

Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

**Relações entre espectroscopia de fluorescência, fotossíntese e
severidade do cancro cítrico (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*)**

Maria Cândida de Godoy Gasparoto

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Agronomia. Área de concentração:
Fitopatologia

Piracicaba
2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Maria Cândida de Godoy Gasparoto
Engenheiro Agrônomo

Relações entre espectroscopia de fluorescência, fotossíntese e severidade do cancro cítrico (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*)

Orientador:

Prof^a. Dra. **LILIAN AMORIM**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Agronomia. Área de Concentração: Fitopatologia

Piracicaba
2006

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

Gasparoto, Maria Cândida de Godoy

Relações entre espectroscopia de fluorescência, fotossíntese e severidade do cancro cítrico (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*) / Maria Cândida de Godoy Gasparoto. - - Piracicaba, 2006.

64 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2006.

1. Cancro cítrico (Doença de planta) 2. Espectroscopia 3. Fotossíntese – Eficiência
I. Título

CDD 632.32

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

*À minha família:
meus pais Mauri e Yeda
e meu irmão Murilo,*

*por estarem sempre ao meu lado, confiando de maneira incondicional
em mim.*

*Só tenho a agradecer tudo que vocês fizeram e fazem por mim. A
vida fica muito mais leve e colorida sabendo que tenho vocês comigo
sempre!*

Amo muito vocês!

Ao Roberson,

*por seu amor (principalmente) e tudo que “chegou” com ele:
companheirismo, confiança, serenidade, felicidade, amizade...etc*

Te amo muito!

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À minha família pelo constante apoio, carinho e pela nossa união que me deixa mais segura para a vida: Pai, Mãe, Mu, Vó Mima, Laura, Cidinho, Elaine, Rafael, Maria Laura, Rafaelzinho, Glaucio, Renata, Cidinha, Edward, Flávio, Marcela, Pri, Ca, Leandro e Flávia.

Ao Roberson pela compreensão, paciência, carinho, amor e tudo de bom que me proporcionou neste momento da minha vida e que irá me proporcionar nos próximos.

Às grandes amigas de todas as horas: Taty, Lambari, Ókici, Polenginha e Padrão.

Aos amigos de toda vida, que apesar da distância levo sempre comigo: apesar de não estar em Torrinha com regularidade, vocês nunca são esquecidos...

Aos amigos de pós-graduação da Fitopatologia, em especial à Estela, Isolda, Denise, Ana Paula, Fátima, Débora, Eliane, Adriana, Sylvia, Zé Veiga, Rock, Franklin, Sílvio, Davi, Fabrício e Júlio.

Aos incansáveis amigos que me ajudaram na realização dos experimentos Denis, Adriana, Jaci e Everton. Este resultado deve-se muito à vocês. Obrigada.

À Prof^a. Lilian com quem eu muito aprendi e pela qual eu tenho total admiração profissional e pessoal.

À Fapesp pelo apoio financeiro ao trabalho.

Ao Fundecitrus pela oportunidade do meu desenvolvimento na área de pesquisa em fitopatologia, em especial ao amigo José Belasque Júnior pela confiança depositada em meu trabalho e ao inesgotável incentivo e apoio.

Ao Bruno Carneiro e Pedreira, Corado (Leonardo Simões de Barros Moreno) e ao Prof. Dr. Carlos Guilherme Silveira Pedreira pela ajuda que sempre disponibilizaram ao longo desta jornada.

Aos pesquisadores e amigos da Seção de Bacteriologia do Instituto Biológico de Campinas, com agradecimento especial ao Dr. Júlio Rodrigues Neto.

Ao Rafael Vasconcelos Ribeiro pelas sugestões e conselhos na instalação dos experimentos e na análise dos dados.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia, em especial a Sílvia, Rodolfo, Jéferson, Edvaldo, Linda e Carmen.

Ao Prof. Dr. Luís Gustavo Marcassa e ao doutorando Emery Lins pela ajuda no entendimento e desenvolvimento da técnica de espectroscopia de fluorescência e ao Instituto de Física da USP de São Carlos.

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
2.1 Cancro cítrico	11
2.1.1 Origem e história	11
2.1.2 Importância econômica	12
2.1.3 Sintomas.....	13
2.1.4 Hospedeiros	14
2.1.5 Detecção e diagnose.....	14
2.2 Trocas gasosas em plantas: fotossíntese e transpiração	15
2.2.1 Fotossíntese e transpiração em plantas cítricas	15
2.2.2 Alterações na fotossíntese, respiração e transpiração de plantas doentes	18
2.3 Espectroscopia de fluorescência	21
2.3.1 Conceito de fluorescência.....	21
2.3.2 A fluorescência dos pigmentos foliares	21
2.3.3 O espectro da fluorescência	22
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1 Mudas	25
3.2 Inoculação e tratamentos	25
3.3 Avaliações e análise de dados.....	27
3.3.1 Severidade do cancro cítrico.....	27
3.3.2 Medidas das trocas gasosas.....	27
3.3.3 Espectroscopia de fluorescência	29
3.3.4 Análise de dados	31
4 RESULTADOS	32
4.1. Severidade do cancro cítrico.....	32
4.2 Trocas gasosas	36
4.3 Espectroscopia de fluorescência	39
5 DISCUSSÃO	44
6 CONCLUSÕES	47
REFERÊNCIAS	48
ANEXOS.....	57

RESUMO

Relações entre espectroscopia de fluorescência, fotossíntese e severidade do cancro cítrico (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*)

O cancro cítrico (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*) é uma das mais importantes doenças dos citros e seu controle é feito com medidas de exclusão e erradicação do patógeno. As chances de detecção de plantas doentes diminuem em pomares com baixa incidência da doença. Considerando-se as dificuldades da diagnose visual do cancro cítrico e as vantagens de uma tecnologia que possa melhorar o processo de detecção desta doença no campo, procurou-se identificar características espectroscópicas únicas de uma planta com esta doença. Os objetivos do presente trabalho foram verificar as características espectroscópicas de folhas com cancro cítrico e correlacioná-las às alterações na eficiência fotossintética do tecido foliar doente e relacionar severidade da doença à eficiência fotossintética. Os perfis espectroscópicos e a eficiência fotossintética de plantas das espécies *Citrus sinensis* ('Hamlin'), *Citrus reticulata* ('Ponkan') e *Citrus limonia* ('Cravo') foram avaliados antes e após a inoculação com *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. O modelo $y = (1 - x)^\beta$, onde y representa a assimilação líquida relativa de CO₂ e x , a severidade da doença, foi ajustado aos dados por meio de regressão não-linear. O modelo monomolecular foi ajustado à relação entre assimilação líquida relativa de CO₂ e razões espectroscópicas da região do vermelho, também por regressão não-linear. Concluiu-se que a doença afeta a eficiência fotossintética de 'Ponkan' e 'Hamlin'. Em 'Hamlin', a doença não apenas reduz a área foliar, mas também reduz a fotossíntese do tecido verde remanescente. Há relação positiva entre as razões espectroscópicas da região do vermelho e a fotossíntese nas variedades testadas.

Palavras-chave: *Citrus* sp.; Eficiência Fotossintética; Laser; Lesão Virtual

ABSTRACT

Relationships between fluorescence spectroscopy, photosynthesis and severity of citrus canker (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*)

Citrus canker (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*) is one of the most important diseases of citrus. Regulatory control is applied by means of exclusion and eradication of the pathogen. Possibilities of detection of infected trees decrease in orchards with low disease incidence. Considering the difficulties in visual diagnosis of citrus canker and the advantages of a technology that can improve the process of its detection in the field, single spectroscopic characteristics of a plant with this disease was searched. The objectives of the present work were to verify the spectroscopic characteristics of leaves with citrus canker and to correlate them to photosynthetic efficiency of these diseased leaves, and to relate disease severity to photosynthetic efficiency. Spectroscopic profiles and photosynthetic efficiency of *Citrus sinensis* ('Hamlin'), *Citrus reticulata* ('Ponkan') and *Citrus limonia* ('Cravo') were assessed before and after the inoculation with *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. The model $y = (1 - x)^\beta$, in which y represents relative net assimilation of CO₂ and x , disease severity, was fitted to the data by nonlinear regression. The monomolecular model was fitted to the relationships between relative net assimilation of CO₂ and spectroscopic reasons of the red region, also by nonlinear regression. It was concluded that the disease affects the photosynthetic efficiency of 'Ponkan' and 'Hamlin'. In 'Hamlin', the disease not only reduces the amount of leaf area, but also reduces the photosynthesis of the remaining green leaf tissue. There is a positive relationship between spectroscopic reasons of the red region and photosynthesis in 'Hamlin', 'Ponkan', and 'Cravo'.

Keywords: Citrus sp.; Photosynthetic Efficiency; Laser; Virtual lesion

1 INTRODUÇÃO

A bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Haase) (VAUTERIN et al., 1995) é o agente causal do cancro cítrico asiático, também denominado cancrose A, uma das maiores ameaças à cultura do citros (STALL; SEYMOUR, 1983). É uma das doenças que causam maiores danos econômicos, afetando a citricultura mundialmente, e é motivo para aplicação de leis de quarentena e de erradicação em muitos países (BRUNINGS; GABRIEL, 2003).

No Brasil, especialmente no Estado de São Paulo, em razão de tratar-se de uma doença quarentenária, seu controle exige a adoção de medidas de exclusão e erradicação do patógeno. Por ser o Estado de São Paulo responsável por mais de 90% da produção citrícola nacional, e mais de 95% do volume total exportado (na forma de suco de laranja congelado ou concentrado e frutos *in natura*), a legislação vigente implica na erradicação parcial ou total de pomares após a detecção de plantas contaminadas.

A incidência da doença é usada como critério de erradicação. A campanha de erradicação, apesar de não ter eliminado totalmente a bactéria do Estado de São Paulo, pode ser considerada como bem sucedida (RODRIGUES NETO et al., 2004), pois manteve a doença em baixo nível de incidência na área nobre da cultura (BARBOSA et al., 2001).

Levantamento amostral, realizado anualmente, revelou que o índice de contaminação por cancro cítrico foi de 0,19% nos talhões de citros avaliados em 2006, ou seja, 99,8% dos talhões de plantas cítricas do Estado de São Paulo e sul do Triângulo Mineiro estão livres da doença (MASSARI; BELASQUE JÚNIOR, 2006).

Inspecionar o pomar rotineiramente é uma das medidas mais importantes para prevenir o cancro cítrico. Este procedimento é realizado por inspetores treinados do Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus), os quais vistoriam todas as ruas do pomar, à procura de plantas doentes, através da diagnose visual dos sintomas de cancro cítrico. Entretanto, considerando-se as dificuldades da inspeção do cancro cítrico e o potencial de impacto econômico de uma tecnologia que possa melhorar o processo de detecção desta doença no campo, estudos vêm sendo realizados desde

2002, na tentativa da caracterização espectroscópica de plantas contaminadas por cancro cítrico, de forma a identificar possíveis características espectroscópicas únicas de uma planta com esta doença.

Desta forma, o objetivo geral do presente trabalho foi identificar alguns dos fenômenos biológicos envolvidos nas respostas obtidas por tecidos vegetais sadios e com cancro cítrico quando excitados por laser. Especificamente, em plantas das espécies *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, *Citrus reticulata* Blanco e *Citrus limonia* (L.) Osbeck, procurou-se: (i) verificar as características espectroscópicas de folhas com cancro cítrico e correlacioná-las às alterações na eficiência fotossintética do tecido foliar doente; (ii) relacionar severidade da doença à eficiência fotossintética das folhas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cancro cítrico

2.1.1 Origem e história

O cancro cítrico, provavelmente, tem como origem o continente Asiático, no qual a doença é endêmica e tem afetado muitas plantas da família Rutaceae (KOIZUMI, 1985). A doença foi introduzida nas Américas do Norte e do Sul provavelmente por material infectado, e nestas regiões estão os dois mais importantes produtores de citros do mundo – Brasil e Estados Unidos (CIVEROLO, 1985; SCHOULTIES et al., 1987; STALL; SEYMOUR, 1983).

No Brasil, o primeiro relato da doença foi em 1957 no município de Presidente Prudente, Estado de São Paulo (AMARAL, 1957; BITANCOURT, 1957). Após a primeira ocorrência, a doença foi encontrada no Paraná (1957) e Mato Grosso do Sul (1958) (AMARAL, 1957; SANTOS, 1991). Em 1980 ocorreu o primeiro relato no Rio Grande do Sul (PORTO; DORNELLES; PORTO, 1981). A doença também foi detectada em Santa Catarina e Minas Gerais. Recentemente a doença foi constatada em Roraima (NASCIMENTO et al., 2003).

Em 1957, logo após a primeira detecção, foi iniciada uma campanha de erradicação da doença que permanece ativa até os dias atuais no Estado de São Paulo. A erradicação, porém, foi abandonada em outros Estados, trazendo como consequência o estabelecimento definitivo da bactéria no Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (AMORIM; BERGAMIN FILHO, 2001; FEICHTENBERGER; MULLER; GUIRADO, 1997; MACIEL; DUARTE; AYUB, 1998). Os Estados de Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Goiás e Minas Gerais adotaram medidas de erradicação e, atualmente, essas áreas são consideradas isentas da doença (RODRIGUES NETO et al., 2004).

A partir de 1996, concomitantemente com a introdução da larva minadora dos citros (*Phyllocnistis citrella*, Stainton), muitos novos focos da doença vêm sendo encontrados (GIMENES-FERNANDES et al., 2000; PRATES; NAKANO; GRAVENA,

1996). O rápido aumento na incidência de cancro cítrico observado no Brasil e em outros países depois da introdução da larva minadora (*Phyllocnistis citrella*, Stainton), não é atribuído primariamente aos adultos da larva minadora, que não são vetores da bactéria. Os estágios larvais, por produzirem abundante tecido suscetível na forma de galerias, formidavelmente aumentam a potencial infecção pelo patógeno (BELASQUE JÚNIOR et al., 2006; JESUS JUNIOR et al., 2006).

Atualmente, o cancro cítrico está presente em mais de trinta países ao redor do mundo: na Ásia, em ilhas dos oceanos Pacífico e Índico, na América do Sul e nos Estados Unidos (DAS, 2003; GOTTLAD; GRAHAM, 2000).

