**FLUXO DE SEIVA EM LARANJEIRA (*Citrus sinensis* L. Osb.)
“PÊRA” INFECTADA COM *Xylella fastidiosa* Wells**

ADRIANO DAL BOSCO

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. **RICARDO FERRAZ DE OLIVEIRA**

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

PIRACICABA

Estado de São Paulo – Brasil

Março – 2001

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Dal Bosco, Adriano

Fluxo de seiva em laranjeira (*Citrus sinensis* L. Osb.) "Pêra" infectada com *Xylella fastidiosa* Wells / Adriano Dal Bosco. -- Piracicaba, 2001.
53 p. : il.

Dissertação (mestrado) -- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2001.
Bibliografia.

1. Bactéria fitopatogênica 2. Clorose-variegada-dos-citros 3. Fluxo de calor 4.
Laranja pêra 5. Resistência estomática 6. Transpiração vegetal 7. Xilema I. Título

CDD 634.31

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

AGRADECIMENTOS

À Estação Experimental de Citricultura Sílvia Moreira pela disponibilização das mudas utilizada no experimento.

Ao Dr. Eduardo Caruso Machado pela doação das mudas.

Ao Prof. Dr. Luiz Roberto Angelocci pela revisão, feita fora do seu horário de trabalho, e pelas sugestões.

Aos colegas Rafael Ribeiro Vasconcelos e Fábio Marin pelas explicações e ajuda na montagem do experimento.

Ao M. Sc. Roberto Terumi Atarassi pelas discussões e explicações.

Ao Prof. Dr. Ricardo Ferraz de Oliveira pela orientação. E também pela compreensão e paciência.

SUMÁRIO

Página

AGRADECIMENTOS.....	ii
RESUMO.....	v
SUMMARY	vii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3 MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1 Material Vegetal Utilizado	10
3.2 Medição do Fluxo de Seiva.....	11
3.2.1 Método.....	11
3.2.2 Instalação dos sensores	15
3.3 Transpiração e Resistência Foliar ao Fluxo de Vapor.....	19
3.4 Delinamento Experimental e Análise dos Dados.....	20
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1 Área Foliar	21
4.2 Fluxo de Seiva Medido pelo Método de Balanço de Calor	22
4.2.1 Parcelas Eliminadas	22
4.2.2 Sinais Provenientes dos Sensores.....	25
4.2.3 Balanço de Calor	27
4.2.4 Variação de temperatura ao longo do caule (dT)	29
4.2.5 Fluxo de Seiva nas Plantas Infectadas	33
4.3 Transpiração Medida com o Porômetro	35
5 CONCLUSÕES.....	38
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
APÊNDICE	45

FLUXO DE SEIVA EM LARANJEIRA (*CITRUS SINENSIS* L. OSB.) “PÊRA” INFECTADA COM *XYLELLA FASTIDIOSA* WELLS

Autor: Adriano Dal Bosco

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Ferraz de Oliveira

RESUMO

A *Xylella fastidiosa* é uma bactéria limitada ao xilema responsável por doenças em várias espécies de plantas. Essas doenças são caracterizadas por sintomas de estresse hídrico e, nas folhas, escaldadura e necrose marginal ou clorose variegada, que é um sintoma típico em citros. Para quantificar os efeitos da infecção por *X. fastidiosa* em laranjeiras, o fluxo de seiva foi medido em plantas de 2,5 anos de idade pelo método do balanço de calor (MBC) de Sakuratani, durante 9 dias. A área foliar das plantas foi determinada para calcular o fluxo de seiva por unidade de área, que foi considerado como sendo equivalente à transpiração. Os dados assim obtidos foram confrontados com medições feitas com o porômetro durante 3 dias. Foi observada uma redução na transpiração, das plantas infectadas em relação às sadias, de 38 %, pelo MBC, e de 21 a 37%, nas medições feitas com o porômetro. A resistência foliar à difusão de vapor foi de 35 a 97 % maior nas plantas infectadas do que nas plantas sadias. A redução na transpiração e o aumento na resistência difusiva foram registrados para as plantas infectadas, tanto em folhas com sintomas visíveis de doença, como em folhas aparentemente sadias. Não foi possível confirmar que a causa primária do estresse hídrico, associado à doença, é o entupimento dos vasos do xilema, porque a diminuição na transpiração pode ter sido decorrente do fechamento

dos estômatos possivelmente ocasionado por alguma substância produzida pela bactéria ou pela planta infectada.

SAP FLOW IN ORANGE TREES (*Citrus sinensis* L. Osb., CULTIVAR “PÊRA”) AFFECTED BY *Xylella fastidiosa* Wells

Author: Adriano Dal Bosco

Adviser: Prof. Dr. Ricardo Ferraz de Oliveira

SUMMARY

Xylella fastidiosa is a xylem-limited bacterium responsible for diseases in several plant species. These diseases are characterized by water stress symptoms and leaf marginal scald and scorch, and variegated chlorosis, which is a typical symptom in citrus. In order to quantify the effects of *X. fastidiosa* infection in orange trees, sap flow was measured in 2,5 years-old plants using Sakuratani's heat balance technique (HBT) during 9 days. The trees' leaf area was measured to determine sap flow per leaf unit area, which was considered to be equivalent to transpiration per unit area. The transpiration data obtained employing HBT were compared with three-day porometer transpiration data. Transpiration rate, measured using HBT, was found to be 38 % lower in affected plants than in unaffected ones, and 21 to 37 % lower, when measured using the porometer. Foliar resistance to vapor diffusion was 35 to 97 % higher in affected plants than in unaffected ones. Reduction in transpiration rate and increase in diffusion resistance was recorded for affected plants in leaves with visual symptoms as well as in apparently healthy ones. It was not possible to confirm xylem vessels plugging as the primary cause for the water stress, associated to the disease, because the decrease in transpiration could have been due to stomata closure possibly brought about by some substance produced by the bacteria or by the affected plant.

1 INTRODUÇÃO

A *Xylella fastidiosa* Wells é uma bactéria limitada ao xilema que causa doenças em várias plantas. De alguma forma, a *X. fastidiosa* ocasiona sintomas de estresse hídrico na planta, tais como murcha das folhas, diminuição no crescimento da planta e redução no tamanho dos frutos. Em alguns hospedeiros, a infecção com a bactéria pode causar ainda escaldadura e necrose marginais e clorose variegada nas folhas.

Existem três teorias principais para explicar esses sintomas. A primeira afirma que a bactéria produz alguma(s) toxina(s) que causa(m) tanto os sintomas foliares, como os sintomas de estresse hídrico, agindo no mecanismo de abertura e fechamento dos estômatos ou em outros mecanismos bioquímicos. Outra teoria é a de que a bactéria provoca um desbalanço hormonal que, por si só, é suficiente para explicar todos os sintomas da doença. A terceira teoria explica melhor o sintoma de estresse hídrico, pois baseia suas explicações no aumento da resistência à passagem da seiva nos vasos de xilema provocado pela presença de uma massa bacteriana associada a gomas e tiloses, obstruindo o lúmen. Levando-se em consideração a distribuição das obstruções, essa teoria explica, até certo ponto, também os sintomas foliares, já que em plantas com sintomas foliares, as bactérias são encontradas no pecíolo e nas nervuras, ao passo que em plantas sem sintomas foliares, as bactérias estão, nas raízes, tronco ou ramos principais.

É possível que o desenvolvimento dos sintomas da doença seja uma associação dos mecanismos propostos por cada teoria, mas a última teoria parece ser a mais provável como causa primária de todos os sintomas das doenças causadas por *X. fastidiosa*.

Todas as medições de condutividade hidráulica, absorção e fluxo de seiva realizadas até o momento foram feitas por métodos destrutivos. Por isso tendem a não

considerar o sistema todo, desprezando os fatores secundários que interagem com o fluxo de seiva em plantas infectadas. Além disso, não há na literatura dados de fluxo de seiva em laranjeiras infectadas com *X. fastidiosa*.

No presente trabalho são apresentadas medições do fluxo de seiva, pelo método do balanço de calor (MBC), e transpiração foliar, usando o porômetro, em laranjeiras com clorose variegada dos citros, uma doença causada pela *Xylella fastidiosa*. Ambos os métodos são não-destrutivos e as medições são feitas enquanto os outros possíveis fatores responsáveis pelo desenvolvimento dos sintomas estão ativos. Espera-se confirmar a hipótese de que a causa primária dos sintomas da clorose variegada dos citros é a obstrução física dos vasos de xilema pela colonização da bactéria.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A clorose variegada dos citros foi identificada no Brasil pela primeira vez em 1987. Desde então, vem-se estudando o patógeno responsável, os insetos vetores e as alterações fisiológicas decorrentes da infecção. A doença foi relacionada ao mal de Pierce que ataca a videira e foi provado que era causada pelo mesmo patógeno (Chagas et al., 1992), a bactéria limitada ao xilema *Xylella fastidiosa* Wells. No ano seguinte, os postulados de Koch foram satisfeitos por Lee et al. (1993), comprovando que realmente a *X. fastidiosa* era a causadora da clorose variegada dos citros.

