INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA FOTOSSÍNTESE DE LARANJEIRA 'PÊRA' COM CLOROSE VARIEGADA DOS CITROS

RAFAEL VASCONCELOS RIBEIRO

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências, Área de Concentração: Fisiologia e Bioquímica de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Maio - 2002

INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA FOTOSSÍNTESE DE LARANJEIRA 'PÊRA' COM CLOROSE VARIEGADA DOS CITROS

RAFAEL VASCONCELOS RIBEIRO
Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. **EDUARDO CARUSO MACHADO**

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências, Área de Concentração: Fisiologia e Bioquímica de Plantas.

PIRACICABA
ESTADO DE SÃO PAULO – BRASIL
MAIO - 2002

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Ribeiro, Rafael Vasconcelos

Influência da temperatura na fotossíntese de laranja 'Pêra' com
clorose variegada dos citros / Rafael Vasconcelos Ribeiro. - Piracicaba,
2002.

58 p. : il.

Dissertação (mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de
Queiroz, 2002.

Bibliografia.

1. Clorose variegada dos citros 2. Fotossíntese 3. Laranja 4.
Temperatura I. Título

CDD 634.3

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

***"NÃO HÁ GARANTIA DE QUE A PESQUISA RESOLVERÁ TODOS OS
PROBLEMAS, MAS NENHUM PROBLEMA SERÁ RESOLVIDO SEM PESQUISA"***

ANTHONY H. PURCELL

À minha querida Família...

...meus pais Marilena Vasconcelos Ribeiro e Cláudio Alberto Gonçalves Ribeiro...

...minhas irmãs Mônica, Simone e Renata...

...meu sobrinho Henrique...

...meus queridos avós paternos Darci Amauri Ribeiro e Dinarcy Gonçalves Ribeiro

...e maternos Dilermando Gadelha de Vasconcelos (in memorian) e Clice Souto de Vasconcelos (in memorian)...

...minha tia Maria Cláudia Gonçalves Ribeiro...

*...que sempre acreditaram em mim, me apoiando e incentivando
através de gestos de amor e carinho que fizeram parte
dessa importante etapa de minha vida...*

Essa conquista também é de vocês!!!

Amo todos vocês!!!

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre se mostrar presente e me guiar pelo caminho da luz.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, que me permitiu dar mais um passo na jornada do conhecimento.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Prof. Dr. Eduardo Caruso Machado, pela excelente orientação, ensinamentos, amizade, confiança e constante incentivo no decorrer do curso.

Ao Prof. Dr. Ricardo Ferraz de Oliveira, pela brilhante orientação, amizade, confiança e sabedoria compartilhada.

À Dra. Rogéria Pereira de Souza pelos ensinamentos, sugestões, discussões e críticas que contribuíram para o enriquecimento do trabalho.

À Universidade Federal de Lavras, pela minha formação.

Ao meu orientador de iniciação científica Prof. Dr. Luiz Edson Mota de Oliveira pelos ensinamentos e por despertar minha consciência científica.

Ao Prof. Dr. Luiz Roberto Angelocci e Prof. Dr. Carlos Pimentel, pelos ensinamentos e sugestões.

Ao MSc. Camilo Lázaro Medina, pelo entusiasmo contagiante, discussões e convívio proveitoso, que me permitiram aprender muito sobre citricultura.

À MSc. Rosangela Cristina Marucci, pela ajuda nos testes para detecção da *Xylella fastidiosa*.

Aos funcionários do Departamento de Ciências Biológicas especialmente a Maria Solizete Granziol Silva, José Francisco Rodrigues, Francisco Xavier Vitti e Maria Aparecida de Araujo Nogueira.

Às bibliotecárias Eliana Garcia e Silvia Zinsly, pela revisão de editoração e formatação final.

Ao Rubervan Saraiva de Souza, pelo companheirismo, carinho e dedicação a minha família.

Aos meus colegas de república, Rodrigo Otávio Rodrigues de Melo Souza, Chryz Melinski Serciloto, Luis Fernando Faria e Walter Dantas Pinheiro, pelo convívio harmônico e momentos de alegria e descontração que tornam a vida mais feliz.

Aos meus colegas de trabalho, Míriam Ferraz Moreira, Gustavo Maia Souza, Mauro Guida dos Santos, Carlos Daniel Giaveno, Oscar Darío Bermúdez e Paula Carolina de Simoni Cordeiro, pelo ambiente saudável e amigo.

Aos meus colegas de mestrado Chryz Melinski Serciloto, Raul Santin Almeida e Janaynna Magalhães Barbosa, pelo companheirismo.

Aos meus grandes amigos Rodrigo Otávio Rodrigues de Melo Souza, Dárlan Einstein do Livramento e Marcus Vinícius Araújo Melo de Oliveira, que torceram pelo meu sucesso. Valeu galera!!!

A Ilana Urbano Bron, por ter cruzado meu caminho e tornado minha vida mais feliz!! MUITO OBRIGADO POR TUDO MEU AMOR!!!

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	ix
RESUMO	xi
SUMMARY	xiii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 CLOROSE VARIEGADA DOS CITROS	3
2.2 CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS DOS CITROS	6
2.3 DISFUNÇÕES FISIOLÓGICAS DEVIDO A PRESENÇA DE <i>XYLELLA FASTIDIOSA</i> E OUTROS PATÓGENOS	7
2.4 EFEITOS DA TEMPERATURA NO APARATO FOTOSSINTÉTICO	10
2.5 FATORES EDAFO-CLIMÁTICOS E A CLOROSE VARIEGADA DOS CITROS	12
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1 MATERIAL VEGETAL	13
3.2 EXPERIMENTO I.....	15
3.2.1 Tratamento térmico	15
3.2.2 Medidas de trocas gasosas	17
3.2.3 Medidas da fluorescência da clorofila <i>a</i>	17

3.2.4 Delineamento experimental	18
3.3 EXPERIMENTO II	18
3.3.1 Tratamento térmico	18
3.3.2 Medidas de produção de oxigênio fotossintético em função de DFFF	19
3.3.2.1 Delineamento experimental	21
3.3.3 Indução da fotossíntese e análise dos coeficientes de extinção da fluorescência da clorofila <i>a</i>	21
3.3.3.1 Delineamento experimental	22
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1 EXPERIMENTO I	23
4.1.1 Trocas gasosas	23
4.1.2 Fluorescência da clorofila <i>a</i>	28
4.2 EXPERIMENTO II	34
4.2.1 Produção de oxigênio fotossintético em função de DFFF	34
4.2.2 Indução da fotossíntese e análise dos coeficientes de extinção da fluorescência da clorofila <i>a</i>	36
5 CONCLUSÕES	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A	assimilação de CO ₂ ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
A_o	produção de oxigênio fotossintético ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
ATP	adenosina 5-trifosfato
C_i	concentração intercelular de CO ₂ ($\mu\text{L L}^{-1}$)
CVC	clorose variegada dos citros
DFFF	densidade de fluxo de fótons fotossintéticos ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
DNA	ácido desoxirribonucleico
DPV	déficit de pressão de vapor do ar (kPa)
DPV_{f-ar}	déficit de pressão de vapor entre a folha e o ar (kPa)
E	transpiração ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
ETR	taxa aparente de transporte de elétrons ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
F_o	fluorescência basal após adaptação ao escuro (unid. rel.)
F_o'	fluorescência basal após excitação do fotossistema I (unid. rel.)
F_m	fluorescência máxima após adaptação ao escuro (unid. rel.)
F_m'	fluorescência máxima na presença de luz (unid. rel.)
F_s	fluorescência em estado de equilíbrio dinâmico, na presença de luz (unid. rel.)
F_v	fluorescência variável após adaptação ao escuro (unid. rel.)
F_v/F_m	eficiência quântica potencial do fotossistema II
g_s	condutância estomática ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
IRGA	analisador de gases por infra-vermelho
LHCII	complexo coletor de luz, acoplado ao fotossistema II

NADPH	dinucleotídeo adenina fosfato nicotinamida (reduzido)
NPQ	coeficiente de extinção não-fotoquímica da fluorescência
PCR	reação em cadeia de polimerase
PSI	fotossistema I
PSII	fotossistema II
PWG	“periwinkle wilt-gelrite”
Q_A	quinona A
qP	coeficiente de extinção fotoquímica da fluorescência
Rubisco	ribulose 1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase
Tf	temperatura foliar (°C)
UFC	unidades formadoras de colônia
XLB	bactéria limitada ao xilema
$\Delta F/F_m'$	eficiência quântica efetiva do fotossistema II
ΦCO_2	eficiência quântica da assimilação de CO ₂ ($\mu\text{mol CO}_2 \mu\text{mol fótons}^{-1}$)
ΦO_2	eficiência quântica da produção de oxigênio fotossintético ($\mu\text{mol O}_2 \mu\text{mol fótons}^{-1}$)
$\Phi PSII$	idem $\Delta F/F_m'$

INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA FOTOSSÍNTESE DE LARANJEIRA 'PÊRA' COM CLOROSE VARIEGADA DOS CITROS

Autor: RAFAEL VASCONCELOS RIBEIRO
Orientador: Prof. Dr. EDUARDO CARUSO MACHADO

RESUMO

A clorose variegada dos citros (CVC) é um dos principais problemas que assolam a citricultura brasileira nos últimos dez anos. Essa doença, causada pela bactéria *Xylella fastidiosa*, determina menor produção das plantas infectadas e tem estreita relação com as condições climáticas, sendo sua severidade agravada em regiões com baixa disponibilidade hídrica, alta demanda atmosférica e elevadas temperaturas. A fotossíntese, que possui relação direta com a produtividade das plantas, é um dos processos fisiológicos afetados pela CVC. Esse trabalho visou investigar os efeitos da temperatura na fotossíntese de plantas infectadas pela *X. fastidiosa* e determinar como o processo fotossintético é afetado pela presença da bactéria. Para tanto, foram utilizadas mudas de laranja 'Pêra' (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), com aproximadamente 9 meses de idade, cultivadas em vasos plásticos de 3L. Foram realizados dois experimentos. No experimento I, mudas sadias e doentes foram dispostas em câmara de crescimento e submetidas por 7 dias a regimes de temperatura de 25/20 e 35/20°C (dia/noite), com concentrações de CO₂ e O₂ atmosféricas, 14h de fotoperíodo, densidade de fluxo de fótons fotossintéticos (DFFF) de 600µmol m⁻² s⁻¹ e déficit de pressão de vapor do ar de 1kPa. Foram realizadas medidas simultâneas de trocas gasosas [assimilação de CO₂ (**A**); transpiração (**E**) e condutância estomática (**g_s**)] e fluorescência da clorofila *a* [eficiência quântica potencial (**F_v/F_m**) e efetiva (**ΔF/F_m'**) do fotossistema II, taxa aparente de

transporte de elétrons (**ETR**) e coeficientes de extinção fotoquímica (**qP**) e não-fotoquímica (**NPQ**) da fluorescência] em tecidos intactos, nas temperaturas de 25, 30, 35 e 40°C. No experimento II, foram realizadas curvas de resposta da produção de oxigênio fotossintético (**A_o**) em função de DFFF e curvas de indução de **A_o**, com medidas simultâneas de **A_o**, $\Delta F/F_m'$, **ETR**, **qP** e **NPQ**, em discos foliares, nas temperaturas de 35 e 45°C. No experimento I, as plantas com CVC apresentaram valores inferiores de **A**, **E** e **g_s**, sendo que as diferenças entre plantas saudas e doentes foram maiores no regime de temperatura de 35/20°C, onde foram registrados os maiores valores de **A**, **E** e **g_s**. Essas variáveis tenderam a decrescer com o aumento da temperatura (de 25 para 40°C), alcançando valores mínimos a 40°C em ambos regimes de temperatura. No experimento I, a CVC não influenciou $\Delta F/F_m'$, **ETR**, **qP** e **NPQ**, porém, F_v/F_m das plantas com CVC foi superior em todas as medidas. As variáveis mais influenciadas pela temperatura foram $\Delta F/F_m'$, **ETR** e **qP**, as duas primeiras decrescendo e a última aumentando com o aumento da temperatura de medida. Os maiores valores de F_v/F_m , $\Delta F/F_m'$, **ETR**, **qP** e **NPQ** foram registrados no regime de 35/20°C, confirmando que essas condições foram mais favoráveis à atividade fotossintética das plantas. No experimento II, as plantas saudas apresentaram os maiores valores de **A_o**, $\Delta F/F_m'$, **ETR**, **qP** e **NPQ** nas medidas efetuadas a 35°C. A presença da bactéria afetou a indução de **A_o** em ambas temperaturas, porém as diferenças em $\Delta F/F_m'$, **ETR**, **qP** e **NPQ** foram encontradas apenas a 35°C. Esses resultados indicaram que o aumento da temperatura afetou o sistema planta-patógeno agravando as disfunções no metabolismo fotossintético das plantas com CVC. A menor fotossíntese de laranjeira 'Pêra' infectada pela *X. fastidiosa* é atribuída a menor condutância estomática, comprometimento de reações bioquímicas e aumento da atividade fotorrespiratória.