2.1.2 Importância econômica

Ao contrário das regulamentações impostas por muitos países para prevenir a introdução (ou re-introdução) da bactéria agente causal do cancro cítrico, a doença continua a aumentar sua extensão. No mundo, milhões de dólares são gastos anualmente em prevenção, quarentena, programas de erradicação e controle da doença (DAS, 2003).

Por tratar-se de uma doença quarentenária, o comércio mundial de frutos cítricos é regulamentado por medidas que visam impedir, principalmente, a entrada do patógeno em áreas livres da doença (CIVEROLO, 1985; GOTTLAD et al., 2001). Os procedimentos de quarentena e as medidas de erradicação resultam em custos quando a infecção por cancro cítrico é registrada porque as regiões onde a doença está presente são submetidas à rigorosa regulamentação internacional, restringindo seus mercados (VERNIÈRE; GOTTLAD; PRUVOST, 2003).

Os prejuízos na produção, devido ao cancro cítrico, não estão claramente calculados. Porém, as perdas ocasionadas pela doença dependem da severidade com que ela se apresenta. Infecções precoces em frutos imaturos podem resultar em frutos defeituosos e mal-formados, além da presença de lesões que fazem com que o fruto seja inaceitável para o mercado de frutos frescos. Infecções mais severas nos frutos e nas folhas causam queda prematura do fruto e desfolha (VERNIÈRE; GOTTLAD;

PRUVOST, 2003). Todos estes aspectos levam a perda de produção e qualidade dos citros.

2.1.3 Sintomas

O cancro cítrico é caracterizado por lesões locais (patógeno não é sistêmico nas plantas hospedeiras), eruptivas, cor de palha ou pardacentas de aspecto corticoso, de dois a aproximadamente doze milímetros de diâmetro (ROSSETI, 2001). Embora os principais sintomas da doença sejam observados nas folhas e nos frutos cítricos, todos os órgãos aéreos da planta são afetados, principalmente quando há aberturas naturais como os estômatos ou aberturas causadas por danos físicos (AMARAL, 2003). Maior frequência de aparecimento da doença pode ocorrer quando novas brotações estão emergindo ou quando o fruto está em estádios precoces de desenvolvimento (GOTTWALD; GRAHAM, 2000).

As lesões são circulares e necróticas e usualmente um halo amarelo característico pode estar presente ao redor das mesmas, quando formadas em folhas e frutos. Nas lesões formadas nos ramos não se observa a formação do halo amarelo. Altas severidades da doença podem promover a queda de folhas e frutos (SCHOULTIES et al., 1987; STALL; SEYMOUR, 1983) e seca de ramos (GOTTWALD; McGUIRE; GARRAN, 1988; GOTTWALD; TIMMER; McGUIRE, 1989). Frutos lesionados e queda precoce dos mesmos provocam grandes impactos econômicos da doença (SCHUBERT; SUN, 2003).

A expressão do sintoma depende da temperatura, a qual influencia o período de incubação; a temperatura ótima está em torno de 28 a 30 °C (VERNIÈRE; GOTTWALD; PRUVOST, 2003). Segundo Christiano (2006), a faixa de temperatura ótima para infecção e progresso do cancro cítrico é de 25 a 35°C. Adicionalmente, ferimentos

dá-se principalmente por material contaminado. Tratos culturais e máquinas podem também disseminar a bactéria, em atividades de colheita, poda e enxertia (CIVEROLO, 1985; DANÓS; BERGER, STALL, 1984; GOTTWALD; GRAHAM; SCHUBERT, 1997; GOTTWALD; McGUIRE; GARRAN, 1988; GOTTWALD; TIMMER; McGUIRE 1989).

2.1.4 Hospedeiros

A bactéria afeta praticamente todas as espécies e variedades do gênero *Citrus* e relativos, cujo grau de suscetibilidade é variável (BRUNINGS; GABRIEL, 2003; RODRIGUES NETO et al., 2004).

Com base em estudos conduzidos em diferentes condições ambientais, os genótipos de citros foram classificados em relação ao grau de suscetibilidade ao cancro cítrico (FEICHTENBERGER et al., 2005):

- 1) Altamente resistentes - 'Calamondin', 'Kumquats';
- 2) Resistentes - tangerinas 'Ponkan', 'Satsuma', 'Tankan', 'Cleópatra', 'Sunki';
- 3) Moderadamente suscetíveis - tangores, tangelos, tangerinas 'Cravo', 'Dancy' e 'Nova', laranjas doces 'Folha Murcha', 'Lima', 'Pêra-Rio', 'Natal' e 'Valência', laranja 'Azeda';
- 4) Suscetíveis - laranjas doces 'Hamlin', 'Piralima', 'Ruby', 'Seleta Vermelha', 'Westin', 'Bahia' e 'Baianinha', tangerinas 'Clementina', 'Orlando', e 'Natsudaidai', lima ácida 'Tahiti', *Poncirus trifoliata*, citranges, citrumelos;
- 5) Altamente suscetíveis - pomelos, lima ácida 'Galego', limões verdadeiros 'Siciliano', 'Eureka' e 'Lisboa', lima-de-umbigo.

2.1.5 Detecção e diagnose

No Estado de São Paulo, a inspeção de pomares/viveiros para a verificação da presença ou não de cancro cítrico vem sendo realizada de duas maneiras: a) pelo trabalho dos produtores, diretamente em seus pomares/viveiros, utilizando equipes próprias de inspetores; b) no trabalho de equipes de inspetores do Fundecitrus, em

convênio com a Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo. Inspeccionar o pomar rotineiramente é uma das medidas mais importantes para prevenir o cancro cítrico.

Os inspetores detectam a doença visualmente, através da identificação dos sintomas em plantas infectadas. Suspeitando-se de amostras positivas, estas são coletadas por técnico responsável da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo e enviadas para diagnóstico em laboratório oficial, onde as lesões são examinadas e é realizado o isolamento da bactéria em meio de cultura apropriado ou PCR (Polymerase Chain Reaction), para confirmação do agente causal.

Apesar das equipes de inspeção serem formadas por pessoas treinadas e conhecedoras dos sintomas da doença, o Fundecitrus vêm detectando casos de ressurgência da doença, muitas vezes resultantes da não localização de plantas doentes durante as inspeções, resultando em prejuízos ao citricultor. De fato, Gimenes-Fernandes et al. (2000) verificaram que, em razão das inúmeras dificuldades existentes durante o processo de inspeção, são necessárias quase duas dezenas de equipes de inspetores, trabalhando simultaneamente, para a localização de todas as plantas doentes em um talhão com incidência de cancro cítrico, número este impraticável em razão do alto custo econômico.

Portanto, é óbvia a necessidade de métodos rápidos que complementem e confirmem a detecção visual do cancro cítrico feita no campo (MAVRODIEVA; LEVY; GABRIEL, 2004).

temperatura ótima para assimilação de CO₂ em algumas espécies de citros está entre 15 e 20°C quando as medidas são realizadas em ambientes com ar seco e entre 20 e 30°C em ambientes úmidos.

A temperatura foliar também afeta a taxa fotossintética. Conforme observado por Ribeiro (2002), ocorre decréscimo na fotossíntese com o aumento da temperatura da folha de laranja 'Pêra'. Segundo Ribeiro, Machado e Oliveira (2004), as maiores taxas fotossintéticas foram encontradas com temperatura foliar em 25 °C, enquanto os menores valores foram observados em 40°C de temperatura foliar. Para laranja doce 'Valência' a taxa máxima de fotossíntese ocorreu a 25°C de temperatura foliar e em tangor 'Murcott' e lima ácida 'Tahiti' a 30 °C. As três espécies apresentaram decréscimo da taxa fotossintética em temperatura foliar acima de 30 °C, sendo esta queda mais acentuada em 'Tahiti' (MACHADO et al., 2005).

Em laranjeiras, a taxa fotossintética máxima ocorre em fluxo fotossintético de fótons entre 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (VU; YELENOSKY; BAUSHER, 1986) e aproximadamente 800 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (VU; YELENOSKY, 1988).

As taxas de assimilação de CO₂, sob condições ideais de temperatura e déficit de pressão de vapor, são de aproximadamente 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ em laranja doce 'Valência' e de 13 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ em tangor 'Murcott' e lima ácida 'Tahiti' (MACHADO et al., 2005).

Sob condições naturais, sem déficit hídrico no solo e com fluxo fotossintético de fótons saturante, a taxa de fotossíntese aumenta até ao redor de 9 horas, decrescendo posteriormente, com o aumento do déficit de pressão de vapor e da temperatura do ar (MEDINA; MACHADO; GOMES, 1999). Este padrão foi observado por Machado et al. (1994), onde plantas cítricas sadias apresentaram valores máximos de fotossíntese ao redor das 9 horas, decresceram acentuadamente até ao redor das 14 horas, para posteriormente variarem pouco até as 16 horas. A taxa de transpiração decresceu a partir das 9 horas, mas de forma menos acentuada que a fotossíntese. Também observaram que, de modo geral, os valores de fotossíntese e transpiração foram maiores em folhas mais novas, o que não foi observado por outros autores em outras espécies arbóreas.

Em relação ao desenvolvimento do sistema fotossintético, Schaedle (1975), estudando a fotossíntese de plantas arbóreas, afirma que, independentemente das espécies, há uma similaridade no padrão de desenvolvimento das folhas, ou seja, no início da expansão foliar, a taxa de fotossíntese líquida das folhas é negativa ou muito baixa. Porém, folhas não são homogêneas e contêm células de diferentes idades de desenvolvimento. Mesmo nos estádios iniciais de desenvolvimento foliar, algumas das células foliares serão capazes de exportar o fotoassimilado excedente apesar da folha como um todo poder ter um balanço negativo de CO₂. A taxa de fotossíntese líquida geralmente aumenta até a total expansão da folha. Seguindo a completa expansão da folha, uma condição relativamente constante do desempenho fotossintético persiste com duração de 10 a 40 dias, dependendo da espécie, período do ano e condições ambientais. Subseqüentemente, com o aumento da idade da folha, a taxa de fotossíntese líquida declina.

Isto confirma o encontrado por Shirke (2001), estudando o efeito da idade das folhas de *Prosopis juliflora* (espécie arbórea; leguminosa vulgarmente chamada de algaroba) na fotossíntese. A máxima taxa de fotossíntese líquida de folhas jovens foi inferior às taxa encontradas em folhas maduras e velhas. O total de CO₂ fixado diariamente pelas folhas jovens foi somente 36% daquela quantidade fixada nas folhas maduras enquanto que as folhas velhas fixaram 76% da quantidade fixada nas folhas

fotossintético de fótons saturante e a umidade do substrato de crescimento foi mantida em condições ideais, as mudanças observadas devem estar relacionadas com variações climáticas e/ou estágio fisiológico das plantas. Segundo os autores, a alta frequência de temperaturas baixas em julho, deve ter afetado a taxa fotossintética, apesar de não haver relatos sobre o efeito da temperatura noturna sobre a fotossíntese em citros.

2.2.2 Alterações na fotossíntese, respiração e transpiração de plantas doentes

A respiração e a fotossíntese constituem funções básicas das plantas e o balanço entre esses dois processos fisiológicos está diretamente relacionado com o estado geral das plantas e com a qualidade dos produtos fornecidos por ela (LEITE; PASCHOLATI, 1995).

Alterações nos processos fisiológicos de plantas acontecem quando, por algum motivo, estas plantas sofrem algum tipo de estresse, como por exemplo, aumento na temperatura foliar, déficit hídrico, deficiência nutricional e invasão da planta por patógeno, entre outros fatores.

No caso das alterações fisiológicas da planta hospedeira em resposta ao ataque de um patógeno, o que se observa, de maneira geral, é que a respiração de um hospedeiro infectado aumenta, pois a planta aumenta sua atividade metabólica e utiliza mais energia para suprir esta demanda. É importante ressaltar que, geralmente, o nível de respiração aumenta do início da infecção até a multiplicação do patógeno e, decresce, chegando a níveis normais ou inferiores aos níveis observados em tecidos saudáveis, em estágios avançados da doença. Outro fato é que plantas resistentes respondem rapidamente alterando a respiração, pois necessitam de energia para ativar os mecanismos de defesa e mantêm níveis elevados de respiração por menos tempo que plantas suscetíveis (LEITE; PASCHOLATI, 1995).

Isto foi observado por Bassanezi, Amorim e Bergamin Filho (2001), trabalhando com duas cultivares de feijão (Rosinha G-2 e Carioca) e com duas doenças fúngicas (ferrugem / *Uromyces appendiculatus* e mancha angular / *Phaeoisariopsis griseola*). A respiração aumentou em ambas cultivares e doenças, sendo maior para a cultivar

Rosinha em ambas doenças, a qual apresentava maior suscetibilidade em relação a cultivar Carioca.

Em plantas cítricas infectadas por *Xylella fastidiosa* (clorose variegada dos citros) não houve diferença significativa nos valores de respiração observados em plantas saudáveis e doentes, embora a fotossíntese tenha sido significativamente menor nas plantas doentes. Esses resultados sugerem a possibilidade da existência de uma atividade de dreno alternativo pela folha, ou seja, sugere que mais elétrons são desviados para a fotorespiração e/ou reação de Mehler do que ao processo de fotossíntese, podendo ser a fotorespiração um mecanismo para permitir a fotoinibição, principalmente em plantas C3, dissipando o excesso de ATP e NADPH, produzindo CO₂ interno para manter a atividade da Rubisco e consumindo oxidantes como H₂O₂ durante as catálises (RIBEIRO; MACHADO; OLIVEIRA, 2003).

Muitos trabalhos, desenvolvidos em vários patossistemas, mostram que, de modo geral, o efeito do patógeno é o de reduzir a taxa fotossintética em plantas hospedeiras, devido ao decréscimo na interceptação da radiação solar (perda de área foliar devido ação do patógeno) e/ou pelo decréscimo da eficiência do uso da radiação interceptada (redução da atividade fotossintética da área verde) (JOHNSON, 1987). Quando o primeiro fator acontece isoladamente, a queda na taxa fotossintética é diretamente proporcional à perda de área foliar verde devido à presença do patógeno. Porém, há certos patossistemas em que ocorre uma perda extra na taxa fotossintética, devido ao efeito do patógeno na fotossíntese da área verde remanescente, além da área afetada pelo patógeno. Este efeito do patógeno na fotossíntese do hospedeiro varia de acordo com o patossistema considerado.

