar as quedas fluxo e Ψ_a observadas em plantas com CVC e em outras patologias causadas pela *X. fastidiosa* (Van Alfen & Allard-Turner, 1979; Dryden & Van Alfen, 1983; Van Alfen *et al.*, 1987; Sperry & Tyree, 1988).

A redução de Ψ_{14} no tratamento com CVC foi influenciada pelo tempo de infecção. Aos 9, 16 e 22 MPI, Ψ_{14} do tratamento CVC foi, respectivamente, -1,2, -1,5 e -2,0 MPa, sendo que o Ψ_{14} do tratamento Sadia, permaneceu ao redor de -0,8 MPa. Este declínio em Ψ_{14} das plantas doentes irrigadas sugere que condutividade hidráulica do xilema diminuiu ao longo do tempo da infecção, provavelmente associada ao aumento na colonização dos vasos de xilema.

Aos 16 MPI o tratamento CVC I apresentou Ψ_{14} menor que do tratamento CVC. Resposta semelhante observou-se aos 22 MPI para os tratamentos CVC I e CVC II (figs. 14 e 17), indicando que a deficiência hídrica agravou os problemas relacionados à condutividade hidráulica do sistema vascular em plantas com CVC. Segundo Boyer (1995), a deficiência hídrica causa redução no crescimento do hospedeiro ou pode prejudicar seus mecanismos naturais de defesa contra patógenos. Por outro lado, Boyer (1995) sugere que as condições necessárias para o desenvolvimento dos patógenos no xilema são pouco alteradas sob deficiência hídrica, permitindo maior colonização dos patógenos vasculares sob condições de estresse da plantas. Entretanto, alterações na seiva de xilema são verificadas em plantas sob estresse hídrico como o pH (Hartung *et al.*, 1988). Em tomateiros submetidos à deficiência

hídrica o pH da seiva do xilema aumentou de cinco para oito (Wilkinson *et al.*, 1998). Este aumento de pH no apoplasto está relacionado à diminuição na atividade de H^+ -ATPase em plantas submetidas à desidratação (Hartung & Radin, 1989). Contudo, ainda não foram pesquisadas as modificações na composição da seiva do xilema em função do estresse hídrico, que poderiam favorecer o desenvolvimento de *X. fastidiosa* nos citros.

Aos 9 e 16 MPI a deficiência hídrica causou declínio semelhante em Ψ_a entre as plantas saudas e doentes (figs. 13 e 16). Contudo, aos 22 MPI, o declínio em Ψ_a nas plantas com CVC, ocorreu de forma mais lenta que nas plantas saudas submetidas à deficiência hídrica. Esse declínio mais lento em Ψ_a das plantas doentes foi devido a menor taxa de transpiração das plantas com CVC (fig. 21). Por sua vez, a queda na transpiração deve estar relacionada à oclusão do xilema pela *X. fastidiosa*. Esta menor transpiração das plantas com CVC proporcionou o declínio mais lento da umidade do substrato aos 22 MPI (fig. 20).

Aos 9 MPI, as plantas com CVC tiveram condutância estomática (g_s) menor que as plantas saudas à tarde, nas horas mais quentes do dia, e aos 16 e 22 MPI, em todos os horários medidos. Também g_s nas plantas saudas tendeu a ser menor ao meio dia e à tarde (fig. 12, 15 e 18). Isto pode ocorrer em respostas ao aumento do DPV ao longo do dia (Apêndice 2). A diminuição de g_s com o aumento do DPV é uma característica das plantas cítricas, sendo considerada importante para a sua adaptação em ambientes áridos (Levy & Syversten, 1981; Sinclair & Allen Jr., 1982; Medina & Machado, 1998). Machado *et al.* (1994), também observaram diminuição na abertura dos estômatos no período da tarde em laranjeiras saudas e com CVC.

A redução da abertura dos estômatos também pode estar relacionada com o estado de hidratação e turgescência do mesofilo (Shulze, 1986). De fato, vários autores observaram queda em g_s em função da diminuição de Ψ_a e do conteúdo relativo da água nas folhas de

laranjeiras (Kriedemann & Barrs, 1981; Vu & Yelenoski, 1988; Medina & Machado, 1998). Estes dados são corroborados pelos de Machado *et al.* (1994) e Habermann (1999), que também associaram a diminuição na g_s ao menor Ψ_a nas folhas de laranjeiras com CVC.

A queda de Ψ_a pode influenciar concentração e distribuição do ABA para as células guardas e induzir o fechamento dos estômatos (Shulze, 1986; Goodwin *et al.*, 1988b). Contudo, Gomes (2001) não observou aumento na concentração de ABA em folhas de laranjeiras 'Pêra' com CVC. Entretanto, não há necessidade de nova síntese de ABA para que ocorra declínio na abertura dos estômatos. O estresse hídrico aumenta o pH da seiva diminuindo o seqüestro de ABA no estroma dos cloroplastos, permitindo que ele seja mobilizado pelo apoplasto e atinja as células guardas (Wilkinson & Davies, 1977; Hartung *et al.*, 1988; Hartung & Radin, 1989; Hartung *et al.*, 1990; Tardieu & Simoneau, 1998). Assim, o fechamento dos estômatos seria induzido sem o aumento de concentração total de ABA, que poderia contribuir para a redução da abertura dos estômatos em plantas com CVC.

Alterações na abertura estomática também são dependentes da concentração de íons K. O fluxo de K para as células guardas durante o dia resulta em absorção de água das células adjacentes e aumento correspondente no turgor, causando abertura dos estômatos (Pier & Berkiwitz, 1987). Entretanto, até os 16 MPI não foram observadas alterações nas concentrações dos nutrientes minerais nas folhas (Apêndice 1).

Possivelmente, os efeitos da CVC sobre g_s também ocorreram como consequência da própria obstrução parcial do xilema e a possibilidade da existência de toxinas estarem agindo sobre os estômatos. Contudo, a manutenção do funcionamento dos estômatos diminui a possibilidade da existência que toxinas agindo sobre g_s . Estes resultados são corroborados por Machado *et al.* (1994) que observaram a manutenção dos mecanismos de abertura e fechamento dos estômatos em plantas com CVC. Um aumento de concentração de compostos

fenólicos, que normalmente está associado aos processos infecciosos, também poderia reduzir g_s (Plumbe & Willmer, 1986 a e b). Também, relata-se no capítulo 2 deste trabalho, que não foi observado aumento na concentração de fenóis em folhas com início do desenvolvimento dos sintomas de CVC, embora g_s tenha sido reduzido significativamente.

Os efeitos da infecção de *X. fastidiosa* sobre a fotossíntese em laranja 'Pêra' foram evidentes. Plantas com CVC irrigadas tiveram menor assimilação de CO_2 (A) que as plantas sadias irrigadas, nas horas de maior demanda atmosférica desde os 9 MPI e em todos os horários aos 16 e 22 MPI. (fig. 12, 15 e 18). A redução máxima de A para o tratamento CVC com relação às plantas sadias foi aproximadamente de 35, 50 e 62,5%, aos 9, 16 e 22 MPI, respectivamente. Estas respostas seguiram de forma semelhante àquelas descritas para g_s . Isto pode ser justificado à medida que a diminuição na abertura dos estômatos limita o acesso do carbono atmosférico aos sítios de fixação no mesófilo (Shulze, 1986).

Houve diferenças nas taxas de assimilação e condutância estomática entre os períodos estudados, sendo que aos 22 MPI as medidas realizadas durante o mês de abril de 1999 foram menores que as de 9 MPI (março de 1998) e de 16 MPI (em outubro de 1998). Aos 22 MPI, após o décimo dia de medidas, a fotossíntese foi ainda menor. Esta queda da assimilação pode relacionar-se ao comportamento sazonal da fotossíntese em plantas cítricas, que tende a ser menor no outono e inverno (Machado *et al.*, 2002). A queda da temperatura também pode ter contribuído para a menor fotossíntese e condutância estomática, visto que a temperatura após os 10 dias de início das medidas atingiu valores menores que 20 °C nas primeiras horas da manhã (Apêndice 2). Em geral, a máxima fotossíntese e condutância, observadas sob condições naturais, ocorre com temperaturas entre 25 e 30 °C (Khairi *et al.*, 1976; Medina *et al.*, 1999).

O estresse hídrico agravou os efeitos da CVC por reduzir A e g_s nas plantas que sofreram estresse aos 16 MPI e aos 22 MPI (fig. 15 e 18). Aos 16 MPI, a redução de A do tratamento CVC I com relação ao CVC chegou a 25 e 40%, respectivamente, ao meio dia e à tarde, e de 30 % no período da tarde aos 22 MPI.

A menor taxa de assimilação de CO_2 em plantas com CVC submetidas à deficiência hídrica, é coerente com o aumento da severidade de sintomas nessas plantas e é uma indicação para explicar o maior depauperamento das plantas nas regiões mais sujeiras ao déficit hídrico.

Não houve diferença entre os tratamentos que sofreram um ou dois ou três ciclos de deficiência hídrica, sendo coerente com os resultados observados para os sintomas (fig. 10), favorecendo a hipótese que o estresse hídrico foi mais importante para o desenvolvimento da doença, quando aplicado na fase inicial de desenvolvimento da planta ou do estabelecimento do patógeno.

2.4.3. TROCAS GASOSAS E RELAÇÕES HÍDRICAS DURANTE O DESENVOLVIMENTO DA CVC

Muitos fatores podem estar envolvidos com diminuição da fotossíntese em plantas com CVC, como a queda do potencial da água nas folhas, redução na atividade de carboxilação do mesófilo e a presença de fotoinibição durante as horas mais quentes do dia (Machado *et al.* 1994; Habermann, 1999; Machado *et al.*, 2001).

A diminuição em A em plantas com CVC poderia estar relacionada em parte com a presença de necroses e clorose nas folhas mais velhas, que acarretam diminuição da área fotossintética ativa. Queiroz-Voltan & Paradela Filho (1999) observaram que nas regiões cloróticas de folhas de laranjeiras com CVC, os cloroplastos apresentavam-se quase totalmente destruídos. Porém, neste trabalho, nas folhas onde foram feitas as medidas, as necroses e clorose características de plantas com CVC eram muito raras e não ultrapassaram a

3% do limbo foliar o que não justifica a redução de aproximadamente 40% na taxa de assimilação de CO₂.

Fatores nutricionais poderiam também estar incluídos. Deficiências minerais de N, K e Zn foram encontradas em plantas com CVC (Quaggio, 1988; Vitti *et al.*, 1989). Contudo, neste experimento não houve alterações significativas na concentração de qualquer nutriente que poderiam justificar esta hipótese (Apêndice 1).

As reduções na assimilação de CO₂ nas plantas com CVC irrigadas parecem estar associadas à menor abertura dos estômatos, uma vez que g_s também diminuiu em proporções semelhantes (fig. 22). Contudo, o mecanismo de abertura estomática responde a vários fatores como, à luz, suprimento de água, DPV e quantidade de CO₂ ambiente. Como, durante o dia, as folhas de plantas com CVC possuem menor Ψ_a , o estômato se fecha, restringindo a perda d'água, mas ao mesmo tempo, diminuindo a difusão de CO₂ no mesofilo. Com isso, se o metabolismo fotossintético tem continuidade, a pressão parcial de CO₂ nos espaços intercelulares (C_i) diminuirá a níveis limitantes ao processo fotossintético. Por outro lado, se as atividades metabólicas também diminuirão com a queda de Ψ_a nas folhas, o consumo de CO₂ na câmara subestomática também poderá diminuir e a depleção em C_i pode não ocorrer (Zeiger, 1988; Chaves, 1995; Kramer & Boyer, 1995). Portanto, o efeito do fechamento estomático sobre C_i nos espaços intercelulares em plantas sob deficiência hídrica, depende da resposta do metabolismo fotossintético. Logo, não se pode concluir que o fechamento estomático determina as perdas em A , sem antes conhecer a resposta do metabolismo fotossintético, ou mais particularmente, a pressão parcial de CO₂ dentro da folha (Farquhar & Sharkey, 1982; Kramer & Boyer, 1995).

A razão entre a concentração foliar interna e externa de CO₂ (C_i/C_a) pode indicar se houve alterações na assimilação de carbono através do comprometimento da atividade

fotossintética (Prior *et al.*, 1997; Laisk & Ojja, 1998). Estas perdas podem estar relacionadas ao menor Ψ_a nas folhas doentes ou por toxinas produzidas pela bactéria. Embora tenha ocorrido queda em A e g_s aos 9 e 16 MPI nas plantas com CVC, neste período a razão C_i/C_a foi semelhante entre os tratamentos, tanto de manhã quanto à tarde (fig. 22). Aos 22 MPI houve aumento na em C_i/C_a ($P < 0,05$). Desta forma, apesar da menor abertura dos estômatos nas plantas doentes e a diminuição do acesso do CO_2 ao mesofilo, houve aumento de C_i nas plantas doentes, revelando comprometimento do metabolismo fotossintético nas folhas com CVC.

A eficiência no uso da água (EUA) foi semelhante aos 9 e 16 MPI (fig. 22) para plantas sadias e doentes, havendo uma redução no período da tarde para ambos. Isto ocorreu devido à maior redução da fotossíntese à tarde, do que com a transpiração (dados não apresentados), que pode ser justificado pelo aumento da demanda hídrica na atmosfera nas horas mais quentes do dia (Apêndice 2). Estas respostas também foram obtidas com laranjeiras 'Valência' por Machado *et al.* (2002). Esta semelhança nas respostas de EUA entre plantas sadias e doentes até os 16 MPI, também é uma indicação que o metabolismo fotossintético de plantas com CVC não foi alterado e que a redução de A nas plantas com CVC está relacionada à menor abertura dos estômatos.

Aos 22 MPI, EUA foi menor nas plantas com CVC tanto de manhã quanto à tarde, devido uma queda relativamente maior em A do que na transpiração. Isto pode estar relacionado à menor eficiência de carboxilação no mesofilo de folhas de plantas com CVC, conforme observado por Habermann (1999). Assim a maior razão C_i/C_a , aliada a queda na atividade de carboxilação indicam que ocorreram quedas no metabolismo fotossintético.

A relação que existe entre g_s e A poderia indicar se houve alterações no metabolismo fotossintético nas plantas doentes (fig. 23). Contudo, as respostas de plantas sadias e doentes

submetidas ou não ao estresse, foram semelhantes tanto aos 16 quanto aos 22 MPI. Assim, a menor abertura dos estômatos e a queda de Ψ_a nas plantas com CVC poderiam explicar a perda de eficiência fotossintética.

A queda na assimilação de CO_2 foi observada em citros quando houve redução do potencial da água nas folhas para valores menores que $-1,5 \text{ MPa}$ (Medina & Machado, 1998). Este limite é superior a Ψ_{14} encontrados em plantas com CVC aos 22 MPI ($-2,0 \text{ MPa}$) (fig. 17). Por outro lado, quando aos 9 e 16 MPI, Ψ_{14} esteve acima ou próximo de $-1,5 \text{ MPa}$, respectivamente, e o aumento de C_i/C_a ou a redução em EUA não foram observados. Esta redução na taxa fotossintética sob baixos potenciais da água nas folhas, foi associada por Vu & Yelenosky (1988) a uma redução na atividade da enzima Rubisco. Muitos fatores estão envolvidos durante a perda do potencial da água nas folhas que levam a uma diminuição do metabolismo fotossintético, como a mudança na turgescência foliar e alterações hormonais (Shulze, 1986; Hartung *et al.*, 1998).

As respostas de A em função de Ψ_6 no período da manhã, sugerem que as plantas com CVC apresentam menor assimilação de CO_2 , sobretudo em potenciais mais altos. Entretanto, quando se relacionou A medido à tarde em função de Ψ_{14} , não houve diferença entre plantas sadias e doentes (fig. 24). Uma hipótese para explicar esta discrepância nos resultados pode ser que Ψ_6 não tenha correspondência com o real estado de hidratação das plantas doentes, no horário que as medidas de assimilação foram tomadas (fig. 24 A e B). Foi visível a perda de turgescência foliar nas primeiras horas da manhã, observada através do enrolamento das folhas e diminuição do ângulo de inserção foliar. Corroborando com esta hipótese, Machado *et al.* (1994) verificaram que plantas com CVC possuem Ψ_a menor que as plantas sadias às 8 horas da manhã. Assim a relação entre A medido às 9:00 horas e Ψ_6 não poderia ser estabelecida para plantas com CVC.

As respostas semelhantes de A medido à tarde em função de Ψ_{14} entre plantas saudas e com CVC mostram que a menor taxa de assimilação de CO_2 das plantas com CVC corresponde ao estado de hidratação de seus tecidos (Fig 24 C e D). Entretanto, poucos foram as medidas de A obtidas com valores de Ψ_{14} acima de $-2,0$ MPa, dificultando a interpretação destes dados. Portanto, não se pode concluir que os efeitos da *X. fastidiosa* sobre a taxa de assimilação de CO_2 de folhas de laranjeiras, estão exclusivamente relacionados com ao menor Ψ_a e a diminuição da abertura dos estômatos, antes de isolar o efeito relacionado ao potencial da água de suas folhas.

Associando estes resultados com os obtidos dos tratamentos submetidos aos ciclos de deficiência hídrica, CVC I e CVC II, que tiveram uma redução em A e g_s , com relação ao tratamento CVC irrigado, se há correspondência dessas medidas com Ψ_a , pode-se sugerir que as perdas causadas pela deficiência hídrica nas plantas CVC I e CVC II foram resultantes de um menor Ψ_a de suas folhas. Estes menores potenciais da água dos tratamentos CVC I e CVC II podem estar relacionados ao favorecimento de uma maior colonização do xilema em plantas submetidas à deficiência hídrica, conforme sugerido por Boyer (1995). Os resultados do capítulo 2 deste trabalho indicam que a deficiência hídrica pode alterar os mecanismos de defesa aos patógeno e facilitar a sua colonização.

2.4.4. RESPOSTAS DA FOTOSÍNTESE EM FUNÇÃO DO DPV_{f-ar}

Aos 16 MPI, pelas equações obtidas das regressões lineares de A em função do déficit de pressão de vapor entre a folha e o ar (DPV_{f-ar}), sob $-3,9$ kPa, as plantas saudas apresentaram A igual a $7,68 \mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$ enquanto as plantas com CVC, $4,52 \mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$, ou seja, 41% menor. Aos 22 MPI ao mesmo DPV_{f-ar} , A para as plantas doentes foi 53% maior (fig. 25). Essa

superioridade para as plantas sadias também ocorreu em proporções semelhantes para g_s em função do DPV_{f-ar} (fig. 26).

Aos 22 MPI, observou-se coeficientes angulares das respostas ao DPV_{f-ar} menores quando comparados aos do início da infecção, tanto para o tratamento Sadio como CVC (figs. 25 e 26). Estes dados sugerem que, embora menores, há continuidade de resposta dos estômatos de plantas com CVC ao DPV_{f-ar} , mesmo em estágio mais avançado da infecção. Na fig. 27, observou-se sob condições controladas, que a amplitude da resposta de A em função do DPV está em função do grau de severidade dos sintomas. Sob baixo DPV, houve diminuição gradativa da assimilação, proporcional à severidade dos sintomas. Entretanto, quando foram submetidas ao déficit de 2, 3 kPa, folhas que tinham mais de 3% do limbo foliar com lesões de CVC reduziram A para próximo de zero. Estes resultados podem explicar a ausência de resposta da abertura dos estômatos em função do aumento de DPV, encontrado por Habermann (1999) em laranjeiras 'Pêra', com aproximadamente 22 meses de inoculação de *X. fastidiosa*.

A pequena taxa de assimilação de CO_2 em plantas com CVC e as perdas impostas por DPV_{f-ar} podem tornar estas plantas pouco tolerantes á ambientes de maior demanda atmosférica. Isso, aliado aos prejuízos causados pelo déficit hídrico, justifica a maior severidade da doença em regiões de maior demanda atmosférica e sujeitas à deficiência hídrica, como o centro-norte do Estado de São Paulo.

CONCLUSÕES

O desenvolvimento da CVC em laranjeiras 'Pera' causou reduções no potencial da água nas folhas (Ψ_a), na taxa assimilação de CO_2 (A), na condutância estomática (g_s) e na taxa de transpiração (E). A semelhança nas respostas de A em função de g_s e de A em função do Ψ_a , entre plantas sadias e doentes ao longo do tempo de infecção, indicam que a menor taxa de assimilação de CO_2 em plantas com CVC está relacionada ao menor potencial da água de suas folhas, causado pela menor condutividade hidráulica no xilema e relacionado à colonização das bactérias.