INFLUENCE OF TEMPERATURE ON PHOTOSYNTHESIS OF SWEET ORANGE 'PÊRA' WITH CITRUS VARIEGATED CHLOROSIS

Author: RAFAEL VASCONCELOS RIBEIRO
Adviser: Prof. Dr. EDUARDO CARUSO MACHADO

SUMMARY

The citrus variegated chlorosis (CVC) has become a great problem for the Brazilian citriculture during the last ten years. CVC, caused by the bacterium *Xylella fastidiosa*, causes a strong decrease in production of infected plants. Higher severities of the disease have been reported in areas with water deficit, high atmospheric demand and high temperatures. Photosynthesis, which has direct relationship with plant productivity, is a physiological process affected by CVC. The objectives of this study were to determine the effects of temperature upon photosynthesis of infected plants and to evaluate how the photosynthetic apparatus is affected by the presence of the bacterium. In order to achieve these objectives, two experiments (I and II) were carried out, using 9 months-old seedlings of sweet orange 'Pêra' (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), grown in 3L plastic pots under greenhouse conditions. In experiment I, prior to measurements, healthy and infected plants were moved to a plant growth chamber and exposed to temperature regimes of 25/20 and 35/20°C (day/night) during 7 days each, CO₂ and O₂ atmospheric concentrations, 14h photoperiod, photosynthetically active radiation (PAR) of 600µmol m⁻² s⁻¹ and air vapor pressure difference of about 1 kPa. Simultaneous measurements of leaf gas exchange [CO₂ assimilation (**A**); transpiration (**E**) and stomatal conductance (**g_s**)] and chlorophyll fluorescence [potential (**F_v/F_m**) and effective

($\Delta F/F_m'$) quantum yield of photosystem II, apparent electron transport rate (**ETR**) and photochemical (**qP**) and non-photochemical (**NPQ**) fluorescence quenching] were taken in intact leaves, at 25, 30, 35 and 40°C. In experiment II, light curves of photosynthetic oxygen evolution (**A_o**), and curves of photosynthesis induction were carried out, with simultaneous measurements of **A_o**, $\Delta F/F_m'$, **ETR**, **qP** and **NPQ** in leaf discs, at 35 and 45°C. In experiment I, infected plants shown decrease in **A**, **E** and **g_s**, and the differences between healthy and infected plants were greater at 35/20°C, where the largest values of **A**, **E** and **g_s** were observed. These variables decreased with increasing temperature, reaching minimum values at 40°C for both temperature regimes. In experiment I, no differences between healthy and infected plants regarding chlorophyll fluorescence variables were observed. However, F_v/F_m of infected plants was higher in all conditions. The three most influenced variables by temperature were $\Delta F/F_m'$, **ETR** and **qP**, whereas the two first decreased while the last increased with increasing temperature. Largest values of F_v/F_m , $\Delta F/F_m'$, **ETR**, **qP** and **NPQ** were registered at 35/20°C, confirming that this temperature regime was more adequate to plant photosynthetic activity. In experiment II, healthy plants showed the largest values of **A_o**, $\Delta F/F_m'$, **ETR**, **qP** and **NPQ** at 35°C. The presence of the bacterium affected **A_o** induction in both temperatures, however, differences in $\Delta F/F_m'$, **ETR**, **qP** and **NPQ** for healthy and infected plants were only found at 35°C. Results from this study indicated that increase in temperature affected the plant-pathogen system, amplifying the malfunction of the photosynthetic metabolism of infected plants. The smallest photosynthetic rates of sweet orange 'Pêra' infected by *X. fastidiosa* were caused by low stomatal conductance, biochemical injuries and photorespiratory activity.

1 INTRODUÇÃO

A clorose variegada dos citros (CVC), cujos primeiros relatos no Brasil surgiram em 1987, é uma das maiores ameaças à indústria citrícola brasileira nos últimos dez anos (Almeida et al, 2001).

A CVC, causada pela bactéria *Xylella fastidiosa*, é uma doença vascular de laranjeiras doces que limita de forma significativa a produção de frutos comerciais (Pooler & Hartung, 1995b). Dentre as principais características das plantas infectadas pela CVC, têm-se a presença de manchas cloróticas nas folhas que evoluem para necroses, folhas murchas à semelhança de deficiência hídrica e frutos com baixa qualidade (Rossetti, 1991). Esses frutos são em maior número, pequenos, endurecidos, com maturação irregular e, portanto, inadequados para o consumo *in natura* e para industrialização.

Sugere-se que o surgimento e desenvolvimento da CVC geralmente têm relação com as características climáticas e a idade das plantas, sendo as laranjeiras jovens mais sensíveis (Laranjeira, 1997; Machado, 1997). Em regiões onde ocorrem estresses, como por exemplo, altas temperaturas e/ou déficit hídrico, a CVC é mais severa, sendo que a ação conjunta desses fatores (clima e CVC) provavelmente acentua as disfunções no metabolismo da planta.

As respostas de espécies vegetais às condições ambientais (Fracheboud, 2001; Vu et al., 1986) e as interações entre patógeno e hospedeiro (Daly, 1976; Duniway, 1976; Machado et al., 1994) têm sido estudadas através de medidas de trocas gasosas e de fluorescência da clorofila *a*.

Segundo Daly (1976) e Duniway (1976), a redução da produtividade de plantas hospedeiras pode ser consequência das menores taxas de fotossíntese decorrentes de lesões necróticas no tecido foliar, desbalanço de nutrientes e de hormônios, toxinas produzidas pelos patógenos e diminuição na condutância estomática às trocas gasosas, podendo esses fatores atuarem em conjunto ou isoladamente.

Os mecanismos fisiológicos e bioquímicos que caracterizam o estabelecimento da doença não são totalmente compreendidos, especialmente em condições estressantes, tornando importante o desenvolvimento de pesquisas que levem em consideração as condições ambientais que favoreçam o estabelecimento da doença.

Tendo em vista tal problemática, este trabalho (parte do programa de pesquisa "Physiological aspects of sweet orange 'Pêra' (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) affected by CVC and its association to pathogenicity of *Xylella fastidiosa*", proc. Fapesp n°. 98/16259-1) visou estudar os efeitos da temperatura sobre o aparato fotossintético de plantas com CVC e determinar como o processo fotossintético é afetado pela presença da *X. fastidiosa*. Nesse estudo foram abordadas duas hipóteses:

a) temperaturas elevadas aliadas a restrição hídrica, promovida pela presença da *X. fastidiosa*, podem agravar as disfunções no processo fotossintético das plantas com CVC;

b) a presença da bactéria pode acelerar as rotas oxidativas e afetar processos bioquímicos em condições de alta temperatura. A produção de espécies ativas de oxigênio pela planta e/ou as toxinas produzidas pela bactéria poderiam afetar a fotossíntese através de alterações no aparato fotoquímico e/ou nas reações bioquímicas.

As hipóteses foram testadas através de medidas de trocas gasosas (assimilação de CO₂, transpiração e condutância estomática), fluorescência da clorofila *a* e produção de oxigênio fotossintético, em ambiente controlado, variando-se apenas a temperatura.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Clorose variegada dos citros

O Brasil e os Estados Unidos são, historicamente, os principais produtores mundiais de citros. O Brasil tem participação superior a 80% no comércio internacional de suco de laranja concentrado e a liderança mundial na produção de laranjas, sendo o Estado de São Paulo responsável por 86% da produção brasileira (FNP Consultoria & Comércio, 2002). Porém, a ocorrência e a alta velocidade de disseminação da clorose variegada dos citros (CVC), cujo patógeno responsável é a bactéria *Xylella fastidiosa*, têm trazido sérios problemas aos produtores.

Plantas com CVC sofrem redução na produção, apresentam frutos atrofiados e endurecidos, com maturação irregular e pouco suco e, portanto, inadequados para a comercialização (Rossetti, 1991).

Segundo Pallazzo & Carvalho (1993), plantas aparentemente sadias apresentam produção 30 a 35% superior quando comparadas com laranjeiras com CVC, ocasionando prejuízos ao redor de cem milhões de dólares anuais (Laranjeira, 1997).

Em 2001, a safra brasileira de laranjas foi a menor dos últimos 10 anos, sendo a CVC um dos fatores que contribuíram para tal situação. A baixa capitalização dos produtores gerou falta de tratos culturais, provocando maior infestação e menor produtividade dos pomares (FNP Consultoria & Comércio, 2002).

A origem de tal enfermidade no território brasileiro é indeterminada. Uma vez que existe grande número de plantas hospedeiras da *X. fastidiosa*, é possível que estirpes de *X. fastidiosa* que causam CVC sejam originárias de plantas selvagens, tais como

ervas-daninhas e que, com o tempo, passaram a infectar os citros por intermédio de homópteros (Hartung et al., 1994).

Oliveira et al. (1998), estudando a disseminação da CVC, constataram que no final da década de 90, aproximadamente 80% do parque citrícola paulista estava infectado pela *X. fastidiosa*. Em 2000, a população estimada de plantas infectadas atingia a marca de 68 milhões (McElrone et al., 2001).

De acordo com o estudo realizado por Gottwald et al.¹, na ausência de medidas emergenciais de controle, a contaminação de 90% do pomar pode ocorrer 12 anos após a introdução de uma única planta infectada (Gottwald et al.¹ citado por Hartung et al., 1994).

A bactéria *X. fastidiosa*, além de ser o agente causal da CVC em laranjeiras doces, também é responsável por outras doenças que afetam várias espécies economicamente importantes, incluindo o mal de Pierce da videira, nanismo da alfafa, redução do porte do pessegueiro, definhamento da vinca, escaldadura da folha da ameixeira, da amoreira, da pereira, da amendoeira, do elmo americano, do plátano, do carvalho e do cafeeiro (Hopkins, 1989; Paradela Filho, 1997; Purcell & Hopkins, 1996; Raju & Wells, 1986).

Até 1973, algumas dessas doenças eram atribuídas a vírus, vindo a presença de insetos vetores reforçar tal relação. A *X. fastidiosa* pode estar muitas vezes presente em plantas que não apresentam sintomas, e por isso, durante anos, o isolamento e crescimento da bactéria foi bastante difícil, prejudicando o avanço das pesquisas (Davis et al., 1978). Em 1978, a bactéria do mal de Pierce foi pela primeira vez cultivada (Davis et al., 1978), entretanto, a complexa relação de patogenicidade entre as estirpes de *X. fastidiosa* não foi completamente caracterizada. Segundo Pooler & Hartung (1995a), análises de DNA sugerem a existência de 5 grupos de *X. fastidiosa*: o grupo dos citros, o

---

¹ GOTTWALD, T.R.; GIDTTI, F.B.; SANTOS, J.M.; CARVALHO, A.C. Preliminary spatial and temporal analysis of citrus variegated chlorosis in Brazil. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 12., Riverside, 1993. Riverside:IOCV, 1993. p.327-335.

grupo da ameixeira-elmo, o grupo da videira-*Ambrosia sp.*, o grupo da amendoeira e o grupo da amoreira.

O termo "xylem-limited bacteria" (XLB) é utilizado para descrever patógenos de plantas cujo isolamento é difícil segundo os procedimentos bacteriológicos padrões. Esses organismos fastidiosos requerem um complexo meio de crescimento, ocorrendo apenas no xilema e elementos traqueais de plantas infectadas (Purcell & Hopkins, 1996; Raju & Weels, 1986). As XLB têm forma de bastonete com ondulação característica nas paredes celulares, são gram-negativas, aeróbicas estritas, não fermentativas e pigmentadas, sem flagelos, não formam esporos, medem cerca de 0,25-0,35µm de diâmetro e 0,9-3,5µm de comprimento. As bactérias apresentam crescimento ótimo em temperaturas entre 26 e 28°C e pH entre 6,5 e 6,9 (Wells et al., 1987).

As bactérias se encontram aderidas às paredes dos vasos do xilema por meio de estruturas extracelulares, que são usualmente mais abundantes na extremidade do bastonete. Essas estruturas assemelham-se a fibras polissacarídeas que constituem o glicocálix, que por sua vez, se encontra aderido à bactéria. Devido à carga negativa, as fibras polissacarídeas do glicocálix podem funcionar como um substrato de troca iônica, ligando o íon (nutriente) ao agregado bacteriano ou conservando e concentrando enzimas digestivas liberadas pela bactéria para ação contra o tecido hospedeiro. Estes indícios levam a crer que a *X. fastidiosa* possua mecanismos especiais para concentrar e absorver nutrientes (Hopkins, 1989).

Os vetores da CVC são homópteros que se alimentam da seiva do xilema das plantas, principalmente cigarrinhas das famílias Cicadellidae e Cercopidae. A bactéria multiplica-se e se adere ao canal alimentar (pré-cibário), à câmara de sucção (cibário) e à parte anterior do intestino do inseto vetor. Um grande número de bactérias pode se acumular no estomodeu, mantendo sua capacidade de infecção por período indeterminado (Purcell et al., 1979).

No Brasil, a bactéria causadora da CVC pode ser transmitida através das seguintes cigarrinhas dos citros: *Acrogonia virescens*, *Bucephalogonia xanthopis*, *Dilobopterus costalimai*, *Ferrariana trivittata*, *Homalodisca ignorata*, *Macugonalia leucomelas*, *Molonea cincta*, *Oncometopia facialis*, *Parathona gratiosa*, *Plesiommatia*

corniculata e *Sonesimia grossa* (Krüger et al., 1998; Lopes et al., 1996; Lopes, 1998; Yamamoto et al., 2000). Material propagativo (estacas, borbulhas) e mudas infectadas nos viveiros são as principais formas de disseminação da doença a longas distâncias.

Até o momento, é considerável a discordância quanto ao mecanismo de patogenicidade nas doenças causadas pela *X. fastidiosa*. Disfunção do sistema de condução de água, produção de fitotoxinas e desbalanço de reguladores de crescimento são propostos como alguns mecanismos de patogenicidade (Hopkins, 1989). Evidências apoiam a hipótese de que o mecanismo de patogenicidade esteja relacionado com o estresse hídrico induzido pela oclusão vascular (Habermann, 1999; Hopkins, 1989; Machado et al., 1994; Machado et al., 2001). Porém, segundo Goodwin et al. (1988), o baixo número de vasos de xilema obstruídos e a falta de algum murchamento visível de folhas de videira infectada pelo mal de Pierce têm levado à hipótese de que as cloroses e necroses foliares são causadas por toxinas produzidas pelo microrganismo.

Um primeiro passo para o melhor entendimento das alterações fisiológicas promovidas pela CVC e dos mecanismos de patogenicidade é o conhecimento da fisiologia das plantas hospedeiras, em particular as laranjeiras.

2.2 Características fisiológicas dos citros

Dentre as principais características que dizem respeito às trocas gasosas de citros, destacam-se as baixas taxas de assimilação de CO₂, condutância estomática e condutância do mesofilo para a difusão do CO₂ (Kriedemann, 1968).

Valores máximos de taxa fotossintética e condutância estomática em laranjeiras são atingidos em fluxo fotossintético de fótons entre 600 e 800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Habermann, 1999; Machado et al., 1994; Vu et al., 1986; Vu & Yelenosky, 1988).

Khairi & Hall (1976a e 1976b), avaliando os efeitos da temperatura e umidade na fotossíntese líquida e transpiração de laranjeiras, constataram que a fotossíntese decrescia em temperaturas superiores a 30°C e déficit de pressão de vapor entre as folhas e o ar ($\text{DPV}_{\text{f-ar}}$) superior a 8 mbar, relacionando-os à queda da condutância de CO₂ no

mesofilo foliar e a mudanças na condutância total de vapor d'água na folha, respectivamente.

Segundo Kriedemann (1968), a temperatura ótima para a assimilação de CO₂ em algumas espécies de citros está entre 15 e 20°C quando as medidas são realizadas em ambiente com ar seco e entre 20 e 30°C em ambientes com umidade relativa superior a 80%.

Quando considerado o crescimento vegetativo, Reuther (1977) cita que, em temperaturas acima de 13°C, a taxa de crescimento aumenta progressivamente até alcançar o máximo em temperaturas superiores a 30°C, vindo a paralisação do crescimento ocorrer em temperaturas acima de 40°C.