No caso de brusone em arroz, Bastiaans (1991) mostrou que a redução na fotossíntese de folhas infectadas, expressa como uma fração da taxa fotossintética de folhas saudáveis, superou a severidade da doença. A doença não só reduziu a quantidade de área foliar verde, mas também afetou a fotossíntese do tecido foliar verde remanescente (conceito de lesão virtual), indicando que a brusone do arroz é um exemplo de combinação patógeno-hospedeiro na qual os efeitos de decréscimo na interceptação da radiação solar e decréscimo da eficiência do uso da radiação interceptada acontecem simultaneamente, reduzindo a fotossíntese de plantas doentes.

Este tipo de ação do patógeno na fotossíntese também foi encontrado por Godoy, Amorim e Bergamin Filho (2001) em folhas de milho infectadas por *Phaeosphaeria maydis*.

Shtienberger (1992) cita que, teoricamente, em relação à área foliar livre da doença, a redução na taxa dos processos fisiológicos pode ser proporcional, maior ou menor que a redução correspondente na área foliar sadia devido à doença. De acordo com esse autor, as respostas fotossintéticas relativamente menores que as áreas afetadas pelo patógeno ocorrem, geralmente, em plantas infectadas por parasitas obrigatórios. A clorofila nas células hospedeiras invadidas pode ser afetada, mas ainda não completamente destruída pela invasão do patógeno e o tecido infectado da folha pode permanecer com um mínimo de atividade. Mignucci e Boyer (1979) encontraram respostas de fotossíntese proporcionalmente menores que a área afetada pelo oídio (*Microsphaera diffusa*): enquanto que 82% da área foliar foi infectada pelo fungo, aproximadamente 50% da atividade fotossintética da folha foi perdida.

Em alguns patossistemas pode-se verificar que a taxa fotossintética do hospedeiro é estimulada, ou não é afetada, imediatamente após o início da interação com o patógeno, por um período bastante reduzido, seguido, invariavelmente, por sua diminuição, devido a destruição da molécula de clorofila e/ou anormalidades na estrutura e função dos cloroplastos (LEITE; PASCHOLATI, 1995; SHTIENBERGER, 1992).

Yarwood (1967) observou um aumento máximo na taxa fotossintética de 13% três dias após a inoculação de plantas de feijão com *Uromyces* sp. Allen (1942) e Livne (1964) também observaram acréscimo na fotossíntese, ambos concordando que este aumento deve-se a estádios precoces da infecção e/ou casos de infecção fraca.

Com relação à transpiração em plantas doentes, casos de aumento e decréscimo já foram relatados. De maneira geral, em relação à transpiração, pode-se afirmar que doenças nas quais os sintomas levam a uma ruptura da superfície cutinizada da planta hospedeira causam um aumento na taxa de transpiração (LEITE; PASCHOLATI, 1995), acelerando as perdas de água do tecido hospedeiro infectado.

2.3 Espectroscopia de fluorescência

2.3.1 Conceito de fluorescência

Quando uma molécula precisa dissipar parte da sua energia para adquirir estabilidade, uma das formas de dissipação é através da emissão de radiação. A fluorescência é um tipo específico de radiação, emitida imediatamente após a absorção de energia pelo átomo, cessando logo em seguida. Portanto, a fluorescência só acontece enquanto houver excitação.

A principal característica da fluorescência emitida é que ela só depende da característica eletrônica da molécula que a emitiu, sendo uma assinatura da mesma. Assim, a fluorescência emitida por um tecido vegetal pode ser uma ferramenta eficiente na detecção de qualquer alteração no estado fisiológico da planta, visto que esta modificação irá alterar a emissão da fluorescência. Estas alterações na fisiologia da planta podem ser causadas por estresse provocado por deficiências nutricionais, déficit hídrico e também pela presença de um patógeno causando doença em uma planta hospedeira.

2.3.2 A fluorescência dos pigmentos foliares

A clorofila *a* é o principal pigmento encontrado na folha da maioria das plantas, absorvendo luz azul e vermelha, refletindo intensamente a luz verde. Este pigmento absorve a energia solar e a energia emitida pelos demais pigmentos, os denominados pigmentos acessórios (clorofila *b*, carotenóides, entre outros) e as transferem para os centros de reação do processo fotossintético. A quantidade de energia transferida varia entre os pigmentos. Enquanto que a clorofila *b* transfere sua energia próximo de 100%, as xantofilas transferem cerca de 30% para a clorofila *a* (LÜDEKER; DAHN; GÜNTHER, 1996). Porém nem toda fluorescência emitida pelos pigmentos é absorvida pela clorofila *a*. A maior parte da energia absorvida é usada para a fotossíntese enquanto a menor parte é dissipada por processos termais como calor ou emitida para o ambiente como fluorescência, a qual pode ser medida (LINS, 2005; LÜDEKER; DAHN; GÜNTHER,

1996). A fluorescência da clorofila é aproximadamente 0,5 a 3% do total da energia luminosa absorvida (LÜDEKER; DAHN; GÜNTHER, 1996).

As clorofilas ainda têm outro papel que é o de fluorescer na região onde os pigmentos dos centros de reação absorvem, transferindo energia para eles. Não é sem propósito que a fluorescência emitida na região do vermelho dependa principalmente da concentração de clorofila na folha, porque somente ela emite nessa região (CEROVIC et al., 1999; LINS, 2005). Parte da fluorescência emitida pela clorofila *a* pode ser absorvida pela própria clorofila *a* e pela clorofila *b*, o que incrementaria o rendimento fotossintético porque essa energia, que antes seria dissipada, voltaria a ser utilizada no centro de reação. Esse fenômeno de re-absorção energética é o responsável por apenas 5% da energia absorvida pela clorofila *a* ser liberada como fluorescência. Além disso, o processo de re-absorção da fluorescência no vermelho pode ser uma forma de avaliar o potencial fotossintético da folha visto que, quanto mais fluorescência for emitida, menor será a concentração de pigmentos na folha ou menor será a absorção dos pigmentos dos centros de reação (LAWLOR, 2001).

A fluorescência da clorofila é a primeira aproximação inversamente relatada ao desempenho fotossintético ou a assimilação de carbono (GÜNTHER; DAHN; LÜDEKER, 1994). Devido a esta estreita relação entre a fluorescência da clorofila e fotossíntese, fluorescência é um bom indicador para o estado da cadeia de transporte de elétrons na fotossíntese e para o estado bioquímico da planta (LÜDEKER; DAHN; GÜNTHER, 1996).

2.3.3 O espectro da fluorescência

A espectroscopia é uma técnica tradicional aplicada nos mais diversos ramos do conhecimento, a qual consiste no estudo da resposta de uma ou de um grupo de moléculas a uma excitação externa. Tanto a excitação, quanto a resposta são radiações, apenas diferindo entre si quanto aos comprimentos de onda diferentes. O resultado final obtido é o conjunto de medições das intensidades da fluorescência, que também é conhecido como espectro da fluorescência.

Porém, uma das melhores formas de excitação de moléculas orgânicas é a aplicação de radiações da região do visível, UV ou infravermelho, isso porque a maioria das moléculas orgânicas absorve essas radiações e a fluorescência emitida nesta região é a que confere as melhores informações sobre a fisiologia da planta. Por isso, a luz de um laser é a melhor fonte de excitação para essas aplicações, pois esse dispositivo emite naquelas regiões citadas, com uma potência óptica suficiente para estimular uma amostra (LINS, 2005).

Durante a década passada, laser como indutor de fluorescência (LIF) foi bastante explorado como ferramenta nos estudos de plantas. Comparado com outras técnicas ópticas, LIF pode ser um indicador mais acurado do estado fisiológico das plantas e pode ser capaz de detectar os impactos de um stress ambiental já nos primeiros estágios de crescimento da planta (CEROVIC et al., 1999).

A melhor radiação para estimular a fluorescência da folha possui comprimento de onda na região entre o UV próximo e o azul (aproximadamente entre 350 nm e 470 nm). Radiações nestes comprimentos de onda são absorvidas pela maioria dos pigmentos foliares que transferem a energia absorvida para as clorofilas *a* e *b* (CEROVIC et al., 1999). A radiação verde pode excitar diretamente as moléculas de clorofila *a* e *b*, pois apenas elas absorvem radiação nesta região (LAWLOR, 2001; LINS et al., 2005).

O poder do laser está na ordem de 10 mW assegurando nenhum efeito termal no local em que ela incide. Utilizando-se este tipo de sistema, as folhas avaliadas são submetidas à denominada técnica da espectroscopia de fluorescência.

Para facilitar a análise da fluorescência na região do visível, esta região foi dividida em regiões menores, ficando mais fácil se referir à fluorescência de uma região, e não de um comprimento de onda (CEROVIC et al., 1999). A primeira é a região do azul que compreende entre 400 e 500 nm. A fluorescência emitida nesta região do espectro é denominada fluorescência do azul ou BF (do inglês, *blue fluorescence*). Outra região é a do verde ou GF (*green fluorescence*), que está entre 500 e 650nm. Juntos eles formam a BGF (*blue - green fluorescence*).

A outra região que vai desde 650 até 800 nm é a chamada de fluorescência da clorofila ou ChIF (do inglês, *chlorophyll fluorescence*). A ChIF ainda se divide em duas

regiões, a da fluorescência no vermelho ou RF (*red fluorescence*) entre 650 a 700 nm, e a da fluorescência no infravermelho ou FRF (*far red fluorescence*) entre 700 e 800 nm. A fluorescência no vermelho e no infravermelho juntas têm esse nome (fluorescência da clorofila) pois a clorofila *a* é o único fluoróforo presente nas folhas com emissão nesta parte do espectro (CEROVIC et al., 1999).

Nessas regiões, citadas anteriormente, há picos de emissão de fluorescência das folhas. Na região BF o pico está em 450 nm, na GF em 530 nm, na RF ocorre em 685 nm e na FRF o pico está em 735 nm.

A intensidade da fluorescência da clorofila nas regiões do vermelho e do infravermelho (650-800 nm) do espectro é altamente sensível às propriedades intrínsecas da folha e a fatores ambientais (KRAUSE; WEIS, 1991). A emissão da fluorescência da clorofila teve sucesso para detectar déficit hídrico, estresse por temperatura e alguns casos de doenças de plantas (CEROVIC et al., 1999).

A fluorescência nas regiões RF (685 nm) e FRF (735 nm) está associada à clorofila *a* no fotossistema II e nos fotossistemas II e I, respectivamente (CEROVIC et al., 1999). Portanto, qualquer alteração no conteúdo de clorofila destes fotossistemas, como resultado de estresse provocado pela invasão de um patógeno, acarretará em mudanças mensuráveis que podem ser detectadas através da medida da fluorescência da clorofila, emitida nestas duas regiões.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Mudas

Os experimentos foram realizados sob condições de casa de vegetação (temperatura do ar mínima e máxima entre 20°C e 34°C, respectivamente, nos dias de avaliação dos experimentos) sendo esta localizada no Instituto Biológico, na cidade de Campinas (SP).

Nos experimentos foram utilizadas quinze mudas cítricas das espécies *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (laranja doce, variedade Hamlin, enxertada sobre limão Cravo), *Citrus reticulata* Blanco (tangerina, variedade Ponkan, enxertada sobre limão Cravo) e *Citrus limonia* (L.) Osbeck (limão Cravo), totalizando quarenta e cinco mudas. As mudas foram adquiridas de viveiro idôneo, da região de Araraquara.

Antes da instalação do experimento, as mudas foram transplantadas para vasos plásticos de doze litros preenchidos com solo misturado a substrato, na proporção de 50% de cada componente da mistura. As plantas foram podadas, aproximadamente, dois meses antes da instalação dos experimentos para que as folhas que fossem utilizadas nas avaliações estivessem com a mesma idade na data de inoculação.

3.2 Inoculação e tratamentos

As cinco folhas mais novas, totalmente expandidas, de cada planta foram inoculadas com suspensão do isolado IBSBF 1421 de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. Foram realizadas duas repetições do experimento no tempo. Denominou-se experimento 1, aquele em que a inoculação aconteceu no dia 25 de janeiro de 2006 e experimento 2, aquele com inoculação realizada em 09 de agosto de 2006, ambos utilizando-se de mesma metodologia e com os mesmos critérios de avaliação.

O isolado utilizado na inoculação das plantas foi reativado e semeado em meio de cultura LPGA (7 g/L de extrato de levedura, 7 g/L de peptona, 7 g/L de glicose e 16 g/L de ágar, pH 7,0-7,2) e incubado a 28° C por quarenta e oito horas. Posteriormente, foram feitas diluições seriadas a partir de uma suspensão bacteriana em solução salina

tamponada fosfatada (80 g/L NaCl, 2 g/L KCl, 2 g/L KH_2PO_4 e 29,2 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, pH 7,3) concentrada a $3,4 \times 10^8$ ufc/mL (600 nm a 0,3 de absorvância em espectrofotômetro) até a concentração final de 10^7 ufc/mL.

As inoculações foram por ferimentos com agulhas hipodérmicas de 0,55 x 20 mm de diâmetro, previamente mergulhadas na suspensão bacteriana de 10^7 ufc/mL e introduzidas no limbo foliar até atravessar toda sua espessura.

Os tratamentos realizados foram: (i) testemunha, que correspondeu a 2 perfurações da agulha mergulhada em tampão PBS (Tampão Fosfato Salino); (ii) severidade média, que correspondeu a 2 perfurações de agulha mergulhada na suspensão bacteriana de 10^7 ufc/mL; (iii) severidade alta, que correspondeu a 4 perfurações de agulha mergulhada na suspensão bacteriana de 10^7 ufc/mL. Para a realização das perfurações, as mesmas ficaram delimitadas por uma moldura com área de 6 cm^2 de modo que os ferimentos se enquadrassem na área que ficaria dentro da câmara de análise da fotossíntese (Figura 1). Foram utilizadas cinco plantas como repetição de cada tratamento, no delineamento experimental inteiramente casualizado.



Figura 1- Inoculação de folhas de citros com agulha hipodérmica em área de 6 cm^2 delimitada por moldura de papel

Imediatamente após a aplicação dos tratamentos, as plantas foram cobertas com sacos plásticos umedecidos e mantidas nesta condição de câmara úmida durante uma

noite, para favorecer a eficácia da inoculação. Após este período, os plásticos foram retirados de cada planta e os experimentos foram conduzidos, cumprindo-se todas as normas de segurança fitossanitária referentes ao cancro cítrico.