A doença se caracteriza pelo aparecimento de manchas amarelas no lado ventral das folhas e subsequente formação de pequenas bolhas gomosas nos locais correspondentes no lado dorsal. Esse sintoma, no início lembra a deficiência de zinco, mas, com a evolução da doença, se diferencia pelas bolhas de goma. Os frutos são menores, em maior número e com o pericarpo endurecido. São persistentes e têm um amarelecimento precoce. No aspecto geral, a planta tem uma diminuição no vigor e, em consequência, da estatura. A menor estatura se deve ao encurtamento dos entrenós. As perdas não se dão somente pela diminuição na produção, mas também na qualidade dos frutos, que não são adequados nem à indústria, nem ao consumo *in natura*.

Queiroz-Voltan & Paradela Filho (1999) fizeram uma análise morfológica mais detalhada das plantas de citros doentes e caracterizaram melhor os sintomas. Segundo esses autores, na região das bolhas de goma, há uma desestruturação do parênquima lacunoso, com divisões celulares anormais e espessamento das paredes celulares com lignina. Além da divisão celular desordenada, há um crescimento celular anormal, o que culmina com o fechamento dos espaços intercelulares do tecido e a formação das bolhas de goma na parte externa do lado dorsal da folha. Além disso, os

cloroplastos do parênquima paliçádico se desintegram, mostrando-se externamente como clorose. Além dessas alterações morfológicas, há alterações bioquímicas, como o aumento no teor de lignina e das enzimas β -1,3-glucanase e quitinase, associadas à resposta de defesa de plantas à presença de patógenos (MARTINS et al., 1999).

No entanto, os sintomas acima só aparecem em fases bem avançadas da doença. O primeiro sintoma detectável assemelha-se a um estresse hídrico e/ou estresse nutricional, tendo a doença sido, no início, confundida com essas situações. Hopkins (1982) relacionou a infecção de citros com a bactéria do mal de Pierce ao aparecimento de uma doença do tipo murcha em mudas de citros em casa de vegetação. Os sintomas observados foram a murcha de brotações jovens, o enrolamento de folhas jovens e uma redução no tamanho das folhas e no crescimento geral da planta. As plantas doentes exibiam sintomas semelhantes aos de deficiência de cobre e desenvolviam-se de forma arbustiva. Alguns desses sintomas ocorrem também em plantas em estresse hídrico.

Não há dúvida de que a infecção por *X. fastidiosa* provoca um estresse hídrico, não só em citros, mas também em videira, ameixeira, pessegueiro, cafeeiro e outras plantas. Em todos os casos, esse é o sintoma inicial. Com a evolução, a infecção causa sintomas diferenciados para cada cultura. Segundo Raju & Wells (1986), em videira e ameixeira, ocorre escaldadura ou necrose das margens. Em pessegueiro, por outro lado, não há sintomas visíveis nas folhas, mas a planta mostra-se severamente atrofiada e tem um hábito de crescimento compacto (Raju & Wells, 1986).

O sintoma de déficit hídrico, a princípio, parece estar relacionado à obstrução dos vasos de xilema pelas bactérias que aí se desenvolvem e formam gomas e tiloses para fixar-se às paredes das células. Entretanto, dada a diversidade de sintomas nas diferentes culturas atacadas pela *X. fastidiosa*, alguns autores acreditam que as bactérias produzem uma ou mais toxinas diretamente responsáveis por alguns sintomas, como a escaldadura e necrose marginal das folhas e, indiretamente, até pelo estresse hídrico, através de um desbalanço hormonal e nutricional da planta.

Esau (1948) estudou sintomas internos de algumas doenças hoje atribuídas à bactéria *Xylella fastidiosa* e verificou que elas tinham em comum a presença de gomas

obstruindo o lúmen do xilema. Outra doença, conhecida como declínio dos citros e de causa ainda desconhecida, também provoca a formação de gomas nos vasos de xilema (Childs¹, citado por Nemec, 1975), levando a planta a apresentar sintomas de estresse hídrico.

Nemec et al. (1975) observou que havia vasos obstruídos tanto em plantas sadias, quanto em plantas com sintomas de declínio dos citros. Todavia, a percentagem de vasos com obstruções era maior nas plantas doentes. Em um trabalho posterior, Nemec (1975) concluiu que somente as obstruções gomosas, as quais sugeriu serem formadas por pentosanas, é que realmente representavam obstrução ao fluxo, já que obstruções lipídicas eram encontradas também em plantas sadias. Esses autores constataram ainda uma interação entre a percentagem de vasos obstruídos e a absorção de água e corante pelo xilema de plantas doentes e plantas sadias. Isso mostra que deve haver um outro fator influenciando a condutividade do xilema além das obstruções.

As obstruções presentes em plantas com declínio dos citros são encontradas em maior abundância em vasos mais velhos do que em tecidos novos, próximos ao câmbio (Cohen, 1980, Cohen et al., 1983, Timmer et al., 1986), e em troncos mais grossos do que em ramos e raízes finas (Cohen et al., 1983). Cohen et al., 1983 ainda mediu a condutividade hidráulica de fragmentos de caule de plantas sadias e doentes e não encontrou diferença significativa nessa variável para ramos finos. Evert (1987) encontrou a mesma distribuição das obstruções em pessegueiro atacado por *X. fastidiosa*. Huang et al. (1986) detectaram bactérias em elementos traqueários menores, mas sem a presença de pectina, goma ou tanino em videiras infectadas com *Xylella fastidiosa*. Está claro que essa distribuição é devida ao crescimento novo da planta e à lentidão do processo de infecção e produção de gomas.

Não há acordo entre pesquisadores sobre se a percentagem de vasos obstruídos e a localização das obstruções é suficiente para causar o sintoma de estresse hídrico na parte aérea e/ou os outros sintomas observados em plantas

¹ CHILDS, J. F. L. Observations on citrus blight. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, v.66, p.33-37, 1954.

infectadas com *X. fastidiosa*. Alguns pesquisadores perceberam que os sintomas foliares do mal de Pierce aparecem ainda quando a colonização do xilema pelas bactérias é pequena, sugerindo que deveria haver um outro mecanismo além do simples entupimento físico dos vasos para explicar isso (Hopkins, 1989). Os outros mecanismos possíveis colocadas na literatura são de que esses sintomas podem ser decorrentes de um desbalanço hormonal causado pelas bactérias ou consequência direta da ação de alguma fitotoxina produzida por elas.

Lee et al. (1982) tentou isolar a(s) fitotoxinas presumivelmente responsáveis pelos sintomas do mal de Pierce em videira. Para isso, preparou um extrato de *X. fastidiosa* multiplicada em meio de cultura. Demonstrou que o extrato era capaz de produzir sintomas característicos da doença em folhas de videira. Além disso, separou o extrato em duas frações. A fração 1, de peso molecular bem maior do que a fração 2, produziu apenas o sintoma de murcha. A fração 2 produziu o sintoma de escaldadura. Mais tarde, demonstrou-se que o meio de cultura utilizado por Lee et al. (1982) já continha substâncias capazes de provocar os sintomas semelhantes aos do mal de Pierce, mesmo na ausência total da bactéria (Goodwin et al., 1988). Assim, ainda não há uma conclusão definitiva sobre a importância de supostas fitotoxinas no desenvolvimento de sintomas de doenças causadas por *X. fastidiosa*.

A possibilidade de que a causa primária do desenvolvimento dos sintomas do mal de Pierce em videira seja um desbalanço hormonal foi analisada por Hopkins (1985). Em cultivares mais resistentes, a aplicação de cinetina ou de ácido giberélico paralisou o desenvolvimento de sintomas. Em plantas infectadas, mas ainda sem sintomas, nas quais esses reguladores vegetais foram aplicados, não foi possível a detecção de bactérias no pecíolo foliar. A aplicação de ácido abscísico ou de etefon em altas doses levou cultivares altamente resistentes a manifestar sintomas da doença, quando infectados. Por outro lado, nenhum dos reguladores vegetais utilizados teve efeito sobre as bactérias *in vitro*. Hopkins ainda especula que a doença não se desenvolve em plantas jovens porque, nessas plantas, há uma maior concentração de ácido indolacético e cinetina. Provavelmente, esses hormônios

favorecem algum mecanismo de defesa da planta que inibe o desenvolvimento das colônias de bactérias.

Queiroz-Voltan et al. (1998) sugeriram que a presença da *X. fastidiosa* no xilema de cafeeiro, de alguma forma diminui o teor de zinco na planta, ocasionando menor síntese de ácido indolacético e causando os sintomas típicos da doença. Em citros, Queiroz-Voltan & Paradela Filho (1999) encontraram um acúmulo de cristais de hesperidina no pecíolo e ramos com sintomas visuais de CVC, o que segundo os autores, pode significar um bloqueio na via metabólica responsável pela produção de triptofano, precursor do ácido indolacético.

French & Stassi (1978) afirmam que a aplicação de ácido giberélico reverte os sintomas de “phony peach” em pessegueiro, sem, no entanto, afetar a população bacteriana. Evert (1987) não concorda com a possibilidade de a deficiência de ácido giberélico estar relacionada aos sintomas de “phony peach” em pessegueiro. Isto porque a doença provoca a diminuição do tamanho dos frutos e a aplicação de giberilina não tem efeito reverso.