2.3 Disfunções fisiológicas devido a presença de *X. fastidiosa* e outros patógenos

A severidade dos sintomas da CVC parece estar relacionada com o grau de colonização dos vasos do xilema (Goodman et al., 1967; Hopkins, 1989; Purcell & Hopkins, 1996). Em laranjeiras com CVC, há queda no fluxo de seiva, sugerindo que ocorre entupimento dos vasos de xilema como consequência da agregação das bactérias às paredes dos vasos condutores (Oliveira et al., 2000).

O potencial da água na folha, a assimilação de CO₂, a transpiração e condutância estomática apresentam reduções nas plantas infectadas (Machado et al., 1994). Habermann (1999) e Machado et al. (1994) sugerem que a redução da fotossíntese em plantas com CVC está relacionada à deficiência hídrica das folhas, gerada pelo decréscimo da condutividade do fluxo de água nos vasos do xilema. A redução da área foliar ativa, causada pelo aumento da clorose e necrose foliar, sintomas visuais da degeneração de cloroplastos, também pode causar redução da taxa de fotossíntese.

Plantas infectadas com CVC sem sintomas visíveis também mostram redução na capacidade fotossintética. Essa observação leva à conclusão de que outros mecanismos fisiológicos estão sendo afetados (Machado et al., 1994), tais como: as reações metabólicas e/ou luminosas da fotossíntese e o desbalanço hormonal causados pela presença de substâncias tóxicas. Habermann (1999), estudando as trocas gasosas e

relações hídricas em laranjeira 'Pêra' infectadas por *X. fastidiosa*, verificou que houve efeito depressivo na fotossíntese devido ao aumento da resistência estomática e comprometimentos relacionados às suas etapas fotoquímica e bioquímica.

O mecanismo fotossintético, reações luminosas e reações bioquímicas, pode ser afetado pela presença do patógeno, sendo esse fato já verificado em folhas de trigo infectadas por míldio (Allen, 1942). Mathre (1968), investigando a atividade fotossintética de plantas de algodão infectadas por *Verticillium albo-atrum*, verificou que os cloroplastos de folhas infectadas apresentam menor eficiência na reação de Hill quando comparados com cloroplastos de folhas saudáveis.

A redução na fotossíntese de folhas infectadas pode ser consequência de vários fatores, incluindo fechamento estomático como resultado de estresse hídrico, toxinas liberadas pelo patógeno que afetam os cloroplastos e produtos liberados pelo hospedeiro em resposta à infecção que poderão agir nos cloroplastos ou diminuir o conteúdo de clorofila (Mathre, 1968).

Plantas afetadas pelo "Blight", doença que causa disfunção nos tecidos do xilema e restrição do movimento da água no caule, também apresentam menor condutância estomática e transpiração. A causa dessas alterações ainda não é conhecida, podendo ser a presença do microrganismo ou substâncias tóxicas (que afetariam a permeabilidade da membrana ou o funcionamento dos estômatos) os principais causadores de estresse hídrico (Syvertsen et al., 1980).

Machado et al. (1994) relacionam a variação dos valores de trocas gasosas de laranjeiras com CVC, em condições de saturação lumínica, com alterações nas condições ambientais, tais como temperatura do ar e déficit de pressão de vapor (DPV). Decréscimos na assimilação de CO₂ em pessegueiros infectados com *X. fastidiosa* são atribuídos ao fechamento estomático nos horários de maior demanda atmosférica (Andersen & French, 1987).

Em pessegueiros e videiras infectadas por *X. fastidiosa*, o decréscimo na fotossíntese é associado a toxinas e ao desbalanço hormonal (Andersen & French, 1987; Goodwin et al., 1988). Mudanças nos níveis de hormônios, aminoácidos (prolina) e carboidratos têm sido observados em videiras infectadas por *X. fastidiosa* (Goodwin et

al., 1988; Purcell & Hopkins, 1996), porém, o mesmo não foi verificado em laranjeiras com CVC (Gomes, 2001; Medina²).

A captura e armazenamento de energia luminosa pelas folhas de plantas superiores é mediada por uma intrincada associação entre complexos de pigmentos captadores de luz e um transporte sequencial de elétrons do fotossistema II (PSII) para o fotossistema I (PSI). A eficiência da utilização da luz por cada fotossistema regula as reações de fixação de CO₂ e geração de ATP pelas reações luminosas.

A energia luminosa absorvida pelo PSII pode ser: utilizada pelas reações fotoquímicas, dissipada em forma de calor ou fluorescência ou ainda transferida fracamente para o PSI. Por essa razão, a proporção de luz reemitida como fluorescência reflete competição entre os vários processos de desativação do "pool" de excitação disponível (Krause & Weis, 1991).

Quando a energia luminosa absorvida for maior que a capacidade fotossintética de utilizá-la nos processos fotoquímicos, os mecanismos de fotoproteção e fotoinibição são ativados. Em plantas sob estresse biótico, o aumento da extinção não-fotoquímica da fluorescência (**NPQ**), juntamente com o aumento do estado de redução do aceptor primário do transporte de elétrons, indicam que a capacidade de fotoproteção foi excedida e a fotoinibição contribui para acelerar a degeneração do aparato fotossintético e o desenvolvimento de sintomas (Balachandran et al., 1997).

Quando comparados tecidos intactos e infectados pelo vírus do mosaico do tabaco, constatou-se que a capacidade e a eficiência fotoquímica dos tecidos doentes foram afetados, apresentando aumento de **NPQ**. Esse fato se correlaciona com o aumento da proporção xantofila/clorofila e à rápida conversão de violaxantina em zeaxantina na presença de luz (Balachandran et al., 1997).

Em plantas sob estresse biótico, a menor eficiência fotossintética pode ser causada pela: 1) ação de mecanismos fotoprotetores para aliviar o excesso de excitação

---

² MEDINA, C.L. (UNICAMP, Instituto de Biologia, Departamento de Fisiologia Vegetal, Campinas). Comunicação pessoal, 2002.

gerado pela menor dissipação de energia através do transporte de elétrons, ocasionando aumento de **NPQ**, declínio na eficiência quântica potencial do PSII, indicada pelo menor F_v/F_m , e fluorescência basal (F_o), sendo usualmente associados ao aumento no "pool" de zeaxantina (Demmig-Adams & Adams, 1992); 2) iniciação dos processos de fotoinibição quando a capacidade de fotoproteção é excedida, sendo indicado pelo declínio na extinção fotoquímica da fluorescência (**qP**) e na relação F_v/F_m , acompanhado pelo aumento de F_o , devido à redução excessiva da cadeia de transporte de elétrons (Osmond, 1994).

Esses processos parecem potencializar a fotooxidação, sugerindo que o transporte de elétrons para o oxigênio e a taxa de geração de oxigênio tóxico excedem a capacidade dos mecanismos de desintoxicação do PSI (Asada, 1994).

Parte dos elétrons envolvidos nos processos fotoquímicos são utilizados em outros processos que não a fixação de carbono. Em condições onde a fixação de carbono é limitada (ex.: baixa temperatura e fechamento estomático), drenos alternativos de elétrons, como a fotorrespiração e a redução de oxigênio molecular (durante a reação de Mehler) podem aumentar suas atividades (Fracheboud, 2001).

Segundo Krause & Weis (1991), a presença de condições ambientais estressantes levam ao decréscimo característico na eficiência quântica potencial do PSII, podendo ser detectada pela queda na relação F_v/F_m . Paralela à queda da fotossíntese devido à menor eficiência fotoquímica, pode ocorrer redução na atividade de algumas enzimas do ciclo de Calvin e mudanças nas rotas bioquímicas, como acúmulo de aminoácidos e ácidos orgânicos (Wright et al., 1995).

2.4 Efeitos da temperatura no aparato fotossintético

A temperatura é uma das principais variáveis ecológicas que determinam a distribuição natural das espécies. Plantas superiores estão presentes nos mais variados ambientes, onde são submetidas a grandes variações de temperatura durante o período de crescimento ativo. Assim como os demais processos de crescimento, a fotossíntese é fortemente afetada pela temperatura, sendo as mudanças nas taxas de fotossíntese em

resposta a temperatura reversíveis quando as variações de temperatura estão compreendidas entre 10 e 35°C (Berry & Björkman, 1980).

A resposta da fotossíntese à temperatura é resultado da interação complexa entre o meio ambiente onde a planta se desenvolve e as características inerentes às espécies. Um ponto importante a se considerar é que a aclimação a altas temperaturas determina o aumento na temperatura limite em que o dano térmico do aparato fotossintético ocorre. Essa aclimação envolve aumento na estabilidade térmica do mecanismo fotossintético, que requer alguns dias ou semanas, embora as mudanças substanciais possam ocorrer nos primeiros dias. A maior parte das mudanças iniciais na fotossíntese, quando plantas são transferidas de um regime de temperatura mais ameno para um regime com temperatura superior, estão relacionadas ao aumento da condutância estomática (Berry & Björkman, 1980).

Segundo Berry & Björkman (1980), os danos devido a elevadas temperaturas são decorrentes da inativação das reações nas membranas dos tilacóides, devido à maior fluidez dos lipídios da membrana (Taiz & Zeiger, 1998), e das enzimas envolvidas no metabolismo fotossintético.

A capacidade fotossintética diminui em proporção ao tamanho e severidade do dano devido às altas temperaturas. Dependendo do tipo de dano, pode haver recuperação da capacidade fotossintética em poucas horas ou dias ou morte do tecido. Quando os tecidos são submetidos a temperaturas próximas à temperatura limite, ocorre perda de atividade enzimática e as funções das membranas fotossintéticas são alteradas; já em temperaturas superiores à temperatura limite, ocorre a perda de integridade celular (Berry & Björkman, 1980).

Berry & Björkman (1980) citam que as mudanças nas propriedades dos lipídios constituintes da membrana cloroplastidial são os principais fatores envolvidos com a aclimação do aparato fotossintético à elevação da temperatura, permitindo o aumento da estabilidade da membrana.

2.4 Fatores edafo-climáticos e a CVC

Os fatores climáticos e edáficos afetam o sistema patógeno-hospedeiro, sendo o estudo das interações entre doenças e o ambiente importantes para a compreensão dos processos que condicionam a resistência das plantas (Krüger, 1978).

Hopkins (1989) considera que a patogenicidade da *X. fastidiosa*, um patógeno ocasional ou oportunista, é agravada pela ocorrência de estresses adicionais. Deficiência hídrica, altas temperaturas, ocorrência de outras doenças, danos no sistema radicular e superprodução de frutos favorecem o desenvolvimento da doença (Hopkins & Thompson, 1984; Hopkins, 1985; Purcell & Hopkins, 1996).

Observações sugerem que a ocorrência de déficits hídricos, alta demanda atmosférica e temperatura podem estar relacionadas com a maior severidade da doença nas regiões Norte e Oeste do Estado de São Paulo (Gravena et al., 1997; Salva et al., 1995). Segundo Machado & Medina³ e McElrone et al. (2001), o clima mais quente e com maior período de deficiência hídrica favorece o desenvolvimento da CVC. As regiões Norte e Nordeste do Estado de São Paulo, que são mais quentes e sujeitas à deficiência hídrica, apresentam juntas, uma incidência de CVC cerca de 17% superior às regiões Centro e Sul juntas (Fundecitrus, 2002).

Fatores abióticos que podem favorecer a CVC ainda não estão bem esclarecidos, mas observações de campo mostram que os mesmos estão presentes. Tratos culturais e adubação também parecem influenciar o desenvolvimento da doença (Lima, 1995; Malavolta et al., 1993).

---

³ MACHADO, E.C.; MEDINA, C.L. (IAC, Centro de Ecofisiologia e Biofísica, Campinas). Comunicação pessoal, 2000.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Plantas Cultivadas sob Condições de Estresse do Departamento de Ciências Biológicas da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP, em Piracicaba/SP.

3.1 Material Vegetal

Foram utilizadas mudas (pé-franco) de laranjeira 'Pêra' (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) com 9 meses de idade, cultivadas em vasos plásticos (3L), contendo substrato (1/4 de composto orgânico vegetal, 1/4 de areia, 1/2 de terra) adubado de acordo com as normas para o cultivo de mudas cítricas (Raij et al., 1996).

A inoculação da bactéria *X. fastidiosa* foi realizada segundo Almeida & Lopes (1999) utilizando-se 15µL de solução concentrada de inóculo ($5,67 \times 10^{-7}$ UFC/mL) por planta, distribuídos em 3 pontos de inoculação (5µL por ponto) em região delgada do ramo. Os ferimentos, para favorecer a penetração da bactéria, foram realizados com auxílio de estilete (Figura 1).

Dessa forma, foram compostos 2 lotes (4 plantas cada), um contendo plantas saudáveis e o outro plantas doentes, devidamente analisadas pelo teste de PCR (Minsavage et al., 1994) ou via isolamento em meio "periwinkle wilt-gelrite" (PWG) (Almeida et al., 2001; Hill & Purcell, 1995), para detecção da bactéria.

Figura 1 - Mudanças de laranja 'Pêra' inoculadas com *Xylella fastidiosa*: a) aspecto geral das mudas em casa de vegetação; b) detalhe mostrando os 3 pontos de inoculação; c) sintomas foliares característicos da CVC.

As mudas foram adubadas com solução nutritiva (adaptado de Furlani, 1997) e foliar a cada 90 e 120 dias, respectivamente. A irrigação foi praticada diariamente pela manhã até que o substrato atingisse a capacidade de campo. A pulverização de defensivos foi semanal, tendo como finalidade evitar o surgimento de doenças e pragas.

Os lotes de plantas (sadias e doentes) permaneceram em casa de vegetação até o início dos ensaios.

3.2 Experimento I

3.2.1 Tratamento térmico

Mudas de laranjeira 'Pêra' sadias e com CVC (6 meses após a inoculação) foram transferidas para câmara de crescimento (Convicon, E-15, Canadá), onde foram submetidas a dois regimes de temperatura: 25/20°C e 35/20°C (dia/noite). As demais condições da câmara de crescimento foram iguais para os dois regimes de temperatura: 14h de fotoperíodo, densidade de fluxo de fótons fotossintéticos (DFFF) de $600\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, déficit de pressão de vapor (DPV) de 1,0kPa e concentração ambiente de CO_2 (Figura 2).

A indução dos regimes de temperatura não foi simultânea. Os lotes de plantas sadias e doentes foram inicialmente submetidos a 25/20°C e somente após a realização das medidas, os dois lotes de plantas foram transferidos para o regime de 35/20°C. Após 7 dias em cada regime de temperatura, foram realizadas medições de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* a 25, 30, 35 e 40°C.