A diminuição de Ψ_a , A , g_s e a maior severidade dos sintomas em plantas com CVC com deficiência hídrica na fase inicial de desenvolvimento da doença, indicam que a deficiência hídrica é um dos fatores que favorecem o desenvolvimento da CVC em laranjeiras 'Pêra'.

A evolução dos sintomas e a diminuição gradativa de Ψ , A , g_s em folhas de plantas com CVC irrigadas, indicam que a irrigação não é uma prática eficaz para conter o avanço da doença ou para atenuar seus efeitos.

A baixa taxa de assimilação de CO_2 em laranjeiras 'Pêra' com CVC e a redução desta taxa em função do aumento do DPV_{far} , podem tornar estas plantas menos adaptáveis em ambientes de maior demanda atmosférica. Isso, aliado aos prejuízos causados pelo déficit hídrico, podem justificar a maior severidade da doença em regiões de maior DPV e sujeitas à deficiência hídrica, como o centro-norte do Estado de São Paulo.

2.6. APÊNDICE

1) Apêndice 1

Tabela 1. Teores de nutrientes em folhas de laranjeira 'Pêra' enxertadas sobre limoeiro 'Cravo' Sadias (S) e com CVC e submetidas à deficiência hídrica (DH). Cordeirópolis Março de 1998

Nutriente	N	K	P	Ca	Mg	B	Cu	Fe	Mn	Zn
	g/kg	g/kg	g/kg	g/kg	g/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
TRAT	g/kg	g/kg	g/kg	g/kg	g/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
S	33	12,9	1,8	33	2,6	59,8	5,1	130,9	34,8	16,7
S	32,9	12,9	2,1	32,8	2,3	72,7	4,7	130,5	41,9	17,2
S	33,3	15,1	2,2	32,5	2,3	76,9	4,1	131,4	40,7	17
S	32,3	12,9	2,3	29,4	2,4	54,9	4,3	113,2	35,4	18
S	31,1	15,1	2,2	33	2,4	70,5	5,3	122,1	41,2	21,1
média	32,52	13,78	2,12	32,14	2,4	66,96	4,7	125,62	38,8	18
desvio	0,87	1,20	0,19	1,55	0,12	9,23	0,51	7,93	3,41	1,80
S-DH	30	11,9	1,7	33,1	2,6	80,7	4,4	162,8	44	14,9
S-DH	32,8	12,4	1,7	33,1	2,5	83,5	4,6	174	41,2	14,4
S-DH	28,7	13,5	1,8	33,1	2,3	87,2	3,6	143,1	44,6	19,1
S-DH	30,7	15,7	2	33,1	2,4	83,4	5,8	144	37,8	15,1
S-DH	26,9	12,9	1,6	33,1	2,4	86,1	3,7	133,6	39,8	14,8
média	29,82	13,28	1,76	33,1	2,44	84,18	4,42	151,5	41,48	15,66
desvio	2,21	1,48	0,15	0,00	0,11	2,55	0,88	16,44	2,85	1,94
CVC	26,5	12,4	1,7	33,1	2,7	80,7	5,9	154,3	38,8	17,1
CVC	31,8	14,6	1,7	32,8	2,5	67,7	4,5	122,6	34,5	15
CVC	32,2	12,4	1,7	33,1	2,5	84,8	4,2	161,1	47,9	16
CVC	30,1	14	1,9	32,3	2,4	75,8	4,6	171,2	38,3	15,2
CVC	30,8	14	1,7	32	2,3	74	4,2	131,3	35,3	15,9
média	30,28	13,48	1,74	32,66	2,48	76,6	4,68	148,1	38,96	15,84
desvio	2,27	1,02	0,09	0,49	0,15	6,53	0,70	20,45	5,33	0,83
CVC-DH	33,9	12,9	2,1	30,9	2,4	74,4	4,8	145,2	34,9	19,6
CVC-DH	33,1	12,4	1,7	33,1	2,4	69	4,2	163,1	41,2	17,1
CVC-DH	33,9	14	1,8	33,1	2,6	71,3	4,7	144,2	40,5	17,6
CVC-DH	31,6	14,6	1,9	33,1	2,7	69,3	6,3	141,2	41,1	19,1
CVC-DH	29,9	14,6	1,6	33,1	2,4	73,9	5,1	152,5	45,1	18,2
média	32,48	13,7	1,82	32,66	2,5	71,58	5,02	149,24	40,56	18,32
desvio	1,72	1,00	0,19	0,98	0,14	2,51	0,79	8,79	3,65	1,03

Tabela 2: Teores de nutrientes em folhas de laranjeira 'Pêra' enxertadas sobre limoeiro 'Cravo', sadias (S) e com CVC e submetidas à deficiência hídrica (DH).
Cordeirópolis outubro de 1998

Nutriente	N	K	P	Ca	Mg	B	Cu	Fe	Mn	Zn
TRAT	g/kg	g/kg	g/kg	g/kg	g/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
S	30,9	14	2,1	29,9	2,4	75,4	9,3	261,4	26,4	20
S	33,4	16	2,1	28,5	2,2	71,8	5,6	255,9	31	19,2
S	30,1	17,1	1,8	30,1	2,5	74,5	5,7	317,2	31,6	19,2
S	31,2	17,6	2	26,6	2,3	69,2	4,9	273,5	26,7	16,6
S	31,4	14,5	2,2	29,4	2,1	72,4	4,6	255,4	26,5	15,9
média	31,4	15,84	2,04	28,9	2,3	72,66	6,02	272,68	28,44	18,18
desvio	0,8	1,272	0,112	1,08	0,12	1,832	1,312	18,136	2,288	1,544
CVC	34,9	14	2,3	26,7	2	79,4	8,2	255,9	25,6	16,9
CVC	39	15,5	2,1	22,9	2,1	54,9	6,4	249,2	24,2	14,3
CVC	29,3	14	2,1	27	2,2	65,7	4,9	228,4	28,3	17,9
CVC	29,8	14,5	2,1	27,4	2,1	68,9	6,6	212,5	23,1	17
CVC	29,9	11,9	2,2	32,1	2,4	70,3	7,3	275,4	30	16,5
média	32,58	13,98	2,16	27,22	2,16	67,84	6,68	244,28	26,24	16,52
desvio	3,496	0,832	0,072	2,024	0,112	6,032	0,856	19,064	2,328	0,896
S-DH	32,9	17,1	2,3	28,6	2,1	70,7	13,6	297,6	30,8	27,2
S-DH	34	15	2,2	27,7	2	68,3	5,3	272,2	26,4	18,3
S-DH	32,4	13,5	2,3	27,5	2,2	89,1	6,1	325,1	29,7	18,3
S-DH	30,8	16	2	32,8	1,9	59,3	8,9	255,6	52,5	31,9
S-DH	27,4	16,6	2,1	26,5	2,3	66,1	5,2	275,5	23,4	16,3
média	31,5	15,64	2,18	28,62	2,1	70,7	7,82	285,2	32,56	22,4
desvio	1,92	1,112	0,104	1,672	0,12	7,36	2,744	20,92	7,976	5,72
CVC-DH	31,4	12,9	2,5	25	2,1	74,4	6,1	255,5	23,5	16,9
CVC-DH	32,2	12,4	2,6	25,8	2,4	69	5,6	271,1	22,2	14,4
CVC-DH	31,4	14	2,4	29,8	2,2	71,3	10,9	285,1	33,8	15,2
CVC-DH	31,5	14,6	2,4	29,5	2,2	69,3	11,5	255,8	30,4	18
CVC-DH	32,9	14,6	2,6	25,1	1,9	73,9	5,4	298	25,9	13,2
média	31,88	13,7	2,5	27,04	2,16	71,58	7,9	273,1	27,16	15,54
desvio	0,536	0,84	0,08	2,088	0,128	2,056	2,64	14,76	3,952	1,528

1) **APÊNDICE 2. VARIAÇÕES DE PARÂMETROS CLIMÁTICOS AO LONGO DOS EXPERIMENTOS**

Data	Dia da medida	HORA	RH	T _a	DPV
1998			%	°C	kPa
"17.03"	1	700	88,9	17,94	0,22486
"17.03"	1	740	83,9	19,31	0,35534
"17.03"	1	820	83,4	19,79	0,37746
"17.03"	1	900	78,4	21,29	0,53874
"17.03"	1	940	77,2	22,07	0,59642
"17.03"	1	1020	73,5	23,82	0,77064
"17.03"	1	1050	68,59	25,55	1,01282
"17.03"	1	1130	70,1	26,01	0,99075
"17.03"	1	1210	67,98	26,08	1,06539
"17.03"	1	1250	63,53	27,75	1,33844
"17.03"	1	1330	68,16	26,28	1,07199
"17.03"	1	1410	67,51	26,85	1,13119
"17.03"	1	1450	66,79	26,69	1,14544
"17.03"	1	1530	69,98	25,65	0,97375
"17.03"	1	1610	68,23	26,32	1,07216
"17.03"	1	1650	70,8	25,42	0,93432
"20.03"	4	720	95	22,12	0,13119
"20.03"	4	800	91,1	23,63	0,25588
"20.03"	4	840	88,8	24,69	0,34313
"20.03"	4	920	79,3	25,99	0,68509
"20.03"	4	1000	76,6	27,33	0,83796
"20.03"	4	1040	68,55	29,5	1,2774
"20.03"	4	1120	69,09	29,07	1,22472
"20.03"	4	1200	68,09	29,27	1,27902
"20.03"	4	1230	68,22	28,22	1,19868
"20.03"	4	1310	63,72	29,08	1,43832
"20.03"	4	1350	57,82	31,15	1,88284

Data	Dia da medida	HORA	RH	T _a	DPV
1998			%	°C	kPa
"20.03"	4	1430	57,41	31,32	1,9196
"20.03"	4	1510	55,87	31,58	2,01856
"20.03"	4	1550	56,42	31,11	1,94091
"20.03"	4	1630	57,82	30,63	1,82787
"23.03"	7	720	99,3	20,61	0,01674
"23.03"	7	800	97,6	21,29	0,05986
"23.03"	7	840	91,8	22,7	0,22287
"23.03"	7	920	85,8	23,49	0,40483
"23.03"	7	1000	80,2	24,81	0,61096
"23.03"	7	1040	77,5	25,89	0,74028
"23.03"	7	1120	74,7	25,9	0,83289
"23.03"	7	1200	71,4	27,24	1,01879
"23.03"	7	1240	70,8	27,99	1,08673
"23.03"	7	1320	68,95	27,61	1,13026
"23.03"	7	1400	65,43	29,32	1,38964
"23.03"	7	1440	61,66	29,95	1,59805
"23.03"	7	1520	58,75	30,63	1,78757
"23.03"	7	1600	65,1	29,01	1,37803
"23.03"	7	1640	62,63	29,73	1,53807
"26.03"	10	720	95,4	19,31	0,10153
"26.03"	10	800	91,4	20,45	0,2037
"26.03"	10	840	85,3	21,2	0,36462
"26.03"	10	920	82	22,25	0,47605
"26.03"	10	1000	76,8	23,35	0,65585
"26.03"	10	1040	70,9	23,83	0,84676
"26.03"	10	1120	69,82	25,16	0,95087
"26.03"	10	1200	60,35	25,79	1,29683
"26.03"	10	1240	59,21	25,81	1,3357

Data	Dia da medida	HORA	RH	T _a	DPV
1998			%	°C	kPa
"26.03"	10	1320	56,66	27,65	1,58131
"26.03"	10	1400	48,03	28,18	1,95565
"26.03"	10	1440	50,73	28,01	1,8358
"26.03"	10	1520	50,65	28,36	1,87659
"26.03"	10	1600	50,43	27,6	1,80335
"26.03"	10	1640	47,65	27,63	1,90783
"27.03"	11	730	99,7	18,02	0,00611
"27.03"	11	810	93,9	19,67	0,13768
"27.03"	11	850	86	21,84	0,36112
"27.03"	11	930	78,2	23,63	0,62676
"27.03"	11	1010	74,4	25,28	0,81235
"27.03"	11	1050	67,43	27,06	1,14804
"27.03"	11	1130	68,51	27,7	1,15231
"27.03"	11	1210	66,05	28,88	1,33048
"27.03"	11	1250	66,81	28,09	1,24243
"27.03"	11	1330	67,39	28,74	1,26766
"27.03"	11	1410	65,27	28,3	1,31605
"27.03"	11	1450	62,49	29,29	1,50522
"27.03"	11	1530	67,75	28,32	1,2235
"27.03"	11	1610	67,32	29,77	1,34813
"27.03"	11	1650	69,11	28,28	1,16918
"03.04"	18	620	97,2	15,55	0,04874
"03.04"	18	700	97,2	15,98	0,05009
"03.04"	18	740	87,6	17,46	0,24371
"03.04"	18	820	83,4	17,84	0,33417
"03.04"	18	900	79,6	19	0,44163
"03.04"	18	940	79,1	19,58	0,46909
"03.04"	18	1020	74,2	20,78	0,62365
"03.04"	18	1100	72,2	21,63	0,70795

Data	Dia da medida	HORA	RH	T _a	DPV
1998			%	°C	kPa
"03.04"	18	1140	71	22,2	0,76464
"03.04"	18	1220	68,77	23,34	0,88232
"03.04"	18	1300	66,12	23,13	0,94513
"03.04"	18	1340	64,55	23,33	1,00094
"03.04"	18	1420	62,62	23,74	1,08182
"03.04"	18	1500	62,92	22,26	0,98125
"03.04"	18	1540	60,19	23,05	1,1052
"03.04"	18	1620	64,24	21,9	0,9258
"03.04"	18	1700	64,13	21,7	0,91738
"10.04"	25	710	100	20,42	0
"10.04"	25	750	100	21,29	0
"10.04"	25	830	95,2	22,36	0,1278
"10.04"	25	910	89,5	23,9	0,30682
"10.04"	25	950	85	25	0,46812
"10.04"	25	1030	82,6	25,12	0,54691
"10.04"	25	1110	75,8	26,57	0,8288
"10.04"	25	1150	74,5	27,85	0,94132
"10.04"	25	1230	70,4	27,6	1,07685
"10.04"	25	1310	61,55	29,1	1,52611
"10.04"	25	1350	71,8	27,65	1,02891
"10.04"	25	1430	65,5	29,43	1,39564
"10.04"	25	1510	67,24	28,15	1,23062
"10.04"	25	1550	69,4	27,64	1,11583
"10.04"	25	1630	65,22	28,56	1,33798
"10.04"	25	1710	68,15	27,36	1,14256

Data	Dia da medida	HORA	RH	T _a	DPV
1998			%	°C	kPa
"15.10"	1	700	93,3	18,02	0,13641
"15.10"	1	740	76,4	20,85	0,57293
"15.10"	1	820	76,9	21,6	0,58718
"15.10"	1	900	73,5	23,21	0,74283
"15.10"	1	940	74,1	23,88	0,75591
"15.10"	1	1020	65,5	26,15	1,15267
"15.10"	1	1100	63,54	25,86	1,19745
"15.10"	1	1140	59,35	27,94	1,50846
"15.10"	1	1220	52,42	29,12	1,89067
"15.10"	1	1300	53,77	29,57	1,88530
"15.10"	1	1340	50,41	29,85	2,05513
"15.10"	1	1420	51,06	29,6	1,99926
"15.10"	1	1500	51,84	28,77	1,87539
"15.10"	1	1540	52,76	29,98	1,97240
"15.10"	1	1620	57,98	27,72	1,53943
"15.10"	1	1700	57,67	27,42	1,52385
"20.10"	5	720	89,7	17,3	0,20040
"20.10"	5	800	84,5	18,71	0,32953
"20.10"	5	840	76,9	20	0,53214
"20.10"	5	920	71,6	21,53	0,71882
"20.10"	5	1000	64,31	23,16	0,99743
"20.10"	5	1040	63,6	24,21	1,08360
"20.10"	5	1120	59,06	25,42	1,30997
"20.10"	5	1200	55,54	26,98	1,55980
"20.10"	5	1240	55,12	27,18	1,59311
"20.10"	5	1320	55,41	26,86	1,55338
"20.10"	5	1400	54,89	26,99	1,58354

Data	Dia da medida	HORA	RH	T _a	DPV
1998			%	°C	kPa
"20.10"	5	1440	55,83	26,41	1,49855
"20.10"	5	1520	56,74	27,2	1,53740
"20.10"	5	1600	52,74	27,6	1,71931
"20.10"	5	1640	53,55	26,74	1,60681
"23.10"	8	710	77,3	21,05	0,55790
"23.10"	8	750	72,2	22,48	0,74558
"23.10"	8	830	70,1	23,53	0,85447
"23.10"	8	910	67,13	24,53	0,99744
"23.10"	8	950	64,86	25,2	1,10978
"23.10"	8	1030	62,67	26,06	1,24061
"23.10"	8	1110	60,74	26,95	1,37495
"23.10"	8	1150	57,01	27,41	1,54670
"23.10"	8	1230	53	29,04	1,85902
"23.10"	8	1310	48,38	29,05	2,04293
"23.10"	8	1350	52,35	28,71	1,84909
"23.10"	8	1430	49,23	29,39	2,04910
"23.10"	8	1510	50,58	27,94	1,83390
"23.10"	8	1550	50,03	28,49	1,91455
"23.10"	8	1630	47,36	28,83	2,05697
"05.11"	21	600	100	15,26	0,00000
"05.11"	21	640	100	19,35	0,00000
"05.11"	21	720	89,9	21,03	0,24792
"05.11"	21	800	75,3	23,18	0,69112
"05.11"	21	840	69,14	25,19	0,97403
"05.11"	21	920	60,69	26,25	1,32114
"05.11"	21	1000	54,53	27,01	1,59805
"05.11"	21	1040	54,31	27,65	1,66706
"05.11"	21	1120	46,03	28,95	2,12363

Data	Dia da medida	HORA	RH	T _a	DPV
1998			%	°C	kPa
"05.11"	21	1200	41,63	29,54	2,37627
"05.11"	21	1240	36,34	30,19	2,69017
"05.11"	21	1320	41,41	29,73	2,41143
"05.11"	21	1400	43,9	29,25	2,24602
"05.11"	21	1440	43,64	29,24	2,25512
"05.11"	21	1520	44,93	28,13	2,06629
"05.11"	21	1600	45,34	28,83	2,13591
"05.11"	21	1640	41,93	29,29	2,33026
"15.11"	31	710	89,2	18,65	0,22875
"15.11"	31	750	81,3	21,13	0,46185
"15.11"	31	830	78,4	22,2	0,56952
"15.11"	31	910	68,54	23,75	0,91104
"15.11"	31	950	64,46	25,53	1,14463
"15.11"	31	1030	60,88	25,97	1,29320
"15.11"	31	1110	62,49	25,69	1,21959
"15.11"	31	1150	53,88	28,3	1,74766
"15.11"	31	1230	53,69	27,32	1,65740
"15.11"	31	1310	54,07	28,18	1,72837
"15.11"	31	1350	54,25	27,68	1,67217
"15.11"	31	1430	49,66	28,81	1,96482
"15.11"	31	1510	46,36	28,76	2,08758
"15.11"	31	1550	45,93	29,33	2,17475
"15.11"	31	1630	49,94	27,51	1,81163
"15.11"	31	1710	48,54	27,29	1,83848

Data	Dia da medida	HORA	RH	T _a	DPV
1999			%	°C	kPa
"01.04"	1	700	100	18,63	0,00
"01.04"	1	740	95,2	21,46	0,12
"01.04"	1	820	87,4	23,06	0,35
"01.04"	1	900	79,5	25,06	0,64
"01.04"	1	940	75	25,61	0,81
"01.04"	1	1020	74,5	26,73	0,88
"01.04"	1	1100	69,72	28,01	1,13
"01.04"	1	1140	67,98	28,11	1,20
"01.04"	1	1220	62,75	29,53	1,52
"01.04"	1	1300	60,38	29,92	1,65
"01.04"	1	1340	59,9	30,13	1,69
"01.04"	1	1420	55,82	31,53	2,02
"01.04"	1	1500	55,34	32,06	2,10
"01.04"	1	1540	62,16	30,39	1,62
"01.04"	1	1620	61,98	29,49	1,54
"03.04"	3	720	91,5	21,19	0,21
"03.04"	3	800	75,9	23,96	0,71
"03.04"	3	840	66,45	26,89	1,17
"03.04"	3	920	65,52	28,27	1,30
"03.04"	3	1000	61,77	29,38	1,54
"03.04"	3	1040	60,84	29,9	1,63
"03.04"	3	1120	55,98	30,95	1,94
"03.04"	3	1200	56,37	31,33	1,97
"03.04"	3	1240	54,62	30,48	1,95
"03.04"	3	1320	56,64	32,21	2,06
"03.04"	3	1400	55,47	31,71	2,05
"03.04"	3	1440	46,5	33,05	2,66