3.3 Avaliações e análise de dados

3.3.1 Severidade do cancro cítrico

Após inoculação, as plantas foram avaliadas diariamente para determinação do período de incubação. Este foi considerado como o número de dias decorridos da inoculação ao aparecimento de ao menos uma lesão necrótica, visível a olho nu, em mais que 50% das folhas inoculadas em cada planta.

Em cada data de avaliação, após o aparecimento dos sintomas, a área de 6 cm² delimitada pela moldura original foi fotografada por uma câmera digital. As imagens digitalizadas foram transferidas para computador e, posteriormente, processadas com o programa de quantificação de doenças QUANT (v.1.0) (VALE; FERNANDES FILHO; LIBERATO, 2003) para a avaliação da severidade dos sintomas nas mesmas. Considerou-se o halo amarelo, freqüentemente encontrado nas folhas, como parte da lesão, ou seja, o mesmo foi considerado no resultado final da severidade.

3.3.2 Medidas das trocas gasosas

As avaliações dos parâmetros fisiológicos, taxa líquida de fotossíntese com saturação da luz (A), taxa de transpiração (Tr) e taxa de respiração no escuro (Re), foram realizadas com um analisador portátil de gás por infra-vermelho (IRGA), modelo LI-6400 (Li-Cor, EUA) nas plantas inoculadas e nas testemunhas (Figura 2).



Figura 2 - IRGA, modelo LI-6400, utilizado nas medidas de trocas gasosas

O equipamento mede a taxa de assimilação de CO_2 e assim, promove um método alternativo e direto para medir a taxa fotossintética, com importantes vantagens: as medidas são instantâneas e não há destruição das amostras. Neste sistema, o ar passa no interior do IRGA que continuamente registra a concentração de CO_2 no sistema, verificando a diferença entre o ar que atravessa a câmara onde está o tecido foliar, e o ar que entra na câmara. Quanto maior a assimilação de CO_2 pela folha, maior sua atividade fotossintética (LONG; HALLGREN, 1993).

Para a avaliação da A e T_r , a folha permanecia na câmara de análise por alguns minutos, até a estabilização da leitura (as medidas foram registradas ao atingir-se valor menor que 1% de variação registrada no equipamento). Para a avaliação da R_e a fonte de luz era desligada e o resultado coletado após a estabilização da leitura.

Após a primeira avaliação de cada folha, foi feita uma marca em torno da região que ficava dentro da câmara de análise para que as próximas avaliações fossem feitas na mesma área, da mesma folha.

No experimento 1, a primeira avaliação foi realizada um dia antes da inoculação (1 ai), situação em que todas as folhas encontravam-se saudas e sem ferimentos; uma nova avaliação foi realizada um dia após a inoculação (1 dai). As avaliações seguintes foram feitas semanalmente, aos 7 e 13 dias após a inoculação (7 dai e 13 dai, respectivamente). A partir deste ponto, as avaliações tornaram-se quinzenais com leituras realizadas aos 28, 44, 58 e 72 dias após a inoculação (28 dai, 44 dai, 58 dai e 72 dai, respectivamente), finalizando-se este experimento.

No experimento 2, também houve avaliação um dia antes da inoculação (1 ai) e repetiu-se a realizada 1 dai. Porém, diferente do que aconteceu no experimento anterior, as leituras, até o final do experimento, foram aos 9, 16, 21 e 42 dai.

Durante as avaliações, algumas condições foram padronizadas para que as leituras não sofressem qualquer tipo de alteração provocada por fatores que não estivessem relacionados com a doença. Para isto, certas providências foram tomadas, tais como: utilização de “mixer” para injeção de CO₂, mantendo-se constante a concentração de CO₂ no ar que entra na câmara em 380 ppm, aproximadamente e, padronização do fluxo de ar pela câmara em 350 $\mu\text{mol s}^{-1}$. Com a finalidade de garantir fluxo fotossintético de fótons constante durante as avaliações, utilizou-se fonte de luz artificial do próprio equipamento regulada para 1000 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, deste modo garantindo o ponto de saturação lumínica para as três variedades avaliadas.

3.3.3 Espectroscopia de fluorescência

Um sistema portátil de espectroscopia de fluorescência (Figura 3) foi o responsável pela coleta de espectros, o qual esteve em operação durante o experimento 2, no qual todas as plantas foram avaliadas quanto às respostas após excitação com laser, com a vantagem de ser uma técnica não destrutiva das amostras.



Figura 3 - Sistema portátil para leituras de espectroscopia de fluorescência

Utilizou-se luz verde como excitação da fluorescência por entregar energia diretamente às clorofilas. A luz de excitação da fluorescência foi emitida por sistema portátil composto de:

1) Um espectrômetro (350 nm até 850 nm), que é um equipamento que pode medir, ao mesmo tempo, várias radiações de frequências diferentes e apresentar o espectro do resultado através de um gráfico da intensidade em função do comprimento de onda da radiação;

2) Fibra em “Y”, a qual envia a luz de um laser (responsável pela excitação) à folha através de uma fibra central, e coleta a fluorescência proveniente do tecido vegetal utilizando seis fibras periféricas e;

3) Fonte de excitação, para estimular a fluorescência na região entre UV e azul: laser do estado sólido de neodímio que emite luz verde de 532 nm de comprimento de onda.

As seis fibras periféricas estão conectadas a um monocromador portátil inserido a um computador. O espectro coletado é analisado por um computador. O procedimento foi executado sob condições que garantissem total segurança no manuseio das folhas contaminadas pela doença.

A primeira leitura espectroscópica ocorreu um dia antes da inoculação (1 ai), situação em que todas as folhas encontravam-se sadias e sem ferimentos; uma nova leitura foi realizada um dia após a inoculação (1 dai) e as seguintes acompanharam os mesmos dias de avaliação dos parâmetros fisiológicos (9, 16, 21 e 42 dai).

Em cada leitura, os espectros eram coletados em diferentes pontos de folhas com e sem sintomas, coletando-se três espectros por folha avaliada. Os espectros foram coletados nas mesmas folhas em que foram obtidos os resultados com o IRGA, na região de transição entre o tecido amarelo (quando este ocorria na folha) e a região verde, evitando-se direcionar a ponta da fibra para a área que já se encontrava necrosada.

Tomou-se o cuidado com a forma de medir a fluorescência, pois o formato do espectro se altera com diferentes posições da ponta do guia em relação à superfície da planta. Isto se dá porque com a inclinação, as fibras do guia restringem ainda mais a

entrada de luz. Nota-se que há uma angulação limite entre a ponta do guia e a superfície da planta, e a partir desta nenhuma luz é capturada (LINS, 2005).

Para fazer a comparação entre as intensidades dos espectros foi necessária padronização do formato dos mesmos, normalizando-os pelo pico da excitação (532 nm) que não foi bloqueado. Assim, todos os espectros estão numa mesma escala, onde o pico da excitação é o mesmo.

Foram utilizadas para comparação as razões RF/ESF e FRF/ESF, onde RF é a fluorescência em 685 nm e FRF a fluorescência em 735 nm e ESF (do inglês, Elastic Scattering Fluorescence, ou seja, Fluorescência do Espalhamento Elástico) representa a normalização do espectro em 532 nm. Portanto, os espectros foram normalizados no pico da excitação (532 nm) para se eliminar possíveis fatores externos como variação da potência do laser, ângulo entre a fibra e a folha, poeira, etc.

3.3.4 Análise de dados

O modelo linear foi ajustado aos dados de incremento de severidade da doença (variável dependente) no tempo (variável independente).

O modelo de Bastiaans (1991), $y = (1 - x)^\beta$, onde y representa a assimilação líquida de CO₂ relativa e x representa a severidade da doença, ambos em proporção, e β representa um parâmetro do modelo, foi ajustado aos dados obtidos nos dois experimentos, através de regressão não-linear pelo método de quadrados mínimos, utilizando-se do programa STATISTICA (StatSoft, Tulsa, EUA). Nas regressões significativas, o parâmetro β foi comparado a 1 pelo teste t.

O modelo monomolecular $y = b_1*(1-b_2* \exp(-b_3*x))$ (em que y representa a assimilação de CO₂ e x representa as razões RF/ESF e FRF/ESF, b_1 representa o valor de estabilização da curva, b_2 relaciona-se ao ponto de intercepto da curva e b_3 representa o coeficiente da curva) foi ajustado aos dados dos dois experimentos por meio de regressão não-linear.

4 RESULTADOS

4.1. Severidade do cancro cítrico

O aumento na severidade das plantas inoculadas foi linear nas três variedades, em ambos os experimentos e correspondeu à expansão das lesões ao redor dos ferimentos (Figuras 4 e 5 e Tabela 1).

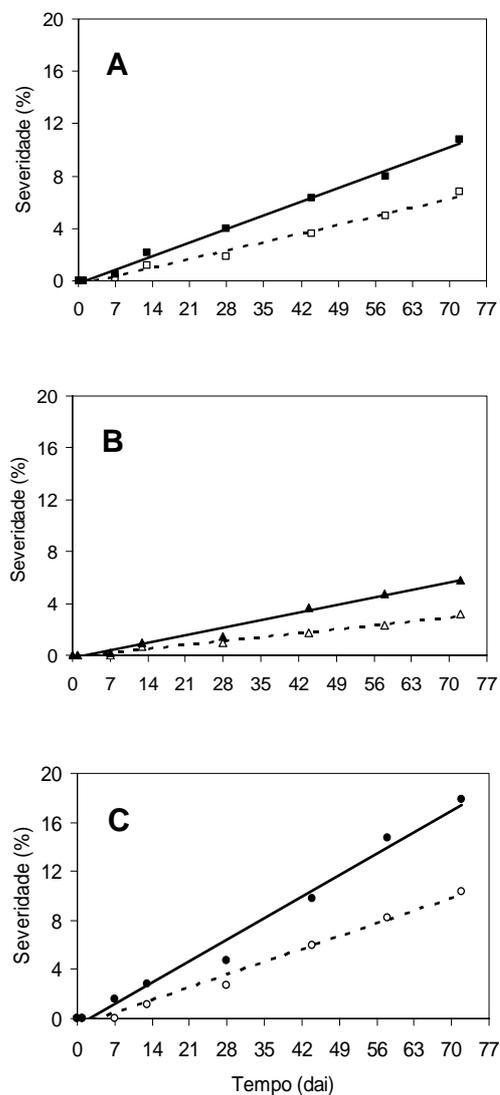


Figura 4- Severidade do cancro cítrico nas variedades Ponkan (A), Cravo (B) e Hamlin (C), durante avaliação do experimento 1. Símbolos escuros e linhas contínuas representam severidade alta da doença; símbolos claros e linhas tracejadas, severidade média

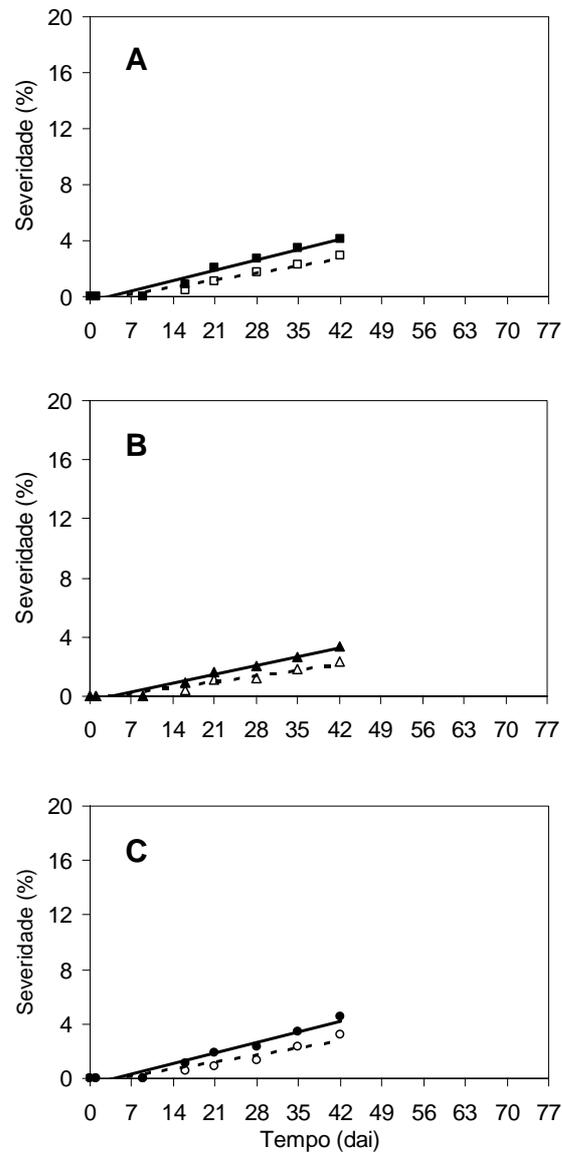


Figura 5- Severidade do cancro cítrico nas variedades Ponkan (A), Cravo (B) e Hamlin (C), durante avaliação do experimento 2. Símbolos escuros e linhas contínuas representam severidade alta da doença; símbolos claros e linhas tracejadas, severidade média