Antes de cada medida, as plantas permaneceram 1 hora em cada temperatura, sendo a temperatura da câmara de crescimento ajustada de acordo com a temperatura de medida (25, 30, 35 e 40°C).

Durante as medidas, independente da temperatura utilizada, as condições na câmara de fotossíntese (IRGA) foram: DFFF de $600\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e DPV entre a folha e o ar ($\text{DPV}_{\text{f-ar}}$) entre 1,0 e 1,5kPa.

Figura 2 - Local onde foram conduzidos os ensaios referentes ao experimento I: a) câmara de crescimento (modelo E15, Conviron, Canadá); b) disposição das mudas de laranja 'Pêra' no interior da câmara de crescimento; c) fibra de emissão de luz/sensor do fluorômetro (Hansatech, FMS1, Inglaterra) (seta menor) acoplada à câmara de fotossíntese do IRGA (LiCor, Li-6400, EUA) (seta maior) usados para medidas simultâneas de fluorescência da clorofila *a* e trocas gasosas.

Os valores de DPV_{f-ar} foram controlados visando evitar seu efeito no mecanismo estomático. Segundo Bernacchi et al. (2001), valores de DPV_{f-ar} entre 1,0 e 1,5kPa não causam fechamento estomático. O controle do DPV_{f-ar} foi realizado através da injeção de ar enriquecido com vapor d'água na câmara de fotossíntese. A pressão de vapor d'água do ar foi ajustada com o uso de um gerador de "dew point" (LiCor, Li-610, EUA).

3.2.2 Medidas de trocas gasosas

As medidas de assimilação de CO_2 , condutância estomática e transpiração foram realizadas em folhas completamente expandidas, localizadas no terço médio da planta, por meio de um analisador portátil de fotossíntese em sistema aberto (LiCor, Li-6400, EUA).

As mesmas folhas foram utilizadas em ambos os regimes de temperatura visando a redução de variações provenientes da planta.

As condições dentro da câmara do aparelho foram as mesmas da câmara de crescimento, sendo as medidas de trocas gasosas registradas quando o coeficiente de variação total dos dados encontrava-se entre 0,1 e 0,2%.

É importante mencionar que as plantas doentes selecionadas para as medidas ainda não apresentavam nenhum tipo de sintoma característico de CVC, isto é, necroses, cloroses ou murchamento foliar, embora os testes (PCR e isolamento em meio PWG) indicassem que as mesmas estavam infectadas. Dessa forma, o efeito da diminuição da área fotossintetizante nas taxas de fotossíntese foi excluído.

3.2.3 Medidas da fluorescência da clorofila *a*

As medidas de fluorescência da clorofila *a* foram efetuadas juntamente com as de trocas gasosas, utilizando-se um fluorômetro modulado (Hansatech, FMS1, Inglaterra). A fibra de emissão/sensor de luz foi adaptada à câmara de fotossíntese do Li-6400, permitindo medidas simultâneas (Figura 2).

As variáveis determinadas foram: eficiência quântica potencial (F_v/F_m) e efetiva

($\Delta F/F_m'$) do PSII, coeficientes de extinção fotoquímica [$qP=(F_m'-F_s)/(F_m'-F_o')$] e não-fotoquímica [$NPQ=(F_m-F_m')/F_m'$] da fluorescência e a taxa aparente de transporte de elétrons ($ETR=DFFF*\Delta F/F_m'*0,5*0,84$) (Bilger et al., 1995; Walz, 1993). Os valores de F_m e F_v indicam respectivamente a fluorescência máxima e variável determinadas após 30 minutos de adaptação ao escuro, F_m' e F_s são, respectivamente, a fluorescência máxima e no estado de equilíbrio dinâmico na presença de luz, e F_o' a fluorescência basal após a excitação do PSI.

Os valores de $\Delta F/F_m'$ foram utilizados para o cálculo da relação entre a eficiência quântica efetiva do PSII e a eficiência quântica da assimilação de CO_2 (Φ_{PSII}/Φ_{CO_2}). Φ_{CO_2} representa a quantidade de CO_2 (mol) assimilado por mol de fótons absorvidos (Fracheboud, 2001). As medidas foram realizadas em DFFF de $600\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$.

3.2.4 Delineamento experimental

O delineamento experimental adotado foi em blocos casualizados em parcelas sub sub divididas com 4 repetições. As parcelas foram as plantas (sadias e doentes), as sub parcelas os regimes de temperatura (25/20°C e 35/20°C) e as sub sub parcelas as temperaturas foliares (25, 30, 35 e 40°C). Os dados foram submetidos à análise de variância (teste F) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.3 Experimento II

3.3.1 Tratamento térmico

As mudas de laranjeira 'Pêra' permaneceram na câmara de crescimento (Convion, E-15, Canadá), em regime de temperatura de 35/20°C (dia/noite), fotoperíodo de 14h, DFFF de $600\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$ e DPV de 1,0 kPa até o momento das medições. As folhas de laranjeira sadias e doentes avaliadas foram as mesmas utilizadas no experimento I.

As medidas de produção de oxigênio e fluorescência da clorofila *a* foram efetuadas em tecidos foliares submetidos às temperaturas de 35 e 45°C. Estas temperaturas representam, respectivamente, a temperatura ótima e desfavorável para a fotossíntese de mudas de laranjeira 'Pêra' em condições saturantes de CO₂ (Ribeiro et al., 2001).

Primeiro foram realizadas as medidas a 35°C e, posteriormente, as medidas a 45°C, no mesmo tecido. Antes das medidas, os tecidos permaneceram em cada temperatura por 30 minutos.

A temperatura foliar foi controlada através da circulação de água com temperatura conhecida, com auxílio de banho-maria (Marconi, MA-127, Brasil) (Figura 3). A temperatura foi monitorada com termopar cobre-constantan (Omega Eng., AWG 24, EUA) aderido à superfície abaxial do disco foliar.

As medições foram realizadas em discos foliares (10cm²) extraídos de folhas maduras, completamente expandidas, sem sintomas de CVC e pertencentes ao terço médio das plantas sadias e doentes.

3.3.2 Medidas da produção de oxigênio em função de DFFF

As taxas de fotossíntese foram medidas através da produção de oxigênio fotossintético, utilizando-se um eletrodo de oxigênio tipo Clark (Hansatech, Inglaterra), acoplado a uma câmara (Hansatech, LD2/3, Inglaterra), com fonte externa de luz (Hansatech, LS3, Inglaterra).

A liberação de oxigênio fotossintético foi registrada pelo Oxygraph Measurement System v. 2.22 (Hansatech, Inglaterra) em computador. As medidas de fotossíntese foram efetuadas em condições saturantes de CO₂, através da adição de 0,2mL da solução 1M de Na₂CO₃/NaHCO₃, 1:19v/v. Nestas condições, a fotorrespiração, assim como as limitações ao fluxo de CO₂ para o cloroplasto através dos estômatos, são praticamente eliminadas, sendo possível analisar o processo fotossintético sem tais interferências

Figura 3 - Local onde foram conduzidos os ensaios referentes ao experimento II: a) vista geral da bancada do laboratório onde foram realizadas as medições de fotossíntese e fluorescência da clorofila *a*; b) câmara do monitor de oxigênio, modelo LD2/3 (Hansatech, Inglaterra); c) variador de voltagem, acoplado à fonte de luz, utilizado para controlar a intensidade luminosa durante os ensaios; d) fonte de luz modelo LS3 (Hansatech, Inglaterra).

(Delieu & Walker, 1981). Os discos foliares foram dispostos, dentro da câmara, sobre feltro umedecido para evitar a desidratação do tecido durante as medidas.

A curva de resposta da fotossíntese à luz foi realizada variando-se DFFF entre 33 e $1121\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, nas temperaturas de 35 e 45°C. Antes das medidas de fotossíntese, o tecido permaneceu no escuro durante 30 minutos com o objetivo de cessar quaisquer processos fotossintéticos existentes, sendo em seguida submetido a 10 minutos de iluminação a $128\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para indução da fotossíntese (Delieu & Walker, 1981). Após esse período, DFFF foi igualado a 33 e em seguida elevado gradativamente até atingir $1121\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (33, 58, 74, 92, 102, 232, 343, 531, 791 e $1121\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

3.3.2.1 Delineamento experimental

O delineamento experimental adotado foi em blocos casualizados em parcelas sub sub divididas com 3 repetições. As parcelas foram as plantas (sadias e doentes), as sub parcelas as temperaturas foliares (35 e 45°C) e as sub sub parcelas as intensidades luminosas (33, 58, 74, 92, 102, 232, 343, 531, 791 e $1121\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Os dados foram submetidos à análise de variância (teste F) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.3.3 Indução da fotossíntese e análise dos coeficientes de extinção da fluorescência da clorofila *a*

A curva de indução da fotossíntese e análise dos coeficientes de extinção da fluorescência, utilizando-se o método do pulso de saturação descrito em Bolhàr-Nordenkampf & Öquist (1993), foram realizadas através de medidas com monitor de oxigênio (descrito anteriormente) e fluorômetro modulado (Hansatech, FMS1, Inglaterra). Essas medidas foram realizadas durante o período de indução da fotossíntese da curva de luz (item 3.3.2).

A fibra de emissão de luz/sensor foi adaptada a câmara do eletrodo de oxigênio, de forma que as medidas de fotossíntese e fluorescência da clorofila *a* foram efetuadas

simultaneamente.

Antes do início das medidas, os tecidos foram adaptados às temperaturas de 35 e 45°C, durante 30 minutos, no escuro, no interior da câmara do eletrodo de oxigênio (idem à curva de luz).

Após as medidas de F_v/F_m (tecido adaptado ao escuro), deu-se início à iluminação e análise dos coeficientes de extinção da fluorescência.

As medidas foram realizadas sob intensidade luminosa de $128 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, visando à indução da fotossíntese. Foram tomadas medidas simultâneas de produção de oxigênio fotossintético (A_o) e fluorescência da clorofila *a* ($\Delta F/F_m'$, qP , NPQ e ETR) a cada 15 segundos, durante um período de 6 minutos.

Foram analisados comparativamente os valores de A_o , $\Delta F/F_m'$, qP , NPQ e ETR , durante o período de indução, de plantas saudáveis e doentes em ambas temperaturas.

3.3.3.1 Delineamento experimental

O delineamento experimental adotado foi em blocos casualizados em parcelas sub sub divididas com 3 repetições. As parcelas foram as plantas (saudáveis e doentes), as sub parcelas as temperaturas foliares (35°C e 45°C) e as sub sub parcelas os tempos após o início da iluminação (0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135, 150, 165, 180, 195, 210, 225, 240, 255, 270, 285, 300, 315, 330 e 360 segundos). Os dados foram submetidos à análise de variância (teste F) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Experimento I

As medidas de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* foram realizadas em plantas sadias e doentes, as últimas sem sintomas visíveis de CVC, embora o testes (PCR e isolamento em meio PWG) indicassem a presença da *X. fastidiosa*. As medições foram realizadas em tecidos intactos, em planta íntegra.

Cabe ressaltar que o experimento foi conduzido em câmara de crescimento, em concentrações de CO₂ e O₂ atmosféricas, ou seja, em condições de fotorrespiração.

4.1.1 Trocas gasosas

A assimilação de CO₂ (**A**) foi afetada com o aumento da temperatura foliar (**Tf**). As maiores atividades fotossintéticas ocorreram a 25°C, atingindo um mínimo a 40°C ($p < 0,05$) (Figuras 4a e 4b). Laisk et al. (1998), avaliando os efeitos do aumento da temperatura em plantas de girassol, verificaram o mesmo padrão de resposta, ou seja, os maiores valores de **A** foram atingidos a 25°C, decrescendo em seguida até 45°C. Resposta semelhante também foi encontrada em plantas de framboesa, com temperatura ótima de 25°C (Stafne et al., 2001).

Em citros, estudos sobre os efeitos das variações da temperatura e déficit de pressão de vapor (DPV), indicaram que **A** decresce em temperaturas acima de 31°C e DPV acima de 2,0kPa (Khairi & Hall, 1976a; Sinclair & Allen Jr., 1982).

Como nesse experimento DPV foi mantido constante, a diminuição de **A** está relacionada ao aumento de **Tf**. Decréscimos na fotossíntese com o aumento de **Tf** estão

Figura 4 - Efeito da temperatura foliar na taxa de assimilação de CO₂ (a, b), condutância estomática (c, d) e transpiração (e, f) de mudas de laranja 'Pêra' sadias (■) e com CVC (○) submetidas a regimes de temperatura (dia/noite) de 25/20°C (a, c, e) e 35/20°C (b, d, f). Linhas verticais representam o desvio padrão da média (n=4).

relacionados principalmente com a redução da condutância do mesófilo (Khairi & Hall, 1976a; Sinclair & Allen Jr., 1982) e atividade de carboxilação (Monson et al., 1982).

Segundo Laisk et al. (1998), o decréscimo em **A** com o aumento de **Tf** é causado pelo rápido aumento da respiração e fotorrespiração, devido a maior atividade oxigenase da ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco). Acima de 40°C, os decréscimos nas taxas de fotossíntese e de fotorrespiração são causados, principalmente, pela diminuição da atividade da Rubisco. Ribeiro et al. (2001), observaram que, na ausência de fotorrespiração, os maiores valores de produção de oxigênio fotossintético em laranja 'Pêra' ocorreram a 40°C, decrescendo em temperaturas mais elevadas.

O padrão de resposta de **A** em função de **Tf** foi semelhante para as plantas sadias e com CVC, porém, **A** sempre foi maior nas sadias (Figura 4a e 4b). Menores valores de **A** em laranjeiras com CVC já foram relatados por outros autores (Gomes, 2001; Habermann, 1999; Machado et al., 1994).

Plantas infectadas pela *X. fastidiosa* foram mais sensíveis ao aumento de **Tf**. A redução média de **A**, com o aumento de **Tf** de 25 para 40°C, considerando os dois regimes de temperatura, foi de 77,6% para plantas sadias e 89,9% para doentes.

No regime de 35/20°C, os valores de **A** foram maiores ($p < 0,05$) (Figura 4b), sugerindo que essa condição ambiental foi mais favorável ao crescimento das plantas, estimulando dessa forma a fotossíntese. Machado et al. (2002), estudando a variação sazonal de **A**, observaram que os maiores valores ocorriam nos períodos com maior crescimento, o qual relacionava-se com a temperatura. Reuther (1977), observou que a taxa máxima de crescimento de citros ocorre ao redor de 30°C.