Data	Dia da medida	HORA	RH	T _a	DPV
1999			%	°C	kPa
"03.04"	3	1520	50,1	33,06	2,48
"03.04"	3	1600	68,88	27,78	1,14
"03.04"	3	1640	86,8	22,04	0,34
"05.04"	5	730	100	19,3	0,00
"05.04"	5	810	89,8	21,94	0,26
"05.04"	5	850	80,3	24,22	0,59
"05.04"	5	930	74,2	26,06	0,86
"05.04"	5	1010	70,9	26,95	1,02
"05.04"	5	1050	67,57	27,43	1,17
"05.04"	5	1130	65,77	28,4	1,30
"05.04"	5	1210	62,28	30,37	1,61
"05.04"	5	1250	58,68	29,82	1,71
"05.04"	5	1330	58,32	29,23	1,67
"05.04"	5	1410	54,87	31,32	2,03
"05.04"	5	1450	50,81	32,45	2,36
"05.04"	5	1530	49,82	32,61	2,43
"05.04"	5	1610	47,98	32,33	2,48
"05.04"	5	1650	54,38	30,11	1,92
"06.04"	5	700	100	17,48	0,00
"06.04"	6	730	100	19,75	0,00
"06.04"	6	810	100	22,83	0,00
"06.04"	6	850	83	24,9	0,53
"06.04"	6	920	78,6	25,92	0,71
"06.04"	6	1000	72,4	27,1	0,98
"06.04"	6	1040	70,4	28,57	1,14
"06.04"	6	1120	67,33	28,39	1,24
"06.04"	6	1200	63,28	30,08	1,54
"06.04"	6	1240	59,2	31,35	1,84

Data	Dia da medida	HORA	RH	T _a	DPV
			%	°C	kPa
"06.04"	6	1320	60,3	30,35	1,69
"06.04"	6	1400	55,07	31,49	2,04
"06.04"	6	1440	58,22	30,72	1,82
"06.04"	6	1520	59,5	30,46	1,74
"06.04"	6	1600	64,43	29	1,40
"06.04"	6	1640	61,71	28,81	1,49
"10.04"	10	610	98,9	14,54	0,02
"10.04"	10	650	99,4	14,78	0,01
"10.04"	10	730	92,2	17,39	0,15
"10.04"	10	810	84,5	19,61	0,35
"10.04"	10	850	79,5	20,52	0,49
"10.04"	10	930	75,5	21,61	0,62
"10.04"	10	1010	73,7	22,9	0,72
"10.04"	10	1050	67,05	23,92	0,96
"10.04"	10	1130	63,55	25,29	1,16
"10.04"	10	1210	63,64	25,72	1,18
"10.04"	10	1250	63,04	26,13	1,23
"10.04"	10	1330	58,87	26,79	1,43
"10.04"	10	1410	58,17	27,53	1,52
"10.04"	10	1450	58,24	26,88	1,46
"10.04"	10	1530	62,76	25,98	1,23
"10.04"	10	1610	63,58	25,22	1,15
"10.04"	10	1650	63,8	24,93	1,13
"14.04"	14	700	100	17,96	0,00
"14.04"	14	740	98,3	19,34	0,04
"14.04"	14	820	97,9	19,73	0,05
"14.04"	14	900	88,7	22,81	0,31
"14.04"	14	940	78,2	24,79	0,67

Data	Dia da medida	HORA	RH	T _a	DPV
1999			%	°C	kPa
"14.04"	14	1020	69,67	25,94	1,00
"14.04"	14	1100	65,27	28,01	1,29
"14.04"	14	1140	63,08	28,67	1,43
"14.04"	14	1220	63,7	27,64	1,32
"14.04"	14	1300	62,73	27,93	1,38
"14.04"	14	1340	56,5	29,58	1,77
"14.04"	14	1420	56,7	29,53	1,76
"14.04"	14	1500	56,78	30,49	1,86
"14.04"	14	1540	58,63	28,73	1,61
"14.04"	14	1620	55,74	29,59	1,81
"14.04"	14	1700	58,96	29,49	1,67
"20.04"	20	710	100	8,77	0,00
"20.04"	20	750	88,7	13,41	0,17
"20.04"	20	830	73,7	17,42	0,52
"20.04"	20	910	61,38	20,13	0,90
"20.04"	20	950	53,76	22,38	1,23
"20.04"	20	1030	49,63	24,36	1,51
"20.04"	20	1110	42,61	25,44	1,84
"20.04"	20	1150	44,81	26,78	1,91
"20.04"	20	1230	43,15	28,01	2,12
"20.04"	20	1310	42,15	28,58	2,23
"20.04"	20	1350	41	29,82	2,44
"20.04"	20	1430	38,17	29,39	2,50
"20.04"	20	1510	50,1	27,57	1,81
"20.04"	20	1550	48,43	26,59	1,77
"20.04"	20	1630	52,16	26	1,58
"27.04"	27	720	100	12,69	0,00
"27.04"	27	800	96,4	15,51	0,06

Data	Dia da medida	HORA	RH	T _a	DPV
1999			%	°C	kPa
"27.04"	27	840	92,2	17,23	0,15
"27.04"	27	920	85,8	18,48	0,30
"27.04"	27	1000	75	21,03	0,61
"27.04"	27	1040	68,02	22,01	0,83
"27.04"	27	1120	62,96	23,58	1,06
"27.04"	27	1200	59,39	24,11	1,20
"27.04"	27	1240	55,18	25,11	1,41
"27.04"	27	1320	51,14	26,32	1,65
"27.04"	27	1400	48,07	27,16	1,84
"27.04"	27	1440	46,03	26,41	1,83
"27.04"	27	1520	46,99	27,36	1,90
"27.04"	27	1600	51,53	25,78	1,58
"27.04"	27	1640	56,15	24,71	1,35

3. CAPÍTULO II

ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS EM LARANJA ‘PÊRA’ INFECTADA COM *Xylella. fastidiosa*

3.1. INTRODUÇÃO

3.1.1. MECANISMOS DE DEFESA DE PLANTAS A PATÓGENOS

Durante o longo tempo de convívio com herbívoros, as plantas desenvolveram muitos mecanismos de sobrevivência. Estes mecanismos são de natureza morfológica anatômica, fisiológica ou bioquímica, estando presentes em diferentes intensidades entre as espécies e, muitas vezes, agindo em conjunto (Bell, 1981; Friend, 1981; Mansfield, 1983; Beart *et al.*, 1985; Hoagland, 1990; Nicholson & Hammerschmidt, 1992).

As plantas produzem várias substâncias para inibir o desenvolvimento de patógenos. Tais substâncias podem estar presentes antes (pré-formadas) ou após a colonização pelo patógeno (pós-formadas). Entre as pré-formadas ocorrem fenóis, alcalóides, lactonas insaturadas, glicosídeos fenólicos e cianogênicos e inibidores protéicos (Pascholati & Leite, 1994). Entre as substâncias pós-formadas, destacam-se as fitoalexinas, que na grande maioria são compostos fenólicos de baixo peso molecular (Goodmann *et al.*, 1986; Pascholati & Leite, 1994), derivadas dos aminoácidos aromáticos fenilalanina e tirosina (Hahlbrock & Schell, 1989; Herrmann, 1995; Kuc, 1995). Os aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano originam-se do ácido shiquímico, que é sintetizado a partir de intermediários da glicólise, a eritrose-4-fosfato e o fosfoenolpiruvato (Lehninger *et al.*, 1993). As fitoalexinas possuem ações antibacterianas, fungitóxicas e antiviróticas (Friend, 1981). Esta ação relaciona-se a capacidade dos fenóis de inativarem enzimas celulolíticas, pectolíticas e degradadoras da parede celular dos patógenos (Martin & Grossman, 1972).

Em citros destaca-se a produção da fitoalexina escoparone (6,7 dimetoxicoumarina) que é o principal composto aromático envolvido na defesa contra *Phytophthora citrophthora*

(Afek & Sztejnberg, 1988), *Guignardia citricarpa* (De Lange *et al.*, 1976) e *Diaporthe citri* (Aritmo *et al.*, 1986).

A rapidez de acúmulo de fitoalexinas está associada com resistência a fungos e bactérias, embora as informações genéticas para a síntese dessas substâncias sejam encontradas tanto em plantas sensíveis como nas tolerantes (Kuc', 1995).

A síntese de fitoalexinas pode ser incrementada por substâncias chamadas de elicitores, produzidas na interação planta-patógeno (Paxton, 1981; Goodman *et al.*, 1986). Os elicitores são reconhecidos por receptores protéicos na membrana, que desencadeiam as reações metabólicas necessárias à síntese de substâncias de defesa (Hammond-Kosack & Jones, 1996; Leite *et al.*, 1997). Sabe-se que em certas bacterioses, a presença do patógeno não é identificada pelo hospedeiro, pois não há a presença de elicitores. Desta forma, as reações de defesa não ocorrem rapidamente, pois não há a pronta ativação de genes de defesa. Neste caso, a produção de fenilpropanóides é muito lenta e pode ser uma consequência das injúrias provocadas pela colonização (Alfano & Collmer, 1996; Dixon & Paiva, 1995).

Portanto, é fundamental que se conheça as alterações que ocorrem no metabolismo de defesa das plantas desde os processos iniciais de desenvolvimento da patologia.

Muitas enzimas estão envolvidas no metabolismo dessas substâncias de defesa e têm suas atividades aumentadas na presença do patógeno ou, indiretamente, em função da colonização e desenvolvimento dos sintomas (Fric, 1976). Entre elas estão as ribonucleases, proteases, peroxidase, fenilalanina-amônio-liase (PAL) e polifenoloxidase. Evidências mostram que algumas destas enzimas podem agir diretamente sobre o desenvolvimento dos patógenos, como a β -1-3-glucanase, que degrada as paredes celulares de *Cercospora arachidicola* (Roulin & Buchala, 1995).

Martins *et al.* (1999) encontraram em laranjeiras 'Natal' com catorze anos de idade e

com dez anos de presença de sintomas característicos de CVC, aumento de concentração de compostos fenólicos, de lignina e das atividades das enzimas peroxidase, β -1-3-glucanase e quitinases.

Contudo, não se sabe como ocorrem as alterações no metabolismo de compostos fenólicos ou na atividade de proteínas nas plantas com CVC no início de desenvolvimento da doença e tampouco se as alterações, encontradas por Martins *et al.* (1999), resultam das modificações metabólicas decorrentes somente da infecção ou são decorrentes também dos efeitos colaterais devidos ao longo tempo de infecção. Portanto, esses estudos são fundamentais para a melhor compreensão dos possíveis mecanismos de defesa da laranjeira à *X. fastidiosa*.

3.1.2. DEFICIÊNCIA HÍDRICA E MECANISMOS DE DEFESA CONTRA PATÓGENOS

Fatores climáticos podem agir sobre a severidade da doença. Foi demonstrado que a deficiência hídrica aumenta a severidade de *X. fastidiosa* em *Parthenocissys quinquefolia* (McElrone *et al.*, 2001), embora os motivos dessa maior severidade não tenham sido esclarecidos. Os resultados apresentados no capítulo I deste trabalho, também indicaram que a deficiência hídrica aumentou os sintomas da CVC em laranjeira 'Pêra', provavelmente por acentuar os prejuízos sobre as trocas gasosas e relações hídricas. Uma das hipóteses para a maior severidade da doença em regiões sujeitas ao déficit hídrico é que ele pode prejudicar os mecanismos de defesa naturais das plantas e facilitar a colonização da bactéria (Boyer, 1995).

Para garantir a sobrevivência sob condições de deficiência hídrica o metabolismo das plantas sofre alterações. A alteração no metabolismo primário é uma resposta genérica encontrada em plantas sob estresse. Muitas enzimas têm suas atividades modificadas em resposta à deficiência hídrica e, também, a tratamento com ABA, tais como, gliceraldeído-3-

fosfato-desidrogenase, sacarose sintase, betaina-aldeído-desidrogenase e ascorbato-peroxidase. Entretanto, o aumento nas atividades de enzimas está associado com outros estresses ambientais e, possivelmente, reflete um aumento na demanda energética. A produção de proteases pode ser uma estratégia importante durante o metabolismo sob estresse, atuando sobre proteínas armazenadas e liberando aminoácidos para síntese urgente de novas proteínas (Ingram & Bartels, 1996).

O metabolismo de compostos fenólicos pode ser regulado pelo estado energético da planta (Herrmann, 1995). Sob condições normais de crescimento, 20% do carbono fixado pelas plantas flui através da via do ácido shiquímico (Hanson & Havir, 1981), precursor dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano. Desta forma, a diminuição da fotossíntese em função do estresse, reduzindo a disponibilidade de carboidratos, pode alterar a concentração de compostos fenólicos.

De fato, um declínio na concentração de ácidos orgânicos, resultante do catabolismo de carboidratos, tem sido verificado em plantas sob estresse (Fougere *et al.*, 1991). Este declínio na concentração de ácidos orgânicos como o shiquímico, pode resultar em menor síntese de compostos fenólicos e tornar a planta mais susceptível ao ataque de patógenos e outros herbívoros. Dunn *et al.* (1998) encontraram menor atividade de PAL em laranjeiras sob estresse salino e aumento de susceptibilidade ao ataque de nematóide. Estes autores sugeriram que a diminuição da atividade da enzima estava relacionada à menor concentração de aminoácidos derivados do ácido shiquímico, das plantas submetidas ao estresse.

A CVC reduz o estado energético das plantas pela redução na taxa de assimilação de CO₂, resultando em menor conteúdo de amido (Gomes, 2001). Também, impõe à planta um desbalanço hídrico pela redução do potencial da água das folhas (Machado *et al.*, 1994, Habermann, 1999; Gomes, 2001). Se estas alterações indicam que o metabolismo de

aminoácidos e compostos derivados do ácido shiquímico pode estar sendo modificado, reduzindo a concentração das substâncias de defesa, é possível que a deficiência hídrica favoreça o desenvolvimento da CVC.

3.1.2.1 MODIFICAÇÕES NO METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS E DE COMPOSTOS FENÓLICOS PROVOCADOS EM FUNÇÃO DA DEFICIÊNCIA HÍDRICA E DA PRESENÇA DE PATÓGENOS.

Rabe (1990) propôs que a diminuição na síntese de glicose ou redução no crescimento em consequência do estresse abiótico conduz ao aumento da produção de compostos nitrogenados, para retirar o excesso de amônia dos tecidos, que pode ser tóxica.

A amônia é gerada via redução do nitrato e do nitrito, particularmente pelas árvores, embora uma pequena quantidade possa também ser adquirida do solo, sob condições ácidas (Stewart *et al.*, 1992). Ela pode ser sintetizada em grande quantidade por outras reações como: no ciclo de nitrogênio da fotorrespiração; na transformação de glicina em serina; através do catabolismo de compostos nitrogenados de transporte, como a asparagina, arginina e ureídeos; durante o metabolismo normal de alguns aminoácidos; através da enzima PAL que libera uma molécula de amônia pela conversão de fenilalanina em ácido cinâmico (Lea, 1997).

A síntese de alguns aminoácidos é importante para a remoção do excesso de amônia, devido à alta razão N/C que possuem, embora haja alto custo energético para a síntese. Por exemplo, a arginina, que possui uma das maiores razões N/C, tem sua concentração aumentada ao redor de seis vezes em plantas sobre estresse hídrico (Rabe, 1990). Em citros sob condições de estresse, também foi observado aumento na concentração de arginina, relacionada à desintoxicação de amônia (Rabe & Lovatt, 1986; Sagee and Lovatt, 1991), embora o acúmulo deste aminoácido também esteja relacionado em citros como reserva de N (Tadeo *et al.*, 1984).

A deficiência hídrica pode regular a síntese de aminoácidos, devido às modificações no pH do citoplasma, alterações na turgescência e no potencial osmótico (Handa *et al.*, 1983; Rhodes *et al.*, 1986; Lea, 1997). Sob estresse, observou-se o aumento de 10 vezes na síntese de prolina bem como a redução na sua degradação oxidativa (Stewart *et al.*, 1977; Huang & Cavalieri, 1979; Sells & Koeppel, 1981; Hanson & Hitz, 1982).

O acúmulo de prolina também pode estar relacionado ao ajuste osmótico, que é uma das estratégias para garantir a sobrevivência da planta, tanto sob déficit hídrico como sob estresse salino. O ajuste osmótico possibilita a continuidade de absorção de água pelo vegetal em potenciais da água mais baixos no solo, mantendo o turgor celular (Hale & Orcutt, 1987; Hare *et al.*, 1998). Ajuste osmótico foi observado em pessegueiros, na resposta à infecção de *X. fastidiosa* (Anderson & French, 1987).

Prolina é um dos aminoácidos mais abundantes nos tecidos dos citros e é considerada uma reserva importante de nitrogênio nas folhas, além de ser um dos compostos solúveis que mais aumenta nas folhas durante o déficit hídrico (Stewart, 1961; Yelenosky, 1979). Stewart (1961), observou que a concentração de prolina usualmente é ao redor de 0,5% da matéria seca de folhas de laranjeiras ‘Valência’ podendo atingir até 2,5%, sob estresse abiótico.

O ajuste osmótico foi observado em citros sob condições de estresse salino (Lloyd *et al.*, 1987, 1989, 1990) e hídrico (Feres *et al.*, 1979). Diferentemente de Feres *et al.* (1979), alguns autores não constataram ajuste osmótico em folhas de laranjeiras e limoeiros (*Citrus limon* L.) submetidos à deficiência hídrica (Domingo, 1994; Savé *et al.*, 1995). Entre os motivos dessa discrepância pode estar a intensidade e duração do estresse, que foram bem maiores no estudo de Feres *et al.* (1979). Também não houve estudos para verificar se o ajuste osmótico pode ocorrer ao nível da raiz, que é o local onde ele se desenvolve em

primeiro lugar (Hsiao & Xu, 2000). Adicionalmente, poucas espécies foram estudadas, apontando para a necessidade de novas pesquisas.

Em adição ao papel biofísico no acúmulo de prolina, tem sido proposto que o processo de síntese deste aminoácido bem como de glicinabetaína, pode manter o potencial de redução celular durante os períodos de estresse, permitindo o funcionamento da fotorrespiração e a dissipação do excesso de energia captada pela clorofila (Hare *et al.*, 1998).

Sob condições de estresse, há maior dreno de carbono para as sínteses de arginina e de prolina do que para as sínteses de compostos aromáticos, podendo afetar negativamente a concentração de compostos fenólicos necessários para a defesa das plantas (Dunn *et al.*, 1998).

Doenças também interferem no metabolismo de aminoácidos em plantas cítricas. A infecção por *Phytophthora parasitica* aumentou a concentração de prolina (Labanauskas *et al.*, 1974). O declínio dos citros, que é outra doença vascular de causa ainda desconhecida, aumenta os teores de arginina e de aminoácidos livres totais (Hanks & Feldman, 1974). A infecção pelo nematóide *Radopholus similis* induziu aumento nas concentrações de arginina, asparagina, glicina, prolina, lisina e histidina (Hanks & Feldman, 1974).

Por outro lado, a diminuição de energia disponível em situações de estresse bióticos ou abióticos pode regular a síntese de compostos aromáticos. Evidências mostram que a atividade da enzima shiquimato-quinase é controlada pela disponibilidade de energia (Shimidt *et al.*, 1990).

Plantas com CVC apresentam redução no estado de hidratação foliar durante o dia, como foi demonstrado por Machado *et al.* (1994) e confirmado no capítulo I deste trabalho. Desta forma, é interessante observar se esta desidratação que ocorre ao longo do tempo nos tecidos de plantas doentes está modificando a presença de amônia e aminoácidos, interferindo

na síntese dos compostos de defesa da planta contra o ataque de *X. fastidiosa*. Também é interessante saber como a deficiência hídrica interage com este processo.