Diamond & Edgington (1960) estudaram plantas de tomate com murcha de *Fusarium* e mostraram que uma redução de 50% do raio efetivo de um grande feixe vascular pode ser compensada, dois nós acima na haste, por um aumento de pressão no xilema de apenas 3%. Nemec et al. (1975) consideraram o número de vasos obstruídos nas raízes de plantas com declínio suficiente para provocar sintomas de estresse hídrico na parte aérea. Em medições de fluxo em fragmentos de caule de citros, Young & Garnsey (1977) observaram um fluxo 40% menor em plantas com sintomas moderados de declínio dos citros, quando comparado ao fluxo medido em plantas saudas. A condutividade hidráulica em plantas de pessegueiro infectadas com *X. fastidiosa* medida por Evert (1987) foi, em média, 72% do valor medido em plantas saudas. Esse autor atribuiu todos os sintomas da doença conhecida como “phony peach” ao bloqueio físico dos vasos de xilema pela massa bacteriana e pelas substâncias produzida pelas bactérias. Para Hopkins (1981), a percentagem de entupimento dos vasos por *X. fastidiosa* em videira é suficiente para causar o sintoma de estresse hídrico nas folhas de plantas doentes. Machado et al. (1994) afirmam que no caso da clorose variegada dos citros, as relações hídricas são afetadas pelo

aumento da resistência ao transporte de água e que uma diminuição na taxa de absorção da água pelas raízes também pode estar relacionada.

A localização na planta das obstruções ao fluxo tem relação com os sintomas apresentados por plantas afetadas. Em plantas com declínio dos citros, raramente aparecem sintomas foliares. Nessas plantas, as maiores porcentagens de vasos entupidos são encontradas nas raízes (Nemec et al., 1975; Cohen et al., 1983), no tronco e ramos mais grossos (Cohen, 1980, Cohen et al., 1983). Em pessegueiro, a infecção de *X. fastidiosa* dá-se com maior rapidez na raiz, no tronco principal e nos ramos grossos (Esau, 1948). Também nessa planta não aparecem sintomas foliares com frequência. Na escaldadura da amendoeira, mal de Pierce e clorose variegada dos citros, os sintomas foliares são típicos da infecção por *X. fastidiosa*. Micertich et al. (1976) constatou a presença da bactéria em 10 a 15% dos vasos da nervura principal das folhas, mas não encontrou nenhuma bactéria nos tecidos radiculares de amendoeira com escaldadura. Hopkins (1981), em um estudo com videiras afetadas pelo mal de Pierce, encontrou uma percentagem de vasos entupidos por bactérias muito menor no caule do que nas folhas, e maior nas nervuras do que no pecíolo. Goodwin et al. (1988) demonstraram ainda que a resistência à passagem do fluxo na junção nó-pecíolo era de 60 a 200 vezes maior em plantas com o mal de Pierce do que em plantas sadias. Em citros com CVC, a obstrução dos vasos diminui das folhas para o caule (Queiroz-Voltan & Paradela Filho, 1999).

Embora haja fortes indicações de que a causa primária dos sintomas da CVC seja o bloqueio físico dos vasos de xilema pelas bactérias e as gomas e tiloses produzidas por elas ou em decorrência da sua presença, não há uma confirmação definitiva desse fato. A planta é um organismo complexo e muitos fatores devem ser levados em consideração concomitantemente. Para isso, é necessário, quando possível trabalhar com os fatores isolados em plantas vivas e inteiras. O presente trabalho objetiva encontrar algumas respostas no que se refere à obstrução do fluxo de seiva no xilema. As medições de fluxo em citros disponíveis na literatura foram feitas com fragmentos retirados da planta, imprimindo-se uma pressão semelhante à encontrada no xilema de plantas vivas a uma das extremidades do fragmento (Tyree & Zimmermann, 1971; Nemec et al., 1975; Young & Garnsey, 1977; Cohen,

1980; Cohen et al., 1983; Timmer et al., 1986). Com a medição do fluxo de seiva e de outros parâmetros do status hídrico da planta por métodos não destrutivos, é possível obter dados que levam em consideração a presença dos outros possíveis fatores envolvidos já discutidos acima.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL UTILIZADO

Oito mudas sadias de laranjeira (*Citrus sinensis* L. Osb.), cultivar “Pêra”, com 2,5 anos de idade, procedentes da Estação Experimental de Citricultura de Cordeirópolis, SP foram selecionadas para as medições de fluxo de seiva. Essas plantas tinham troncos com diâmetro aproximado de 20 a 25 mm à altura de, pelo menos, 15 cm do nível do solo. As mudas foram cultivadas em vasos plásticos com capacidade para 20 L, utilizando como substrato a seguinte mistura: 2 partes de terra peneirada, seca ao ar; 1 parte de areia grossa; 1 parte de uma mistura comercial à base de material orgânico (Plantamax).

Efetuuou-se um controle periódico de plantas daninhas, pragas e doenças. A reposição de nutrientes foi feita periodicamente via água de irrigação. Para a reposição de nutrientes, utilizou-se a solução de Hoagland.

Doze meses antes do início das medições, 4 das 8 mudas selecionadas foram inoculadas com *Xylella fastidiosa* pelo método de Medina (1998). Esse método consiste em inocular a bactéria em plantas de limão-cravo, que é mais facilmente infectado pelo patógeno. Em seguida, enxerta-se por encostia um ramo infectado numa muda de laranjeira.

As plantas foram então trazidas para Piracicaba e transferidas para tanques plásticos de 100 L de capacidade, contendo o mesmo substrato acima. Ao substrato, foi adicionado adubo NPK, conforme necessidade indicada pela análise de solo.

Os tanques com as plantas foram colocados numa casa de vegetação de 90 m² de área, constituída de telado antiafídico, situada no Posto Meteorológico do Departamento de Ciências Exatas da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo (USP), no município de Piracicaba, SP, cujas seguintes coordenadas geográficas são: 22°42'30" de latitude Sul, 47°30'00" de longitude Oeste, a 546 m de altitude média.

A irrigação foi feita somente uma vez, no início do experimento, até a saturação do substrato. Não foram feitas irrigações adicionais até o fim do experimento. Entretanto, durante os dias de medição, houve a ocorrência de chuva, conforme mostram os dados meteorológicos obtidos no posto Meteorológico do Departamento de Ciências Exatas da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo (Tabela 1).

Tabela 1. Dados meteorológicos coletados durante o período do experimento

Dia Juliano	Radiação Global W m ⁻²	Insolação h d ⁻¹	Precipitação mm d ⁻¹	Umidade Relativa %	Vel. máxima do vento km h ⁻¹	Vel. média do vento km h ⁻¹	Temperatura máxima °C	Temperatura mínima °C	Temperatura média °C	Evaporação mm d ⁻¹
32	259	8,4	0	76	9,1	7	31,8	20,1	26,4	6,9
33	253	7,4	0	77	8,5	4,8	32,1	21	26,6	6,08
34	263	7,9	0	75	7,7	4,9	31,5	21,7	26,6	6,08
35	269	8,2	0,2	74	6,2	4,9	32,9	21	27	6,17
36	240	8	17,2	87	17	7,1	33,6	21,5	27,1	6,19
37	197	4,4	11,6	80	19,6	9,1	30,6	20,5	25,6	5,8
38	182	3,9	0	83	5,7	6,4	31,1	20,7	25,9	4,7
39	206	7,3	15,6	86	20,1	4,9	33,5	20,8	27,2	7,4
40	86	1,2	5	98	5,5	1,6	25,1	21,4	23,3	5,33

Fonte: Posto Meteorológico do Departamento de Ciências Exatas – ESALQ/USP

3.2 MEDIÇÃO DO FLUXO DE SEIVA

3.2.1 MÉTODO

As taxas de fluxo de seiva foram determinadas pelo método de balanço de calor (Sakuratani, 1981), utilizando sensores do modelos SGB 19 e SGB 25, fabricados pela Dynamax Inc., Houston, TX/EUA. Os sensores são compostos por uma jaqueta térmica com uma resistência elétrica feita de um fio de constantan (tamanho AWG 24)

encapado com teflon, termopares de cobre—constantan e uma capa branca de isopreno que serve como isolante térmico. O método baseia-se no fornecimento de calor a um segmento de caule de volume conhecido. Todo o calor perdido por condução é medido pelos termopares. A diferença entre o total de energia fornecida pela resistência e o total da energia medida pelos termopares é a energia perdida por convecção da seiva. Esse valor está diretamente relacionado ao fluxo de seiva naquele segmento de caule. Os sensores foram ligados a um sistema de aquisição de dados modelo CR7X, fabricado pela Campbell Sci., UT/EUA, o qual registrava os sinais AH, BH e CH (Figura 1) em μV , com resolução de 1 nV, e o sinal de diferença de potencial aplicada à jaqueta térmica, em V, com resolução de 1 mV. O sistema de aquisição de dados foi programado para ler os dados a cada segundo e registrar a média a cada 5 minutos.