O aumento médio de **A**, quando o regime de temperatura mudou de 25/20°C (dia/noite) para 35/20°C (dia/noite), foi 65,4 e 24,9% em plantas sadias e com CVC, respectivamente. As diferenças entre plantas sadias e doentes se tornaram mais evidentes no regime de 35/20°C ($p < 0,05$), indicando que em ambientes onde as plantas podem expressar seu potencial fisiológico, a diferença entre plantas sadias e doentes se torna maior.

O decréscimo médio em **A** (considerados todos os valores) nas plantas infectadas por *X. fastidiosa* foi de 39,5% para o regime de temperatura de 35/20°C e 18,9% para

25/20°C. Tem-se observado que nas regiões Norte e Nordeste do Estado de São Paulo, onde o DPV e a temperatura do ar são maiores e a ocorrência de déficits hídricos é mais freqüente em relação a região Sul, ocorre maior incidência e severidade da CVC (Fundecitrus, 2002). Medina et al. (2001) observaram que a deficiência hídrica favorece o desenvolvimento e severidade da CVC. Estes autores também constataram que o DPV e a deficiência hídrica afetam em maior proporção a fotossíntese de plantas com CVC. De acordo com os resultados obtidos nessa dissertação, fica claro que, além da deficiência hídrica e alto DPV (Habermann, 1999; Medina et al., 1999), temperaturas elevadas, por si só, acentuam as diferenças entre **A** de plantas sadias e com CVC.

A condutância estomática (g_s) e transpiração (**E**) das plantas sadias e com CVC também foram afetadas pelo aumento de **Tf** (Figuras 4b, 4c, 4d e 4f). Os maiores valores de g_s das plantas sadias foram encontrados a 25°C (Figura 4c e 4d) e os menores a 40°C ($p < 0,05$). Em citros, a temperatura ótima para g_s é 30°C (Hall et al., 1975; Khairi & Hall, 1976a,b; Kriedemann, 1971), isto é, pouco acima da encontrada nesse experimento. Nas plantas com CVC, as menores condutâncias foram atingidas a partir de 35°C no regime de 25/20°C e a 40°C no regime de 35/20°C ($p < 0,05$).

O aumento de **Tf** de 25 para 40°C no regime de 35/20°C acarretou decréscimo mais acentuado em g_s das plantas sadias. Esses dados indicaram que plantas sadias foram mais sensíveis ao aumento de **Tf** no regime de 35/20°C, ao contrário das plantas com CVC, nas quais o decréscimo de g_s foi maior no regime de 25/20°C (Figura 4c e 4d). Quando o regime de temperatura mudou de 25/20 para 35/20°C, verificou-se aumento médio de g_s de 74,6 e 51,4% em plantas sadias e doentes respectivamente, demonstrando que plantas com CVC foram menos sensíveis ao aumento da temperatura de crescimento ou apresentaram menor resposta às variações ambientais.

A diferença média entre g_s de plantas sadias e com CVC a 25/20°C foi de 37,3%, já a 35/20°C essa diferença aumentou para 45,6%. Portanto, as diferenças em g_s , assim como em **A**, se tornaram mais acentuadas a 35/20°C. Os menores valores de g_s das plantas com CVC possivelmente estão relacionados com o menor teor de água nas folhas (Habermann, 1999; Machado et al., 1994; Medina et al., 2001), ocasionado pela oclusão parcial dos vasos do xilema.

Segundo Goodwin et al. (1988), amendoeiras infectadas por "phony peach" apresentaram maiores resistências estomáticas. Embora não se tenha detectado diferença estatística entre tecidos foliares sadios e doentes sem sintomas, a resistência estomática dos tecidos doentes assintomáticos foi duas vezes maior se comparado com tecidos sadios.

Como **E** é função direta de **g_s**, as alterações decorrentes do aumento de **T_f**, do regime de temperatura e da presença da bactéria foram semelhantes às ocorridas em **g_s**. Os valores de **E** encontrados nesse experimento estão dentro da variação observada por outros autores, isto é, entre 1,1 e 4 mmol H₂O m⁻² s⁻¹ em plantas sadias (Hall et al., 1975; Kriedemann, 1971; Levy, 1980; Sinclair & Allen Jr., 1982; Vu et al., 1986).

As maiores taxas de **E** foram encontradas a 25°C (a 25/20°C) e entre 25 e 30°C (a 35/20°C) (p<0,05). **E** tendeu a decrescer à medida que **T_f** aumentou, sendo os menores valores encontrados a partir de 30°C nas plantas sadias e 35°C nas doentes, no regime de 25/20°C. O regime de temperatura 35/20°C fez com que os menores valores de **E** surgissem em **T_f** superior a 30°C, nas plantas sadias e doentes (p<0,05).

O aumento médio em **E** de 47,7% nas plantas sadias e de 39,4% nas doentes quando as plantas passam do regime de 25/20°C para 35/20°C, demonstra novamente a menor sensibilidade ou a menor resposta (devido à restrição hídrica) das plantas com CVC ao aumento da temperatura de crescimento.

A maior estabilidade das plantas doentes frente às variações ambientais já foi registrada na literatura. Em estudo envolvendo o aumento de DPV (de 1,2 para 2,5kPa), Habermann (1999) observou perda da sensibilidade de resposta de **A**, **E** e **g_s** em laranjeiras infectadas pela *X. fastidiosa*.

A restrição estomática devido à presença da *X. fastidiosa* foi 1,2 vezes maior quando o regime de temperatura passou de 25/20 para 35/20°C. Já o efeito da CVC em **A** foi 2,1 vezes maior no regime de 35/20°C, indicando que somente o decréscimo de **g_s** não deve justificar tamanha queda em **A**. O mesmo grau de abertura/fechamento estomático tem maior influência no fluxo de vapor d'água que no fluxo de CO₂ (Angelocci, 2000). Dessa forma, seriam esperados maiores decréscimos na transpiração do que na fotossíntese das plantas com CVC, o que não foi verificado. Portanto, existem

indícios de que outros processos estão sendo afetados pela CVC, que não apenas o mecanismo estomático.

As concentrações intercelulares de CO_2 (Ci) permaneceram constantes durante as medidas e semelhantes entre plantas saudas e doentes (dados não apresentados), indicando que não houve restrição de substrato para a realização da fotossíntese. Esse fato sugere que houve algum tipo de comprometimento no metabolismo fotossintético de plantas com CVC, tendo em vista que plantas saudas apresentaram maiores valores de A .

Habermann (1999), estudando as relações hídricas de laranjeiras infectadas pela CVC, observou que a menor eficiência de carboxilação das folhas doentes poderia ser a causa dos menores valores de A .

4.1.2 Fluorescência da clorofila *a*

A eficiência quântica máxima do fotossistema II (F_v/F_m) diminuiu com o aumento de Tf , alcançando valores máximos a 25°C ($p < 0,05$). Os decréscimos em F_v/F_m nas plantas saudas e com CVC foram mais acentuados a partir de 35°C (Figura 5a e 5b).

Decréscimos de F_v/F_m e da fluorescência máxima (F_m) com o aumento de Tf indicam dano no aparato fotossintético, no caso uma termoinibição (Bilger et al., 1995; Fracheboud, 2001; Krause & Weis, 1991; Laisk et al., 1998). Essa termoinibição pode ser uma causa adicional na queda de A , principalmente em Tf de 40°C .

A relação F_v/F_m das plantas doentes foi superior às saudas em todas as medidas realizadas ($p < 0,05$). As plantas infectadas não apresentaram alteração significativa em F_v/F_m quando o regime de temperatura mudou de $25/20$ para $35/20^\circ\text{C}$, enquanto que nas plantas saudas os valores de F_v/F_m foram maiores a $35/20^\circ\text{C}$ ($p < 0,05$). A maior diferença entre plantas saudas e doentes foi registrada a $25/20^\circ\text{C}$ (Figura 5a e 5b).

Figura 5 - Efeito da temperatura foliar na eficiência quântica potencial (F_v/F_m) [a, b] e efetiva ($\Delta F/F_m'$) [c, d] do fotossistema II e na taxa aparente de transporte de elétrons (ETR) [e, f] de mudas de laranja 'Pêra' sadias (■) e com CVC (○) submetidas a regimes de temperatura (dia/noite) de 25/20°C (a, c, e) e 35/20°C (b, d, f). Linhas verticais representam o desvio padrão da média (n=4).

Em geral, a ocorrência de estresses ambientais que afetam a eficiência do PSII levam ao decréscimo de F_v/F_m (Krause & Weis, 1991). Os valores de F_v/F_m encontrados nesse experimento indicam maior influência de T_f nas plantas a 40°C, sendo essa uma temperatura desfavorável à atividade fotoquímica das plantas sadias e doentes.

Houve maior influência da temperatura na eficiência quântica efetiva do PSII ($\Delta F/F_m'$) se comparada com F_v/F_m . O decréscimo de $\Delta F/F_m'$ ocorreu a partir de 30°C no regime de temperatura de 25/20°C ($p < 0,05$), porém, a 35/20°C, não houve diminuição dessa variável com o aumento de T_f (Figura 5c e 5d).

Os valores de $\Delta F/F_m'$, assim como F_v/F_m , foram maiores a 35/20°C ($p < 0,05$); entretanto não houve diferença entre plantas sadias e doentes nesse regime de temperatura. As plantas com CVC apresentaram valores de $\Delta F/F_m'$ superiores aos das plantas sadias apenas no regime de 25/20°C ($p < 0,05$) (Figura 5c e 5d).

Machado et al. (2001), avaliando a influência da CVC em laranjeira 'Natal' em condições de campo, verificaram que plantas infectadas apresentavam menores valores de F_v/F_m e $\Delta F/F_m'$. A recuperação de $\Delta F/F_m'$, com o passar do dia, foi mais lenta nas plantas doentes, no entanto essas diferenças foram evidentes apenas em condições em que o DPV alcançou 4kPa, a temperatura do ar 35°C e baixos valores de A .

Segundo Berry & Björkman (1980) e Havaux (1992), dentre os componentes do aparato fotossintético, o PSII possui maior sensibilidade térmica, já o fotossistema I (PSI), as enzimas do estroma e o sistema de membranas dos cloroplastos são comparativamente mais termoestáveis.

A taxa aparente de transporte de elétrons (**ETR**) não foi afetada pela CVC em ambos regimes de temperatura, embora os valores das plantas doentes tendessem a ser maiores no regime de 25/20°C. O efeito da temperatura foi evidente ($p < 0,05$); **ETR** aumentou em média 31,1% no regime de 35/20°C. O aumento de T_f de 25 para 40°C provocou diminuição em **ETR** apenas a 25/20°C (Figura 5e e 5f).

Os eventos que levam à inibição do transporte fotossintético de elétrons em folhas de batateira submetidas à alta temperatura são a inibição da fotólise da água (em temperaturas superiores a 32°C), redução da eficiência de captação de energia pelos

centros de reação do PSII, alterações no fluxo de elétrons após Q_A ($T_f > 42^\circ\text{C}$) e dano no PSI ($T_f > 45^\circ\text{C}$) (Havaux, 1993b).

Com o aumento de T_f , mais elétrons são direcionados para rotas alternativas, em detrimento da redução de carbono. Laisk et al. (1998) observaram que, a 45°C , $300\mu\text{mol mol}^{-1} \text{CO}_2$ e 21% de O_2 , cerca de 30% dos elétrons foram utilizados na fixação de carbono, enquanto que a $104\mu\text{mol mol}^{-1} \text{CO}_2$ e 2% de O_2 essa proporção diminuiu para 10%.

Berry & Björkman (1980) relatam que o aumento da temperatura de crescimento torna o aparato fotossintético mais tolerante ao estresse térmico. Esse fato foi confirmado pelos maiores valores de F_v/F_m , $\Delta F/F_m'$ e ETR no regime de $35/20^\circ\text{C}$. É importante notar que as medidas de F_v/F_m são as que mais se relacionam com A , ou seja, os maiores valores dessas medidas foram registrados a 25°C em ambos os regimes de temperatura.

De acordo com Pearcy (1978), a maior tolerância à elevação da temperatura deve-se à mudança na composição lipídica das membranas dos tilacóides, possivelmente resultando em menor fluidez das membranas. É possível que as plantas, ao permanecerem 7 dias no regime de $35/20^\circ\text{C}$, tenham adquirido essa conformação de membrana, o que pode ter promovido maiores valores de F_v/F_m , $\Delta F/F_m'$ e ETR nesse regime de temperatura.

Os processos fotoquímicos, como a captação de luz e transporte de elétrons, são relativamente imunes aos efeitos diretos da temperatura; porém, esses processos sofrem influência direta das alterações nos processos bioquímicos e das mudanças na fluidez da membrana dos tilacóides induzidas pelo calor (Nilsen & Orcutt, 1996).

Segundo Schreiber & Berry (1977), um dos primeiros componentes do aparato fotossintético a ser danificado pelo aumento de T_f são as membranas dos tilacóides. As reações dependentes de sua integridade são, particularmente, a fotólise da água e a fotofosforilação. As propriedades da membrana podem mudar quando a temperatura em que a planta está crescendo é alterada, presumivelmente pelo ajustamento de sua composição (Schreiber & Berry, 1977).

A CVC não influenciou a extinção fotoquímica (**qP**) e não fotoquímica (**NPQ**) da fluorescência. Os coeficientes de extinção **qP** e **NPQ** foram máximos a 40°C ($p < 0,05$) (dados não apresentados).

Segundo Schreiber & Bilger (1987), em condições naturais (21% de O₂ e 0,03% de CO₂), o decréscimo em **A**, não acompanhado pela diminuição de **qP**, indica que, nessa situação o oxigênio molecular funciona como eficiente acceptor de elétrons, reoxidando o "pool" de plastoquinona, mantendo dessa forma **qP** alto. Os resultados encontrados nesse experimento confirmam esse relato, indicando a existência de atividade fotorrespiratória nas folhas (Schreiber & Bilger, 1987).

Em temperaturas extremas (altas ou baixas) ocorre a desconexão do PSII do complexo coletor de luz (LHCII), seguido pela migração do PSII da região do grana para a lamela. Essa resposta de natureza fotoprotetiva, diminuiria o tamanho da antena do PSII sob excesso de luz (excesso de excitação) e possivelmente levaria a outras mudanças que tornariam os centros do PSII menos susceptíveis à fotoinibição (Demmig-Adams & Adams, 1992; Sundby et al., 1986).

Os resultados indicaram que, embora a parte fotoquímica das plantas com CVC esteja aparentemente em perfeito estado, os valores de assimilação de CO₂ ainda são inferiores aos das plantas saudáveis. Surge a questão: para onde estariam sendo direcionados os elétrons gerados pelas reações fotoquímicas, visto que não estariam sendo utilizados na fotossíntese?