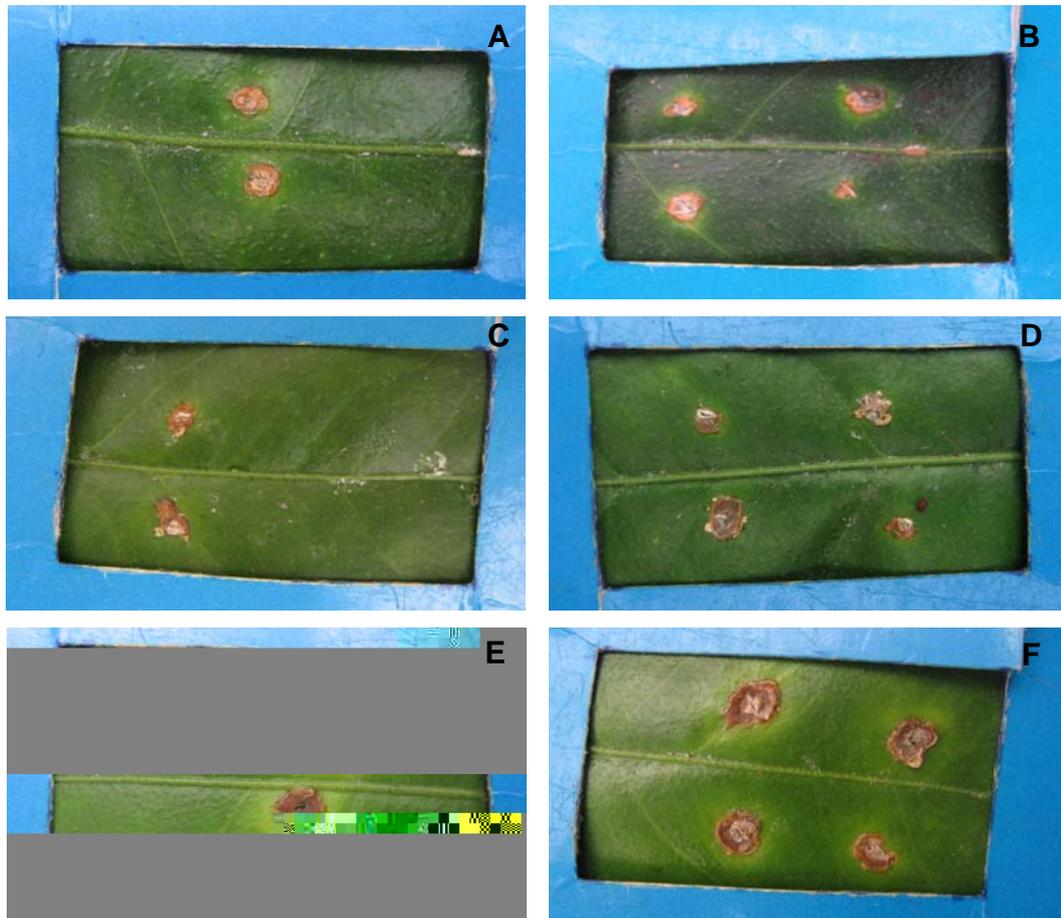


Figura 6- Expressão dos sintomas em plantas inoculadas de tangerina Ponkan nas severidades média (A) e alta (B), limão Cravo nas severidades média (C) e alta (D) e laranja Hamlin nas severidades média (E) e alta (F), no experimento 1, aos 72 dias após a inoculação (data da última avaliação)

Quanto à sintomatologia da doença, duas observações podem ser feitas no experimento 2, diferindo-o do experimento anterior: o aparecimento do sintoma foi retardado e as severidades alcançadas ao final do experimento foram ainda menores que no experimento 1.

O período de incubação para as três variedades, em ambas as severidades, foi atingido ao redor dos 16 dias após a inoculação. Este atraso no aparecimento do sintoma quando comparado ao experimento anterior, possivelmente, deveu-se ao fato das menores temperaturas médias dos dias compreendidos entre a inoculação da bactéria até o aparecimento dos sintomas neste experimento (Anexos A e B).

A severidade máxima obtida ao final do experimento, levando-se em consideração os diferentes tratamentos, não ultrapassou 5%, sendo bastante inferior à encontrada no experimento 1 (aproximadamente 18%).

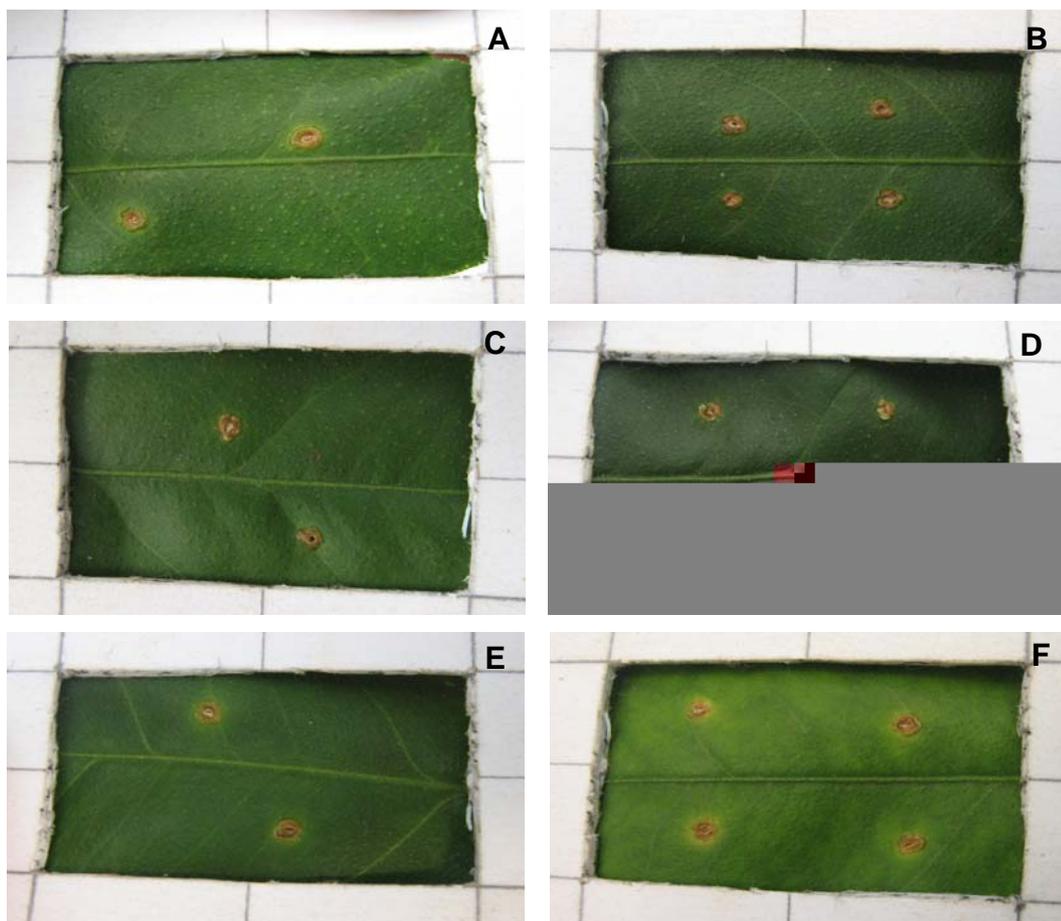


Figura 7- Expressão dos sintomas em plantas inoculadas de tangerina Ponkan nas severidades média (A) e alta (B), limão Cravo nas severidades média (C) e alta (D) e laranja Hamlin nas severidades média (E) e alta (F), no experimento 2, aos 42 dias após a inoculação (data da última avaliação)

4.2 Trocas gasosas

A exemplo do aumento linear pouco pronunciado da severidade do cancro cítrico ao longo do tempo de avaliação dos experimentos, a fotossíntese relativa (porcentagem da assimilação de CO_2 em relação às plantas testemunhas) e a taxa de transpiração

relativa (taxa de transpiração em porcentagem das plantas testemunhas) mostraram decréscimo pouco acentuado no decorrer das avaliações dos dois experimentos. (Anexos C, D, E e F). Houve grande variação na taxa de respiração no escuro durante as datas de avaliação dos experimentos 1 e 2 e entre eles (Anexos G e H).

O modelo proposto por Bastiaans (1991) foi ajustado aos valores de fotossíntese relativa e de severidade da doença obtidos nos experimentos 1 e 2, analisando-se conjuntamente os dados de ambos os experimentos para as variedades Ponkan e Hamlin (Figura 8). As regressões não-lineares foram significativas ($p < 0,01$) para as variedades citadas anteriormente, apesar dos baixos valores dos coeficientes de determinação (R^2) obtidos no ajuste do modelo (Tabela 2). Para estas duas variedades os dados obtidos podem justificar o modelo, ou seja, há diminuição da assimilação líquida de CO_2 das folhas doentes com o aumento da severidade da doença e os valores de β estimados foram, respectivamente, maior e igual a 1, para as variedades Hamlin e Ponkan a 5% de probabilidade. No caso da variedade Cravo estas observações não podem ser feitas visto que a mesma apresentou regressão não significativa, ou seja, o modelo não se ajustou aos valores obtidos nas avaliações.

Tabela 2- Coeficientes de determinação (R^2), parâmetro da equação $y = (1 - x)^\beta$ (em que y representa a assimilação líquida relativa de CO_2 e x representa a severidade da doença, ambos em proporção, e β representa um parâmetro estimado do modelo) e a significância da regressão não-linear (p) para os dados dos experimentos 1 e 2, analisados conjuntamente, para as variedades Ponkan e Hamlin

Variedades	R^2	β	p
Ponkan	0,18	1,6	0,005
Hamlin	0,15	1,8*	0,0003

*Indica valor significativamente diferente de 1 pelo teste t.

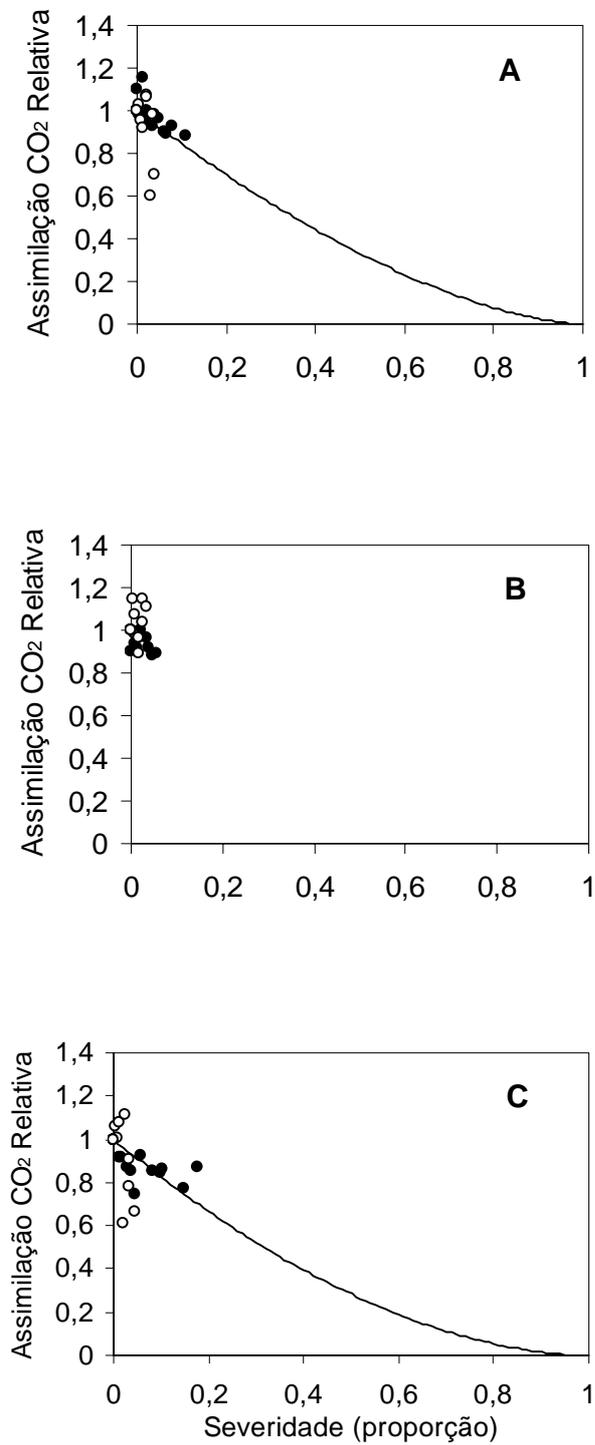


Figura 8- Assimilação líquida de CO₂ em relação à testemunha em função da severidade do cancro cítrico (ambos em proporção), para as variedades Ponkan (A), Cravo (B) e Hamlin (C). Dados relativos ao experimento 1 (símbolo escuro) e ao experimento 2 (símbolo claro)

4.3 Espectroscopia de fluorescência

Os dados de assimilação líquida de CO₂ nos diferentes dias de avaliação (Figura 9) e os dados de espectroscopia de fluorescência em função do tempo (Figuras 10 e 11), para cada espécie estudada, mostram que, de um modo geral, ambos têm o mesmo padrão de resposta à doença ao longo do tempo, ou seja, se as razões RF/ESF e FRF/ESF diminuem, são observados decréscimos nos valores de fotossíntese no mesmo dia de leitura.

Nota-se para as três variedades, nas severidades média e alta, a grande variação nas leituras de espectroscopia de fluorescência e de fotossíntese em cada data de avaliação (erro padrão).

Não houve diferenças entre as espécies no que diz respeito às respostas obtidas pela excitação com o laser e nem se observou diferença evidente entre as diferentes severidades dentro da mesma espécie. Devido a esta igualdade entre as espécies nas respostas ao laser, optou-se pela análise conjunta dos dados, tentando-se correlacionar as leituras obtidas pela excitação da folha com o laser com os valores encontrados de fotossíntese. As razões RF/ESF e FRF/ESF foram relacionadas com a fotossíntese de plantas sadias e doentes. O modelo monomolecular foi ajustado aos dados obtidos neste experimento (Tabela 3 e Figuras 12 e 13). Os ajustes foram significativos ($p < 0,05$).