3.1.4. PEROXIDASES (EC 1.11.17)

As peroxidases catalisam a oxidação de um doador de hidrogênio (usualmente um fenol substituído) com a participação de peróxido de hidrogênio (Sinclair, 1984). Elas também catalisam a formação de peróxidos que possuem ação antimicrobiana. São promotoras da produção de lignina, suberinas e extensinas, atuando nos processos de polimerização destas substâncias, bem como atuam na síntese de compostos fenólicos complexos (Vera-Estrella *et al.*, 1993; Baker & Orlandi, 1995).

Com relação a biossíntese de lignina, a peroxidase é responsável pela remoção de átomos de hidrogênio dos grupos alcoóis hidroxicinâmicos, cujos radicais se polimerizam para formar lignina (Freudenberg, 1965; Goodman *et al.*, 1986; Whetten & Sederoff, 1995). A lignificação está correlacionada à resposta de defesa em muitas plantas, pois atua como barreira mecânica à penetração, crescimento ou mobilidade de patógenos, conferindo resistência à parede celular ao ataque enzimático ou à difusão de toxinas (Nicholson & Hammerschmidt, 1992).

Danos na membrana plasmática, causados por ruptura mecânica ou pela ação de enzimas proteolíticas ativam as peroxidases que estão nas membranas (Sanches-Ferrer *et al.*, 1989; Reimann *et al.*, 1992). Estas enzimas podem ficar aderidas à parede celular durante o processo de lignificação (Abeles & Biles, 1991).

Martins *et al.* (1999) constataram um incremento da atividade peroxidásica em plantas com CVC. Desta forma, é importante saber como a atividade desta enzima se desenvolve nas plantas com CVC durante o desenvolvimento da doença e não somente nos estágios

avanzados, que podem configurar mais uma ação de reparo aos danos, do que consequência de estímulo exercido pela presença da bactéria nos tecidos.

As isoenzimas de peroxidases podem diferir nas propriedades bioquímicas, tais como atividade específica, afinidade pelo substrato, pH ótimo, etc., e serem separadas em formas ácidas ou básicas por eletroforese, cromatografia de troca iônica ou focalização isoelétrica (Gaspar *et al.*, 1982). Hamil & Brebbaker (1969), observaram através de eletroforese em gel de poliacrilamida, 24 isoenzimas em extratos obtidos de 250 variedades de milho. Por sua vez, Grison & Pilet (1985) relataram onze isoperoxidasas na fração citoplasmática extraída de raízes de milho. Lusso (1989) encontrou oito isoenzimas em extratos de folhas de milho inoculadas com *Helminthosporium carbonum*, *H. maydis* ou injuriadas mecanicamente imediatamente após a fricção com carburundo. Porém após 12 horas houve o aparecimento de duas novas isoenzimas e o desaparecimento de três em todos os tratamentos. Portanto, é importante saber se ocorre um estímulo para a síntese de diferentes isoenzimas de peroxidase pela presença de *X. fastidiosa* em tecidos com CVC.

3.1.5. OBJETIVOS

Estudar as alterações nas concentrações de açúcares solúveis, aminoácidos, compostos fenólicos e atividade de peroxidases em laranjeiras ‘Pêra’ com CVC e submetidas à deficiência hídrica.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. EXPERIMENTO

O experimento foi instalado no Centro Avançado de Pesquisa do Agronegócio de Citros 'Sylvio Moreira' do Instituto Agronômico em junho de 1999. Oitenta plantas de laranjeira 'Pêra' enxertadas em limoeiro 'Cravo', com 12 meses de idade, foram transplantadas para vasos de 30 litros, contendo substrato preparado com $\frac{1}{4}$ de areia, $\frac{1}{4}$ composto orgânico e $\frac{1}{2}$ de terra. 30 dias após o transplante em 20 de agosto de 1999, 20 plantas foram inoculadas pelo processo de encostia descrito no capítulo I. A irrigação foi diária e a adubação foi efetuada com 20 g de nitrato de cálcio, a cada 30 dias (fig.1).



Figura 1. Experimento instalado no Centro Avançado de Pesquisa do Agronegócio de Citros 'Sylvio Moreira' do Instituto Agronômico em Cordeirópolis, SP.

Após a confirmação da doença ter sido feita pelo exame PCR, e aparecimento dos primeiros sintomas de CVC, em março de 2000 foram selecionadas plantas sadias e doentes e aplicados os seguintes tratamentos:

- a) Plantas sadias irrigadas
- b) Plantas sadias e com deficiência hídrica
- c) Plantas com CVC irrigadas
- d) Plantas com CVC e com deficiência hídrica

O tratamento de deficiência hídrica foi aplicado por meio da interrupção da irrigação até que a taxa de assimilação de CO_2 (A) fosse próximo a zero. As medidas de A , condutância estomática (g_s) e da taxa de transpiração (E) foram realizadas com o aparelho portátil de fotossíntese, por radiação infravermelho, Li 6400 (LiCOR, Lincoln, Nebraska) em folhas, completamente expandidas, com cinco a oito meses de idade e em ramos com sintomas de CVC. As folhas selecionadas para as medidas continham no máximo 3 % do limbo foliar com a presença de sintomas característicos de CVC. As medidas foram realizadas diariamente às 10 horas da manhã com luz artificial fornecida pelo própria câmara do aparelho, com densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (FFF) de $1000 \mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s.}$, considerado suficiente para a saturação lumínica da fotossíntese (Syvertsen, 1984). As medidas foram realizadas sob controle de temperatura da câmara de medição, fixada em 28°C , que era próxima à temperatura do ambiente naquele horário de medida.

Um dia após A ter atingido valores próximos a zero, e às 12 horas, amostras foram retiradas para as análises bioquímicas de todos os tratamentos. Para tanto, foram retirados das mesmas folhas utilizadas para medidas de A , seis discos foliares com 7 mm de diâmetro, com furador de rolha. Os discos foliares foram retirados de um dos lados do limbo foliar, paralelos à nervura central e imediatamente transferidos para eppendorfs (fig. 2). Para evitar a perda de

água, os eppendorfs foram tampados e rapidamente colocados no gelo até que houvesse a medida da massa fresca. No outro lado do limbo, outros seis discos foram retirados apenas para medidas de massa seca, após serem mantidos por 48 horas em estufa com temperatura de 68 °C.

Para extração de açúcares solúveis, aminoácidos e compostos fenólicos, os discos foliares foram transferidos para tubo de ensaio contendo 10 mL do extrator MCW (metanol, clorofórmio e água na proporção 12:5:3) (Bielesk & Turner, 1966) que ficaram por doze dias em câmara fria (8 °C) até a descoloração total dos discos. Após a separação da fase aquosa do MCW pela adição de água e clorofórmio, obteve-se o extrato (A), doravante assim denominado. Um mL de extrato (A) foi seco sob vácuo e o pó seco obtido foi solubilizado em 0,5 mL de etanol 70% para obtenção do extrato (B), doravante assim denominado.



Figura 2. Detalhe do método de coleta de material para análises bioquímicas em laranjeiras 'Pêra' com CVC e submetidas à deficiência hídrica. Círculo mostra a presença dos sintomas iniciais da doença. Cordeirópolis SP.

Todos os resultados foram analisados teste F ($P < 0,05$), considerando-se o delineamento experimental como fatorial ao acaso. Como causa de variação dos dados considerou-se a sanidade, a presença do estresse e a interação entre eles. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

3.2.2. AÇÚCARES SOLÚVEIS TOTAIS

Determinou-se a concentração de açúcares solúveis totais pelo método de fenol sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956). Adicionou-se a 0,5 mL do extrato (B) (diluído 5 vezes) 0,5 mL de reagente de fenol e 2 mL de H_2SO_4 concentrado. Agitou-se bem e após resfria-lo, fez-se a leitura de absorbância em espectrofotômetro a 490 nm. Leu-se em espectrofotômetro a 490 nm. Como branco, colocou-se água no lugar da amostra. As concentrações de açúcares solúveis foram calculadas a partir de uma curva padrão obtida com leituras de concentrações conhecidas de sacarose entre 5 a 50 μg . Utilizou-se 6 repetições por tratamento.

3.2.3. COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

Os compostos fenólicos totais foram analisados pelo método espectrofotométrico de Swain & Hills (1959). Para tanto, 200 μL do extrato (B) foram diluídos em 3,3 mL de água e adicionou-se 0,25 mL do reagente de Folin Ciocalteau, homogenizando-se a mistura em agitador elétrico de tubos. Após três minutos, adicionou-se 0,5 mL de Na_2CO_3 (17,5 g /50 mL) e agitou-se novamente. Adicionou-se 0,75 mL de água e após agitação, aguardou-se uma hora em bancada para posterior leitura da absorbância a 725 nm. Para os cálculos de concentração em relação a massa fresca, tomou-se a curva padrão obtida com leituras da concentração de ácido fênico entre 5 e 50 μg .

3.2.4. SEPARAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

A separação de compostos fenólicos foi feita à partir do extrato (B) por cromatografia líquida de alta performance (HPLC-SD 200 -Dynamax) usando-se uma coluna de fase reversa TSK ODS-120T (5 μ m, 250 mm x 4,6 mm, Pharmacia). Os compostos eluindo na coluna foram detectados com monitor de UV com λ de 280 nm. Os sinais do detector foram integrados e analisados pelo sistema Star Workstation (Varian). Para separar os compostos, foi utilizado o método de Banwart *et al.* (1985) adaptado por Mazzafera & Guerreiro Filho (1998), no qual, utilizou-se o tampão A aquoso composto por 2% de ácido acético em água deionizada (pH ajustado para 4,8 com solução 1 M de NaOH) e o tampão B constituído por 70% do tampão A e solventes orgânicos (metanol/n-butanol/ácido acético, 82/16/2, v/v/v). Para eluição, o gradiente empregado foi: 0% de tampão B entre os 0 e 5 min (fluxo de 0,6 mL/min), 5% de tampão B entre 5 e 20 min (fluxo de 1,2 mL/min), 20% de tampão B entre 20 e 40 min (fluxo de 1,2 mL/min), 30% de tampão B entre 40-70 min (fluxo de 1,2 mL/min), 70% de tampão B entre 70-75 min (fluxo de 1,2 mL/min) e 100% de tampão B entre 75 a 85 min (fluxo de 1,2 mL/min).

Também se verificou a concentração do fenol escoparone (4,6 dimetoxicumarina) comparando-se com uma solução padrão de escoparone (Sigma).

O cromatograma obtido permitiu a determinação de 3 compostos (incluindo o escoparone) (fig.3).

Houve 4 repetições por tratamento e os resultados foram analisados pelo teste F e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Para estas análises os dados das concentrações do composto B e composto C foram transformados em (Log x +1).

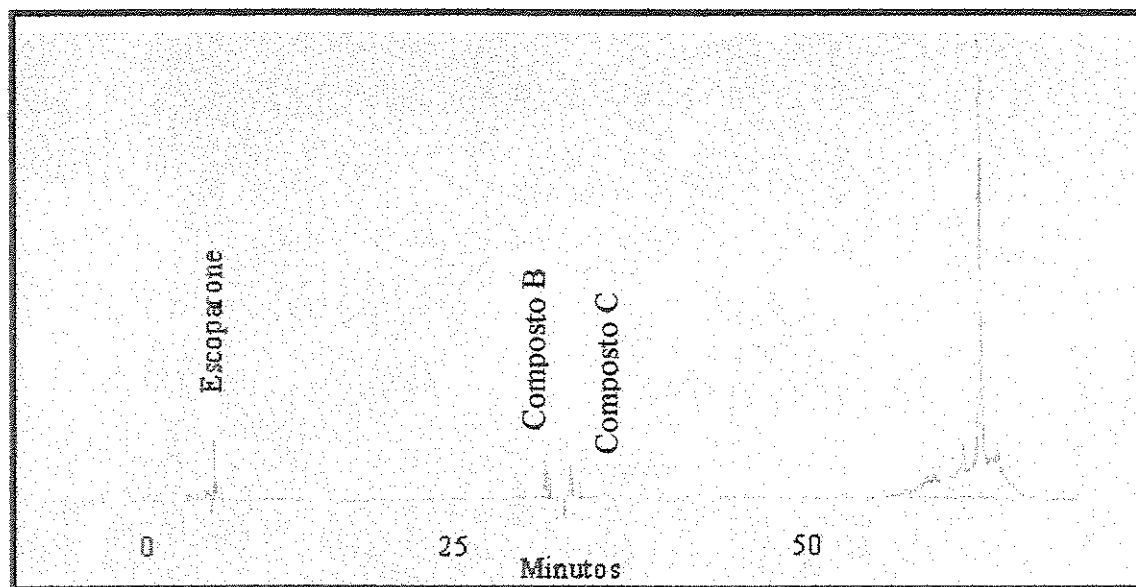


Figura 3. Perfil de eluição de fenóis, utilizando uma coluna TSK ODS-120T (4,6 mm x 250 mm) por HPLC. Fluxo de 1,2 mL/min. Os sinais foram monitorados com λ de 280 nm.

3.2.5. AMINOÁCIDOS LIVRES TOTAIS

A determinação de aminoácidos foi feita com 4 repetições por tratamento, seguindo-se o método de reação colorimétrica dos aminoácidos com ninhidrina (Yemm & Cooching, 1955).

Para tanto, adicionou-se em tubo de ensaio, 1 mL do extrato (A) (diluído 10 vezes); 0,5 mL de tampão citrato de sódio 0,2 M com pH 5,0; 0,2 mL de ninhidrina 5% em metil celusolve; 1,0 mL de KCN 2% (v/v) de uma solução de KCN 0,01 M em metil celusolve. Essa mistura foi levada ao banho térmico durante 20 min a 100 °C. Os tubos de ensaios foram cobertos com esferas de vidro para evitar a evaporação da solução. Após o resfriamento, foi adicionado etanol 60%, até completar 4 mL. A leitura foi feita em espectofotômetro a 570 nm.

A concentração de aminoácidos foi obtida com o emprego de uma curva padrão obtida com concentrações conhecidas de leucina entre de 0 a 500 nmol/mL. Os valores das concentrações de aminoácidos foram expressos em nmol de aminoácidos/g de massa seca.

3.2.6. IDENTIFICAÇÃO DE AMINOÁCIDOS LIVRES E AMÔNIA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

3.2.6.1. DERIVAÇÃO DOS AMINOÁCIDOS

Foram utilizados dois métodos para derivação dos aminoácidos livres para a separação e quantificação em HPLC. Os aminoácidos ASP, GLU, GLN + GLY, ILEU, LEU, LYS, MET, PHE, PRO, THR, TYR, VAL e amônia foram derivados com o reagente Accqaa2 (Burgoyne, 1993). Para tanto, em 20 µL do extrato (A) foram adicionados 60 µl do reagente Accqaa2. A mistura foi mantida a 55°C por 10 minutos. Essa mistura foi armazenada a -18 °C até a análise em HPLC.

Para determinação de SER, ARG e ALA, utilizou-se a derivação dos aminoácidos com o método de derivação com OPA (o-ftaldialdeído) (Jarret *et al.*, 1986). Para tanto, 20 µL da fase aquosa do extrato (A) foram adicionados 60 µL do reagente OPA (50 mg OPA em 1 mL de metanol) em tampão borato 0,3 M, pH 9,5 ajustado com NaOH 2 N e 1,25% (v/v) de β-mercaptoetanol, foram misturados e agitados. Logo após 2 minutos, 20 µl dessa mistura foram injetados em HPLC.

Todos os tampões foram feitos em água milli-Q (água deionizada com resistência de 18,2 MΩ obtida em deionizador Milli-Q da Millipore).

3.2.6.2. SEPARAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS AMINOÁCIDOS

A separação e a quantificação dos aminoácidos foram feitas em HPLC (SD-200, Dynamax) utilizando-se uma coluna cromatográfica (Waters spherisorb ODS-2, 5mm, 4,6 mm

X 250 mm, da SUPELCO INC.) acoplada a um sistema de bombas hidráulicas, controladas por um gerador de gradiente modelo 2152 (Dynamax). Ao serem eluídos pela coluna cromatográfica, os derivados dos aminoácidos eram detectados por um monitor de fluorescência (RF-10 AxL- Shimadzu). Para o método Accqaa2 fixou-se um λ de excitação de 290 nm e de emissão de 390 nm. Para o método OPA, utilizou-se um λ de excitação de 250 nm e de emissão de 480 nm. Os sinais foram integrados e analisados pelo sistema Star Chromatography (Varian).

Os tampões utilizados para o método Accqua 2 foram: tampão A composto por 100 mM de acetato de sódio, 5,6 mM de trietilamina (pH 6,8, ajustado com ácido fosfórico 50%). Tampão B composto por 85% de acetonitrila em água deionizada. Fixou-se um fluxo de eluição para o método Accqaa2 de 0,8 mL/min e o gradiente gerado, através da variação na proporção dos tampões A e B foi: 0 a 60% de B entre 0 e 30 minutos; 60 a 80% de B entre 30 a 60 minutos; 80 a 100% de B entre 60 e 70 minutos.

Os tampões utilizados para eluição com o sistema OPA foram: tampão A composto por tampão fosfato (50 mM) contendo 2% de tetrahydrofurano e 2 % (v/v) de metanol com pH 7,5 ajustado com ácido acético concentrado e, tampão B, metanol a 65% em H₂O. Fixou-se para OPA um fluxo de 0,8 mL/min e o gradiente foi gerado através da variação na proporção dos tampões A e B sendo: 20 a 28% de B entre 0 e 5 minutos, 28 a 58% de B entre 5 e 35 min; 58 a 75% de B entre 35 e 40 minutos; 75 a 95% de B entre 40 e 56 minutos; 75 a 95% de B entre 56 e 60 minutos; 95 a 100% de B entre 56 e 60 minutos.

Todos os tampões foram deaerados e os polares (tampões A) foram filtrados a vácuo, em filtro Millipore, através de membrana PVDF, com poros de 0,45 μ m de diâmetro.

Cada aminoácido das amostras foi identificado pelo seu tempo de retenção na coluna cromatográfica, tomando-se por base o padrão de aminoácidos Sigma AAS-18, ao qual foram adicionados os aminoácidos asparagina, glutamina, γ -aminobutírico e amônia.

A concentração de cada aminoácido nas amostras foi determinada pela área de seu respectivo pico, comparando-se com o padrão utilizado, cuja concentração era de 250 nmol/mL. Como exemplo, é apresentado na fig.4 o cromatograma padrão obtido pelo método Accqaa2.

3.2.7. ATIVIDADE DE PEROXIDASE (EC 1.11.17)

A atividade das peroxidases foi determinada no início da deficiência hídrica (início), quando *A* atingiu valores próximos a zero (pleno estresse) e durante a recuperação (dois dias após a re-irrigação), de acordo com adaptação do método descrito por Storrie & Madden (1990). No início e em pleno estresse, mediu-se a atividade de peroxidase em folhas com CVC sem sintomas e nas plantas sadias. Durante a recuperação, mediu-se em folhas com CVC com e sem sintomas. Para tanto 0,3 gramas de tecido vegetal fresco foram macerados em 5 mL de tampão de homogeneização (Tris 50 mM + HCl 0,2 M + EDTA 1 mM + $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 1 mM). O macerado foi filtrado em papel de filtro e centrifugado a 3500 g durante 15 min. a 4 °C e separou-se do sobrenadante. Para obtenção do extrato enzimático o sobrenadante foi novamente centrifugado a 11.000 g por 10 min.