Geralmente parte dos elétrons transportados é requerida por drenos alternativos. Esse transporte eletrônico alternativo é acelerado quando o metabolismo de carbono é inibido, além de ser dependente da temperatura (Laisk et al., 1998; Loreto et al., 1994 e 1995). Esse fato está relacionado com a capacidade dos processos protetores, como a ação dos antioxidantes nas moléculas de oxigênio ativo (Foyer et al., 1994). Os drenos alternativos de elétrons seriam principalmente a fotorrespiração e a redução de oxigênio molecular (reação de Mehler), que representariam um gasto de energia e estresse oxidativo, respectivamente. Se mais elétrons são utilizados nesses processos, a relação entre a eficiência quântica do PSII e da fixação de CO₂ (Φ_{PSII}/Φ_{CO_2}) tende a aumentar (Fracheboud, 2001).

Comparações entre o rendimento quântico da fixação de CO_2 (ΦCO_2) e a eficiência quântica do PSII (ΦPSII) em plantas de milho expostas a baixa temperatura sugerem o aumento do transporte de elétrons para os drenos alternativos, provavelmente gerando espécies ativas de oxigênio (Fryer et al., 1998). As espécies ativas de oxigênio, como peróxido de hidrogênio, superóxidos e hidroxilas, inativam enzimas e danificam importantes componentes celulares (Foyer et al., 1994). Segundo Foyer et al. (1994), a produção e destruição de espécies ativas de oxigênio estão intimamente envolvidas nos processos de hipersensibilidade e regulação do fluxo fotossintético de elétrons.

O aumento de T_f fez com que $\Phi\text{PSII}/\Phi\text{CO}_2$ aumentasse, sendo esse aumento mais acentuado nas plantas infectadas pela CVC a 40°C ($p < 0,05$). As plantas doentes apresentaram, em média, $\Phi\text{PSII}/\Phi\text{CO}_2$ 2,12 vezes superior às sadias (Figura 6).

Figura 6 - Efeito da temperatura foliar na relação entre eficiências quânticas do PSII e da fixação de CO_2 ($\Phi\text{PSII}/\Phi\text{CO}_2$) de mudas de laranja 'Pêra' sadias (■) e com CVC (○) submetidas a regimes de temperatura (dia/noite) de $25/20^\circ\text{C}$ (a) e $35/20^\circ\text{C}$ (b). Linhas verticais representam o desvio padrão da média ($n=3$).

Os drenos alternativos se tornaram mais ativos a 40°C em ambos regimes de temperatura (Figura 6), deixando evidente a diferença entre plantas sadias e com CVC. Esse fato mais uma vez confirma os relatos de que em condições de alta temperatura, as plantas doentes são mais afetadas.

Os principais fatores envolvidos na termoinibição são os danos no PSII, que causam decréscimo no transporte de elétrons e na produção de ATP, com consequente inativação da Rubisco; e aumento no transporte alternativo de elétrons (Laisk et al., 1998).

Ao invés dos elétrons serem encaminhados para processos fotossintéticos, foram direcionados para a fotorrespiração e/ou reação de Mehler. Essa afirmação foi apoiada devido as plantas com CVC apresentarem menores valores de A e mesma taxa de respiração mitocondrial (dados não apresentados). A taxa de liberação de CO_2 fotorrespiratório em plantas C_3 aumenta em temperatura elevadas, diminuindo a assimilação de CO_2 e a produção de biomassa (Marschner, 1995).

A fotorrespiração seria um processo que evitaria a fotoinibição, principalmente em plantas C_3 (Hall & Rao, 1994), dissipando o excesso de ATP e NADPH, gerando CO_2 interno (mantendo dessa forma a atividade da Rubisco) e consumindo oxidantes fortes como H_2O_2 , pela ação de catalases (Lorimer & Andrews, 1981; Lüttge et al., 1996).

4.2 Experimento II

Cabe ressaltar que as medidas de produção de oxigênio fotossintético e fluorescência da clorofila *a* foram realizadas em discos foliares, de plantas saudas e doentes, retirados das mesmas folhas utilizadas no experimento I.

A fotorrespiração, o efeito estomático e a oclusão vascular parcial foram praticamente eliminados nesse experimento, tendo em vista que o mesmo foi realizado com discos foliares e em condições saturantes de CO_2 (Delieu & Walker, 1981).

4.2.1 Produção de oxigênio fotossintético em função de DFFF

As maiores taxas de produção de oxigênio fotossintético (A_0) de plantas saudas e com CVC ocorreram a 35°C (Figura 7a e 7b). O aumento da temperatura de 35 para

45°C promoveu maior decréscimo em A_0 das plantas sadias, sugerindo que essas plantas foram mais susceptíveis ao aumento da temperatura foliar.

A CVC causou decréscimo médio de 31,4% em A_0 ($p < 0,05$) a 35°C; já a 45°C não foi observada diferença entre plantas sadias e doentes (Figura 7a e 7b). Ao que tudo indica, a temperatura de 45°C causou maior dano ao aparato fotossintético das plantas sadias.

Figura 7 - Efeito da densidade de fluxo de f\acute{o}tons fotossint\acute{e}ticos (DFFF) na produ\c{c}\~ao de oxig\~enio fotossint\acute{e}tico de mudas de laranja 'P\^era' sadias (■) e com CVC (O) em temperaturas de 35°C (a) e 45°C (b). Linhas verticais representam o desvio padr\~ao da m\~edia (n=3).

O aumento da temperatura foliar promoveu maiores pontos de compensa\c{c}\~ao luminoso, sendo que os valores aumentaram de 31 para 71 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ nas plantas sadias e de 52 para 86 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ nas plantas com CVC.

A efici\~encia qu\~antica da produ\c{c}\~ao de oxig\~enio fotossint\acute{e}tico (ΦO_2), dada pela parte linear inicial da curva de luz (at\~e 100 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), das plantas sadias e doentes foi semelhante a 35°C; j\~a a 45°C, nota-se menor ΦO_2 das plantas com CVC (Figura 7b).

A saturação lumínica foi afetada pela temperatura apenas nas plantas saudas, sendo atingida a 35°C, a partir de 791 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Nas plantas com CVC a saturação lumínica ocorreu a 343 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ em ambas temperaturas ($p < 0,05$).

4.2.2 Indução da fotossíntese e análise dos coeficientes de extinção da fluorescência da clorofila *a*

A temperatura influenciou a indução da fotossíntese nas plantas saudas e doentes, sendo os maiores valores de A_0 encontrados a 35°C ($p < 0,05$). As plantas saudas apresentaram maiores A_0 ($p < 0,05$), alcançando 2,5 $\mu\text{mol O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ a 35°C e 1,0 $\mu\text{mol O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ a 45°C (Figura 8a e 8b).

A 45°C, a fotossíntese das plantas com CVC não foi induzida, ao contrário do ocorrido a 35°C, quando os valores de A_0 chegaram a 1,5 $\mu\text{mol O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. A falta de indução das plantas doentes se deve ao comprometimento de processo(s) relativos à fase escura (bioquímica) da fotossíntese, tendo em vista que não houve dano à parte fotoquímica que justificasse os menores valores encontrados (Figura 8d e 8f). A temperatura de 45°C promoveu maior lentidão na indução da fotossíntese das plantas saudas.

Em plantas íntegras como as utilizadas no experimento I, a diminuição de A nas plantas com CVC é causada, em parte, pelos menores valores de g_s , consequência da oclusão parcial dos vasos do xilema pela *X. fastidiosa*. Deve-se realçar que a redução de A_0 devido à alta temperatura ocorreu em ambas as plantas; porém, as plantas com CVC foram mais afetadas. Esse fato leva a crer que existe outro fator, ainda não identificado, que causa maior redução de A e A_0 nas plantas infectadas pela *X. fastidiosa*.

Figura 8 - Produção de oxigênio fotossintético (a, b), eficiência quântica efetiva do PSII ($\Delta F/F_m'$) [c, d] e taxa aparente de transporte de elétrons (ETR) [e, f] durante a indução da fotossíntese de mudas de laranjeira 'Pêra' sadias (■) e com CVC (○) a 35°C (a, c, e) e 45°C (b, d, f). Linhas verticais representam o desvio padrão da média (n=3). Os primeiros valores das figuras 8c e 8d representam a eficiência quântica potencial do PSII (F_v/F_m). Indução realizada a $128 \mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Desde que o método empregado para quantificar A_o praticamente elimina o efeito dos estômatos e suprime a fotorrespiração (Walker, 1990), os menores valores de A_o encontrados em plantas com CVC suportam a hipótese de que o mecanismo fotossintético não é restringido apenas pelo menor g_s .

Os valores de F_v/F_m das plantas com CVC foram novamente superiores ($p < 0,05$), repetindo e confirmando os resultados obtidos no experimento I. A temperatura de 45°C causou decréscimo de F_v/F_m em ambas as plantas ($p < 0,05$) (Figura 8c e 8d). Uma vez que a CVC causa déficit hídrico, pode-se sugerir que a maior eficiência do PSII nas plantas doentes foi causada pela deficiência hídrica que, segundo Havaux (1992, 1993a), fortaleceria as interações entre proteínas do PSII e o meio lipídico, através de alterações na composição lipídica das membranas dos tilacóides em plantas sob estresse hídrico.

As plantas doentes apresentaram menor $\Delta F/F_m'$ a 35°C ($p < 0,05$) durante todo o período de indução. A taxa aparente de transporte de elétrons (**ETR**) foi afetada pela CVC da mesma forma que $\Delta F/F_m'$. Os maiores valores de **ETR** medidos a 35°C ocorreram nas plantas sadias ($p < 0,05$) (Figura 8e e 8f). As diferenças entre plantas sadias e doentes, no que diz respeito a $\Delta F/F_m'$ e **ETR**, foram evidentes apenas a 35°C; já a 45°C, o comportamento fotoquímico foi praticamente o mesmo.

Foram verificadas alterações nos coeficientes de extinção da fluorescência devido ao aumento de temperatura e à presença da *X. fastidiosa*. A extinção fotoquímica da fluorescência (**qP**) foi maior a 45°C ($p < 0,05$), apresentando valores semelhantes entre plantas sadias e doentes. Contudo, os altos valores de **qP** a 45°C não refletiram altos valores de produção de oxigênio fotossintético. O maior **qP** das plantas sadias a 35°C foi evidente, sendo superior desde o início da indução ($p < 0,05$) (Figura 9a e 9b).

Os maiores valores de **qP** (quando consideradas todas as medidas) foram encontrados nas plantas sadias, apresentando estabilização mais rápida quando comparada as plantas com CVC ($p < 0,05$).

A CVC causou maior **NPQ** a 35°C, não sendo observadas diferenças entre plantas sadias e com CVC a 45°C (Figura 9c e 9d). Nota-se um aumento acentuado de **NPQ** a partir de 120s (após o início da indução) nas plantas doentes a 35°C (Figura 9c), indicando que a presença de *X. fastidiosa* induziu maior dissipação de energia devido à

geração de calor e à energização das membranas dos tilacóides.

Uma vez que as medidas do experimento II foram efetuadas na ausência de fotorrespiração, ou seja, quando o efeito fotoprotetor desse mecanismo foi eliminado, as laranjeiras infectadas pela CVC dissiparam o excesso de excitação através do aumento de NPQ (Figura 9c).

Figura 9 - Extinção fotoquímica (qP) [a,b] e não-fotoquímica (NPQ) [c,d] da fluorescência durante a indução da fotossíntese de mudas de laranjeira 'Pêra' sadias (■) e com CVC (O) a 35°C (a,c) e 45°C (b,d). Linhas verticais representam o desvio padrão da média (n=3). Indução realizada a $128 \mu\text{mol f\acute{otons m}^{-2} \text{s}^{-1}}$.

NPQ respondeu de forma inversa a qP , ou seja, a utilização (ou dissipação) de energia nos processos fotoquímicos tendeu a aumentar, enquanto que a dissipação

através de processos não-fotoquímicos diminuiu com a indução da fotossíntese, vindo confirmar a competição entre esses processos (Figura 9).

Assim como na curva de luz, as medidas de A_0 durante a indução da fotossíntese foram superiores nas plantas saudáveis, confirmando que algum tipo de restrição, direta ou indireta, da parte fotoquímica e/ou bioquímica causou decréscimo de A_0 nas plantas com CVC. No caso das medidas efetuadas a 35°C, podemos sugerir que os menores valores de A_0 das plantas com CVC foram devido aos menores valores de $\Delta F/F_m'$, ETR e qP aliado ao comprometimento da parte bioquímica da fotossíntese. Já na temperatura de 45°C, os menores valores de A_0 das plantas doentes estão relacionados, aparentemente, apenas à menor capacidade bioquímica dessas plantas.

Com base nos resultados obtidos a 35°C, se torna evidente o efeito da CVC no aparato fotoquímico da fotossíntese em condições onde não existe a atividade fotorrespiratória. Portanto, existem vários aspectos relacionados à redução na atividade fotossintética das plantas infectadas pela *X. fastidiosa*, quando considerados os resultados obtidos em ambos os experimentos.

Em estudo realizado em laranjeira 'Natal' infectada por CVC, as plantas doentes apresentaram decréscimo de 60% em A em condições de alta demanda atmosférica e de temperatura (Machado et al., 1994; Machado et al., 2001).

Mathre (1968) também constatou que folhas de algodoeiro, aparentemente saudáveis, apresentaram redução de 50% na fotossíntese quando infectadas por *Verticilium*, um patógeno vascular. Em pessegueiros severamente infectados por "phony peach", doença também causada pela *X. fastidiosa*, ocorreu decréscimo de 10 a 18% em A (Andersen & French, 1987).

Em estudo envolvendo trocas gasosas e relações hídricas de laranjeiras com CVC, Machado et al. (1994) relatam que os sintomas de deficiência hídrica de plantas doentes estavam associados a decréscimos em A , E , g_s e do potencial da água na folha. Os resultados encontrados por esses autores indicaram que o decréscimo na fotossíntese estaria relacionado com baixos valores de condutância estomática das plantas com CVC, que, por sua vez, seriam decorrência da deficiência hídrica ocasionada pelo aumento da resistência ao fluxo de água nos xilemas de plantas infectadas.

Em plantas infectadas pela *X. fastidiosa*, ocorre redução na condutividade hidráulica dos vasos de xilema, devido à presença de agregados bacterianos. O fluxo diário de seiva foi 38% menor em plantas com CVC, devido à oclusão vascular (Dal Bosco, 2001; Dal Bosco et al., 2001). Uma vez que existe uma menor hidratação da parte aérea (copa), as plantas tendem a diminuir a perda de vapor d'água para a atmosfera, fechando os estômatos. No entanto, a menor condutância estomática das plantas com CVC promove, concomitante à redução na taxa de transpiração, decréscimo na fotossíntese. Esse fato ocorre devido aos estômatos influenciarem o processo de difusão de ambos os gases envolvidos nesses processos, ou seja, ao mesmo tempo que ocorre a restrição da perda de vapor d'água para a atmosfera, tem-se a diminuição do fornecimento de CO₂ para o processo fotossintético.