Tabela 3- Coeficientes de determinação (R^2), e parâmetros da equação $y = b1*(1 - b2*exp(-b3*x))$ (em que y representa a assimilação de CO₂ e x representa as razões RF/ESF e FRF/ESF, ambos em proporção, $b1$ representa o valor de estabilização da curva, $b2$ relaciona-se ao ponto de intercepto da curva e $b3$ representa o coeficiente da curva) para o conjunto de dados das variedades Ponkan, Cravo e Hamlin

Razões	R^2	$b1$	$b2$	$b3$
RF/ESF	0,28	0,12	1,17	4,55
FRF/ESF	0,31	0,12	1,68	3,31

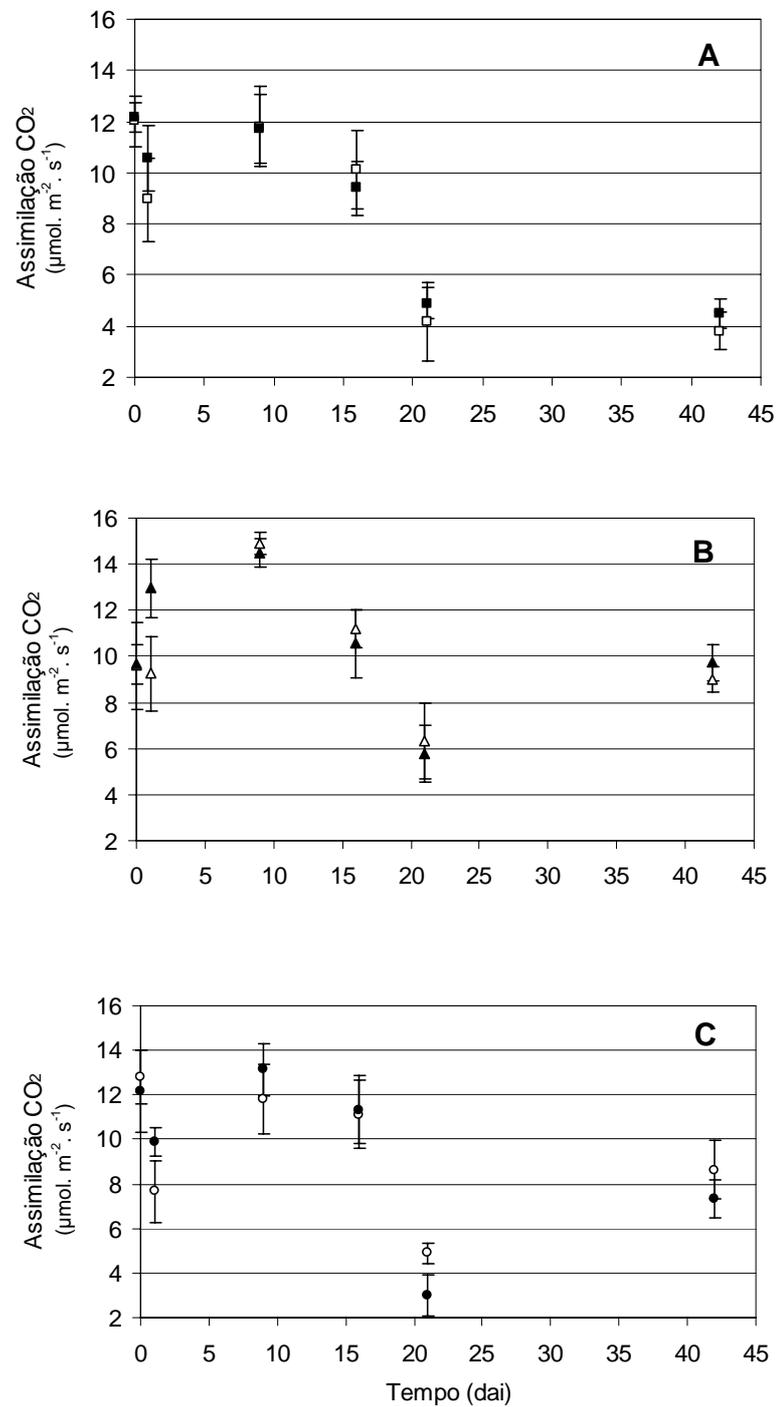


Figura 9- Valores médios (símbolos) e erro padrão (barras) da taxa de assimilação de CO₂ para plantas doentes das variedades Ponkan (A), Cravo (B) e Hamlin (C), durante as datas de avaliação do experimento 2, onde símbolos escuros representam severidade alta da doença e símbolos claros, severidade média

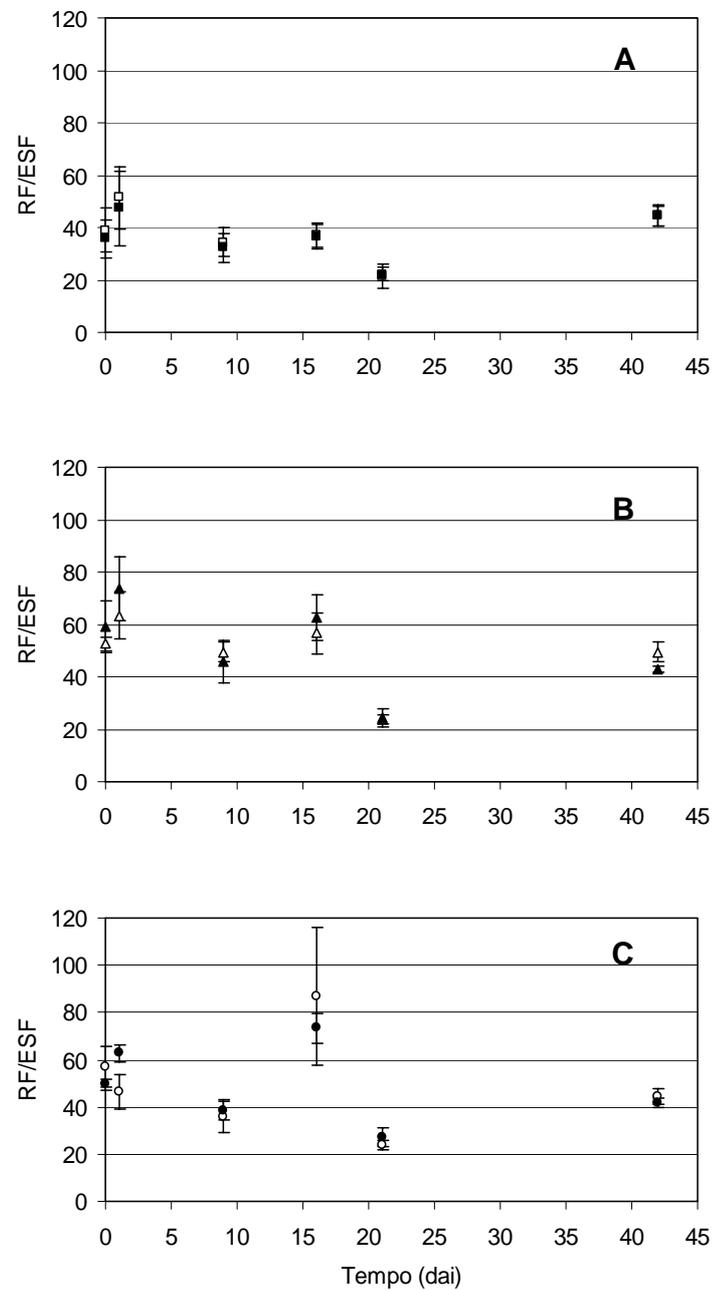


Figura 10- Valores médios (símbolos) e erro padrão (barras) da razão RF/ESF para plantas doentes das variedades Ponkan (A), Cravo (B) e Hamlin (C), durante as datas de avaliação do experimento 2, onde símbolos escuros representam severidade alta da doença e símbolos claros, severidade média

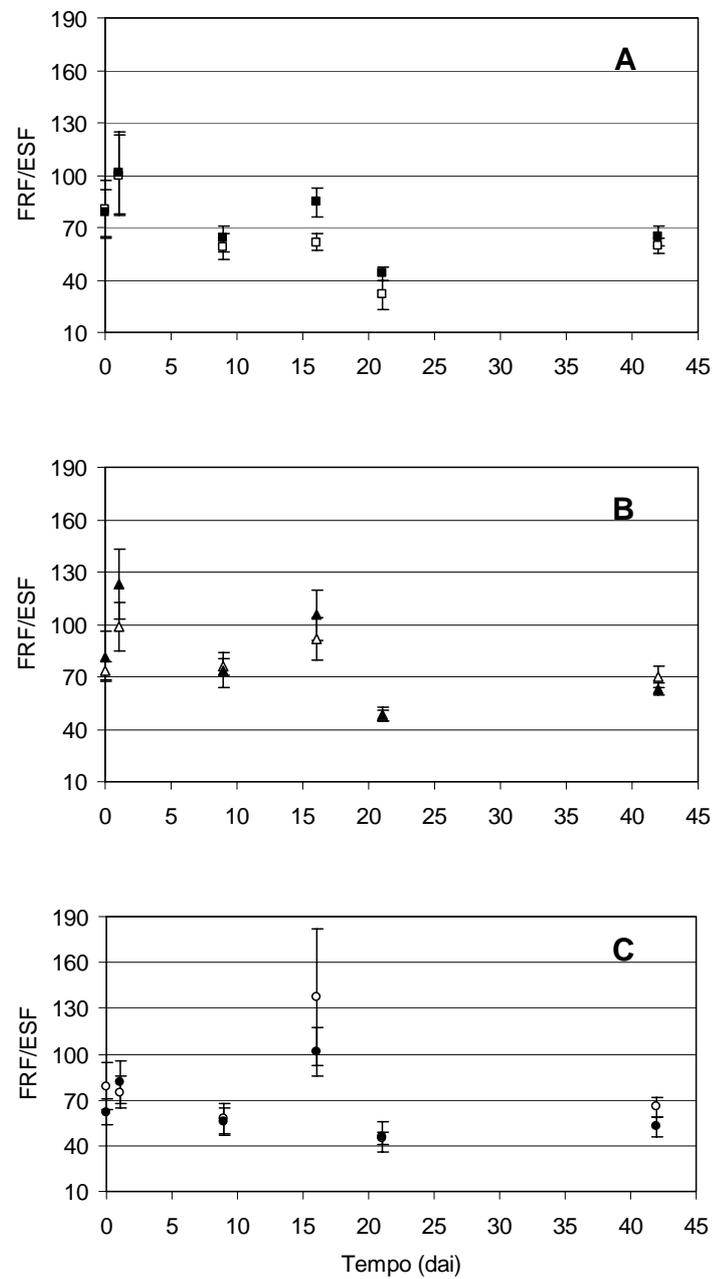


Figura 11- Valores médios (símbolos) e erro padrão (barras) da FRF/ESF para plantas doentes das variedades Ponkan (A), Cravo (B) e Hamlin (C), durante as datas de avaliação do experimento 2, onde símbolos escuros representam severidade alta da doença e símbolos claros, severidade média

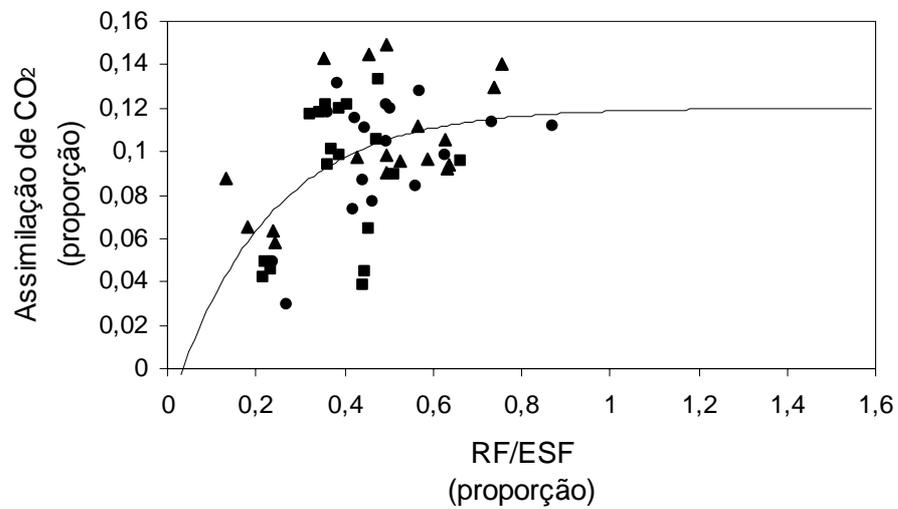


Figura 12- Assimilação de CO₂ em função da razão RF/ESF, ambos em proporção, para plantas testemunhas e doentes das variedades Ponkan (quadrados), Cravo (triângulos) e Hamlin (círculos)

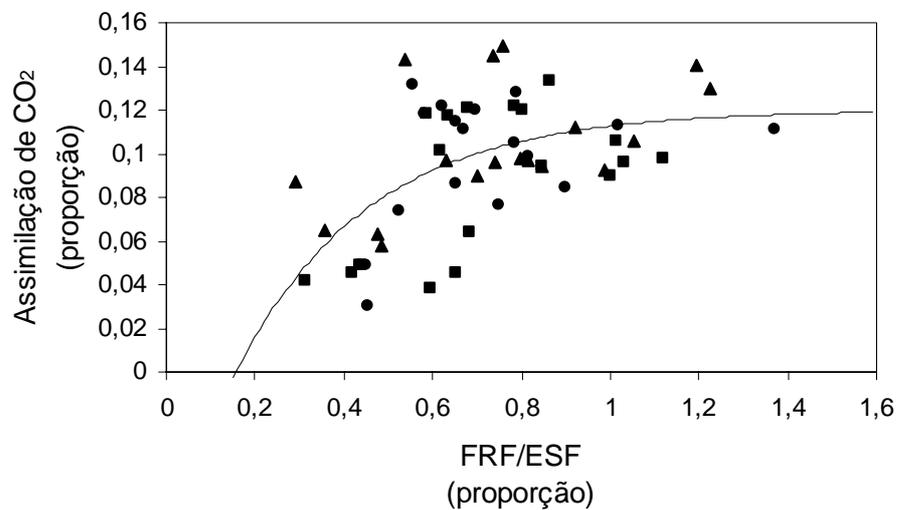


Figura 13- Assimilação de CO₂ em função da razão FRF/ESF, ambos em proporção, para plantas testemunhas e doentes das variedades Ponkan (quadrados), Cravo (triângulos) e Hamlin (círculos)

5 DISCUSSÃO

Nenhum estudo relacionando severidade da doença e fotossíntese foi realizado para o patossistema citros-*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. Pode-se citar alguns entraves para a não concretização destes estudos, entre eles o fato do cancro cítrico ser considerado doença quarentenária e o alto custo na aquisição e manutenção dos equipamentos envolvidos.

A inoculação com número fixo de ferimentos mostrou vantagens e desvantagens neste estudo: a principal vantagem é a homogeneidade dos valores obtidos nas repetições e a principal desvantagem, a baixa gama de severidades. Como as leituras de eficiência fotossintética com o equipamento IRGA são relativamente demoradas e, para fins comparativos, devem ser feitas num curto período do dia (entre 9 e 12 horas) (MEDINA; MACHADO; GOMES, 1999), o número de repetições torna-se restrito. Dessa forma, para que uma maior gama de severidade possa ser medida, um grande número de experimentos deve ser realizado. Essa alternativa apresenta também uma série de problemas decorrentes da elevada variação da fotossíntese com as condições ambientais (MACHADO et al., 2005; RIBEIRO; MACHADO; OLIVEIRA, 2004) o que acarretaria na necessidade de repetições por anos seguidos. A melhor solução num estudo deste tipo seria a condução do experimento em ambiente completamente controlado. Entretanto, as câmaras de crescimento de plantas com luminosidade suficiente para abrigar mudas cítricas como as utilizadas neste estudo são muito caras e pouco disponíveis em locais seguros para se trabalhar com esta doença.