Para calcular o fluxo de seiva, foram utilizadas as seguintes equações, fornecidas por Van Bavel (1999):

$$F_s = \frac{Q_f}{dT \cdot C_p} \quad (1)$$

Onde:

F_s é o fluxo de seiva em g s^{-1} ;

Q_f é a potência (em W) perdida por convecção da seiva no segmento de caule, calculada pela eq. (2);

Figura 1. Representação esquemática de um sensor de fluxo de seiva. Diferença de voltagem (μV) entre os termopares superiores dos dois conjuntos (AH). Diferença de voltagem (μV) entre os termopares inferiores dos dois conjuntos (BH). Diferença de voltagem (μV) entre a termopilha interna e a externa à placa de cortiça (CH). Potência (W) aplicada à jaqueta térmica (Pin). Diferença de temperatura (K) entre a porção abaixo e a porção acima da jaqueta térmica (dT).

dT é a diferença de temperatura (em K) entre a porção do caule abaixo e a porção acima da jaqueta térmica (Figura 1), calculada pela eq. (3) e;

Cp é a capacidade térmica da água, que é igual a $4,186 \text{ J g}^{-1} \text{ K}^{-1}$.

$$Q_r = P_{in} - Q_r - Q_v \quad (2)$$

Onde:

P_{in} é a potência de entrada em W, calculada pela eq. (4);

Q_r é a potência (em W) perdida radialmente por condução através de um isolante de cortiça, calculada pela eq. (5);

Q_v é a potência (em W) perdida verticalmente por condução no segmento de caule, calculada pela eq. (6).

$$dT = \frac{(AH + BH)}{2 \cdot K_T} \quad (3)$$

Onde:

AH é diferença de potencial elétrico (em mV) entre os termopares superiores de cada conjunto. Há um conjunto de termopares acima e outro abaixo da jaqueta térmica (Figura 1);

BH é a diferença de potencial elétrico (em mV) entre os termopares inferiores de cada conjunto e;

K_T é uma constante para conversão de mV para K. Van Bavel (1999) recomenda o valor 0,4 mV K⁻¹. Mas o valor 0,384 mV K⁻¹ foi utilizado, por ser mais adequado, de acordo com a Escala Internacional de Temperatura, 1990 – ITS-90 (National Bureau of Standards, 2001), para a faixa de voltagem observada nas leituras.

$$P_{in} = \frac{V_{in}^2}{R} \quad (4)$$

Onde:

V_{in} é a diferença de potencial elétrico (em V) aplicada à jaqueta térmica e;

R é a resistência da jaqueta térmica em Ω.

$$Q_r = K_{sh} \cdot CH \quad (5)$$

Onde:

K_{sh} é uma constante de condutividade (em W mV⁻¹) da placa de cortiça que separa as duas termopilhas que medem CH e é calculada para cada dia de medição pela eq. (6) quando o fluxo de seiva é desprezível;

$$K_{sh} = \frac{P_{in} - Q_v}{CH} \quad (6)$$

O **K_{sh}** utilizado foi calculado para cada dia de medição a partir da média das leituras registradas na madrugada anterior, entre as 3 e 5h.

CH é a leitura da diferença de potencial elétrico entre a termopilha adjacente à jaqueta térmica e a outra colocada no lado externo do isolante de cortiça.

$$Q_v = \frac{(BH - AH) \cdot A \cdot K_{st}}{K_T \cdot dX} \quad (7)$$

Onde:

A é a área (em m^2) de secção transversal do segmento de caule onde o sensor foi instalado;

K_{st} é a condutividade térmica do caule, que foi considerada como sendo $0,42 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$;

O calor armazenado (Q_a) no segmento de caule foi considerado desprezível (Weibel & Boersma, 1995; Grime et al., 1995).

Os dados de fluxo de seiva assim coletados foram filtrados aplicando as restrições propostas por Van Bavel (1999), com exceção da velocidade máxima da seiva, que foi considerada como sendo $0,03 \text{ cm s}^{-1}$, tendo como base a média das leituras de fluxo máximo registradas. Assim foram eliminadas as leituras que estavam fora da faixa de sensibilidade dos sensores. Os dados de fluxo de seiva foram coletados durante 7 dias compreendidos entre os dias 2 e 9 de janeiro de 2001, nas 8 plantas do experimento. Numa planta testemunha foi instalado um sensor (ao qual não foi aplicada voltagem para aquecimento da jaqueta térmica) para o monitoramento do dT passivo.

Steinberg et al. (1989) e Oliveira (1997) forneceram explicações detalhadas sobre a construção e princípios de funcionamento dos sensores e Baker & Nieber (1989), Groot & King (1992) e Shackel et al. (1992) relataram análises das fontes de erro envolvidas no método.

3.2.2 INSTALAÇÃO DOS SENSORES

Os sensores foram instalados numa tarde de sol, que foi seguida por quatro dias consecutivos de sol, com céu aberto. No quinto e sexto dias, houve baixas precipitações ($<10 \text{ mm d}^{-1}$) à tarde, com sol entre nuvens. Nos dias seguintes, houve precipitações mais intensas, acompanhadas de vento.

O tronco das plantas teve o tecido suberoso parcialmente eliminado no segmento onde seriam instalados os sensores utilizando uma lixa fina. Isso é necessário para garantir um bom contato do caule com a jaqueta térmica. Para melhorar ainda mais o contato, utilizou-se uma pasta com alta condutividade térmica (Dow Corning 4, da Dow Corning Corp., MI/EUA) (Figura 2b).

Os sensores foram instalados no tronco das árvores a uma altura de, pelo menos, 15 cm da superfície do solo (Figura 3a), para evitar a influência do calor irradiado pelo solo sobre o sensor e do gradiente de temperatura entre as raízes e o caule. Para melhorar o isolamento térmico, cada sensor foi totalmente coberto com 3 camadas de papel alumínio (Figura 3b). O caule abaixo do sensor também foi coberto com papel alumínio até o colo. Para completar a vedação na parte superior do conjunto do sensor e isolante térmico, foi utilizada uma pasta de silicone (Figura 3c). Essa vedação é muito importante, pois a entrada de água chuva ou irrigação alteraria o balanço de calor no sistema.

As jaquetas térmicas foram alimentadas eletricamente através de uma fonte portátil de voltagem de corrente contínua, modelo 3303A (Topward), com capacidade para uma diferença máxima de potencial de 30 V e uma corrente de 3 A. A fonte de voltagem foi ajustada para fornecer 12 V a um regulador de voltagem, modelo AVR D (Dynamax Inc., Houston, TX/EUA). O regulador foi ajustado para fornecer de 4,7 a 4,8 V para os sensores. A ligação entre o regulador e os sensores, bem como entre os sensores e o sistema de aquisição de dados foi feita com um cabo de 15 m, modelo ECW-50 (Dynamax Inc., Houston, TX/EUA), que continha os 6 fios necessários para fazer todas as ligações.

Figura 2. Aspectos das plantas e instalação dos sensores de fluxo de seiva. Sintomas de estresse hídrico em uma planta infectada (a). Aplicação da pasta de silicone de alta condutividade térmica (b). Instalação de um sensor de fluxo de seiva (c).

Figura 3. Aspectos das plantas e instalação dos sensores de fluxo de seiva. Sensores instalados, já com a capa de isopreno e o isolamento adicional acima e abaixo do sensor (a). Sensor coberto com 3 camadas de papel alumínio (b). Aplicação de silicone na parte superior do conjunto sensor-isolantes (c).

3.3 *TRANSPIRAÇÃO E RESISTÊNCIA FOLIAR AO FLUXO DE VAPOR*

Após as medições de fluxo de seiva, as árvores foram desfolhadas e a área foliar total de cada planta foi determinada utilizando o planímetro eletrônico modelo LI-3000A fabricado pela Li-Cor, Inc., NE/EUA. Foi então calculado o fluxo de seiva diário por unidade de área. Como as plantas eram de pequeno porte, a diferença entre o fluxo de seiva no tronco e a transpiração foliar foi considerada desprezível para dados integrados ao longo de um dia inteiro.

Foram feitas também medições de transpiração e resistência foliar à difusão de vapor, utilizando um porômetro de equilíbrio dinâmico, modelo LI-1600, fabricado pela Li-Cor, Inc. (Lincoln, NE/EUA). As leituras no aparelho foram feitas em $\mu\text{g cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (transpiração) e em s cm^{-1} (resistência difusiva).

Para as medições, foram escolhidas 3 folhas jovens de cada planta dispostas num ângulo de 120° umas das outras na parte distal dos ramos. Nas plantas doentes, quando possível, as folhas com sintomas foram as escolhidas. A cabeça do sensor do porômetro estava ajustada para medições em folhas largas, amostrando uma área circular de 2 cm^2 . Para evitar discrepância em leituras consecutivas na mesma folha, todas as leituras de um mesmo dia foram feitas na mesma região da folha: no centro do limbo, evitando-se a nervura principal.

As medições foram feitas a cada hora, das 9h às 18h, durante três dias. Das 9h às 14h foi possível calibrar o porômetro para fixar umidade na câmara semelhante à do ambiente. Entretanto, depois desse horário, devido à menor taxa transpiratória, não foi possível fazer leituras utilizando a calibração acima. Por conseguinte, o porômetro foi calibrado para utilizar uma umidade na câmara dez pontos percentuais abaixo da umidade do ambiente.