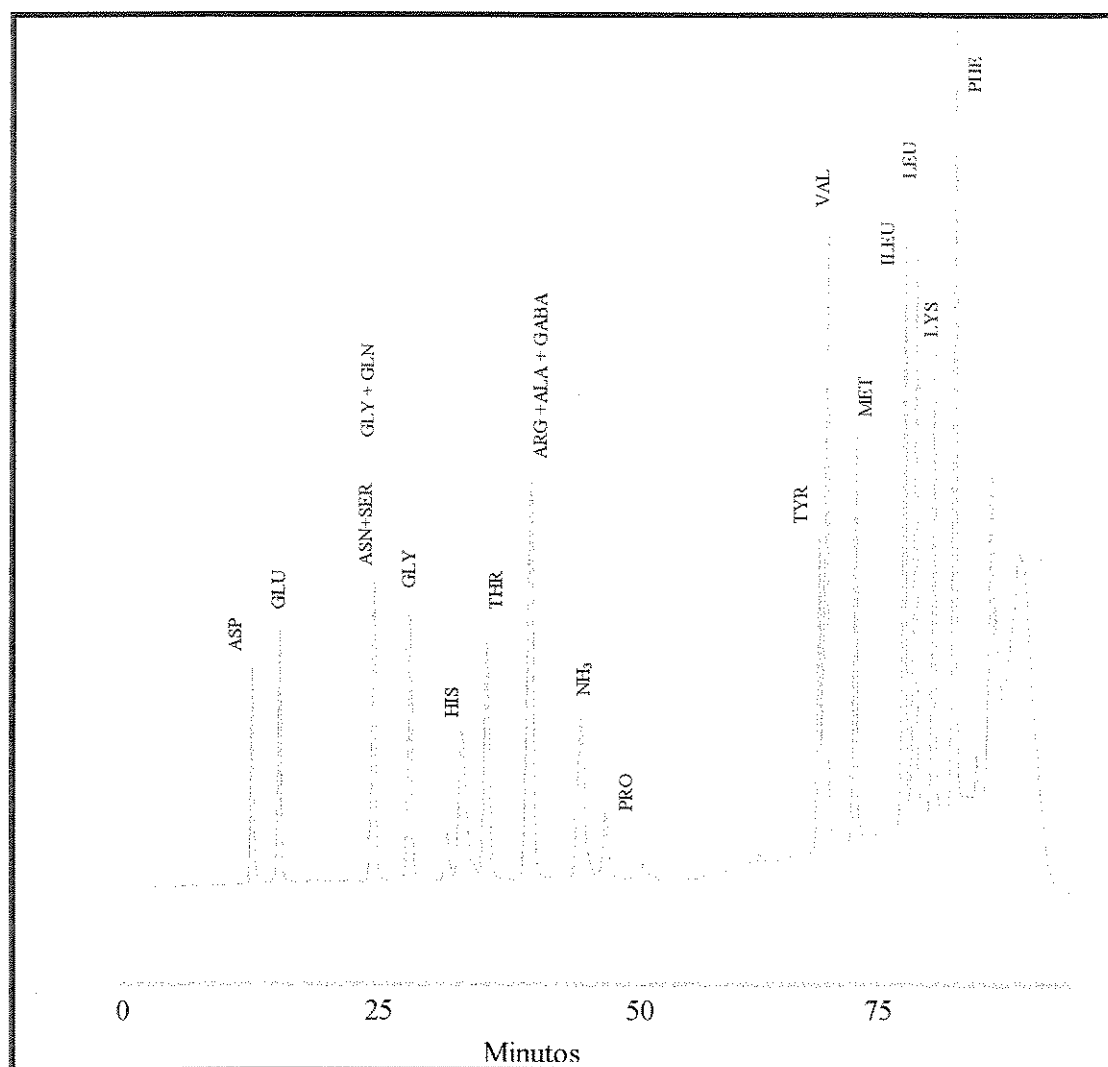


Figura 4. Perfil de eluição de derivados Accqaa2-aminoácidos do padrão Sigma AAS-18, enriquecido com ASN, GLN, GABA e NH₃. Coluna Waters spherisorb ODS-2, 5mm, 4,6 mm X 250 mm. Fluxo de 0,8 ml/min; λ exc. 250 nm; λ em. 390 nm; tampão A acetato de sódio com 5,6 mM de trietilamina e pH 6,8; tampão B acetonitrila 85% em água; gradiente 0 a 100% de B em 70 minutos.

A mistura de reação foi composta por 100 μL do extrato enzimático e 1,4 mL de uma mistura contendo 24,1 μM , 90 μM de peróxido de hidrogênio em água deionizada. Acompanhou-se por dois minutos a reação em intervalos de 10 em 10 segundos, medindo-se a absorbância em 420 nm. A atividade específica foi expressa em Δ de absorbância/mg de proteína.min. A concentração de proteína foi determinada no extrato enzimático pelo método de Bradford (1976).

Foram feitas seis repetições por tratamento e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

3.2.8. PERFIL ELETROFORÉTICO DE ISOENZIMAS DE PEROXIDASE

A separação das isoenzimas de peroxidase foi feita por eletroforese em gel não desnaturante de poliacrilamida a 12% (Vallejos, 1983).

Foram aplicados no gel 10 μL do extrato enzimático (o mesmo utilizado para medida de atividade de peroxidase) de plantas sadias e com CVC, diluídas 1/1 com solução, 5% de glicerol e alguns cristais de azul de bromofenol. A corrida deu-se em 24 mA por 4 horas.

A reação para revelação das isoenzimas ocorreu com solução composta por guaiacol 50 mM, 50 mM de H_2O_2 e 50 mM de acetato de sódio, pH 6,0. Outro gel foi revelado, com uma solução composta por seringaldazina 0,1%, 1 μL de H_2O_2 (100%) e tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0. Após vinte minutos de reação os géis foram fotografados.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1. TROCAS GASOSAS

As plantas com CVC irrigadas apresentaram menor taxa assimilação de CO_2 (A), menor condutância estomática (g_s) e menor taxa de transpiração (E) que as plantas sadias irrigadas sob as mesmas condições de luz e temperatura (fig. 5). Embora a doença estava no início do seu desenvolvimento e apresentando poucas folhas com início da manifestação dos sintomas, a redução em A foi de aproximadamente 34% com diminuições proporcionais de g_s e de E . Embora esta análise não tenha sido feita ao longo do período do dia, as medidas foram feitas no período da manhã, sob condições favoráveis de luz e temperatura para a fotossíntese. Como ocorre menor fotossíntese em plantas com CVC no período de maior déficit de pressão de vapor (vide capítulo I), é provável que, no decorrer do dia, quedas ainda maiores ocorreriam. Isto revelou que embora apenas 3% do limbo foliar estava com sintomas os prejuízos causados pela CVC são maiores e concordam com os resultados obtidos pelo capítulo I deste trabalho. Esta desproporção ocorre por se tratar de uma doença vascular que prejudica o estado de hidratação dos tecidos fotossintetizantes antes de prejudicar a área fotossintética nos tecidos.

Valores próximos a zero para A , g_s , e E , ocorreram após 10 dias da suspensão da irrigação em plantas sadias e apenas aos 17 dias em plantas com CVC. Esta diferença provavelmente deve-se ao menor valor de E em plantas com CVC, mantendo a umidade do substrato por um período mais longo, à semelhança do que foi relatado no capítulo I.

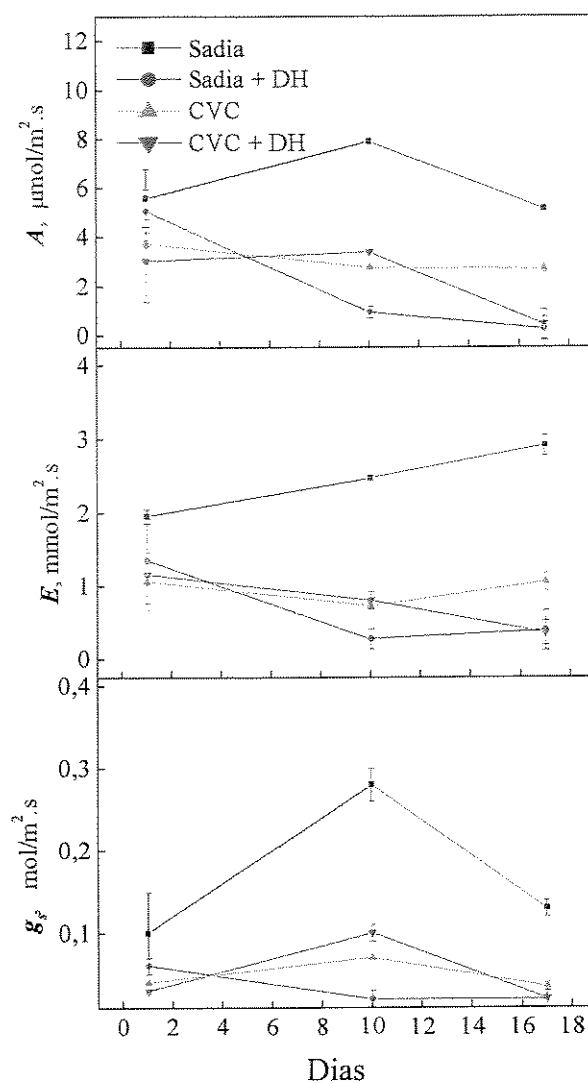


Figura 5. Taxa de assimilação de CO_2 (A), transpiração (E) e condutância estomática (g_s) em folhas de laranjeiras 'Pêra' com CVC e sadias, submetidas à deficiência hídrica (DH). Medidas realizadas às 10 horas da manhã com *FFF* de $1000 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ e temperatura de 28°C .

3.3.2. AÇÚCARES REDUTORES

Plantas irrigadas com CVC e sadias apresentaram concentrações semelhantes de açúcares solúveis (fig.6), confirmando os dados obtidos por Gomes (2001) em circunstâncias semelhantes. Este fato deve relacionar-se à capacidade de acúmulo de amido nas folhas das plantas cítricas, constituindo uma reserva importante de carboidratos (Goldschmidt & Golomb, 1982). Mesmo com a redução na fotossíntese e na síntese de carboidratos nas plantas doentes, é possível que as reservas tenham sido disponibilizadas metabolicamente, mantendo a concentração de açúcares em níveis semelhantes às plantas sadias. Em folhas adultas dos citros, há uma constância na concentração de açúcares solúveis nos diversos períodos do ano, exceto quando há um período de grande demanda por carboidratos para a formação de novos órgãos (Sanz *et al.*, 1987). Esta manutenção sob períodos de reduzida atividade fotossintética é atribuída à modificações na atividade de enzimas do metabolismo de açúcares, como o aumento da atividade de β -amilase e invertases ácidas (Preiss, 1982; Quick *et al.*, 1992; Lavon *et al.*, 1995). Entre as plantas sadias submetidas à deficiência hídrica não apresentaram queda no teor de açúcares solúveis. Gomes (2001), observou resultados semelhantes sob estresse, sugerindo que o teor de açúcares solúveis em plantas sadias com estresse hídrico deve ser mantido devido à hidrólise de amido na folha, cujo teor diminui. Nas laranjeiras com CVC sob deficiência hídrica, houve queda significativa no teor de açúcares solúveis (fig. 6). Gomes (2001), também observou queda no teor de açúcares redutores em laranjeiras com CVC sob deficiência hídrica. No entanto, devido a menor fotossíntese nessas plantas, mesmo sem deficiência hídrica, suas reservas são menores. Desta forma, o estresse hídrico pode influenciar a disponibilidade de açúcares solúveis em plantas com CVC, que são necessários para as diversas funções no metabolismo, como a síntese de aminoácidos, compostos fenólicos e proteínas.

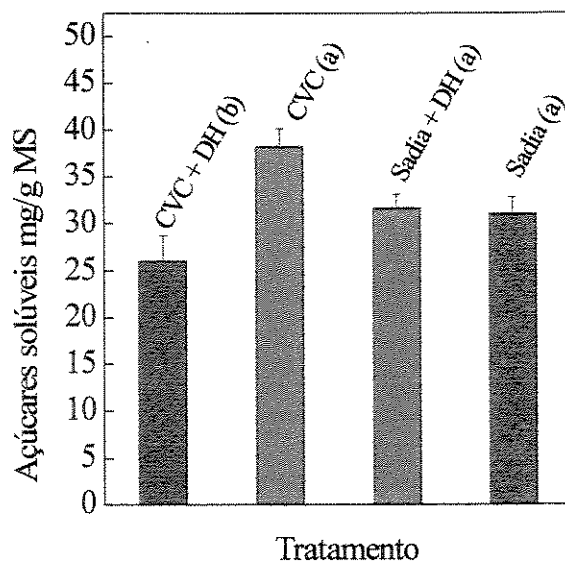


Figura 6. Concentração de açúcares solúveis equivalentes à sacarose, em folhas de laranjeiras 'Pêra' sadias e com CVC e submetidas à deficiência hídrica (DH). Tratamentos seguidos de letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

3.3.3. AMINOÁCIDOS

A tabela 1 mostra os teores de aminoácidos em plantas sadias ou doentes submetidas ou não à deficiência hídrica. Nota-se que não houve alterações significativas no teor de aminoácidos em função exclusivamente da doença. Apenas houve alterações significativas quando houve a presença de estresse hídrico ou na interação. Houve aumento das concentrações de PRO, ARG e ALA, PHE e queda nos teores de GLU e SER.

Embora o conteúdo e a proporção de aminoácidos sejam variáveis em folhas de citros em função da idade de coleta, da variedade, nutrição e clima (Sinclair 1984), as proporções encontradas foram semelhantes às encontradas na literatura destacando-se os maiores conteúdos de prolina, arginina, alanina (Stewart, 1961; Labanauskas *et al.*, 1974; Culiñez *et al.*, 1981), onde a concentração de prolina pode chegar a representar mais de 50% dos aminoácidos nas folhas sendo reserva importante para nitrogênio em citros (Sinclair, 1984).

Tabela 1. Concentração de aminoácidos em folhas de laranjeiras 'Pêra' sadias e com CVC e submetidas à deficiência hídrica (DH).

AA*	Tratamento				Causa de variação		
	Sadia	Sadia + DH	CVC	CVC + DH	Sanidade	Estresse	Interação
	$\mu\text{mol/g}$				Teste F		
ALA	5,20	6,30	3,82	5,70	ns	*	ns
ARG	4,42	6,22	2,31	6,80	ns	*	ns
ASP	1,01	0,97	1,25	0,97	ns	ns	ns
GLU	2,06	1,37	1,8	1,30	ns	*	ns
GLY + GLN	0,90	0,48	0,68	0,88	ns	*	*
ILE	3,02	2,70	2,71	3,70	ns	ns	*
LEU	2,60	2,30	2,52	3,01	ns	ns	*
LYS	3,00	2,30	2,10	3,32	ns	ns	*
MET	3,20	1,99	3,20	3,02	ns	*	*
NH ₃	0,30	0,31	0,30	0,30	ns	ns	ns
PHE	1,50	3,10	2,60	2,83	ns	*	*
PRO	28,20	58,30	29,90	59,00	ns	*	ns
SER	2,12	1,25	1,52	1,08	ns	*	ns
TYR	1,52	1,34	1,60	1,7	ns	ns	ns
THR	1,31	1,43	1,08	1,42	ns	ns	ns
VAL	1,90	2,20	2,10	2,03	ns	ns	ns
Soma	62,26	93,81	59,49	95,03	--	--	--
Total**	78,8	104,2	73,8	100,3	ns	*	ns

* Aminoácidos individuais foram medidos por HPLC e a concentração total equivalente à leucina calculada pelo método de (Yemm & Cooching, 1995). * significa que houve diferença pelo teste F ao nível de 0,05% de probabilidade.

** Concentração total de aminoácidos foi medida pelo método de Yemm & Cooching (1955).

Stewart (1961) encontrou de 35 a 77 $\mu\text{mol/g}$ MS de prolina, respectivamente em folhas velhas e novas de laranjeira 'Valência', representando ao redor de 40% dos aminoácidos totais. Para arginina encontrou de 2,71 a 6,78 $\mu\text{mol/g}$ MS, para folhas velhas e novas respectivamente, representando entre 2,7 e 6,78% dos aminoácidos livres totais (entre 63 e 249 $\mu\text{mol/g}$ MS).

O aumento na concentração de prolina em situações de estresse hídrico está ligado tanto a maior síntese quanto à restrição à sua oxidação degradativa (Stewart *et al.*, 1977; Huang & Cavalieri, 1979; Sells & Koeppe, 1981; Hanson & Hitz, 1982).

Freqüentemente tem-se sugerido que o acúmulo de prolina é uma adaptação para sobrevivência ao estresse e relacionado ao ajuste osmótico (Rabe, 1990). Contudo, ainda há dúvidas se ocorre ajuste osmótico em citros sob deficiência hídrica, pois embora ele tenha sido evidenciado por Fereres *et al.* (1979) não foi encontrado por Domingo (1994) e Savé *et al.* (1995).

A síntese de prolina também está envolvida na manutenção do potencial de redução celular sob situação de estresse (formação de NADP^+) e para a estabilidade de proteínas (Itai & Paleg, 1982; Hare & Cress, 1997; Hare *et al.*, 1998).

O acúmulo de arginina, também é observado em citros sob deficiência hídrica e estresses minerais (Rabe & Lovatt, 1986; Lovatt *et al.*, 1992). Lovatt (1986), notou que qualquer tipo de estresse que causa a redução de glicose ou diminuição no crescimento leva ao acúmulo de amônia, induzindo um aumento na síntese de arginina para sua detoxificação. Contudo, não foi observada alteração no conteúdo de amônia neste estudo, o que pode não ter ocorrido devido a maior formação de arginina. Observa-se que o acúmulo de amônia em citros sob situações de estresse encontrado por Lovatt *et al.* (1992) foi verificado apenas sob adição de uréia em aplicação foliar.

Dunn *et al.* (1998) sugeriram, que sob condições de estresse, o maior dreno de carbono para as sínteses de arginina em citros poderia diminuir as sínteses de aminoácidos aromáticos importantes para a síntese de compostos de defesa da planta, contudo, foi observado aumento de fenilalanina nas plantas sob deficiência hídrica (tabela 1). Este aumento de fenilalanina também foi observado em tomateiros por Rhodes *et al.* (1986). Como Dunn *et al.* (1998) não mediram a concentração de aminoácidos aromáticos, pode ser que as menores concentrações de compostos fenólicos encontradas estivessem relacionada à deficiência na atividade da enzima PAL e não à falta de substrato.

O acúmulo de alanina tem origem na degradação do glutamato e está relacionado com o metabolismo dinâmico de aminoácidos em situações de estresse e sua grande demanda para síntese protéica (Rhodes *et al.* 1986).

Houve decréscimo na concentração de glutamato, serina em ambos os tratamentos sob estresse e de metionina em interação com os tratamentos. O menor acúmulo de glutamato pode estar relacionada ao seu papel nas reações de síntese de vários aminoácidos que aumentaram como prolina, arginina e alanina. O glutamato também participa das transaminações que ocorrem na síntese de alanina e aspartato e serina (Lehninger *et al.*, 1993).

A semelhança na proporção de aminoácidos entre plantas saudáveis e doentes sugere que o metabolismo nitrogenado não foi alterado em função da presença de *X. fastidiosa* nos tecidos.

Uma hipótese para explicar a semelhança no conteúdo e proporção de aminoácidos, seria que a recuperação do Ψ_a durante a noite em plantas com CVC (capítulo I) não permitiria tempo suficiente de estresse para que houvesse alterações na concentração de aminoácidos livres. Também é possível que apesar da queda de 35% em *A* encontrados nas plantas com CVC, houve disponibilidade de substrato para a assimilação da amônia.

Outra hipótese seria que, as alterações no metabolismo nitrogenado e na composição de aminoácidos das plantas sob estresse tenham origem no próprio sistema radicular. Quando o sistema radicular está sob estresse, ocorre aumento produção de ABA, que é responsável pela ativação de diversos genes (genes responsivos ao ABA ou ABRE) e pela regulação de diversos processos de adaptação da planta à desidratação (Ingram & Bartels, 1996). Contudo, a queda de Ψ_a durante o dia nas folhas com CVC, não corresponde ao declínio no estado de hidratação do sistema radicular ou à diminuição da umidade do substrato (capítulo 1). Assim, é possível que não tenha ocorrido acúmulo de ABA. Corroborando com esta hipótese, Gomes, (2001) não observou alterações no conteúdo de ABA em plantas com CVC irrigadas com relação às plantas sadias, mesmo sob diminuição do Ψ_a .

A semelhança no conteúdo e proporção de aminoácidos também pode relacionar-se com a menor taxa de absorção de nitrogênio em plantas com CVC, que poderia ter impedido a ocorrência de acúmulo de aminoácidos livres. Esta menor absorção em plantas com CVC pode relacionar-se à baixa condutividade do sistema vascular e menor E (Syvertsen & Graham, 1985). Ou seja, se a absorção e fluxo de nitrogênio são mantidos proporcionalmente à condutividade hidráulica do sistema vascular, não havendo limitações para a assimilação, é possível que não ocorra acúmulos de amônia, arginina e prolina. Portanto, estudos sobre o fluxo de nitrogênio em plantas sadias e doentes poderiam dar esclarecimento adicionais sobre o metabolismo nitrogenado das plantas com CVC.