Contrariamente às observações de campo, as quais classificam a variedade Ponkan mais resistente ao cancro cítrico que a variedade Cravo (FEICHTENBERGER et al., 2005), observou-se o inverso. Na verdade, as observações deste estudo limitam-se ao crescimento da lesão ao redor do ferimento, que é um dos componentes da resistência varietal. O próprio método de inoculação utilizado permite que se avalie apenas a resistência à colonização, desprezando qualquer barreira imposta pela planta à infecção da bactéria. Não foram avaliados a frequência de infecção nem o número/extensão de ferimentos em condições naturais. Provavelmente, a grande quantidade de espinhos aliada a uma densidade foliar mediana característica da

variedade Cravo fazem com que, em condições de campo, as plantas cítricas desta espécie apresentem elevado número de lesões provenientes do atrito das folhas com os espinhos, resultando na menor resistência desta quando comparada à variedade Ponkan.

O termo lesão virtual abrange a área da lesão visual mais uma área adjacente na qual a atividade fotossintética também é afetada pela atividade do patógeno. O conceito de lesão virtual proposto por Bastiaans (1991) foi a base para um modelo que quantifica a capacidade fotossintética de folhas doentes. A relação entre a severidade da doença e a fotossíntese das folhas infectadas é descrita por um único parâmetro β (BASSANEZI, 2000). Pelos resultados obtidos nos experimentos 1 e 2 a variedade Ponkan apresentou valor de β igual a 1 e a variedade Hamlin, valor de β maior que 1, indicando decréscimo na taxa fotossintética destas duas variedades com o aumento da severidade da doença. Na variedade Hamlin a diminuição da taxa fotossintética foi proporcionalmente maior que área afetada pela doença, mostrando a existência de lesão virtual. Na variedade Cravo o modelo não se ajustou aos valores obtidos nas avaliações, uma vez que para esta variedade, em ambos os experimentos, as severidades não alcançaram valores expressivos fazendo com que esta obtivesse a menor expansão da lesão ao redor do ferimento em relação às outras variedades avaliadas.

Nos níveis de severidade estudados, as medidas espectroscópicas (razão RF/ESF e FRF/ESF) têm relação positiva significativa com os valores de fotossíntese. O modelo monomolecular ajustou-se melhor aos dados que o modelo linear e, aparentemente, tem relação com o conteúdo de clorofila presente nas folhas visto que, a fluorescência emitida na região do vermelho depende principalmente da concentração de clorofila na folha, porque somente ela emite nessa região (CEROVIC et al., 1999; LINS, 2005). Os menores valores de fotossíntese se relacionam com os menores valores de RF/ESF e FRF/ESF, provavelmente devido ao menor conteúdo de clorofila nestas amostras, causando uma diminuição na fluorescência emitida. À medida que ocorre aumento no conteúdo de clorofila das folhas, a fotossíntese também aumenta e o sistema de espectroscopia de fluorescência lê estes incrementos mostrando valores de RF/ESF e FRF/ESF maiores. A fotossíntese atinge seu máximo e se estabiliza, mas

o sistema de espectroscopia continua com leituras crescentes de RF/ESF e FRF/ESF. Portanto, o sistema portátil de espectroscopia é capaz de realizar leituras que se relacionam diretamente com a fotossíntese das folhas, porém, esta relação só é verdadeira até certo ponto, a partir do qual o mesmo continua captando intensidades de fluorescência maiores (RF/ESF e FRF/ESF maiores), embora as folhas estejam com sua atividade fotossintética constante. É importante ressaltar a grande variação nas leituras de espectroscopia de fluorescência, possivelmente explicadas pela variação na idade das folhas avaliadas, diferentes dias de leitura e que, ao contrário do equipamento IRGA que mede a fotossíntese de uma área de 6 cm², o sistema de espectroscopia faz leituras pontuais na folha.

A relação das leituras de espectroscopia de fluorescência com a fotossíntese sugere que doenças que afetam o conteúdo de clorofila da folha não poderão ser diferenciadas com base nestas razões estudadas, uma vez que as mesmas apresentarão alterações semelhantes. De fato, Marcassa et al. (2006) não conseguiram diferenciar acuradamente folhas com sintomas de cancro cítrico e clorose variegada dos citros (CVC). No entanto, esses mesmos autores conseguiram distinguir amostras representadas por folhas com e sem sintomas de cancro cítrico. Provavelmente, em razão da relação existente entre a espectroscopia de fluorescência, da forma como testada, e a fotossíntese, resultados mais promissores serão obtidos na comparação de plantas com e sem estresses, e não com plantas sob diferentes tipos de estresses.

6 CONCLUSÕES

- O cancro cítrico afeta a eficiência fotossintética, mesmo em baixas severidades da doença. Na variedade Hamlin, a doença não apenas reduz a área foliar, mas também reduz a fotossíntese do tecido verde remanescente.

- Há relação positiva significativa entre as razões RF/ESF e FRF/ESF e a fotossíntese nas variedades estudadas.

REFERÊNCIAS

ALLEN, P. J. Changes in the metabolism of wheat leaves induced by infection with powdery mildew. **American Journal of Botany**, New York, v. 29, n.6, p. 351-423, 1942.

AMARAL, S.F. Providências para a erradicação do cancro cítrico. **O Biológico**, São Paulo, v. 23, p.112-123, 1957.

AMARAL, A. M. do. **Cancro cítrico**: permanente preocupação da citricultura no Brasil e no mundo. Brasília: EMBRAPA, 2003. 5p. (Comunicado Técnico, 86).

AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. A epidemiologia do cancro cítrico. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 27, n. 1, p. 151-156, 2001.

BARBOSA, J. C.; GIMENES-FERNANDES, N., MASSARI, C. A., AYRES, A. J. Incidência e distribuição de cancro cítrico em pomares comerciais do Estado de São Paulo e sul do Triângulo Mineiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 27, p. 30-35, 2001.

BASSANEZI, R. B. Efeito de doenças foliares na eficiência fotossintética do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) como contribuição na avaliação de danos. 2000. 233p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

BASSANEZI, R. B.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. Eficiência fotossintética de folhas de feijoeiro infectadas com o vírus do mosaico-em-desenho, *Uromyces appendiculatus* e *Phaeoisariopsis griseola*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 27, n. 1, p. 5-11, 2001.

BASTIAANS, L. Ratio between virtual and visual lesion size as a measure to describe reduction in leaf photosynthesis of rice due to leaf blast. **Phytopathology**, St. Paul, v. 81, n. 6, p. 611-615, 1991.

BELASQUE JUNIOR, J.; PARRA-PEDRAZZOLI, A. L.; RODRIGUES NETO, J.; YAMAMOTO, P. T.; CHAGAS, M. C. M.; PARRA, J. R. P.; VINYARD, B. T.; HARTUNG, J. S. Adult citrus leafminers (*Phyllocnistis citrella*) are not efficient vectors for *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 89, p.590-594, 2005.

BITANCOURT, A.A. O cancro cítrico. **O Biológico**, São Paulo, v. 23, n.6, p. 101-111, 1957.

BRUNINGS, A. M.; GABRIEL, D. W. *Xanthomonas citri*: breaking the surface. **Molecular Plant Pathology**, London, v.4, n. 3, p. 141-157, 2003.

CEROVIC, Z. G.; SAMSON, G.; MORALES, F; TREMBLAY, N.; MOYA, I. Ultraviolet-induced fluorescence for plant monitoring: present state and prospects. **Agronomie**, Paris, v. 19, p. 543-578, 1999.

CHRISTIANO, R. S. C. Cancro cítrico (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*) e sua interação com a lagarta minadora dos citros (*Phyllocnistis citrella*) em laranja doce (*Citrus sinensis*). 2006. 82p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

CIVEROLO, E.L. Citrus bacterial canker disease: The bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. IN: CITRUS CANKER: AN INTERNATIONAL PERSPECTIVE. Lake Alfred, 1985. **Citrus Canker**: an international perspective, Lake Alfred: Citrus Research and Education Center, University of Florida, 1985. p. 11-17.

DANÓS, E.; BERGER, R.D.; STALL, R.E. Temporal and spatial spread of citrus canker within groves. **Phytopathology**, St. Paul, v. 74, p. 904-908, 1984.

DAS, A. K. Citrus canker – a review. **Journal of Applied Horticulture**, Indiranagar, v.5, n.1, p. 52-60, 2003.

FEICHTENBERGER, E.; MÜLLER, G. W.; GUIRADO, N. Doenças dos citros (*Citrus* spp.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. (Ed.). **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Ceres. 1997. v.2, p. 261-196.

FEICHTENBERGER, E.; BASSANEZI, R.B.; SPÓSITO, M. B.; BELASQUE JUNIOR, J. Doenças dos citros (*Citrus* spp.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Ed.). **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Ceres. 2005. v.2, p. 239-269.

GIMENES-FERNANDES, N.; BARBOSA, J.C.; AYRES, A.J.; MASSARI, C.A. Plantas doentes não detectadas nas inspeções dificultam a erradicação do cancro cítrico. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 26, p.320-325, 2000.

GODOY, C. V.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. Alterações na fotossíntese e na transpiração de folhas de milho infetadas por *Phaeosphaeria maydis*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 2, p. 209-213, 2001.

GOTTWALD, T.R.; GRAHAM, J. H. Citrus canker. The plant health instructor. **Plant Disease Lessons**, St. Paul. DOI: 10.1094/PHP- I - 2000 – 1002 – 01. 2000. Disponível em: <<http://www.apsnet.org/education/lessonsplantpath/citruscanker>>. Acesso em: 24 ago. 2004.

GOTTWALD, T.R.; GRAHAM, J.H.; SCHUBERT, T.S. An epidemiological analysis of the spread of citrus canker in urban Miami, Florida, and synergistic interaction with the Asian citrus leafminer. **Fruits**, Paris, v. 52, n.6, p. 371-378, 1997.

GOTTWALD, T.R.; McGUIRE, R.G.; GARRAN, S. Asiatic citrus canker: spatial and temporal spread in simulated new planting situations in Argentina. **Phytopathology**, St. Paul, v. 78, n.6, p. 739-745, 1988.

GOTTWALD, T.R.; TIMMER, L.W.; McGUIRE, R.G. Analysis of disease progress of citrus canker in nurseries in Argentina. **Phytopathology**, St. Paul, v.79, n.11, p. 1276-1283, 1989.

GOTTWALD, T.R.; HUGHES, G.; GRAHAM, J.H.; SUN, X.; RILEY, T. The citrus canker epidemic in Florida: The scientific basis of regulatory eradication policy for an invasive species. **Phytopathology**, St. Paul, v. 91, p. 30-34, 2001.

GÜNTHER, K. P.; DAHN, H. G.; LÜDEKER, W. Remote sensing vegetation status by laser- induced fluoresce. **Remote Sensing Environ**, New York, v. 47, p. 10-17, 1994.

JESUS JUNIOR, W. C.; BELASQUE JÚNIOR, J.; AMORIM, L.; CHRISTIANO, R. S. C.; PARRA, J. R. P.; BERGAMIN FILHO, A. Injuries caused by citrus leafminer (*Phyllocnistis citrella*) exacerbate citrus canker (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*) infection. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.31, p.277-283, 2006.

JOHNSON, K. B. Defoliation, disease, and growth: a reply. **Phytopathology**, St. Paul, v. 77, n. 11, p. 1495-1497, 1987.

KOIZUMI, M. Citrus canker: The world situation. In: TIMMER, L. W. (Ed.). **Citrus canker: An international perspective**. University of Florida / Institute of Food and Agricultural Science, Gainesville: University of Florida, 1985. p. 2-7.

KRAUSE, G. H.; WEIS, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. **Annual Review of Plant Physiology**, Stanford, v. 42, p. 313-349, 1991.

KRIEDEMANN, P. E. Some photosynthetic characteristics of citrus leaves. **Australian Journal of Biological Sciences**, Melbourne, v. 21, n.5, p. 895- 905, 1968.

KRIEDEMANN, P. E. Photosynthesis and transpiration as a function of gaseous diffusive resistances in oranges leaves. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 24, p. 218-225, 1971.

LAWLOR, D. W. **Photosynthesis**. 3rd ed. New York: BIOS Scientific Publishers, 2001. 386p.

LEITE, B.; PASCHOLATI, S. F. Hospedeiro: alterações fisiológicas induzidas por fitopatógenos. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de Fitopatologia**, 3. ed. São Paulo: Ceres. 1995. v.1, p. 393-416.

LINS, E. C. C. C. Técnicas ópticas para análise da manifestação do estresse hídrico em laranjeiras. 2005. 102p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2005.

LINS, E. C. ; NUNES, F D ; GASPAROTO, M C. G.; BELASQUE JUNIOR, J.; BAGNATO, V.S.; MARCASSA, L. G. Fluorescence spectroscopy to detect water stress in orange trees. In: International Conference on Microwave and Optoelectronics, 2005, Brasília. **Proceedings...** Piscataway : IEEE, 2005. p. 534-537.

LIVNE, A. Photosynthesis in healthy and rust-affected plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 39, p. 614-621, 1964.

LONG, S. P.; HÄLLGREN, J. E. Measurement of CO₂ assimilation by plants in the field and the laboratory. 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. chap. 9, p.129-167.

LÜDEKER, W.; DAHN, H. G.; GÜNTHER, K. P. Detection of fungal infection of plants by laser-induced fluorescence: an attempt to use remote sensing. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 148, p. 579-585, 1996.

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**, Piracicaba, 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**, Londrina, v. 6, n. 1, p. 53-57, 1994.

MACHADO, E. C.; SCHMIDT, P. T.; MEDINA, C. L.; RIBEIRO, R. V. Respostas de três espécies de citros a fatores ambientais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 12, p. 1161-1170, 2005.

MACIEL, J. L. N.; DUARTE, V.; AYUB, M. A. Z. Plasmid DNA restriction profile and copper sensitivity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *Citri* from Rio Grande do Sul, Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 23, p. 116-120, 1998.