Apesar do cuidado em se escolher folhas semelhantes e submetidas a exposições semelhantes, houve uma grande variação nos valores registrados para diferentes folhas da mesma planta. Optou-se então por considerar apenas os valores máximos e mínimos obtidos em cada planta. Na escolha das folhas, priorizou-se o critério orientação, não tendo sido possível, portanto, escolher somente folhas com

sintomas nas plantas infectadas. Portanto, nas plantas infectadas, os valores máximos de transpiração medidos com o porômetro representam folhas sem sintomas, ao passo que os valores mínimos representam as folhas com sintomas severos.

3.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE DOS DADOS

Foi utilizado o Delineamento Completamente Casualizado, sendo cada parcela constituída por uma planta. Foram utilizados dois tratamentos com quatro repetições: plantas infectadas com *X. fastidiosa* e plantas sadias (controle). As variáveis consideradas em cada parcela foram o fluxo de seiva por unidade de área, a transpiração foliar e a resistência foliar à difusão de vapor. Devido à alta variação encontrada entre plantas submetidas ao mesmo tratamento, optou-se pela utilização da estatística descritiva para análise dos resultados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na ocasião em que se realizaram as medições, as plantas infectadas apresentavam sintomas da clorose variegada dos citros com severidade e distribuição diferentes. Algumas plantas tinham folhas cloróticas em alguns ramos, os quais também apresentavam encurtamento dos entrenós. Em outras plantas, não havia clorose, mas os sintomas de estresse hídrico, como o enrolamento das folhas, já estavam presentes.

Algumas folhas das plantas infectadas, ao invés de clorose variegada, apresentavam uma coloração alterada, de um verde mais claro, às vezes amarelado.

O porte das plantas infectadas, em geral, era menor do que o das plantas sadias. Entretanto, as plantas sem sintomas foliares visíveis apresentavam porte semelhante ao das plantas sadias.

4.1 ÁREA FOLIAR

A área foliar das plantas infectadas foi menor do que a das plantas sadias (Tabela 2). Vários autores (Shinozaki et al., 1964; Rogers & Hinckley, 1979; Tyree & Sperry, 1988) já observaram a dependência da área foliar de um ramo com a sua condutividade hidráulica. Portanto, a redução na área foliar nas plantas infectadas provavelmente se deve a uma diminuição da condutividade hidráulica do xilema, provavelmente causada pelo entupimento de vasos colonizados pela *X. fastidiosa*.

Tabela 2. Área foliar das plantas estudadas

Plantas saudáveis		Plantas doentes	
Repetição	Área foliar (m ²)	Repetição	Área foliar (m ²)
I	1,524	I	1,180
II	1,841	II	1,235
III	1,930	III	1,266
IV	2,076	IV	1,999

4.2 FLUXO DE SEIVA MEDIDO PELO MÉTODO DE BALANÇO DE CALOR

4.2.1 PARCELAS ELIMINADAS

Duas das 8 parcelas utilizadas na obtenção dos dados de transpiração pelo método de balanço de calor foram eliminadas. Uma dessas parcelas correspondia a uma planta sadia e a outra a uma planta doente. As leituras correspondentes a essas plantas oscilavam bruscamente em intervalos de tempo muito curtos. A Figura 4 ilustra o comportamento da leitura de fluxo de seiva por unidade de área a cada 5 minutos na planta infectada eliminada. A Figura 5 mostra o comportamento do fluxo de seiva por unidade de área numa outra planta infectada, que foi mantida no experimento. O comportamento do fluxo de seiva nas outras plantas do experimento é mostrado no Apêndice.

Figura 4. Fluxo de seiva medido pelo método de balanço de calor durante 9 dias numa das parcelas eliminadas do experimento. Leituras a cada 5 minutos em uma planta infectada.

Figura 5. Fluxo de seiva medido pelo método de balanço de calor durante 9 dias numa das parcelas mantidas no experimento. Leituras a cada 5 minutos em uma planta infectada.

Nas primeiras 24 h depois da instalação dos sensores, é normal que haja oscilações e magnitude de leituras irreais, até que a jaqueta térmica atinja um estado de equilíbrio dinâmico com o segmento de caule. Algumas vezes, quando o contato entre a jaqueta térmica e os termopares com o segmento de caule não é bom, o tempo para que o sistema atinja o equilíbrio dinâmico aumenta. Nesse caso, espera-se que, com o crescimento da planta, em alguns dias o contato entre os elementos do sensor e o segmento de caule melhore e o equilíbrio dinâmico se estabeleça. Isso parece ter começado a acontecer no quarto dia de experimento (dia 35, Calendário Juliano), que seguiu 3 dias consecutivos de sol (Tabela 1). Mas, nos dias seguintes, com a ocorrência de chuvas acompanhadas de vento, o equilíbrio se desfez.

No final do experimento, com a retirada do sensor, foi observada a presença de exsudatos e fungos na superfície de contato jaqueta térmica–segmento de caule. A

planta em questão não estava exposta à mesma quantidade e qualidade de radiação solar a que as outras plantas estavam durante período da manhã, devido à presença e árvores ao lado do telado. Isso contribuiu para que, na ocasião da instalação dos sensores, o caule dessa planta estivesse mais úmido do que o caule das demais. Assim, na tentativa de limpar e alisar o caule com uma lixa, o floema foi ferido, o que ocasionou a exsudação observada. Com a presença dos exsudatos, temperatura elevada e ausência de luz na superfície isolada com a capa de isopreno, o desenvolvimento de fungos foi favorecido. Os fungos e os exsudatos, aliados à umidade das chuvas, alteraram as propriedades térmicas do complexo sensor-caule, e prejudicaram o contato da jaqueta térmica com a superfície do segmento de caule. Cohen et al. (1993) tiveram um problema semelhante ao tentar medir o fluxo de seiva em milho. Quando os sensores foram instalados no caule sem a retirada da bainha foliar, os dados de fluxo de seiva correlacionavam-se melhor com o fluxo de radiação solar do que com a transpiração medida pelo método gravimétrico. Retirando-se a bainha, os dados de fluxo de seiva apresentavam uma alta correlação com a transpiração.

4.2.2 SINAIS PROVENIENTES DOS SENSORES

A Figura 6 mostra o comportamento dos sinais provenientes de um sensor de fluxo de seiva instalado numa planta sadia, durante 24 horas. CH é a diferença de voltagem (μV) entre as duas termopilhas que medem a perda radial de calor. AH é a diferença de voltagem (μV) entre os termopares superiores de cada par e BH é a diferença de voltagem (μV) entre os termopares inferiores de cada par, para a medida de fluxo de calor por condução no sentido axial do caule. A Figura 1 ilustra de forma esquemática a distribuição dos termopares e termopilhas.

Figura 6. Sinais registrados pelo sistema de aquisição dos dados a cada 5 minutos durante 24 horas no dia 37 (Calendário Juliano). Os sinais relativos às diferenças de tensão entre as termopilhas (CH), termopares superiores de cada conjunto (AH) e termopares inferiores de cada conjunto (BH) são dados em μV (escala à esquerda); a tensão aplicada à jaqueta térmica (V_{in}) é dada em V (escala à direita).

À noite, quando o fluxo de seiva é desprezível, a jaqueta térmica estava em equilíbrio com o segmento de caule, de forma que todos os termopares e termopilhas registravam uma diferença de tensão constante. CH é bem maior do que AH e BH porque a maior parte do calor, quando o fluxo de seiva é nulo, é perdida radialmente. AH é negativo porque mede a diferença de tensão entre o termopar superior mais distante da jaqueta térmica e o termopar inferior mais próximo à jaqueta. BH é positivo e de magnitude semelhante à de AH. Isso é esperado para a situação de fluxo zero e condutividade térmica uniforme do caule. V_{in} representa a diferença de potencial medida nos terminais da resistência da jaqueta térmica. É fundamental medir a tensão que sai da jaqueta térmica ao invés da tensão aplicada. A medição da

voltagem de saída garante um bom monitoramento do funcionamento da jaqueta térmica e da potência de fato aplicada ao segmento de caule.

Quando o fluxo de seiva tornou-se significativo, entre 8 e 9h, houve uma queda brusca no sinal de CH, chegando algumas vezes a atingir valores negativos. Com o calor perdido por convecção da seiva, a perda radial de calor fica próxima a zero. AH e BH, ao contrário de CH têm um aumento brusco, que se deve ao início do movimento da seiva que acumulou calor durante a noite. AH e BH assumem valores semelhantes em módulo, direção e sentido. Ou seja, o calor perdido verticalmente, medido pela diferença de AH e BH, fica próximo a zero quando há fluxo de seiva no segmento de caule.

4.2.3 BALANÇO DE CALOR

A Figura 7 ilustra o balanço de calor, mostrando a potência (em W) aplicada e perdida pelo segmento de caule. P_{in} é a potência aplicada ao caule. Seu comportamento é semelhante ao de V_{in} , apesar de haver uma relação quadrática entre esses dois valores (eq. 4). Isso ocorre porque V_{in} varia muito pouco, mostrando que a voltagem fornecida pelo regulador é estável. Essa estabilidade é muito importante quando não se considera o calor armazenado (Q_a) nas medições.