3.3.4. COMPOSTOS FENÓLICOS

Embora o estado energético da planta possa afetar a síntese de compostos fenólicos (Herrmann, 1995), a redução em A e o menor conteúdo de carboidratos solúveis nas plantas com CVC não interferiram na concentração de compostos fenólicos totais neste experimento

(fig.7). Contudo, Martins *et al.* (1999) encontraram aumento na concentração destes compostos fenólicos em plantas com CVC após com aproximadamente 10 anos de infecção. Ora, se as plantas com CVC apresentam reduzida eficiência fotossintética, e ocorre uma diminuição do seu estado energético ao longo do tempo, a maior síntese de compostos pode ser uma resposta de defesa à infecção, independente de uma maior disponibilidade de substrato para a sua síntese. Por outro lado, se não houve aumento na concentração desses compostos neste experimento, quando as plantas estavam manifestando os primeiros sintomas, é provável que haja influência do tempo de infecção para que ocorram as alterações observadas por Martins *et al.* (1999).

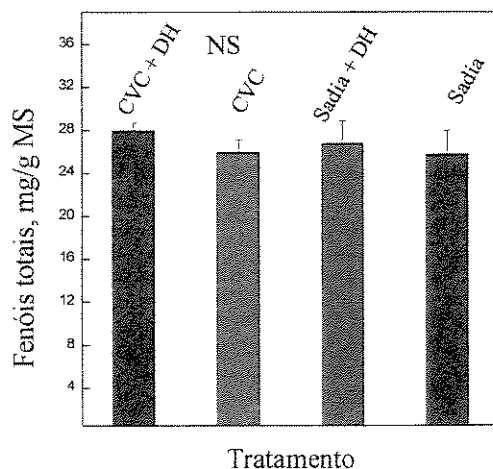


Figura 7. Concentração de compostos fenólicos totais equivalentes ao ácido fênico medido em folhas de laranja 'Pêra' sadias e com CVC e submetidas à deficiência hídrica (DH).

As reações de defesa dos citros podem se manifestar rapidamente após a inoculação de patógenos. Aumento na concentração de escoparone de 20 para 450 µg/g de massa fresca foi observado em raízes de algumas espécies tolerantes a *Phytophthora citrophthora* após 4 dias da inoculação do patógeno (Afek & Sztejnberg, 1988). A concentração de outra fitoalexina, a umbeliferona (7-hidroxycumarina), aumentou cerca de 10 vezes em quatro dias após a inoculação com *Penicillium digitatum* na casca de frutos cítricos verdes. Também não houve modificações na concentração de escoparone nem no conteúdo dos outros dois fenóis analisados nas plantas com CVC com ou sem deficiência hídrica (fig. 8). O acúmulo rápido de fitoalexinas, em resposta ao ataque do patógeno, depende da presença de bioelicitores que são reconhecidos pelas células do hospedeiro por receptores protéicos na membrana plasmática. Estes receptores comandam várias respostas que resultam na ativação de genes relacionados à síntese de compostos fenólicos (Hammond-Kosack & Jones, 1996). Como não houve resposta nesse experimento para acúmulo de compostos fenólicos, podemos sugerir que na relação entre *X. fastidiosa* e laranjeiras não houve a indução para este tipo de respostas de defesa.

O acúmulo de fenóis encontrado por Martins *et al.* (1999) pode então se relacionar ao longo período de desenvolvimento da doença e neste caso, pode ter ocorrido em resposta às injúrias provocadas pela bactéria ao longo do tempo de infecção. Este acúmulo é importante e, mesmo que tardio, pode reduzir o avanço da doença (Alfano & Collmer 1995; Dixon & Paiva, 1995).

Diversos compostos fenólicos como o ácido p-cumárico, ácido caféico, ácido clorogênico e salicílico são inibidores da abertura estomática em *Commelina communis* (Plumbe & Willmer, 1986). A manutenção no perfil de fenóis das plantas com CVC sugere que, a menor condutância estomática em plantas doentes (Fig. 5) não possui relação com acúmulo de fenóis.

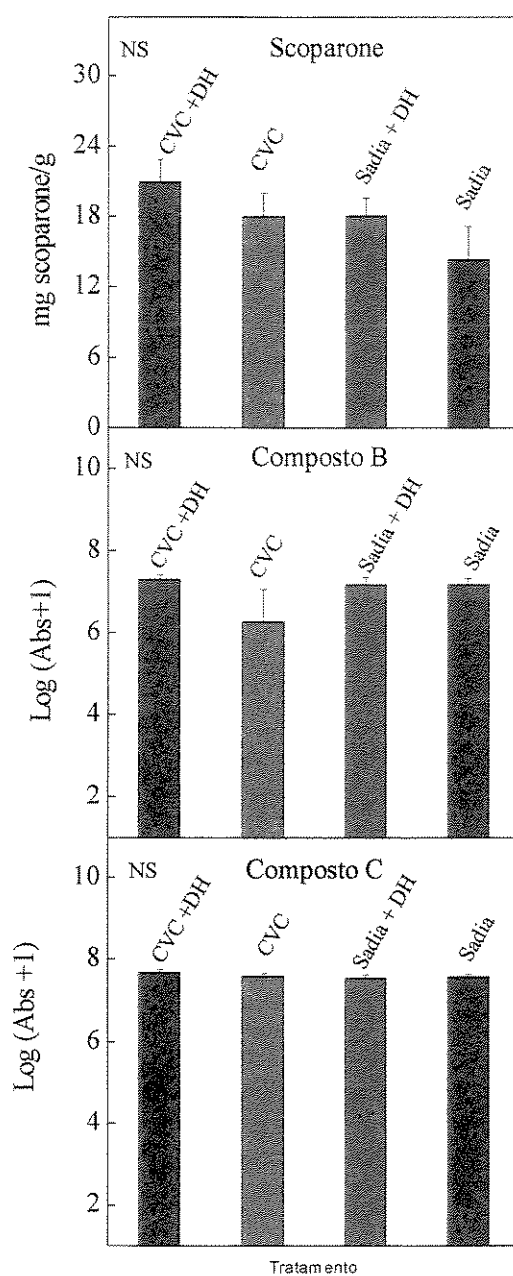


Figura 8. Concentração de diferentes compostos fenólicos medidos em HPLC em folhas de laranjeira 'Pêra' sadias e com CVC e submetidas à deficiência hídrica (DH).

3.3.5. ATIVIDADE DE PEROXIDASES

Em plantas com CVC a atividade da peroxidase foi semelhante a das plantas sadias. Também não houve interferência da deficiência hídrica (fig. 9). Os perfis eletroforéticos de izoenzimas também foram semelhantes e coerentes com o estudo de Vallejos (1993) que encontrou apenas uma izoenzima nos tecidos foliares de citros (figs. 10 e 11).

Como a atividade dessa enzima está relacionada com a síntese de compostos fenólicos e produção de ligninas (Vera-Estrella *et al.*, 1992; Baker & Orlandi, 1995; Bolwell *et al.*, 1995), os resultados foram coerentes com aqueles obtidos com os compostos fenólicos onde também não houve incremento na suas sínteses. O mesmo posicionamento das bandas protéicas no gel obtidas nas reações com seringaldazina e guaiacol sugere que as izoenzimas estejam relacionadas com o processo de lignificação natural da planta, funcionando como seringaldazinas oxidases (Goldberg *et al.*, 1983; Catesson, 1992).

O aumento de peroxidases também se dá em função de injúrias nos tecidos. Danos na membrana plasmática, resultantes da ruptura mecânica ou por ação proteolítica, ativam as peroxidases que estão nas membranas (Baker & Orlandi, 1995). A fig. 9 mostra que na presença de sintomas de CVC, há aumento na atividade da peroxidase e pode estar relacionada as injúrias nos tecidos resultantes da infecção. Queiroz-Voltan & Paradela Filho (1999) observaram a destruição de cloroplastos nas regiões cloróticas das plantas com CVC. Estas lesões podem vir a ocorrer com o próprio estado de desidratação que as folhas das plantas doentes são submetidas pelo entupimento do sistema vascular. A intensificação do estresse poderia concentrar íons, cristalizar enzimas, promover desacoplamento de membranas e destruição de organelas (Kaiser, 1987; Chaves, 1991).

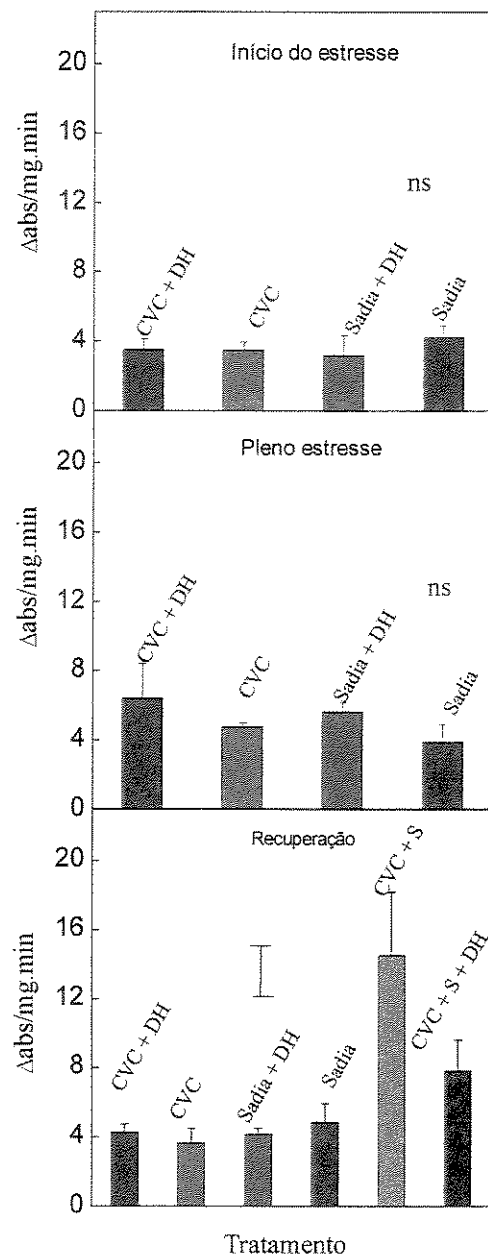


Figura 9. Atividade de peroxidase medida em folhas de laranjeira 'Pêra' sadia e com CVC, sem sintomas (CVC) e com sintomas (S) e submetidas à deficiência hídrica (DH).

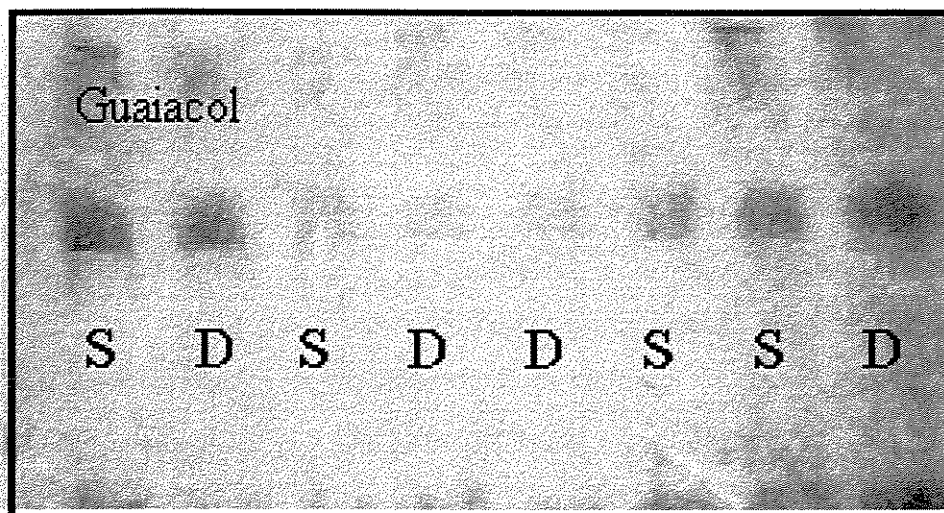


Figura 10. Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida a 12%, para a identificação de isoenzimas de peroxidases em folhas de laranjeiras 'Pêra' sadias (S) e com CVC (D) tendo como substrato o guaiacol.

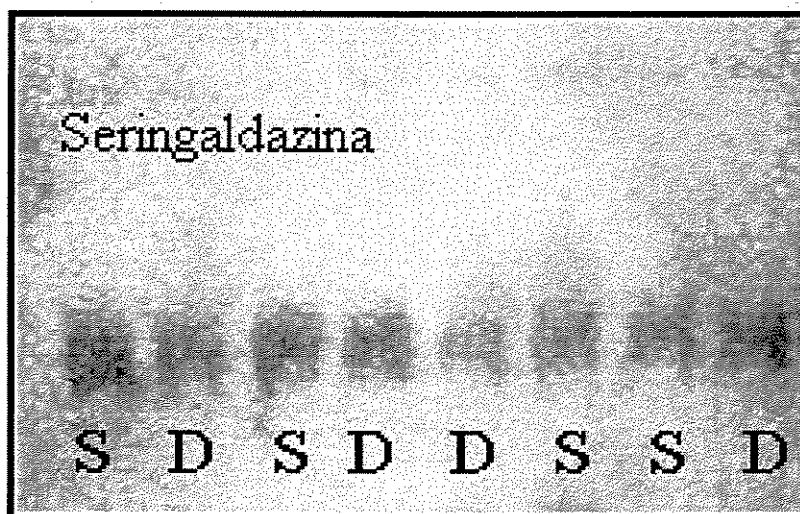


Figura 11. Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida a 12%, para a identificação de isoenzimas de peroxidases em folhas de laranjeiras 'Pêra' sadias (S) e com CVC (D) tendo como substrato a seringaldazina.

Assim, o aumento na atividade de peroxidase encontrada em plantas com CVC por Martins *et al.* (1999) pode estar relacionado ao estágio de infecção que a planta se encontrava, embora, mesmo que tardio, seja uma importante reação de defesa para conter o avanço da colonização da bactéria neste estágio de infecção. A aplicação do estresse reduziu a atividade de peroxidase em folhas com sintomas (fig. 9), devido a menor síntese de proteínas em plantas submetidas ao estresse (Paleg & Aspinall, 1981, Rabe, 1990). Isto pode reduzir a eficácia de bloqueio ao desenvolvimento do patógeno tornando a planta mais vulnerável.

Muitas vezes, o desenvolvimento dos sintomas devido a *X. fastidiosa* está condicionado á presenças de estresses adicionais e a tolerância de algumas espécies e cultivares relacionada à anatomia do xilema e a capacidade de suportar a perda de parte dos tecidos obstruídos pela colonização sistêmica (Hopkins, 1989; Purcell & Hopkins, 1996). Estirpes da bactéria têm desenvolvido patogenicidade maior em certas plantas, devido á sua maior capacidade de multiplicação e colonização da bactéria nos xilema (Hopkins, 1989; Purcell & Hopkins, 1996, Leite *et al.*, 2001).

Desta forma, uma redução na atividade de peroxidase sob situação de estresse pode facilitar a maior colonização dos tecidos e agravar a severidade da doença. Outras enzimas relacionadas aos compostos de defesa também tiveram a atividade diminuída sob deficiência hídrica como, por exemplo, a queda na atividade de PAL observada por Dunn *et al.* (1998). Estes dados corroboram a hipótese de Boyer (1995), que atribuiu a maior susceptibilidade das plantas sob estresse a menor síntese de compostos de defesa. Isto também poderia justificar em parte o maior desenvolvimento da doença em locais de maior ocorrência da deficiência hídrica no Estado de São Paulo, ou os resultados abordados do capítulo I, em relação ao desenvolvimento da CVC nas plantas submetidas à deficiência hídrica.

3.4. CONCLUSÕES

A composição dos açúcares solúveis, aminoácidos livres, fenóis e a atividade de peroxidases em folhas de laranjeiras 'Pêra' com CVC não foram afetadas até os 9 meses após a infecção com *X. fastidiosa*. No entanto, a taxa de assimilação de CO₂, a transpiração e a condutância estomática foram significativamente alteradas, sofrendo quedas relacionadas com o desbalanço das relações hídricas nas plantas com CVC. Tais resultados indicam que o hábito da bactéria colonizar o xilema, causando desbalanço hídrico é o principal fator de patogenicidade da *X. fastidiosa*.

A deficiência hídrica interferiu na atividade de peroxidases, somente em laranjeiras 'Pêra' com sintomas de CVC. Assim a ocorrência de deficiência hídrica pode prejudicar os mecanismos de defesa da plantas, justificando o maior desenvolvimento da doença quando as plantas são submetidas à deficiência hídrica.

4. LITERATURA CITADA

- Abeles, F.B. & Biles, C.L., 1991. Characterization of peroxidases in lignifying peach fruit endocarp. *Pant Physiol.* 85: 269-273.
- Afek, U. & Sztejnberg, A., 1988. Accumulation of scoparone, a phytoalexin associated with resistance of *Citrus* to *Phytophthora citrophthora*. *Phytopatol.* 78:1678-1682.
- Alfano, J. R. & Collmer, A., 1996. Bacterial Pathogens in plants: Life up against the wall. *Plant Cell.* 8:1683-1698.
- Amorim, L.; Bergamin F°, A.; Palazzo, D. A.; Bassanezi, R. B.; Godoy, C. V.; Torres, G. A. M., 1993. Clorose variegada dos citros: uma escala diagramática para avaliação da severidade da doença. *Fitopatol. Bras.* 18(2):174-180.
- Anderson, P. C. & French, W. J., 1987. Biophysical characteristics of peach trees infected with phony peach disease. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 31:25-40.
- Appel, D.N., & Stipes, R. J., 1984. Canker expansion on water-stressed pin oaks colonized by *Endothia gyrosa*. *Plant Dis.*, 68: 851-53.
- Aritmo, Y., Homma, Y. & Osawa, T., 1986. Studies on *Citrus* melanose and *Citrus* stem-end rot by *Diaporth citri* (Faw.) Wolf. 9. Effect of light and temperature on the self-defense reaction of *Citrus plants*. *Ann. Phytophatol. Soc. Jpn.* 54:282-289.
- Baker, C.J. & Orlandi, E.W., 1995. Active oxygen in plant pathogenesis. *Annu.Rev. Phytopatol.* 33: 229-322.
- Banhwart, W.L., Porter, T.C., Granato, T.C. & Hassett, J.J., 1985. HPLC separation and wavelength area ratios of more than 50 phenolic acids and flavonoides. *J.Chem. Ecol.* 11:383-395.
- Beart, J. E., Lilley, T. H. & Haslam, E., 1985. Plant polyphenols secondary metabolism and chemical defense: some observations. *Phytochem.*, 24:33-8.

- Beckman, C. H. & Halmos, S. 1962. Relation of vascular occluding reactions in banana roots to pathogenicity of root-invading fungi. *Phytopathol.* 52:893-897.
- Beckman, C.H., Mueller, W. C. & Mace, M. E., 1974. The stabilization of artificial and natural cell wall membranes by phenolic infusion and its relation to wilt disease resistance. *Phytopathology* 64:1214-1220.
- Bell, A.A. 1981. Biochemistry mechanisms of disease resistance. *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 32: 21-81.
- Beel, A.A. & Presley, J.T., 1969. Temperature effects upon resistance and phytoalexin synthesis in cotton inoculated with *Verticillium albo-atrum*. *Phytopathol.* 59:1141-6.
- Bertrand, P.F., English, H., Uriu, K. & Schick, F.J., 1976. Late season water deficits and development of *Cytospora* canker of French prune. *Phytopathology* 66: 1318-20.
- Bielek, R. L. & Turner, N. A., 1966. Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thin layer electrophoresis and chromatography. *Anal. Biochem.* 17:278-282.
- Bolwell, G.P, Butt, V.S., Davies, D.R. & Zimmerlin, A. 1995. The origin of the oxidative burst in plants. *Free Rad.Res.Comm.* 23: 517-532.
- Boyer, J. S., 1995. Biochemical and biophysical aspects of water deficits and the predisposition to disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 33:251-274.
- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Burgoyne, R. F., 1993. Determining amino acid composition. *Bio Technol.* 11: 1302-1304.
- Catesson, A.M., 1992. Plant peroxidases and cell differentiation cyto and histological aspects. IN: Plant peroxidases 1980-1990. Topics and detailed literature on molecular, biochemical, and physiological aspects (C. Penel, T. Gaspar & H. Greppin eds.). University of Geneva, Geneva, pp 117-124.