Segundo Esau (1948), a deposição de gomas nos vasos de xilema de videiras com mal de Pierce e de pessegueiros com "phony peach" é o primeiro sintoma interno da doença. Essa deposição, aliada ao aumento da formação de tiloses, ocorre antes do surgimento dos sintomas externos. Portanto, uma das prováveis causas do decréscimo de **A**, **E** e **g_s** em plantas doentes sem sintomas externos seja a restrição hídrica provocada pelo bloqueio dos vasos do xilema devido à presença de gomas e tiloses. Oliveira et al. (2000) observaram em laranjeira 'Natal' com CVC, sem sintomas visíveis, quedas ao redor de 60% no fluxo de seiva no xilema.

No experimento I, o menor **g_s** das plantas doentes seria consequência da possível restrição hídrica desencadeada pela CVC, que, por sua vez, poderia induzir menores taxas de **A** e **E**. Os valores de **A**, **E** e **g_s** das plantas com CVC, se comparados com as sadias, foram menos influenciados pelas variações de temperatura em ambos os experimentos, indicando que as plantas doentes sofreram um tipo de "hardening" induzido pela possível deficiência hídrica causada pela presença da bactéria.

O decréscimo de **A** em plantas infectadas por patógenos pode ser consequência não apenas do fechamento estomático, mas também da perda de área fotossinteticamente ativa. Porém, as alterações na fotossíntese de plantas com CVC foram detectadas em tecidos sem quaisquer sintomas da doença, demonstrando que a doença prejudicou as

plantas antes mesmo do desenvolvimento de sintomas externos. Esses resultados também foram encontrados por outros autores (Machado et al., 1994; Medina⁴).

Segundo Daly (1976) e Duniway (1976), além do efeito da menor condutância estomática na fotossíntese em plantas sob estresse biótico, tem-se a influência de lesões necróticas no tecido foliar, desbalanço de nutrientes e toxinas produzidas pelo patógeno, podendo esses fatores atuarem de forma simultânea ou não.

Goodwin et al. (1988) afirmam que o baixo número de vasos de xilema bloqueados e a falta de murchamento visível de folhas apresentando "phony peach" levam à hipótese de que toxinas produzidas pelas bactérias são as responsáveis pelas cloroses e necroses foliares. Contudo, a influência dessas toxinas no mecanismo fotossintético ainda é desconhecida.

Uma vez que, nas medidas de fotossíntese do segundo experimento, o efeito estomático foi eliminado, pode-se sugerir que os menores valores de fotossíntese das plantas com CVC confirmam que a bactéria, além de promover a queda na fotossíntese devido à maior resistência estomática, causa algum tipo de dano nas reações bioquímicas do processo fotossintético. Essas alterações bioquímicas poderiam ser ocasionadas por algum tipo de composto (toxina) produzido pela *X. fastidiosa* ou consequência indireta de possíveis respostas da planta frente a infecção por patógenos.

Andersen & French (1987) concluíram que as características sintomatológicas e biofísicas de plantas apresentando o "phony peach" não apoiam a hipótese dos sintomas serem resultantes apenas do bloqueio físico dos vasos do xilema pela bactéria.

Além de influenciar o mecanismo fotossintético através do fechamento estomático e danos na parte bioquímica, a CVC promove decréscimos na fotossíntese através do aumento da atividade fotorrespiratória, ou seja, ocorre aumento da atividade oxigenase em detrimento da atividade carboxilase da Rubisco em temperaturas elevadas

---

⁴ MEDINA, C.L. (UNICAMP, Instituto de Biologia, Departamento de Fisiologia Vegetal, Campinas). Comunicação pessoal. 2002

(40°C) ($p < 0,05$). Essa afirmação é baseada nos resultados obtidos no experimento I, quando esse tipo de mecanismo de fotoproteção estava ativo.

A atuação mais intensa de drenos alternativos nas plantas doentes fez com que as medidas de fluorescência (**qP**, **NPQ**, **ETR** e $\Delta F/F_m'$, no experimento I) não diferissem das sadias, ou seja, em condições onde as plantas podem utilizar a fotorrespiração como um processo de dissipação do excesso de energia, o aparato fotoquímico é protegido. Fica evidente que uma vez suprimida a fotorrespiração (experimento II), as plantas infectadas dissipam o excesso de excitação através da geração de calor, indicado pelos maiores valores de **NPQ**, sendo esse mais um mecanismo de fotoproteção de laranjeiras com CVC na ausência da fotorrespiração.

5 CONCLUSÕES

- O aumento da temperatura influencia o sistema planta-patógeno, agravando as disfunções no metabolismo fotossintético de laranjeira 'Pêra' com CVC.
- O decréscimo na fotossíntese de laranjeira 'Pêra' infectada pela *Xylella fastidiosa* é atribuído ao fechamento estomático, comprometimento de reações bioquímicas e aumento da atividade fotorrespiratória.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, P.J. Changes in the metabolism of wheat leaves induced by infection with powdery mildew. **American Journal of Botany**, v.29, n.6, p.425-435, 1942.
- ALMEIDA, R.P.P.; LOPES, J.R.S. Inoculação mecânica, multiplicação e movimento de *Xylella fastidiosa* em citros. **Fitopatologia Brasileira**, v.24, p.245, 1999. Suplemento. /Apresentado no XXXII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Fortaleza, 1999 - Resumo/
- ALMEIDA, R.P.P.; PEREIRA, E.F.; PURCELL, A.H.; LOPES, J.R.S. Multiplication and movement of a citrus strain of *Xylella fastidiosa* within sweet orange. **Plant Disease**, v.85, n.4, p.382-386, 2001.
- ANDERSEN, P.C.; FRENCH, W.J. Biophysical characteristics of peach trees infected with phony peach disease. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.31, n.1, p.25-40, 1987.
- ANGELOCCI, L.R. **Processos de transferência no sistema planta-atmosfera**. Piracicaba:CALQ, 2000. 112p.
- ASADA, K. Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. In: FOYER, C.H.; MULLINEAUX, P.M. (Ed.) **Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants**. Boca Raton: CRC Press, 1994. p.77-104.

- BALACHANDRAN, S.; HURRY, V.M.; KELLEY, S.E.; OSMOND, C.B.; ROBINSON, S.A.; ROHOZINSKI, J.; SEATON, G.G.R.; SIMS, D.A. Concepts of plant biotic stress. Some insights into the stress physiology of virus-infected plants, from the perspective of photosynthesis. **Physiologia Plantarum**, v.100, n.2, p.203-213, 1997.
- BERNACCHI, C.J.; SINGSAAS, E.L.; PIMENTEL, C.; PORTIS JR, A.R.; LONG, S.P. Improved temperature response functions for models of Rubisco-limited photosynthesis. **Plant, Cell and Environment**, v.24, n.2, p.253-259, 2001.
- BERRY, J.; BJÖRKMAN, O. Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology**, v.31, p.491-543, 1980.
- BILGER, W.; SCHREIBER, U.; BOCK, M. Determination of the quantum efficiency of photosystem II and non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in the field. **Oecologia**, v.102, n.4, p.425-432, 1995.
- BOLHÀR-NORDENKAMPF, H.R.; ÖQUIST, G.O. Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. In: HALL, D.O.; SCURLOCK, J.M.O.; BOLHÀR-NORDENKAMPF, H.R.; LEEGOOD, R.C.; LONG, S.P. (Ed.) **Photosynthesis and production in a changing environment: a field and laboratory manual**. London: Chapman & Hall, 1993. p.193-206.
- DAL BOSCO, A. Transpiração em laranjeira (*Citrus sinensis* L. Osb.) infectada com *Xylella fastidiosa* Wells. Piracicaba, 2001. 53p. Dissertação. (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

- DAL BOSCO, A.; OLIVEIRA, R.F.; MACHADO, E.C.; RIBEIRO, R.V. Fluxo de seiva em laranjeira (*Citrus sinensis* L. Osb.) 'Pêra' infectada com *Xylella fastidiosa*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 8., Ilhéus, 2001. **Resumos**. Ilhéus:SBFV, 2001. p.212.
- DALY, J.M. The carbon balance of diseased plants: changes in respiration, photosynthesis and translocation. In: HEITEFUSS, R.; WILLIAMS, P.H. (Ed.) **Physiological plant pathology**. Berlin: Springer-Verlag, 1976. v.4. p.450-479. (Encyclopedia of Plant Physiology)
- DAVIS, M.J.; PURCELL, A.H.; THOMSON, S.V. Pierce's disease of grapevines: isolation of the causal bacterium. **Science**, v.199, n. 4324, p.75-77, 1978.
- DELIEU, T.; WALKER, D.A. Polarographic measurement of photosynthetic oxygen evolution by leaf discs. **New Phytologist**, v.89, n.2, p.165-178, 1981.
- DEMMIG-ADAMS, B.; ADAMS III, W.W. Photoprotection and other responses of plants to high light stress. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.43, p.599-626, 1992.
- DUNIWAY, J.M. Water status and imbalance. In: HEITEFUSS, R.; WILLIAMS, P.H. (Ed.) **Physiological plant pathology**. Berlin: Springer-Verlag, 1976. v.4. p.430-449. (Encyclopedia of Plant Physiology)
- ESAU, K. Anatomic effects of the viruses of pierce's disease and phony peach. **Hilgardia**, v.18, n.12, p.423-482, 1948.
- FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. **Agrianual 2002**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2002. 536p.

- FOYER, C.H.; DESCOURVIÈRES, P.; KUNERT, K.J. Protection against oxygen radicals: an important defense mechanism studied in transgenic plants. **Plant, Cell and Environment**, v.17, n.5, p.507-523, 1994.
- FRYER, M.J.; ANDREWS, J.R.; OXBOROUGH, K.; BLOWERS, D.A.; BAKER, N.R. Relationship between CO₂ assimilation, photosynthetic electron transport, and active O₂ metabolism in leaves of maize in the field during periods of low temperature. **Plant Physiology**, v.116, n.2, p.571-580, 1998.
- FRACHEBOUD, Y. **Using chlorophyll fluorescence to study photosynthesis**. <http://www.ab.ipw.agrl.ethz.ch/~yfracheb/flex.htm>. (8 jul. 2001)
- FUNDECITRUS. **Estatísticas CVC**. <http://www.fundecitrus.com.br/escvcbr.htm>. (15 mai. 2002)
- FURLANI, P.R. **Instruções para o cultivo de hortaliças de folhas pela técnica de hidroponia**. Campinas: Insituto Agrônômico, 1997. 30p. (Boletim Técnico, 168)
- GOMES, M.M.A. Relações hídricas, trocas gasosas e conteúdo de ácido abscísico e ácido 3-indol acético em laranjeiras 'Pêra' com clorose variegada dos citros. Campinas, 2001. 155p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
- GOODMAN, R.N.; KIRÁLY, Z.; ZAITLIN, M. **The biochemistry and physiology of infectious plant disease**. New York: D. Van Nostrand, 1967. cap.7, p.232-280 : Growth regulator metabolism.
- GOODWIN, P.H.; DEVAY, J.E.; MEREDITH, C.P. Roles of water stress and phytotoxins in the development of pierce's disease of the grapevine. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.32, n.1, p.1-15, 1988.

- GRAVENA, S.; DE NEGRI, J.D.; QUAGGIO, J.A.; GONZALES, M.A.; PINTO, W.B.S.; BASILE, G.B. Manejo de cigarrinhas e CVC no pomar. In: DONADIO, L.C.; MOREIRA, C.S. (Ed.) **Clorose variegada dos citros**. Bebedouro: Estação Experimental de Citricultura, 1997. p.93-112.
- HABERMANN, G. Trocas gasosas e relações hídricas em laranjeira-doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck cv. Pera) com clorose variegada dos citros (CVC). Botucatu, 1999. 79p. Dissertação. (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista.
- HALL, A.E.; CAMACHO-B, S.E.; KAUFMANN, M.R. Regulation of water loss by citrus leaves. **Physiologia Plantarum**, v.33, n.1, p.62-65, 1975.
- HALL, D.O.; RAO, K.K. **Photosynthesis: studies in biology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1994. 211p.
- HARTUNG, J.S.; BERETTA, J.; BRLANSKY, R.H.; SPISSO, J.; LEE, R.F. Citrus variegated chlorosis bacterium: axenic culture, pathogenicity, and serological relationships with other strains of *Xylella fastidiosa*. **Phytopathology**, v.84, n.6, p.591-597, 1994.
- HAVAUX, M. Stress tolerance of photosystem II in vivo. Antagonistic effects of water, heat, and photoinhibition stresses. **Plant Physiology**, v.100, n.1, p.424-432, 1992.
- HAVAUX, M. Rapid photosynthetic adaptation to heat stress triggered in potato leaves by moderately elevated temperatures. **Plant, Cell and Environment**, v.16, n. 4, p.461-467, 1993a.
- HAVAUX, M. Characterization of thermal damage to the photosynthetic electron transport system in potato leaves. **Plant Science**, v.94, n.1-2, p.19-33, 1993b.

- HILL, B.L.; PURCELL, A.H. Multiplication and movement of *Xylella fastidiosa* within grapevine and 4 other plants. **Phytopathology**, v.85, n.11, p.1368-1372, 1995.
- HOPKINS, D.L. Effects of plant growth regulators on development of pierce's disease symptoms in grapevine. **Plant Disease**, v.69, n.11, p.944-946, 1985.
- HOPKINS, D.L. *Xylella fastidiosa*: xylem-limited bacterial pathogen of plants. **Annual Review of Phytopathology**, v.27, p.271-290, 1989.
- HOPKINS, D.L.; THOMPSON, C.M. Seasonal concentration of the pierce's disease bacterium in 'Carlos' and 'Welder' muscadine grapes compared with 'Schuyler' bunch grape. **HortScience**, v.19, n.3, p.419-420, 1984.
- KHAIRI, M.M.A.; HALL, A.E. Temperature and humidity effects on net photosynthesis and transpiration of citrus. **Physiologia Plantarum**, v.36, n.1, p.29-34, 1976a.
- KHAIRI, M.M.A.; HALL, A.E. Comparative studies of net photosynthesis and transpiration of some citrus species and relatives. **Physiologia Plantarum**, v.36, n.1, p.35-39, 1976b.
- KRAUSE, G.H.; WEIS, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.42, p.313-349, 1991.
- KRIEDEMANN, P.E. Some photosynthetic characteristics of citrus leaves. **Australian Journal of Biological Sciences**, v.21, n.5, p.895-905, 1968.
- KRIEDEMANN, P.E. Photosynthesis and transpiration as function of gaseous diffusive resistances in orange leaves. **Physiologia Plantarum**, v.24, n.2, p.218-225, 1971.