Q_v é a potência perdida verticalmente e é proporcional à diferença entre BH e AH (eq. 6), por isso, com o início do fluxo de seiva pela manhã, o valor de Q_v cai drasticamente. Para a obtenção de medidas confiáveis, é importante que Q_v , embora baixo, não assuma valores negativos. O mesmo pode ser dito com relação a Q_r (potência perdida radialmente). Na medida em que esses valores ficam próximos a zero ou negativos, o valor da potência perdida por convecção da seiva (Q_f), que não é medido diretamente (eq. 2), pode atingir valores iguais ou superiores à potência aplicada (Figura 7). Quando isso acontece, dT (eq. 3) aproxima-se de zero e Q_f assume valores altos, de forma que o fluxo calculado pela eq. 1 tende ao infinito. Portanto, não é mais possível determinar o fluxo real de seiva; esse é o limite de sensibilidade do sensor.

Figura 7. Valores de potência aplicada (P_{in}) e de sua repartição nos diferentes fluxos de calor ao longo do dia 37 (Calendário Juliano). Q_v e Q_r são as potências dissipadas, respectivamente, nos sentidos axial e radial do caule. Q_f é a potência dissipada convectivamente pela seiva.

Para que o fluxo integrado em 24h não seja prejudicado por valores irreais registrados na situação acima, os dados foram filtrados para a condição de velocidade máxima da seiva (Van Bavel, 1999). O fluxo máximo (eq. 8) é calculado e, toda vez que um fluxo maior for lido, o filtro ajusta para que seja registrado o fluxo máximo no lugar.

$$F_{m\acute{a}x} = V_{m\acute{a}x} \cdot A \quad (8)$$

Onde:

$F_{m\acute{a}x}$ é o fluxo máximo que o sensor pode registrar em $\text{cm}^3 \text{s}^{-1}$;

$V_{\text{máx}}$ é a velocidade máxima da seiva para o tipo de planta e ramo utilizado na medição. O valor $0,03 \text{ cm s}^{-1}$ foi utilizado;

A é a área de secção transversal do segmento de caule onde o sensor está instalado em cm^2 .

Num dia em que o fluxo de seiva foi menor (Figura 8), Q_r não foi maior do que P_{in} em nenhum momento.

Figura 8. Valores de potência aplicada (P_{in}) e de sua repartição nos diferentes fluxos de calor ao longo do dia 34 (Calendário Juliano). Q_v e Q_r são as potências dissipadas, respectivamente, nos sentidos axial e radial do caule. Q_f é a potência dissipada convectivamente pela seiva.

4.2.4 VARIAÇÃO DE TEMPERATURA AO LONGO DO CAULE (dT)

O valor de dT (eq. 3) é uma medida da diferença de temperatura do caule entre os limites superior e inferior da jaqueta térmica. Se a temperatura acima da jaqueta for maior do que a temperatura abaixo, o dT será positivo. Do contrário, será negativo.

Essa diferença é inversamente proporcional ao fluxo de seiva que passa pela jaqueta, pois, quanto maior o fluxo, menor o tempo em que a seiva fica exposta à potência aplicada ao segmento de caule onde o sensor está instalado.

Entretanto, existe também um gradiente de temperatura no caule que ocorre naturalmente. Vários são os fatores responsáveis pela formação desse gradiente, mas os principais, no caso da região da planta onde os sensores de fluxo de seiva foram instalados, são a diferença de temperatura entre o solo e o ar e a exposição direta de algumas partes do caule, enquanto outras ficam sombreadas ou protegidas.

A Figura 9 mostra a variação do dT passivo, ou seja, o dT medido por um sensor ao qual não foi aplicada a potência de entrada (P_{in}). As leituras começaram a ser registradas logo após a instalação do sensor. Observa-se uma grande variação nas primeiras 24 h, quando comparada à variação que ocorreu nos dias seguintes. Isso demonstra a importância de se descartar os dados de, pelo menos, as primeiras 24 h. Apesar de a variação do dT ter sido bem maior nas primeiras 24 h, seus valores estão dentro da faixa aceitável para as especificações dos sensores, que vai de $-0,25$ a $+0,25$ K (Van Bavel, 1999).

No dia em que as medições de dT passivo começaram a ser registradas (dia 34, Calendário Juliano) o céu estava limpo. Nos dois dias seguintes, houve precipitações apenas no final da tarde, mas o céu permaneceu com poucas nuvens durante as horas mais quentes do dia.

Na madrugada do dia 35, dT assumiu valores levemente negativos. Isso se deve ao armazenamento de calor no solo, que, durante a noite, ficou mais quente do que a atmosfera. No dia seguinte, o dT volta a ser positivo, devido à exposição direta ao sol da porção de caule acima do sensor, que não foi coberta com papel alumínio. Nos dias 35 e 36, observa-se uma pequena queda no dT perto do meio-dia. Essa queda ocorreu porque, nesses horários, o caule não estava exposto diretamente aos raios solares; era protegido pela copa da planta.

Figura 9. Variações de temperatura ao longo do caule, com a jaqueta térmica desligada (dT passivo). Médias a cada 5 min na planta testemunha.

Com a ocorrência de sol durante o dia e chuva no final da tarde e à noite, o dT ficou negativo devido à ausência de insolação direta sobre o caule e ao resfriamento rápido do ar, não acompanhado pelo resfriamento do solo (dias 37 e 39). O dia 40 teve apenas 1,2 horas de insolação (Tabela 1), e a variação do dT foi mínima.

As variações de dT em um sensor com a jaqueta térmica ligada (Figura 10) são guiadas primariamente pelo fluxo de seiva no segmento de caule aquecido, embora também sofra as influências do meio. Em todos os dias em que a jaqueta térmica ficou ligada, foi observado um pico no valor de dT, no início da manhã. Esse pico marca o início do movimento da seiva. O dT é alto nos primeiros instantes, devido ao acúmulo de calor no segmento de caule no período noturno, quando o fluxo de seiva era desprezível.

No dia 41 à tarde, a jaqueta térmica foi desligada para registrar o dT passivo nos dois dias seguintes. Assim, começaram a aparecer valores negativos, não muito inferiores a $-0,2$ K.

Figura 10. Variação da diferença de temperatura ao longo do caule (dT) numa parcela do experimento (planta infectada). Médias a cada 5 minutos.

Numa planta que foi eliminada do experimento devido à instalação inadequada do sensor de fluxo de seiva, as variações de dT foram muito irregulares (Figura 11), embora fossem de magnitude semelhante ao de plantas mantidas no experimento. Não há uma relação bem definida entre o valor de dT e a hora do dia. Parece que o dT foi estabilizado pelo calor da jaqueta térmica e não foi muito influenciado pelo fluxo de seiva. Isso aconteceu porque os termopares responsáveis pela medição de dT não tinham um bom contato com o caule. Isso fica ainda mais claro, quando se observam as variações ocorridas com o desligamento da jaqueta térmica. São variações bruscas, de até 8 K. Variações tão grandes não podem ser explicadas apenas pelo mal contato entre o caule e os termopares. Durante vários dias, antes do desligamento

da jaqueta, bem como nos dias em que o dT passivo foi registrado, houve precipitações acompanhadas de vento. Dessa sorte, houve a penetração de água, que além de modificar todo o balanço térmico no segmento de caule onde o sensor estava instalado, pode ter atingido diretamente os termopares. Portanto, as variações de temperatura registradas dizem respeito às diferenças entre a temperatura de um conjunto de termopares e outro, não necessariamente, entre um ponto e outro do caule.

Figura 11. Variação de temperatura ao longo do caule (dT) numa parcela eliminada do experimento (planta infectada). Médias a cada 5 minutos.

4.2.5 FLUXO DE SEIVA NAS PLANTAS INFECTADAS

O comportamento do fluxo de seiva das plantas saudáveis e das plantas infectadas foi semelhante (Figura 12). Por outro lado, a magnitude dos valores sem dúvida é afetada pela infecção: nos horários mais quentes do dia (entre 13 e 16 h), a redução no fluxo de seiva chega a uma média de 45 %.

É possível observar ainda, na Figura 12, que o fluxo de seiva começa a aumentar mais cedo, pela manhã, nas plantas infectadas do que nas plantas sadias. Por outro lado, também cessa mais cedo, à tarde. Pelo fato de as plantas infectadas consumirem menos água, havia sempre para elas uma disponibilidade maior de água no solo. Por isso, começavam a transpirar ainda quando a radiação solar e o déficit de pressão de vapor ainda não eram muito altos, pela manhã. Ou, colocando de outra forma, as plantas doentes alcançavam uma diferença de potencial hídrico, entre o solo e o ar nos nas câmaras subestomáticas, maior do que o das plantas sadias, as quais estavam num solo com menor potencial hídrico, devido ao consumo de água pela própria planta no dia anterior.

Figura 12. Fluxo de seiva em laranjeiras sadias e infectadas por *X. fastidiosa* durante os dias 2, 3 e 4 de fevereiro de 2001.