- Chang, C. J.; Garnier, M.; Zreik, L.; Rossetti, V.; Bové, J. M., 1993. Culture and serological detection of the xylem-limited bacterium causing citrus variegated chlorosis and its identification as a strain of *Xylella fastidiosa*. *Curr. Microbiol.*, 27:137-142.
- Chaves, M., 1991. Effects of water deficits on carbon assimilation. *J. Exp. Bot.* 42(234):1-16.
- Chaves, M.M., 1995. Carbon assimilation by plants under water and high temperature stress regulation at the leaf and the whole plant level. In: V Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal. Lavras, Brasil, conferências, p75.
- Costerton, J. W. & Irwin, R. T., 1981. The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Annu. Ver. Microbiol.* 35:299-324.
- Culianez, F., Martín, B., Guerri, J., & Tadeo, J.L. 1981. Proteins and amino acids changes in citrus organs during the fruiting period. IN: V International Society of Citriculture Congresses. Japão, proceedings. 556-571.
- Davis, M.J., 1989. Host colonization and pathogens in plant diseases caused by fastidious xylem-inhabiting bacteria. In *Vascular Wilt Diseases of Plant*, (E.C. Tjamos and C.H. Beckman, eds.), Springer-Verlag, Berlin, pp. 33-50.
- Davis, M.J., French, W.K., Schaad, N. W., 1981. Axenic culture of the bacteria associated with phony disease of peach and plum leaf scald. *Curr. Microbiol.* 6:309-14. 1981.
- Davis, M.J. Purcell, A.H. & Thomson, S.V., 1980. Isolation media for Pierce's disease bacterium. *Phytopathol.*, 70: 425-429.
- Davis, M.J., Whitcomb, R.F. & Gillaspie Jr., A.G., 1980. Fastidious bacteria of plant vascular tissue and invertebrates (including so called rickettsia-like bacteria). IN: *The Prokaryotes: A Handbook of Bacteria*, (M.P. Starr, H. Stolp, H.G., Truper, A Balows & H.G. Schlegel, eds.). Springer- Verlag., Heidelberg pp. 2172-88.

- Debois, M. K., Giller, K.A., Hamilton, J.K., Ribers, P.A. & Smith, T., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28: 360-356.
- DeJong, T.M. & Doyle, J.F., 1984. Leaf gas exchange and growth responses of mature "Fantasia" nectarine tree to Paclobutrazol. *J. Amer. Soc. Hortic. Sci.* 109: 978-82.
- DeLange, J. H., Vincent, A. P., Du Plessis, L. M., Van Wyk, P.J. & Ackerman, L.G. J., 1976. Scoparone (6,7-dimethoxycoumarin) induced in *Citrus* peel by black spot, *Guignardia citricarpa* Kiely. *Phytophylactica* 8: 83-84.
- Dimond, A.E., 1970. Biophysics and biochemistry of the vascular wilt syndrome. *Ann. Ver. Phytopathol.* 8: 301-22.
- Dixon, R. A. & Paiva, N. L., 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7: 1085-1111.
- Domingo, R., 1994. Respuesta del limonero Fino al riego deficitario controlado. Aspectos fisiológicos. Tesis Doctoral. Universidade de Mursia. 237 pp.
- Dow, J. M. & Daniels, M. J. 2000. *Xylella* genomics and bacterial pathogenicity to plants. *Yest* 17: 263-271.
- Dryden, P. & Van Alfen, N.K., 1983. Use of the pressure bomb for hydraulic conductance studies. *J. Exp. Bot.*, 34: 523-28.
- Dunn, D.C.; Duncan, L.W. & Romeo, J., 1998. Changes in arginine, PAL activity, and nematode Behavior in salinity stressed citrus. *Phytochemistry*. 49: 413-417.
- Durbin, R. D., 1991. Bacterial phytotoxins: Mechanisms of action. *Experientia* 47:776-783.
- Elgersma, D. M., 1973. Tylose formation in elms after inoculation with *Ceratocystis ulmi*, a possible resistance mechanism. *Neth J. Plant. Pathol.* 79:218-220.
- Erez, A., 1984. Dwarfing peaches by pruning and by paclobutrazol. *Acta Hort.* 146: 235-41.

- Evert, D. R., 1987. Influence of phony disease of peach on stem hydraulic conductivity and leaf xylem pressure potential. J. Am. Soc. Hort. Sci. 112:1032-1036.
- Evert, D.R. & Mullinix Jr., B.G., 1983. Xylem water potential of peach trees infected with phony disease. HortSci. 18:719-21.
- Farquhar, G.D. & Sharkey, T.D., 1982. Stomatal conductance and photosynthesis. Annu. Rev. Plant Physiol. 33: 317-345.
- Fereres, E., Cruz-Romero, G., Hoffman, G.J. & Rawlins, S.L., 1979. Recovery of orange trees following severe water stress. J. Ap. Ecol., 16:833-842.
- Fougere, T., Le, R.D. & Streater, J.G., 1991. Effects of salt stress on amino acid, organic acid, and carbohydrates composition of roots, bacterioids, and cytosol of alfafa (*Medicago sativa*, L.). Plant Physiology 96, 1228-1234.
- French, W.J. & Kitajima, E.W., 1978. Occurrence of plum leaf scald in Brazil and Paraguay. Plant Dis. Reprtr. 62:1035-38.
- French, W.K. & Stassi, D.L., 1978. Response of phony-infected peach trees with gibberellic acid. HortSci. 13:158-59.
- Freudenberg, K., 1965. Lignin: its constitution and formation from p-hydroxycinnamyl alcohols. Sci. 148: 595-600.
- Friend, J., 1981. Alterations in secondary metabolism. IN: Effect of disease on the physiology of the growing plant (P. G. Ayres ed.). Cambridge University Press, Cambridge, p. 179-200.
- Fry, S. M. & Milholland, 1990a. Response of resistant, tolerant and susceptible grapevine tissues to invasion by the Pierce's disease bacterium, *Xylella fastidiosa*. Phytopathol. 80: 66:69.

- Fry, S. M. & Milholland, 1990b. Multiplication and translocation of *Xylella fastidiosa* in petioles and stems of grapevine resistant, tolerant, and susceptible to Pierce's disease. *Phytopathol.* 80: 61-65.
- Fundecitrus, 1999. Home page do Fundo Paulista de Defesa da Citricultura <http://www.fundecitrus.com.br>.
- Gardner, J. M., Feldman, A. W., & Stamper, D. H., 1983. Role and fate of bacteria in vascular occlusions of citrus. *Physiol. Plant Pathol.* 23: 295-309.
- Gaspar, T., Penel, C., Thorpe, T. & Greppin, H., 1982. Peroxydases 1970-1980: a survey of their biochemical and physiological roles in higher plants. University of Geneva Press, Geneva, 324p.
- Goldberg, R., Catesson, A.M., Czaninsk, Y., 1983. Some properties of syringaldazine oxidase, a peroxidase specifically involved in the lignification processes. *Z. Pflanzenphysiol. Bd.*, 110: 123-127
- Goldschmidt, E. E. & Golomb, A., 1982. The carbohydrate balance of alternate bearing citrus trees and the significance for reserves for flowering and fruiting. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 107:206-209.
- Goldschmidt, E. E. & Koch, K. E., 1996. Citrus. IN: Photoassimilate distribution in plants and crops. Source-sink relationships (E. Zamski & A. A. Schaffer, eds.), Marcel Dekker Inc., New York, pp. 797-823.
- Gomes, M.M.A., 2001. Trocas gasosas, relações hídricas e hormonais de laranja 'Pêra' infectada com *Xylella fastidiosa* e submetidas à deficiência hídrica. Universidade de Campinas, Campinas, Brasil, tese de Doutorado.

- Goodman, R.N., Király, Z. & Wood., K.R. 1986. Growth regulator metabolism. In: Biochemistry and Physiology of Plant Disease. University of Missouri Press, Columbia, p. 245-286.
- Goodman, R. N., Király, Z., Wood, K.R. Secondary metabolite 1996. IN: The biochemistry and physiology of plant disease (R. N. Goodman ed.). University of Missouri Press, pp 211-224.
- Goodwin, P. H., De Vay, J. E., & Meredith, C. P., 1988a. Physiological responses of *Vitis vinifera* cv. 'Chardonnay' to infection by the Pierce's disease bacterium. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 32:17-32.
- Goodwin, P. H., De Vay, J. E. & Meredith, C. P., 1988b. Roles of water stress and phytotoxins in the development of Pierce's disease of the grapevine. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 32: 1-15.
- Gottwald, T. R., Gidtti, F. B., Santos, J. M. & Carvalho, A. C., 1993. Preliminary spatial and temporal analysis of Citrus Variegated Chlorosis (CVC) in São Paulo, Brasil. IN: Conference of the International Organization of Citrus Virologists, 12, Riverside. Proceedings...p. 327-335.
- Graniti, A., 1991. Phytotoxins and their involviment in plant deseases. *Introducion. Experientia* 47: 751- 55.
- Gravena, S., De Negri, J. D., Quaggio, J. A., Gonzalez, M. A., Pinto, W. B. & Basile, G. B., 1997. Manejo de cigarrinhas em CVC no Pomar. IN: Clorose Variegada dos Citros (L.C. Donadio & C.S. Moreira eds.) 1ª ed. Fundecitrus. Bebedouro. 162p.
- Grison, R. & Pilet, P.E., 1985. Cytoplasmic and wall isoperoxidases in growing maize roots. *J. Plant Physiol.*, 118: 189-199.

- Grupo Paulista de Adubação e Calagem para Citros, 1994. Recomendação de adubação e calagem para citros no Estado de São Paulo. Laranja, Edição especial. 28p.
- Habermann, G., 1999. Trocas gasosas e relações hídricas em laranjeiras-doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck cv. Pera) com clorose variegada dos citros (CVC). Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Brasil, dissertação de Mestrado.
- Hahlbrock, K. & Scheel, D., 1989. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 40:347-369.
- Hale, M.G. & Orcutt, D. M., 1987. The physiology of plants under stress. John Willey, New York, pp.26-43.
- Hamill, D.E. & Brewbaker, J.L. 1969. Isoenzyme polymorphism in flowering plants IV. The peroxidase isoenzyme of maize (*Zea mays*) *Physiol. Plant.* 22: 945-958.
- Hammond-Kosack, K. E. & Jones, J.D.G., 1996. Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell*, 8: 1773-1791.
- Handa, S., Bressan, R.A., Handa, A.K., Carpita, N.C. & Hasegawa, P.M. 1983. Solutes contributing to osmotic adjustment in cultured plant cells adapted to water stress. *Plant Physiol.* 73: 834-843.
- Hanks, R. W. & Feldman, A.W., 1963. Use of arginine and total amino acids to determine site and stress in *Citrus* trees with young tree decline. IN: VI IOCV Conference, Swaziland, proceedings. Pp 184-190.
- Hanson, K.R. & Havir, E.A., 1981. Phenyllalanine ammonia-lyase. IN: *Biochemistry of Plants* (P.K. Stumpf & E.E.Conn eds.), Academic Press, New York, pp 577-626.
- Hanson, A.D. & Hitz, W.D., 1982. Metabolic responses of mesophytes to plant water deficits. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 73: 160-203.

- Hare, P.D. & Cress, W. A., 1997. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Reg.* 21: 79-102.
- Hare, P.D., Cress, W.A. & Van Staden, J., 1998. Dissecting the holes of osmolyte accumulation during stress. *Plant Cell Environ.* 21: 535-553.
- Hartung, W., Radin, J.W. & Hendrix, D.L., 1988. Absciscic acid movement into the apoplastic solution of water-stressed cotton leaves. Role of apoplastic pH. *Plant Physiol.* 86:908-913.
- Hartung, W. & Radin, J.W., 1989. Absciscic acid in the mesophyll apoplast and in the root xylem sap of water stressed plants. The significance of pH gradients. *Curr. Top Plant Biochem. Physiol.* 8: 110-124.
- Hartung, W., Radin, J.W. & Hendrik, D.L., 1988. Absciscic acid movement into the apoplastic solution of water stressed cotton leaves: role of apoplastic pH. *Plant Physiol.* 86:908-13.
- Hartung, W.; Slovik, S.; Baier, M., 1990. pH changes and redistribution of absciscic acid within the leaf under stress. IN: Importance of Root to Shoot Communication in the Responses to environmental Stress, Monograph 21. (W. J. Davies B. & Jeffcoat, eds.). British Society for Plant Growth Regulation, Bristol, pp.215-236.
- Hartung, W., Wilkinson, S., & Davies, W. J., 1998. Factors that regulate absciscic acid concentrations at the primary site of action at the guard cell. *J. Exp. Bot.*, 49: 361-367.
- Hearon, S.S. Sherald, J. L., & Kostka, S.J., 1980. Association of xylem-limited bacteria with elm, sycamore, and oak leaf scorch. *Can. J. Bot.* 58: 1986-93.
- Herrmann, K. M., 1995. The shikimate pathway: early steps in biosynthesis of aromatic compounds. *Plant Cell.* 7:907-919.
- Hewit W.B., Frazier N.W. & Freitag, J.H. 1949. Pierce's disease investigations. *Hilgardia* 19: 207-64.

- Hoagland, R. E., 1990. Biochemical responses of plant to pathogens. IN: Microbes and microbial products as herbicides (R. E. Hoagland ed.). American Chemical Society, Washington, pp 87-113.
- Hopkins, D.L., 1981. Seasonal concentration of the pearce's disease bacterium in grapevine stems, petioles, and leaf veins. *Phytopathol.* 74: 415-418.
- Hopkins, D.L., 1983. Gram-negative, xylem-limited bacteria in plant disease. *Phytopathol.* 73:347-50.
- Hopkins, D.L., 1985. Effects of plant growth regulators on development of Pierce's disease symptoms in grapevine. *Plant Dis.* 69: 944-946.
- Hopkins, D. L., 1988. Production of diagnostic symptoms of blight in Citrus inoculated with *Xylella fastidiosa*. *Plant Dis.* 72:432-435.
- Hopkins, D.L. 1989. *Xylella fastidiosa*: xylem-limited bacterial pathogen of plants. *Ann. Rev. Phytopatol.* 27:271-290.
- Hopkins, D.L & Thompson, C.M., 1984. Seasonal concentration of Pierce's disease bacterium on 'Carlos' and 'Welder' muscadine grapes compared with 'Schuyler' bunch grape. *HortSci.* 19:419-420.
- Hsiao, T.C. & Xu, L.K. 2000. Sensitivity of growth of roots versus leaves to water stress: biophysical analysis and relation to water transport. *J. Exp. Bot.* 51:1595-1616.
- Huang, A.H.C. & Cavalieri, 1979. Proline oxidase and water stress-induced proline accumulation in spinach leaves. *Plant Physiol.* 63: 531-535.
- Huang, P. Y., Milholland, R.D. & Daykin, M.E., 1986. Structural and morphological changes associated with the Piarse's disease bacterium in bunch and muscadine grape tissues. *Phytopathol.* 76: 1232-38.
- Huber, D.M., 1980. The role of mineral nutrition in defense. IN: Plant disease: an advanced

- treatise. How plants defend themselves (J.G. Horsfall & E.B. Cowing eds.). Academic Press, New York, v.5, pp. 385-406.
- Husain, A. & Kelman, A. 1958. Relation of slime production to mechanism of wilting and pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum*. Phytopathol. 48:115-65.
- Ingram J. & Bartels, D., 1996. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. Ann. Rev. Plant. Physiol. Mol. Biol. 47:377-433.
- Itai, C. & Paleg, L.G., 1982. Responses of water-stressed *Hordeum distichum* L. and *Cucumis sativus* to proline and betaine. Plant Sci Lett. 25: 329-335.
- Jarret, H. W., Coosky, K. D., Ellis, B. & Anderson, J. M., 1986. The separation of o-phthalaldehyde derivatives of amino acids by reversed-phase chromatography on octylsilica column. Anal. Biochem. 153:189-198.
- Kaiser, W.M., 1987. Effects of water deficit on photosynthetic capacity. Physiol. Plant. 71: 142-149.
- Katzen, F., Ferreira, D. U., Oddo, C. G., Ielmini, V., Becker, A., Puhler, A. & Ielpi, K., 1998. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum mutants: effects on xanthan biosynthesis and plant virulence. J. Bacteriol. 180:1607-17.
- Kaufmann, M., 1968. Evaluation of the pressure chamber method for measurement of water stress in citrus. Proc. Am. Soc. Hort. Sci., 93:186-198.
- Khairi, M. M. A., Hall, A. E., 1976a. Comparative studies of net photosynthesis and transpiration of some citrus species and relatives. Physiol. Plant. 36:35-39.
- Khairi, M. M. A., Hall, A. E., 1976b. Temperature and humidity effects on net photosynthesis and transpiration of citrus. Physiol. Plant. 36:29-34.
- Kitajima, E.W. Balarcic, M. & Fernandes-Valiela, M.V., 1975. Association of rickettsia-like bacteria with plum leaf scald disease. Phytopathology, 65: 476-79.

- Kostka, S. J., Tattar, T. A. & Sherald, J. L., 1986. Elm leaf scorch: abnormal physiology in American elms infected with fastidious, xylem-inhabiting bacteria. *Can. J. For. Res.* 16: 1088-91.
- Kramer, P. J. & Boyer, J.S., 1995. *Water relations of plants and soils*. Orlando: Academic Press.
- Kriedemann, P. E. & Barrs, H.D., 1981. Citrus orchards. In: *Water deficits and plant growth*. VI. Woody plant communities (T.T. Kozlowski, ed.). Academic Press, London. p 325-418.
- Krügner, T.L., 1978. Ação do ambiente sobre doenças de plantas. IN: *Manual de Fitopatologia - Princípios e Conceitos v.1* (F. Galli, ed.) Editora Agronômica Ceres, São Paulo, pp. 215-226.
- Kuc', J., 1987. Plant immunization and its applicability for disease control. IN: *Innovative approaches to plant disease control* (J. Chet ed.). John Wiley & Sons, New York, pp. 255-274.
- Kuc', J., 1995. Phytoalexins, stress metabolism, and disease resistance in plants. *Ann. Rev. Phytopathol.* 33: 275-297.
- Labanauskas, C.K., Stolzy, L. H. & Handy, M.F., 1974. Soil oxygen and *Phytophthora* spp. root infestation effects on the protein and free amino acids in lemon and orange leaves. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 99: 497-500.
- Laisk, A. & Oja, V. 1998. *Dynamics of leaf photosynthesis. Rapid-response measurements and their interpretations*. Csiro Publishing, Collingwood. 160p.
- Laranjeira, F. F., 1997. Dez anos de clorose variegada dos citros. O que sabemos?. *Laranja* 18 (1): 123-142.
- Larcher, W., 2000. *Ecofisiologia Vegetal*. Rima, São Carlos, 531 p.

- Lavon, R., Goldschmidt, E. E., Salomon, R. & Frank, A., 1995. Effect of potassium, magnesium and calcium deficiencies on carbohydrate pools and metabolism in *Citrus* leaves. J. Am. Soc. Hortic. Sci 120:54-58.
- Lawlor, D.W. 1994. Relation between carbon and nitrogen assimilation, tissue composition and whole plant function. IN: A whole plant perspective on carbon-nitrogen interactions (J. Roy & E. Garnier eds.). SPB Academic Publishing Co., The Hague.
- Lea, J.P., 1997. Primary Nitrogen Metabolism. IN: Plant Biochemistry (P.M. Dey & J.B. Harbone), 1^a ed. Academic Press, London. pp 273-313.
- Lee, R. R. Raju, B. C., Nyland, G. & Gohenn, A. C., 1982. Phytotoxin(s) produced in culture by Pierce's disease bacterium. Phytopathol. 72:886-88.
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L., & Cox, M. M., 1993. Principles of biochemistry. Worth publishers, New York, 1013 p.
- Leite, B., Ishida, M.L., Alves, E., Pascholati, S. F. & Sugui, J. A. 2000. Detection of calcium in the adhesive material obtained from the plant pathogen *Colletotrichum graminicola*: X ray microanalysis (EDS) evidences. Proc. Microsc. Microanal. 6:698-699.
- Leite, B., Pascholati, S. F., Kitajima, E. W. & Ishida. 2001. Mecanismo de adesão de bactérias e fungos às plantas hospedeiras. Rev. Anu. Patol. Plant. 9:1-40.
- Leite, B., Roncato, L.D.B., Pascholati, S.F. & Lambais, M.R., 1997. Reconhecimento e transdução de sinais moleculares em interações planta-fungos patogênicos. Rev. Anu. Pato. Plant. 5:235-80.
- Lima, J. E. O., Coutinho, A., Roberto, S. R., Miranda, V. S., Carlos, E. F., Salva, R. & Massari, C., 1996. New developments on citrus variegated chlorosis research at Fundecitrus, Brazil. Proc. Int. Soc. Citric. 1:435-439.