- KRÜGNER, T.L. Ação do ambiente sobre doenças de plantas. In: GALLI, F. (Ed.) **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1978. v.1. p.215-226.
- KRÜGNER, R.; LOPES, M.T.V.C.; SANTOS, J.S.; BERETTA, M.J.G.; LOPES, J.R.S. Transmission efficiency of *Xylella fastidiosa* by sharpshooters and identification of two new vector species. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 14., Cordeirópolis, 1998. Campinas: IOCV, 1998. p.13-18.
- LAISK, A.; RASULOV, B.H.; LORETO, F. Thermoinhibition of photosynthesis as analyzed by gas exchange and chlorophyll fluorescence. **Russian Journal of Plant Physiology**, v.45, n.4, p.412-421, 1998.
- LARANJEIRA, F.F. Dez anos de clorose variegada dos citros: o que sabemos? **Laranja**, v.18, n.1, p.123-141, 1997.
- LEVY, Y. Effect of evaporative demand on water relations of *Citrus limon*. **Annals of Botany**, v.46, n.6, p.695-700, 1980.
- LIMA, J.E.O. A pesquisa sobre Amarelinho no Fundecitrus. **Laranja**, v.16, n.2, p.137-144, 1995.
- LOPES, J.R.S. Vector aspects of citrus variegated chlorosis. In: JOINT ANNUAL MEETING OF AMERICAN PHYTOPATHOLOGICAL SOCIETY AND ENTOMOLOGICAL SOCIETY OF AMERICA, Las Vegas, 1998. Las Vegas: APS & ESA, 1998. p.72

- LOPES, J.R.S.; BERETTA, M.J.G.; HARAKAVA, R.; ALMEIDA, R.P.P.; KRÜGNER, R.; GARCIA JR, A. Confirmação da transmissão por cigarrinhas do agente causal da clorose variegada dos citros. **Fitopatologia Brasileira**, v.21, p.343, 1996. Suplemento. /Apresentado no XXI Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Campo Grande, 1996 - Resumo/
- LORETO, F.; TRICOLI, D.; DI MARCO, G. On the relationship between electron transport rate and photosynthesis in leaves of the C4 plant *Sorghum bicolor* exposed to water stress, temperature changes and carbon metabolism inhibition. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.22, n.6, p.885-892,1995.
- LORETO, F.; DI MARCO, G.; TRICOLI, D.; SHARKEY, T.D. Measurements of mesophyll conductance, photosynthetic electron transport and alternative electron sinks of field grown wheat leaves. **Photosynthesis Research**, v.41, n.3, p.397-403,1994.
- LORIMER, G.H.; ANDREWS, T.J. The C₂ chem- and photorespiration carbon oxidation cycle. In: HATCH, M.D.; BOARDMAN, N.K. (Ed.) **Photosynthesis: the biochemistry of plants**, a comprehensive treatise. New York: Academic Press, 1981. v.8. p.330-375.
- LÜTTGE, U.; KLUGE, M.; BAUER, G. **Botanique: traité fondamental**. Trad. de V.A. Sieffert. Paris: Lavoisier, Tec & Doc., 1996. cap. 9, p.137-145: Les cytosomes.
- MACHADO, E.C.; MEDINA, C.L.; GOMES, M.M.A.; HABERMANN, G. Variação sazonal da fotossíntese, condutância estomática e potencial da água na folha de laranja 'Valência'. **Scientia Agricola**, v.59, n.1, p.53-58, 2002.

- MACHADO, E.C.; QUAGGIO, J.A.; LAGÔA, A.M.M.A.; TICELLI, M.; FURLANI, P.R. Trocas gasosas e relações hídricas em laranjeiras com clorose variegada dos citros. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.6, n.1, p.53-57,1994.
- MACHADO, E.C.; OLIVEIRA, R.F.; MEDINA, C.L.; SOUZA, R.P.; RIBEIRO, R.V.; SILVA, J.A.B.; STUCHI, E.S.; PAVANI, L.C. Respostas fisiológicas de laranjeira 'Natal' com clorose variegada dos citros (CVC) sob irrigação em condições de campo, em diferentes meses do ano. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 8., Ilhéus, 2001. **Resumos**. Ilhéus:SBFV, 2001. p.103.
- MACHADO, M.A. Clorose variegada dos citros: pesquisa e desenvolvimento. **Laranja**, v.18, n.1, p.143-154,1997.
- MALAVOLTA, E.; PRATES, H.S.; VITTI, G.C.; PINTO, W.B.S. Novas observações sobre o "amarelinho" ou clorose variegada dos citros. **Laranja**, v.14, n.1, p.177-200, 1993.
- MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. San Diego: Academic Press, 1995. 899p.
- MATHRE, D.E. Photosynthetic activities of cotton plants infected with *Verticillium albo-atrum*. **Phytopathology**, v.58, n.2, p.137-141, 1968.
- McELRONE, A.J.; SHERALD, J.L.; FORSETH, I.N. Effects of water stress on symptomatology and growth of *Parthenocissus quinquefolia* infected by *Xylella fastidiosa*. **Plant Disease**, v.85, n.11, p.1160-1164, 2001.
- MEDINA, C.L.; MACHADO, E.C.; GOMES, M.M.A. Condutância estomática, transpiração e fotossíntese em laranjeira 'Valência' sob deficiência hídrica. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.11, n.1, p.29-34, 1999.

- MEDINA, C.L.; MACHADO, E.C.; GOMES, M.M.A.; MACHADO, M.A. Relações entre fotossíntese e demanda atmosférica e potencial de água em laranjeira 'Pêra' com CVC. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 8., Ilhéus, 2001. **Resumos**. Ilhéus:SBFV, 2001. p.103.
- MINSAVAGE, G.V.; THOMPSON, C.M.; HOPKINS, D.L.; LEITE, R.M.V.B.C.; STALL, R.E. Development of a polymerase chain-reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. **Phytopathology**, v.84, n.5, p.456-461, 1994.
- MONSON, R.K.; STIDHAM, M.A.; WILLIAMS III, G.J.; EDWARDS, G.E.; URIBE, E.G. Temperature dependence of photosynthesis in *Agropyron smithii* Rydb. I. Factors affecting net CO₂ uptake in intact leaves and contribution from ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase measured *in vivo* and *in vitro*. **Plant Physiology**, v.69, n.4, p.921-928, 1982.
- NILSEN, E.T.; ORCUTT, D.M. **The physiology of plants under stress**: abiotic factors. New York: John Wiley, 1996. cap.11, p.445-485: High temperature and energy balance.
- OLIVEIRA, A.C.; CRISTOFANI, M.; MACHADO, M.A. Avaliação de multiplicação de *Xylella fastidiosa* em uma progênie F₁ de *Citrus sunki* e *Poncirus trifoliata*. **Fitopatologia Brasileira**, v.23, p.214, 1998. Suplemento. /Apresentado no XXXI Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Fortaleza, 1998 - Resumo/
- OLIVEIRA, R.F.; MACHADO, E.C.; MARIN, F.R.; MEDINA, C.L. Sap flow rates and stomatal conductance of sweet orange 'Pêra' (*Citrus sinensis* L. Osb.). In: INTERNATIONAL SOCIETY OF CITRICULTURE CONGRESS, 9., Orlando, 2000. Orlando: ISC, 2000. p.391.

- OSMOND, C.B. What is photoinhibition? In: BAKER, N.R.; BOWYER, J.R. (Ed.) **Photoinhibition of photosynthesis**. Oxford: Bios Scientific, 1994. p.1-24.
- PALAZZO, D.A.; CARVALHO, M.L.V. Estimativas de perdas em laranja Natal, por clorose variegada dos citros (CVC), nas colheitas de 1991/92, em Colina, SP. **Fitopatologia Brasileira**, v.18, p.295, 1993. Suplemento. /Apresentado no XXVI Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Aracaju, 1993 - Resumo/
- PARADELA FILHO, O.; SUGIMORI, M.H.; RIBEIRO, I.J.A.; GARCIA JR, A.; BERETTA, M.J.G.; HARAKAWA, R.; MACHADO, M.A.; LARANJEIRA, F.F.; NETO, J.R.; BERIAM, L.O.S. Constatação de *Xylella fastidiosa* em cafeeiro no Brasil. **Summa Phytopathologica**, v.23, n.1, p.46-49, 1997
- PEARCY, R.W. Effect of growth temperature on the fatty acid composition of the leaf lipids in *Atriplex lentiformis* (torr.) Wats. **Plant Physiology**, v.61, n.4, p.484-486, 1978.
- POOLER, M.R.; HARTUNG, J.S. Genetic relationships among strains of *Xylella fastidiosa* from RAPD-PCR data. **Current Microbiology**, v.31, n.2, p.134-137, 1995a.
- POOLER, M.R.; HARTUNG, J.S. Specific PCR detection and identification of *Xylella fastidiosa* strains causing Citrus variegated chlorosis. **Current Microbiology**, v.31, n.6, p.377-381, 1995b.
- PURCELL, A.H.; HOPKINS, D.L. Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v.34, p.131-151, 1996.

- PURCELL, A.H.; FINLAY, A.H.; MCLEAN, D.L. Pierce's disease bacterium: mechanism of transmission by leafhopper vectors. **Science**, v.206, n.4420, p.839-841, 1979.
- RAIJ, B. van.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A.; FURLANI, A.M.C. (ed.) **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. Campinas: Instituto Agrônomo & Fundação IAC, 1996. 285p.
- RAJU, B.C.; WELLS, J.M. Diseases caused by fastidious xylem-limited bacteria and strategies for management. **Plant Disease**, v.70, n.3, p.182-186, 1986.
- REUTHER, W. Citrus. In: ALVIM, P.T.; KOZLOWSKI, T.T. (Ed.) **Ecophysiology of tropical crops**. Londres:Academic Press, 1977. p.409-439.
- RIBEIRO, R.V.; MACHADO, E.C.; OLIVEIRA, R.F.; MEDINA, C.L. Resposta da fotossíntese à temperatura e sua interação com a intensidade luminosa em mudas de laranjeira 'Pera'. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 8., Ilhéus, 2001. **Resumos**. Ilhéus:SBFV, 2001. p.211.
- ROSSETTI, V. Clorose variegada dos citros (CVC). In: RODRIGUES, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU Jr., J.; AMARO, A.A. **Citricultura brasileira**. Campinas: Fundação Cargill, 1991. p.715-721.
- SALVA, R.A.; ROBERTO, R.S.; CARLOS, E.F. Situação da clorose variegada dos citros no estado de São Paulo. **Laranja**, v.16, n.2, p.155-164, 1995.
- SCHREIBER, U.; BILGER, W. Rapid assessment of stress effects on plant leaves by chlorophyll fluorescence measurements. In: TENHUNEN, J.D.; CATARINO, F.M.; LANGE, O.L.; OECHEL, W.C. **Plant response to stress**. Berlin: Springer-Verlag; NATO ASI Series, 1987. p.27-53. (Series G: Ecological Sciences, v.15).

- SCHREIBER, U.; BERRY, J.A. Heat-induced changes of chlorophyll fluorescence in intact leaves correlated with damage of the photosynthetic apparatus. **Planta**, v.136, n.3, p.233-238, 1977.
- SINCLAIR, T.R.; ALLEN Jr., L.H. Carbon dioxide and water vapour exchange of leaves on field-grown citrus trees. **Journal of Experimental Botany**, v.33, n.137, p.1166-1175, 1982.
- STAFNE, E.T.; CLARK, J.R.; ROM, C.R. Leaf gas exchange response of 'Arapaho' blackberry and six red raspberry cultivars to moderate and high temperatures. **HortScience**, v.36, n.5, p.880-883, 2001.
- SUNDBY, C.; MELIS, A.; MÄENPÄÄ, P.; ANDERSSON, B. Temperature-dependent changes in the antenna size of photosystem II. Reversible conversion of photosystem II_α to photosystem II_β. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.851, n.3, p.475-483, 1986.
- SYVERTSEN, J.P.; BAUSHER, M.G.; ALBRIGO, L.G. Water relations and related leaf characteristics of healthy and Blight affected citrus trees. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.105, n.3, p.431-434, 1980.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. Sunderland: Sinauer Associates, 1998. cap. 25, p.725-757: Stress physiology.
- VU, J.C.V.; YELENOSKY, G.; BAUSHER, M.G. CO₂ exchange rate, stomatal conductance, and transpiration in attached leaves of 'Valencia' orange. **HortScience**, v.21, n.1, p.143-144, 1986.

- VU, J.C.V.; YELENOSKY, G. Water deficit and associated changes in some photosynthetic parameters in leaves of 'Valencia' orange (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck). **Plant Physiology**, v.88, n.2, p.375-378, 1988.
- WALKER, D.A. **Use of the oxygen electrode and fluorescence probes in simple measurements of photosynthesis**. Chichester: Oxygraphics Ltd., 1990. 203p.
- WALZ. **Portable chlrophyll fluorometer PAM-2000 and data aquisition software DA-2000**. Effeltrich: Walz Mess-und Regeltechnik, 1993. 199p.
- WELLS, J.M.; RAJU, B.C.; HUNG, H.; WEISBURG, W.G.; MANDELCO-PAUL, L.; BRENNER, D.J. *Xylella fastidiosa* gen. nov., sp. nov: Gram-negative, xylem-limited, fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.37, n.2, p.136-143, 1987.
- WRIGHT, D.P.; BALDWIN, B.C.; SHEPHARD, M.C.; SCHOLLES, J.D. Source-sink relationships in wheat leaves infected with powdery mildew. II. Changes in the regulation of the Calvin cycle. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.47, n.4, p.255-267, 1995.
- YAMAMOTO, P.T.; ROBERTO, S.R.; DALLA PRIA JR, W.; FELIPE, M.R.; MIRANDA, V.S.; TEIXEIRA, D.C.; LOPES, J.R.S. Transmissão de *Xylella fastidiosa* pelas cigarrinhas *Homalodisca ignorata*, *Acrogonia virescens* e *Molomea cincta* (Hemíptera: Cicadellidae) em plantas cítricas. **Summa Phytopathologica**, v.26, n.1, p.128, 2000. /Apresentado no XVIII Congresso Paulista de Fitopatologia, Campinas, 1999 - Resumo/