Com o aumento da déficit de pressão de vapor, ao longo do dia, as plantas sadias são levadas a transpirar e a sua taxa transpiratória supera a das plantas doentes. Nesse instante, a resistência à passagem do fluxo de seiva pelos vasos do xilema das plantas infectadas é responsável pela limitação da transpiração. Como a

água que chega aos estômatos nessas condições não é suficiente para suprir a demanda evaporativa, a folha entra em estresse hídrico e os estômatos se fecham, fazendo com que as plantas infectadas interrompam a transpiração mais cedo do que as plantas saudas.

4.3 TRANSPIRAÇÃO MEDIDA COM O PORÔMETRO

Na comparação das medições de transpiração feitas com o porômetro e aquelas feitas pelos sensores de fluxo de seiva (método do balanço de calor) (Tabela 3), a média dos valores máximos obtidos com o porômetro é a que mais se aproxima dos valores obtidos pelo método do balanço de calor. A diferença entre a transpiração medida por um método e outro é semelhante à encontrada por Swanson (1994). Para as plantas saudas, a medição com o porômetro superestimou a transpiração das plantas saudas em 8 % e, das plantas doentes, subestimou em 2 %. Esse autor mediu a transpiração em duas espécies de árvore, sendo que a medição com o porômetro em um galho, extrapolada para toda a copa, superestimou em 1 % para uma espécie e subestimou em 20 % para a outra, tendo como referência o método do balanço de calor. Dugas et al. (1993) compararam as medições de transpiração em *Prunus sp.* obtidas com o porômetro e obtidas pelo método do balanço de calor, tendo o método gravimétrico como referência. A correlação da medição com o porômetro versus método gravimétrico foi de 0,59 e método do balanço de calor versus método gravimétrico foi de 0,9. No relato desse autor, as medições com o porômetro subestimaram as medições pelo método gravimétrico, ao passo que as medições feitas pelo método do balanço de calor forneceram valores semelhantes aos obtidos pelo método gravimétrico. Ansley et al. (1994) também encontraram valores menores de transpiração quando medindo com o porômetro do que quando medindo pelo método do balanço de calor.

Na comparação entre plantas saudas e plantas infectadas, houve uma redução de 38 %, num período de 24 h, e 29 % no fluxo de seiva medido entre as 9 e 18 h de cada dia, pelo método do balanço de calor (Tabela 1; Figura 12). As maiores reduções no fluxo de seiva, em média 45 %, ocorreram entre 13 e 15h. Com as medições de transpiração foliar feitas com o porômetro, a redução registrada foi de 37 % na

comparação entre os mínimos e de 21 % na comparação entre os valores máximos registrados em cada planta.

Nas medições com o porômetro, foi encontrada uma redução maior quando considerados só os valores mínimos porque aí foram incluídas leituras feitas nas plantas infectadas em folhas com sintomas avançados.

Tabela 3. Média (3 dias) do fluxo de seiva ($\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1}$), medido pelo método do balanço de calor (MBC), e transpiração foliar, medida usando o porômetro, em plantas sadias e em plantas infectadas por *X. fastidiosa*

Método	Plantas sadias		Plantas Infectadas	
	Média	CV (%)	Média	CV (%)
MBC (24 h) ¹	5,46	94	3,37	88
MBC (9 às 18h) ²	7,91	51	5,64	40
Porômetro (mínimo) ³	4,12	35	2,60	32
Porômetro (máximo) ⁴	7,32	55	5,76	9

¹ Fluxo de seiva médio por hora, incluindo as 24 h do dia.

² Fluxo de seiva médio por hora, incluindo apenas as leituras registradas entre as 9 e 18 h de cada dia.

³ Média das leituras de transpiração foliar mínima registradas para cada planta entre as 9 e 18 h de cada dia.

⁴ Média das leituras de transpiração foliar máxima registradas para cada planta entre as 9 e 18 h de cada dia.

A resistência difusiva é uma medida que está relacionada à abertura e fechamento estomático. Quanto maior a resistência difusiva, menor a quantidade de estômatos abertos e/ou menor o grau de abertura de cada estômato. Portanto, há uma relação inversa entre essa medida e a transpiração.

Na comparação entre plantas sadias e infectadas (Tabela 4), quando consideradas as folhas com menor resistência difusiva em cada planta, as plantas infectadas atingiram, em média, valores 35 % superiores aos registrados para as plantas sadias. Quando foram consideradas as folhas com maior resistência difusiva em cada planta, as plantas infectadas atingiram valores médios 97 % superiores aos das plantas sadias.

Há uma relação de dependência entre o fluxo de seiva e a resistência difusiva. Entretanto, não foi possível determinar qual das duas é afetada primeiro. Ou seja, não é possível definir se a infecção com *X. fastidiosa* causa uma diminuição no fluxo de seiva devido ao entupimento dos vasos de xilema. O efeito primário poderia estar recaindo sobre os estômatos, devido a alguma substância produzida pela bactéria ou pela planta, em resposta à presença da bactéria.

Tabela 4. Resistência foliar à difusão de vapor ($s\ cm^{-1}$) em plantas saudas e em plantas infectadas por *X. fastidiosa*. Média (3 dias) das leituras máximas e das mínimas.

	Plantas saudas		Plantas Infectadas	
	Média	CV (%)	Média	CV (%)
Mínimo*	2,50	32	3,37	11
Máximo*	3,94	25	7,76	24

* Média das leituras de resistência difusiva máxima e mínimas registradas para cada planta entre as 9 e 18 h de cada dia.

5 CONCLUSÕES

O método do balanço de calor forneceu boas estimativas de fluxo de seiva, as quais foram semelhantes às estimativas de transpiração foliar obtidas com o porômetro.

Na média diária do fluxo de seiva medido pelo método do balanço de calor, a infecção com *X. fastidiosa* ocasionou uma redução de 38 %, alcançando picos de cerca de 45 % nas horas mais quentes do dia. Na transpiração foliar, medida com o porômetro, a redução foi de 21 % em folhas aparentemente saudáveis de plantas doentes, com relação a folhas de plantas saudáveis e de 37 %, quando consideradas folhas com sintomas severos nas plantas doentes.

A resistência foliar à difusão de vapor foi 35 % maior nas plantas infectadas do que nas saudáveis, quando consideradas as folhas com resistência mínima em cada planta e de 97 %, quando consideradas as folhas com resistência máxima.

Não foi possível determinar se a causa primária do sintoma de estresse hídrico é o entupimento físico do xilema ou se é um efeito da presença da bactéria, ou de alguma substância produzida por ela ou pela, sobre os estômatos. Contudo, ficou claro que o estresse hídrico aparece antes dos sintomas foliares da clorose variegada dos citros.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANSLEY, R. J.; DUGAS, W. A.; HEUER, M. L.; TREVINO, B. A. Stem flow and porometer measurements of transpiration from honey mesquite (*Prosopis glandulosa*). *Journal of Experimental Botany*, v.45, n.275, p.874-856, Jun., 1994.
- BAKER, J. M.; NIEBER, J. L. An analysis of the steady-state heat balance method for measuring sap flow in plants. *Agricultural and Forest Meteorology*, v.48, n.1-2, p.93-109, 1989.
- CHAGAS, C. M.; ROSSETTI, V.; BERETTA, M. J. G. Electron microscopy studies of a xylem-limited bacterium in sweet orange affected with citrus variegated chlorosis disease in Brazil. *Journal of Phytopathology*, v.134, p.306-312, 1992.
- COHEN, Mortimer. Hydraulic conductivity of wood of trees with citrus blight. *Proceedings of the Florida State Horticulture Society*, v. 92, p. 68-70, 1980.
- COHEN, M.; PELOSI, R. R.; BRLANSKY, R. H. Nature and location of xylem blockage structures in trees with citrus blight. *Phytopathology*, v.73, n.8, p.1125-1130, Aug., 1983.
- COHEN, Y.; TAKEUCHI, S.; NOZAKA, J.; YANO, T. Accuracy of sap flow measurement using heat balance and heat pulse methods. *Agronomy Journal*, v.85, p.1080-1086, 1993.