- Lloyd, J. Kriedemann, P.E. & Aspinall, D., 1989. Comparative sensitivity of Prior Lisbon lemon and Valencia orange to foliar sodium and chloride concentrations- *Plant Cell Environ.* 12:529-540.
- Lloyd, J. Kriedemann, P.E. & Aspinall, D. 1990. Contrasts between citrus species in response to salinisation: An analysis of photosynthesis and water relations for different rootstock-scion combinations. *Physiol. Plant.* 78: 236-246.
- Lloyd, J. Kriedemann, P.E. & Syvertsen, J.P., 1987. Gas exchange, water relations and ion concentration of leaves on salt stressed 'Valencia' orange, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. *Aust. J. Plant Physiol.* 14: 387-396.
- Loomis, N.H., 1958. Performance of *Vitis* species in the south as an indication of their relative resistance to Pierce's disease. *Plant Dis. Rep.* 42:833-36.
- Lopes, J.R.S. Mecanismos de transmissão de *Xylella fastidiosa* por cigarrinhas. *Laranja*, 17 (1): 79-92.
- Lovatt, C.J., 1986. Salinity stress results in ammonia intoxication. Abstract, *Plant Physiol.* 80 p.10.
- Lovatt, C.J., Sagee, O., Anwar, A.G., Zheng, Y. & Protacio, C.M., 1992. Influência do nitrogênio, carboidratos e reguladores de crescimento em plantas no florescimento, frutificação e produção de citros. IN: Segundo Seminário Internacional de citros (L.C. Donadio, ed.). Fundação Cargill, Campinas pp.27-42.
- Lusso, F.G., 1989. Alteração na atividade e no perfil eletroforético da enzima peroxidase em mesocótilos e folhas de milho (*Zea mays* L.) em resposta à inoculação com *Helmithosporium maydis*, raça 1 e à injúria mecânica. Universidade de São Paulo, Piracicaba, dissertação de Mestrado.

- MacCoy, R.E., 1982. Chronic and insidious disease: the fastidious vascular pathogens. In: Mount, M.S & Lacy, G.H. (eds.), *Phytopathogenic Prokaryotes 1*. New York, Academic Press, p. 475-89.
- Machado, E.C., Medina, C.L., Gomes, M.M.A. & Habermann, G., 2002. Fotossíntese, condutância estomática e potencial da água na folha em laranjeira '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, A. B., Stuchi, E. S. & Pavan, L. C., 2001. Respostas fisiológicas em laranjeira '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., Lagôa, A. M. A., Ticelli, M.; Furlani, P. R., 1994. Trocas gasosas e relações hídricas em laranjeiras com clorose variegada dos citros. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* 6(1):53-57.
- Malavolta, E. & Prates, H.S., 1991. Alterações na composição mineral das folhas de pomares afetados pela anomalia 'amarelinho' ou clorose variegada. *Laranja* 12:315-329.
- Mansfield, J. W., 1983. Antimicrobial compounds. IN: *Biochemical plant pathology* (J. A. Callow. ed.). John Wiley & Sons, Chichester, pp 237-65.
- Martin, J. & Grossman, F., 1972. Inhibition of pectic and cellulolytic enzymes of *Rhysoctonia solani* Kuhn and the influence of some inhibitors on the disease process. *Phytopatol. Zeitz.* 76:38-45.
- Martins, E.M.F., Guzzo, S.D., Palazzo, D.A. & Harakava, R., 1999. Alterações metabólicas constatadas em plantas de laranja 'Natal' infectadas por *Xylella fastidiosa*. *Summa Phytopatol.* 25:288-293.

- Mayama, S., Daly, J.M., Rehfeld., D.W & Daly, C., 1975. Hypersensitive response of near-isogenic wheat carrying the temperature-sensitive Sr6 allele for resistance to stem rust. *Physiol. Plant Pathol.* 7:35-47.
- Mazzafera, P. & Guerreiro Filho, O., 1998. Ultraviolet HPLC- derived profiles as a toll in *Coffea* (Rubiaceae) taxonomy *J.Camp. Biol.*, 3: 15-20.
- McElrone, A. J., Sherald, J.L. & Forseth, I. N., 2001. Effects of water stress on symptomatology and growth of *Parthenocissus quinquefolia* infect by *Xylella fastidiosa*. *Plant Dis.* 85:1160-64.
- Medina, C.L. & Machado, E.C., 1998. Trocas gasosas e relações hídricas em laranjeira ‘Valência’ enxertada sobre limoeiro ‘Cravo’ e Trifoliata e submetida à deficiência hídrica. *Bragantia* 57:15-22.
- Medina, C. L., Machado, E. C., Gomes, M. M. A., 1999. Condutância estomática, transpiração e fotossíntese em laranjeiras ‘Valência’ sob deficiência hídrica. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* 11: 29-34.
- Milburn, J. A. & McKayghlin, M.E., 1974. Studies of cavitation in isolated vascular bundles and whole leaves of *Plantago Major* L. *New Phytol.* 73:861-71.
- Mircetich, S.M., Lowe, S.K., Moller W.J., & Nyland, G., 1976. Etiology of almond leaf scorch disease and transmission of the causal agent. *Phytopathol.* 66:17-24.
- Mollenhauer, H. H. & Hopkins, D.L., 1974. Ultrastructural study of pierce’s disease bacterium in grape xylem tissue. *J. Bacteriol.* 119:612-18.
- Mollenhauer, H. H. & Hopkins, D. L., 1976. Xylem morphology of Pierce’s disease-infected grapevines with different levels of tolerance. *Physiol. Plant Pathol.* 9:95-100
- Nicholson, R.N. & Hammerschmidt, R., 1992. Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annu. Ver. Phytopathol.* 30:369-380.

- Nobel, P. S. 1991. Physicochemical and Environmental Plant Physiology, New York Academic Press.
- Nyland G., Goheen A.C., Lowe S.K. & Kirkpatrick A.C., 1980. The ultrastructure of a rickettsia-like organism from a peach tree affected with phony disease. *Phytopathology*, 63: 1275-78.
- Oliveira, A.C., Garcia, A.N., Medina, C.L. & Machado, E. C., 2000a. Evidencia de gradiente de distribuição de *Xylella fastidiosa* no xilema de folhas de citros. IN: XXXIII Congresso Brasileiro de Fitopatologia. Belém, Brasil, suplemento, *Brazilian Phytopathol* 25: p. 324.
- Oliveira, R. F.; Machado, E. C., Marin, F. R.; Medina, C. L., 2000b. Sap flow rates and stomatal conductance of sweet orange 'Pêra' (*Citrus sinensis* L. Osb.) infected by *Xylella fastidiosa*. IN: IX International Society of Citriculture Congress, Florida, USA, abstracts. p.161.
- Ortolani, A.A., Pedro Jr., M.J. & Alfonsi, R.R., 1991. Agroclimatologia e o cultivo de citros. In: *Citricultura brasileira I* (O. Rodrigues; F. Viégas, J. Pompeu Jr. & A. Amaro, eds.). 2ª ed. Fundação Cargill, Campinas pp.153-195.
- Paradela Filho, O., Sugimori, M. H., Ribeiro, I. J. A., Garcia Junior, A., Beretta, M.J.G., Harakawa, R., Machado, M. A., Laranjeira, F.F., Rodrigues Neto, J. & Berian, L. O. S. 1995. Primeira constatação em cafeeiro no Brasil da *Xylella fastidiosa* causadora da clorose variegada dos citros. *Laranja, Cordeirópolis*, 16 (2): 135-136.
- Pascholati, S. F., & Leite, B., 1994. Mecanismos bioquímicos de resistência às doenças. *Rev. Anu. Patol. Plant.*, 2: 1- 47.
- Paxton, J.D., 1981. Phytoalexins – a working redefinition. *Phytopathol.* 101:106-109.
- Pier, P. A. & Berkiwitz, G. A., 1987. Modulation of water stress effects on photosynthesis by altered leaf K. *Plant. Physiol.* 85:1068-72.

- Plumbe, A. M. & C. M. Willmer, 1986a. Phytoalexins, water stress and stomata. II. The effects of phytoalexins on stomatal responses in epidermal strips and on guard cell protoplasts. *New Phytol.* 102:375-384.
- Plumbe, A. M. & C. M. Willmer, 1986b. Phytoalexins, water stress and stomata. III. The effects of some phenolics, fatty acids and some other compounds on stomatal responses. *New Phytol.* 103:17-22.
- Pooler, M. R. & Hartung, J. S., 1995. Specific PCR detection and identification of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chlorosis. *Curr. Microbiol.* 31:377-381.
- Preiss, J., 1982. Plant Carbohydrates. IN: Macromolecular carbohydrates-Occurrence, Metabolism, function and biosynthesis of starch and its regulation. *Encyclopedia of Plant physiology* (F. A. Loewus & W. Tanner, eds.), vol. 13A, new series, Springer-Verlag, Berlin, pp.395-417.
- Prior L.D.; Eamus, D. & Duff, G.A., 1997. Seasonal and diurnal patterns of carbon assimilation, stomatal conductance and leaf water potential in *Eucalyptus treodonta* sampling in a wet-dry savanna in northern Australia. *Aust. J. Bot.* 45: 241-258.
- Purcell, A. H. & Hopkins, D. L., 1996. Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34:131-151.
- Quaggio, J.A., 1988. Distúrbios nutricionais em citros afetados por CVC. Ata da 1ª reunião do Grupo de Trabalho sobre CVC, Secretaria da Agricultura, SP.
- Queiroz-Voltan, R.B. & Paradela Filho, O., 1999. Caracterização de estruturas anatômicas de citros infectados com *Xylella fastidiosa*. *Laranja*, 20, 55-76.
- Quick, P., Chaves, M. M., Wendler, R., David, M., Rodrigues, M. L., Passarinho, J. S., Pereira, J. S., Adcock, M. D., Leegood, R. C. & Stitt, M., 1992. The effect of water stress

- on photosynthetic carbon metabolism in four species grown under field conditions. *Plant Cell Environ.* 15:25-35.
- Rabe, E., 1990. Stress physiology: The functional significance of the accumulation of nitrogen-containing compounds. *J. Hort. Sci.* 65:231-243.
- Rabe, E. & Lovatt, C.J., 1986. Increased arginine biosynthesis in leaves of phosphorus-deficient *Citrus* and *Poncirus* species. *Plant Physiol.* 76:747-52.
- Raju, B.C., Goheen, A.C. & Frazier, N. W., 1983. Occurrence of Pierce's disease bacteria in plants and vectors in California. *Phytopathol* 73: 1309-13.
- Reimann, C.R., Ringli, C., Dudler, R. 1992. Complementary DNA cloning and sequence analysis of a pathogen-induced putative peroxidase from rice. *Plant Physiol*, 100: 1611-1612.
- Rhodes, D. Handa, S. & Bressan, R.A., 1986. Metabolic changes associated with adaptation of plant cells to water stress *Plant Physiol.* 82: 890-893.
- Rossetti, V.V., 2001. Manual ilustrado de doenças dos citros. Fealq/Fundecitros, Piracicaba, 207 p.
- Rossetti, V. & De Negri, J.D., 1990. Clorose variegada dos citros (CVC), *Laranja* 15:1-14.
- Roulin, S. & Buchala, A. J., 1995. The induction of β -1,3-glucanases and other enzymes in groundnut leaves infected with *Cercospora arachidicola*. *Physiol. Plant. Mol. Pathol.*, 46:471-489.
- Sagee, O. & Lovatt C.J., 1991. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 1991 116-280.
- Salva, R. A., Roberto, S. R. & Carlos, E. F., 1995. Situação da clorose variegada dos citros no Estado de São Paulo. *Laranja*, 16: 155-164.

- Sanches-Ferrer, A. Bru, R. & Garcia-Carmona, F. 1989. Novel procedure for extraction of a latent grape polyphenoloxidase using temperature-induced phase separation in triton x-114. *Plant Physiol.* 91:1481-1487.
- Sanz, A., Monerri, C., González-Ferrer & Guardiola, J., 1987. Changes in carbohydrates and mineral elements in citrus leaves during flowering and fruti set. *Physiol. Plantarum* 69: 93-98.
- Savé, R., Biel, C., Domingo, R., Ruiz-Sánchez, C. & Torrecillas, A., 1995. Some physiological and morphological characteristics of citrus plants for drought resistance. *Plant Sci.* 110:167-172.
- Schulze. E.D., 1986. Carbon dioxide and water vapor exchange in response to drought in the atmosphere and in the soil. *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, 37:247-74.
- Sells, G.D & Koeppe, D.E., 1981. Oxidation of proline by mitochondria isolated from water-stressed maize shoots. *Plant Physiol* 68::1058-1063.
- Sherald, J. L. Weels, J. M., Hurtt, S. S. & Kostka, S. J., 1985. Association of fastidious xylem-bacterium-inhabiting bacteria (FXLB) on American Sycamore. *Phytopathol.* 75: 930-33.
- Sherald, J. L. Weels, J. M., Hurtt, S. S. & Kostka, S. J., 1987. Association of fastidious xylem-bacterium-inhabiting bacteria with leaf scorch in red maple. *Plant Dis.* 71: 930-33.
- Shimidt, C.L., Danneel, H. J., Schultz, G. & Buchanan, B.B., 1990. Shikimate kinase from spinach chloroplasts: Purification, characterization, and regulatory function in aromatic amino acid biosynthesis. *Plant Physiol.*, 93: 758-766.
- Shoeneweiss, D. F., 1983. Drought predisposition to cytospora canker in blue spruce, *Plant Dis.* 67: 383-385.
- Shoeneweiss, D.F., 1986. Water stress predisposition to disease - an overview. In: *Water, fungi and plants* (P.G Ayres & L. Boddy ed.). The Bath Press, Avon pp. 157-174.

- Sinclair, T. R. & Allen Jr., L. H., 1982. Carbon dioxide and water vapor exchange of leaves on field-grown citrus trees. *J. Exp. Bot.* 33:1166-1175.
- Sinclair, W., 1984. The Biochemistry and physiology of the lemon and other citrus fruits. The regents of the University of California, Oakland. 946 p.
- Simpson, A.J.G. *et al.*, 2000. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Nature* 151-59.
- Sperry, J. S. & Tyree, M. T., 1988. Mechanism of water stress induced xylem embolism. *Plant Physiol.* 88:581-87.
- Stewart, I., 1961. Nitrogen transformations in citrus trees. *Soil and Crop Sci. Soc. of Florida*, 21: 272-82.
- Stewart, G. R., Boggess, S.F., Aspinall, L.G. & Paleg, L.G., 1977. Inhibition of proline oxidation by water stress. *Plant Physiol.* 59: 930-32.
- Stewart, G.R, Joly, C.A. & Simirnof, N., 1992. *Oecologia* 91, 511-517.
- Strobel, G. A. & Hess, W. M., 1968. Biological activity of a phytotoxic glycopeptide produced by *Corynebacterium sepedonicum*. *Plant Physiol.* 43:1673-88.
- Storre, B. & Madden, E., 1990. Isolation of subcellular organelles. In: *Methods in enzymology* (M.P.Dutscher, ed.). Academic Press, New York, pp. 203-225.
- Swain, T. & Hillis, W.E., 1959. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. The quantitative analysis of phenolic constituents. *J.Sci. Food Agric.*, 10: 63-68.
- Syvertsen, J.P. 1984. Light acclimation in citrus leaves. II. CO₂ assimilation and light, water, and nitrogen use efficiency. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 109: 812-817.
- Syvertsen, J. P. & Graham, J. H., 1985. Hydraulic conductivity of roots, mineral nutrition, and leaf gas exchange of citrus rootstocks. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 110: 865-869.

- Tadeo, J.L., Calot, M.C., Guerri, J., Martin, B., Legaz, F., Culiñez & Primo-Millo, E., 1984. Amino acid changes in organs of Valencia Late (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck) young trees during the growth cycle. *Proc. Int. Soc. Citriculture* 1:241-245.
- Taiz, L. & Zeiger R., 1991. *Plant Physiology*. Benjamin/Cummings Publishing, Redwood City, 249p.
- Tang, J. L., Liu, Y.N., Barber, C.E., Dow, J.M., Wootton, J.C. & Daniels, M.J., 1991. genetic and molecular analysis of a cluster of rpf genes involved in positive regulation of synthesis of extracellular enzymes and polysaccharide in *Xanthomonas campestris* patovar *campestris*. *Mol. Gen. Genet.* 22:409-17.
- Tardieu, F. & Simonneau, T., 1998. Variability among species of stomatal control under fluctuating soil water status and evaporative demand: modeling isohydric and anisohydric behaviours. *J. Exp. Bot.*, 49: 419-432.
- Teackle, D.S., Smith, P.M. & Steindl D.R.L., 1975. Ratoon stunting disease of sugarcane: possible correlation of resistance with vascular anatomy. *Phytopathol.* 65:138-41.
- Vallejos, C. E., 1983. Enzyme activity staining. In: *Isozymes in Plant Genetics and Breeding*, Part A, (S.D. Tanksley & T. J. Orton, eds.), Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, pp. 469-516.
- Van Alfen, N. K., 1989. Reassessment of plant wilt toxins. *Annu. Rev. Phytopathol.* 27:533-50.
- Van Alfen, N. K. & Allard-Turner, V., 1979. Susceptibility of plants to vascular disruption by macromolecules. *Plant Physiol.* 63:1072-75.
- Van Alfen, N. K., McMillan, B. D. & Dryden, P., 1987. The multi-component extracellular polysaccharide of *Clavibacter michiganense* subsp. *insidiosum*. *Phytopathology* 77:496-501.

- VanderMolen, G. E., Beckman, C. H. & Hodehorst, E., 1977. Vascular gelation: A general response phenomenon following infection. *Physiol. Plant Pathol.* 11:95-100.
- Vera-Estrella, R. Blumwald, E. & Higgins, V.J. 1993. Non-specific glycopeptide elicitors of *Cladosporium fulvum*: evidence for involvement of active oxygen species in elicitor-induced effects on tomato cell suspensions. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* 42:9-22.
- Vitti, G.C., Marchi, R.J., Borella, M.L. & Vaz Filho, D., 1989. Estudo de prováveis desequilíbrios nutricionais em pomares cítricos no município de Colina-SP, FCAV, Unesp, Jaboticabal, 12p.
- Vu, J.C.V. & Yelenosky, G., 1988. Solar irradiance and drought stress effects on the activity and concentration of ribulose bophosphate carboxylase in 'Valencia' orange leaves. *Isr. J. Bot.* 37:245-56.
- Vu, J.C.V., Yelenosky, G. & Bausher, M.G., 1986. CO₂ exchange rate, stomatal conductance, and transpiration in attached leaves of Valencia orange. *HortSci.* 21:143-144.
- Wells J.M., Raju B.C., Hung H.Y., Weis-Berg. W.G., Mandelco-Paul, *et al.*, 1987. *Xylella fastidiosa* new-genus new-species Gran-negative xylem-limited fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37: 136-43.
- Whetten, R. & Sederoff, R., 1995. Lignin Biosynthesis. *Plant Cell* 7: 1001-1013.
- Wiebe, H.H., Grerr, R.L., & Van Alfen, N.K., 1984. Frequency and grouping of vessel endings in alfafa (*Medicago sativa*) shoots. *New Phytol.* 97: 583-90.
- Wilkinson, S. & Davies, W. J., 1997. Xylem sap pH increase: a drought signal received at the apoplastic face of the guard cell that involves the suppression of saturable abscisic acid uptake by the epidermal symplast. *Plant Physiol.* 113:559-573.
- Wilkinson, S., Corlett, J.E., Oger, L. & Davies, W.J., 1998. Effects of xylem pH on transpiration from wild-type and *flacca* tomato leaves. *Plant Physiol.* 117:703-709.

- Yelenosky, G., 1979. Accumulation of free proline in citrus leaves during cold hardening of young trees in controlled temperature regimes. *Plant. Physiol.* 64: 425-427.
- Yemm, E.M. & Cocking, E.C., 1955. Estimation of amino acids by ninhydrin. *Analyst*, 80:209-213.
- Zimmerman, M.H., 1983. *Xylem Structure and the Ascent of Sap*. Springer Verlag, Berlin, 143p.
- Zimmerman, M.H. & Macdonough, J., 1978. Dysfunction in the flow of food. IN: *Plant Disease and Advanced Treatise*, 3, (J. G. Horsfall & E. B. Cowling, eds.). Academic Press, New York, pp.117-40.