- DIAMOND, A. E. & EDGINGTON, L. V. Mechanics of water transport in healthy and Fusarium wilted tomato plants. *Phytopathology*, n. 50, p. 634, 1960. (Abstract).
- DUGAS, W. A.; WALLACE, J. S.; ALLEN, S. J.; ROBERTS, J. M. Heat balance, porometer, and deuterium estimates of transpiration from potted trees. *Agricultural and Forest Meteorology*, v. 64, n.1-2, p. 47-32, Apr., 1993.
- ESAU, Katherine. Anatomic effects of the viruses of Pierce's disease and phony peach. *Hilgardia*, v.18, n.12, p.423-482, 1948.
- EVERT, D. R. Influence of phony disease of peach on stem hydraulic conductivity and leaf xylem pressure potential. *Journal of the American Society of Horticultural Science*, v.122, n6., p.1032-1036, 1987.
- FRENCH, W. J. & STASSI, D. L. Response of phony-infected peach trees to gibberellic acid. *HortScience*, v. 13, p. 158-159, 1978.
- GOODWIN, P. H.; DeVAY, J. E.; MEREDITH, C. P. Physiological response of *Vitis vinifera* cv. "Chardonnay" to infection by Pierce's disease bacterium. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 32, p. 17-32, 1988.
- GRIME, V. L.; MORISON, J. I. L.; SIMMONDS, L. P. Including the heat storage term in sap flow measurements with the stem heat balance method. *Agricultural and Forest Meteorology*, v.74, n.1-2, p.1-25, Apr. 1995.
- GROOT, A.; KING, K. M. Measurement of sap flow by the heat balance method: numerical analysis and application to coniferous seedlings. *Agricultural and Forest Meteorology*, v.59, n.3-4, p.289-308, Jul., 1992

- HOPKINS, D. L. Seasonal concentration of the Pierce's disease bacterium in grapevine stems, petioles, and leaf veins. *Phytopathology*, v.71, n.4, p.415-418, Apr., 1981.
- HOPKINS, D. L. Relationship of Pierce's disease bacterium to a wilt-type disease in citrus in the greenhouse. *Phytopathology*, v.72, n.8, p.1090-1092, Aug., 1982.
- 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, Nov., 1985.
- HOPKINS, D. L. *Xylella fastidiosa*: xylem-limited bacterial pathogen of plants. *Annual Review of Phytopathology*, v.27, p.271-290, 1989.
- HUANG, P. Y.; MILHOLLAND, R. D.; DAYKIN, M. E. Structural and morphological changes associated with the Pierce's disease bacterium in bunch and muscadine grape tissue. *Phytopathology*, v.76, n.11, p.1232-1238, 1986.
- LEE, R. F.; BERETTA, M. J. G.; HARTUNG, J. H.; HOOKER, M. E.; DERRICK, K. S. Citrus variegated chlorosis: confirmation of *Xylella fastidiosa* as the causal agent. *Summa Phytopatologica*, v.19, n.2, p.123-125, 1993.
- LEE, R. F.; RAJU, B. C.; NYLAND, G.; GOHEEN, A. C. Phytotoxin(s) produced in culture by the Pierce's disease bacterium. *Phytopathology*, v.72, n.7, p.886-888, Jul., 1982.
- MACHADO, E. C.; QUAGGIO, J. A.; LAGÔA, A. M. M. A.; TICELLI, M.; FURLANI, P. R. Trocas gasosas e ralções hídricas em laranjeiras com clorose variegada dos citros. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v.6, n.1, p.53-57, 1994.

- MARTINS, E. M. F.; GUZZO, S. D.; PALAZZO, D. A.; HARAKAVA, R. Alterações metabólicas constatadas em plantas de laranja Natal infectadas por *Xylella fastidiosa*. *Summa Phytopathologica*, v.25, p.288-293, 1999.
- MEDINA, C. L.; NUNES, W. M.; MACHADO, M. A.; MACHADO, E. C. Método de transmissão de *Xylella fastidiosa* em mudas de citros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 31. Fortaleza, 1998. *Fitopatologia Brasileira*, 1998. Suplemento de agosto.
- MIRCETICH, Srecko M.; LOWE, S. K.; MOLLER, W. J.; NYLAND, G. Etiology of almond leaf scorch disease and transmission of the causal agent. *Phytopathology*, v.66, n.1, p.17-24, Jan., 1976.
- NATIONAL BUREAU OF STANDARDS. International Temperature Scale, 1990. <http://www.its-90.com/>. (20 fev 2001).
- NEMEC, S. Vessel blockage by myelin forms in citrus with and without rough-lemon decline symptoms. *Canadian Journal of Botany*, v.53, p.102-108, 1975.
- NEMEC, S.; CONSTANT, Robert; PATTERSON, Mike. Distribution of obstructions to water movement in Citrus with and without blight. *Florida State Horticultural Society*, v., p.70-75, 1975.
- OLIVEIRA, Ricardo Ferraz. Desenvolvimento e análise de desempenho de um sensor de fluxo para avaliação de transpiração vegetal pelo método de balanço de calor. Piracicaba, 1997. Tese (Livre Docência). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- QUEIROZ-VOLTAN, R. B.; PARADELA FILHO, O.; CARELLI, M. L. C.; FAHL, J. I. Aspectos estruturais de cafeeiro infectado com *Xylella fastidiosa*. *Bragantia*, v.57, n.1, p.23-33, 1998.

- QUEIROZ-VOLTAN, R. B.; PARADELA FILHO, O. Caracterização de estruturas anatômicas de citros infectados com *Xylella fastidiosa*. Laranja, v.20, n.1, p.55-76, 1999.
- RAJU, Boligala C.; WELLS, John M. Diseases caused by fastidious xylem-limited bacteria and strategies for management. Plant Disease, v.70, n.3, p.182-186, Mar., 1986.
- ROGERS, R. & HINCKLEY, T. M. Foliar weight and area related to current sapwood area in oak. Forest Science, v.25, n.2, p.298-303, jun., 1979.
- SAKURATANI, T. A heat balance method for measuring water flux in the stem of intact plantas. Journal of Agriculture and Meteorology, v. 39, n.1, p.9-17, 1981.
- SHACKEL, K. A.; JOHNSON, R. S.; MEDAWAR, C. K. Substantial errors in estimates of sap flow using the heat balance technique on woody stems under field conditions. Journal of the American Society of Horticultural Science, v.117, n.2, p.351-356, 1992.
- SHINOZAKI, K.; YODA, K.; HOZUMI, K.; KIRA, T. A quantitative analysis of plant form - the pipe model theory. I. Basic analysis. II. Further evidence of the theory and its application in forest ecology. Japanese Journal of Ecology, v.14, p.97-105, 1964.
- STEINBERG, S.; VAN BAVEL, C. H. M.; McFARLAND, M. A gauge to measure mass flow rate of sap in stems and trunks of woody plants. Journal of the American Society of Horticultural Science, v.114, n.3, p.466-472, 1989.
- SWANSON, R. W. Significant historical developments in thermal methods for measuring sap flow in trees. Agricultural and Forest Meteorology, v.72, n.1-2, p.113-132, Dec., 1994.

- TIMMER, L. W.; BRLANSKY, R. H.; GRAHAM, J. H.; SANDLER, H. A.; AGOSTINI, J. P. Comparison of water flow and xylem plugging in declining and in apparently healthy citrus trees in Florida and Argentina. *Phytopathology*, v.76, n.7, 1986.
- TYREE, M. T.; ZIMMERMANN, M. H. The theory and practice of measuring transport coefficients and sap flow in the xylem of red maple stems (*Acer rubrum*). *Journal of Experimental Botany*, v. 22, n.70, p.1-18, Feb., 1971.
- TYREE, M. T.; SPERRY, J. S. Do woody plants operate near the point of catastrophic xylem dysfunction caused by dynamic water stresses? Answers from a model. *Plant Physiology*, v.88, n.3, p.574-580, 1988.
- VAN BAVEL, Michael G. Dynagage™ instalation and operation manual. Houston: Dynamax Inc., 1999. 81 p.
- WEIBEL, F. P.; BOERSMA, K. An improved stem heat balance method using analog heat control. *Agricultural and Forest Meteorology*, v.75, n.1-3, p.191-208, Jun, 1995.
- YOUNG, Roger H.; GARNSEY, Stephen M. Water uptake patterns in blighted citrus tress. *Journal of the American Society of Horticultural Science*, v.102, n.6, p.751-756, 1977.

APÊNDICE

**Fluxo de Seiva em Todas as Plantas do Experimento
Medido pelo Método do Balanço de Calor**

Figura 12. Fluxo de seiva, medido pelo método do balanço de calor, em uma planta sadia durante 9 dias. Dados coletados a cada 5 min. Esta planta foi eliminada do experimento

Figura 13. Fluxo de seiva, medido pelo método do balanço de calor, em uma planta infectada durante 9 dias. Dados coletados a cada 5 min. Os dados dessa planta foram utilizados na Figura 4 e Figura 9.

Figura 14. Fluxo de seiva, medido pelo método do balanço de calor, em uma planta infectada durante 9 dias. Dados coletados a cada 5 min. Essa é a mesma planta da Figura 4.

Figura 15. Fluxo de seiva, medido pelo método do balanço de calor, em uma planta sadia durante 9 dias. Dados coletados a cada 5 min. Os dados dessa planta foram utilizados na Figura 5, Figura 6 e Figura 7.

Figura 16. Fluxo de seiva, medido pelo método do balanço de calor, em uma planta infectada durante 9 dias. Dados coletados a cada 5 min

Figura 17. Fluxo de seiva, medido pelo método do balanço de calor, em uma planta infectada durante 9 dias. Dados coletados a cada 5 min

Figura 18. Fluxo de seiva, medido pelo método do balanço de calor, em uma planta sadia durante 9 dias. Dados coletados a cada 5 min

Figura 19. Fluxo de seiva, medido pelo método do balanço de calor, em uma planta infectada durante 9 dias. Dados coletados a cada 5 min. Essa é a mesma planta mostrada na Figura 3 e Figura 10, tendo sido eliminada do experimento.