MARCASSA, L. G.; GASPAROTO, M. C. G.; BELASQUE JUNIOR, J.; LINS, E. C.; DIAS NUNES, F.; BAGNATO, V. S. Fluorescence spectroscopy applied to orange trees. **Laser Physics**, Moscow, v. 16, n.5, p. 884-888, 2006.

MASSARI, C. A.; BELASQUE JÚNIOR, J. A campanha de erradicação do cancro cítrico no Estado de São Paulo – situação atual e contaminação em viveiros. **Laranja**, Cordeirópolis, v.27, p.41-55, 2006.

MAVRODIEVA, V.; LEVY, L.; GABRIEL, D. W. Improved sampling methods for real-time polymerase chain reaction diagnosis of citrus canker from field samples. **Phytopathology**, St. Paul, v. 94, n. 1, p. 61-68, 2004.

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**, Londrina, v. 11, n.1, p. 29-34, 1999.

MIGNUCCI, J. S.; BOYER, J. S. Inhibition of photosynthesis and transpiration in soybean infected by *Microsphaera diffusa*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 69, n.3, p. 227-230, 1979.

NASCIMENTO, J.F.; RODRIGUES NETO, J.; ALVES, J.M.A.; RÊGO, M.M. & ARAÚJO, A.E.S. Ocorrência de cancro cítrico no Estado de Roraima. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 29, n. 1, p. 81-82, 2003.

PORTO, O. M.; DORNELLES, C.M.M.; PORTO, M.D.M. Ocorrência de cancro cítrico no Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 6, 1981, Recife. **Anais...** Recife, 1981. p.1386-1388.

PRATES, H.S., NAKANO, O., GRAVENA, S. **A minadora das folhas de citros *Phyllocnistis citrella*, Stainton, 1856**. Campinas: CATI, 1996. 3p. (Comunicado Técnico, 129).

RIBEIRO, R. V. Influência da temperatura na fotossíntese de laranjeira “Pêra” com clorose variegada dos citros. 2002. 73p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

RIBEIRO, R. V.; MACHADO, E. C.; OLIVEIRA, R. F. Early photosynthetic responses of sweet orange plants infected with *Xylella fastidiosa*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 62, p. 167-173, 2003.

RIBEIRO, R. V.; MACHADO, E. C.; OLIVEIRA, R. F. Growth- and leaf- temperature effects on photosynthesis of sweet orange seedlings infected with *Xylella fastidiosa*. **Plant Pathology**, London, v. 53, p.334-340, 2004.

RODRIGUES NETO, J.; BELASQUE JUNIOR, J.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. Larva-minadora aumenta a incidência do cancro cítrico. **Visão Agrícola**, Piracicaba, v.2, p. 14-19, jul./dez. 2004.

ROSSETI, V. V. **Manual ilustrado de doenças dos citros**. Piracicaba: Fealq / Fundecitrus, 2001. 207p.

SANTOS, C.F. O cancro cítrico: ocorrência no Brasil e seu controle. 2 ed. IN: RODRIGUES, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JÚNIOR, J.; AMARO, A.A. **Citricultura Brasileira**. Campinas: Fundação Cargill, 1991, v. 2, p.787-823.

SCHAEDLE, M. Tree photosynthesis. **Annual Review of Plant Physiology**, Stanford, v. 26, p. 101-105, 1975.

SCHOULTIES, C.L.; CIVEROLO, E.L.; MILLER, J.W.; STALL, R.E.; KRASS, C.J.; POE, S.R.; DUCHARME, E.P. Citrus canker in Florida. **Plant Disease**, St. Paul, v. 71, p. 388-395, 1987.

SCHUBERT, T. S.; SUN, X. **Bacterial citrus canker**. Gainesville: PLANT PATHOLOGY, 2003. 6p. (Circular, 377).

SHIRKE, P. A. Leaf photosynthesis, dark respiration and fluorescence as influenced by leaf age in an evergreen tree, *Prosopis juliflora*. **Photosynthetica**, Praha, v. 39, n. 2, p. 305-311, 2001.

SHTIENBERG, D. Effects of foliar diseases on gas exchange processes: a comparative study. **Phytopathology**, St. Paul, v. 82, n. 7, p. 760-765, 1992.

STALL, R.E.; SEYMOUR, C.P. Canker, a threat to citrus in the gulf-coast states. **Plant Disease**, St. Paul, v. 67, p. 581-585. 1983.

VALE, F. X. R.; FERNANDES FILHO, E. I.; LIBERATO, J. R. Quant. A software plant disease severity assessment. In: International Congress of Plant Pathology, 8, 2003, Christchurch. **Proceedings...** Christchurch: International Society of Plant Pathology, 2003. p. 105.

VAUTERIN, L., HOSTE, B., KERSTERS, K., SWINGS, J. Reclassification of *Xanthomonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 45, p.472-489, 1995.

VERNIÈRE, C. J.; GOTTWALD, T. R.; PRUVOST, O. Disease development and symptom expression of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in various citrus plant tissues. **Phytopathology**, St. Paul, v.93, n.7, p. 832-843, 2003.

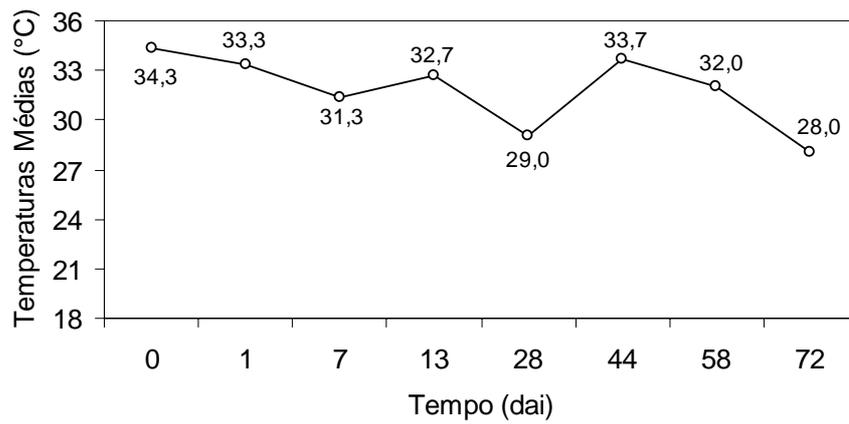
VU, J. C. V.; YELENOSKY, G. Water deficit and associated changes in some photosynthetic parameters in leaves of "Valencia" orange (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck). **Plant Physiology**, Rockville, v. 88, p. 375-378, 1988.

YARWOOD, C. E. Response to parasites. **Annual Review of Plant Physiology**, Stanford, v. 18, p. 419-438, 1967.

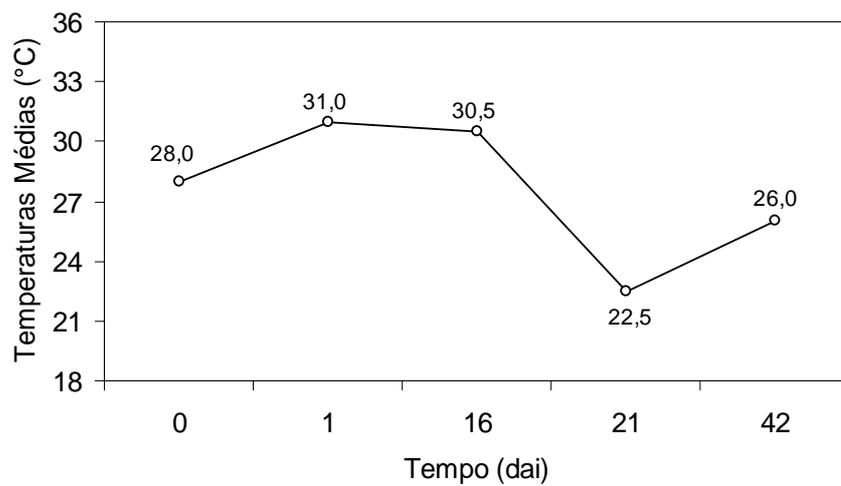
VU, J. C. V.; YELENOSKY, G.; BAUSHER, M. G. CO₂ exchange rate, stomatal conductance, and transpiration in attached leaves of "Valencia" orange. **HortScience**, St. Joseph, v. 21, n. 1, p. 143-144, 1986.

ANEXOS

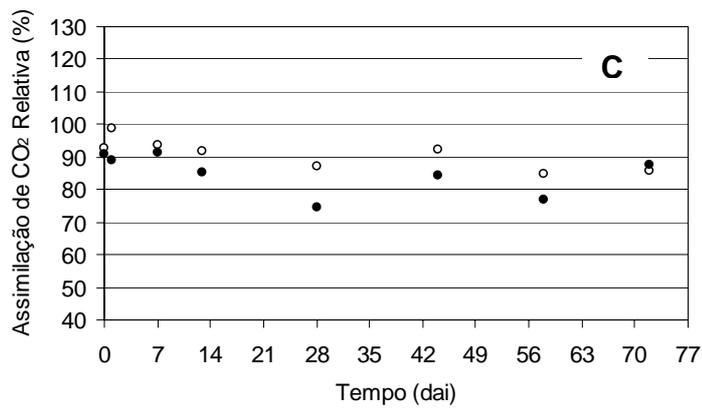
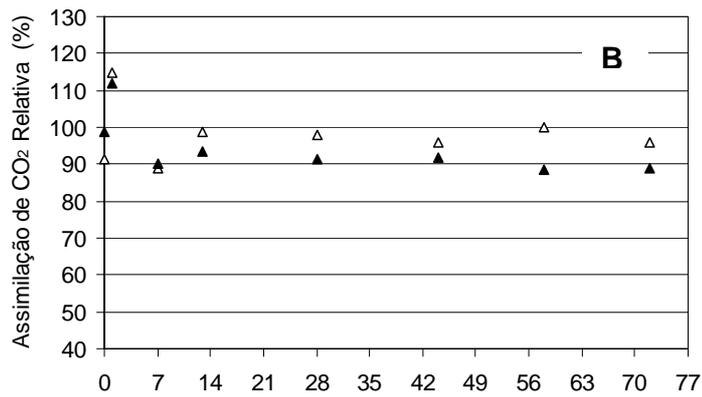
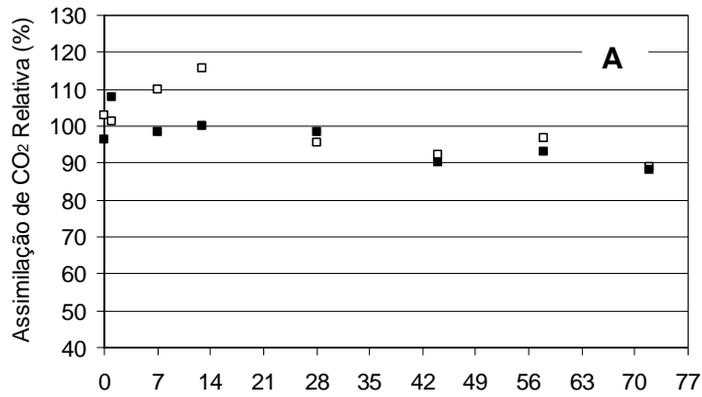
ANEXO A- Temperaturas médias do ar (°C) alcançadas dentro da casa de vegetação, nos horários de avaliação do experimento 1



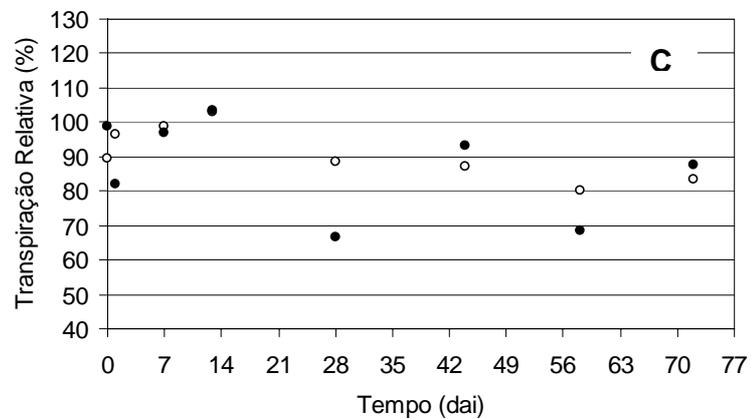
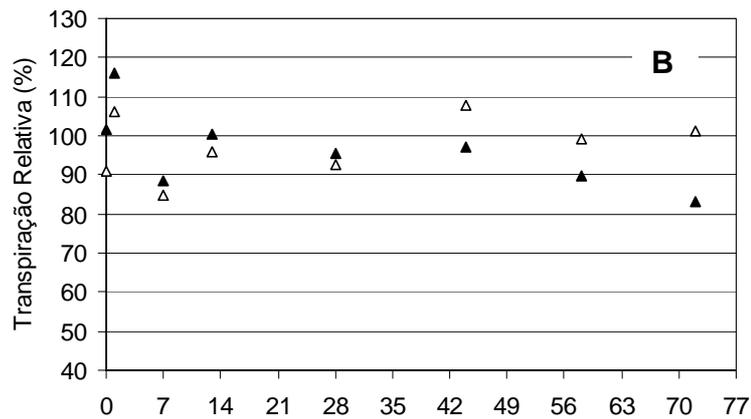
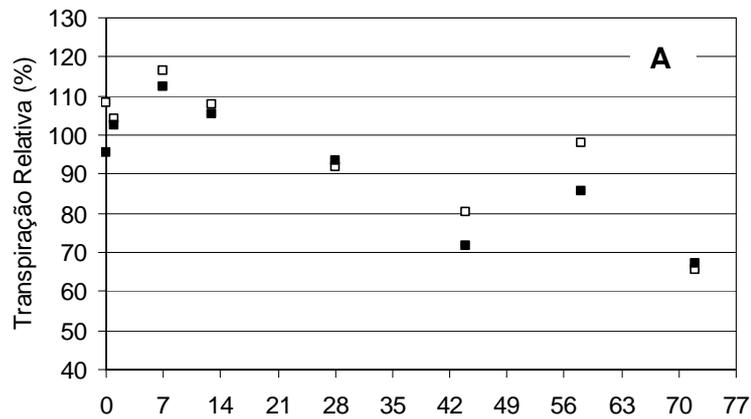
ANEXO B- Temperaturas médias do ar (°C) alcançadas dentro da casa de vegetação, nos horários de avaliação do experimento 2



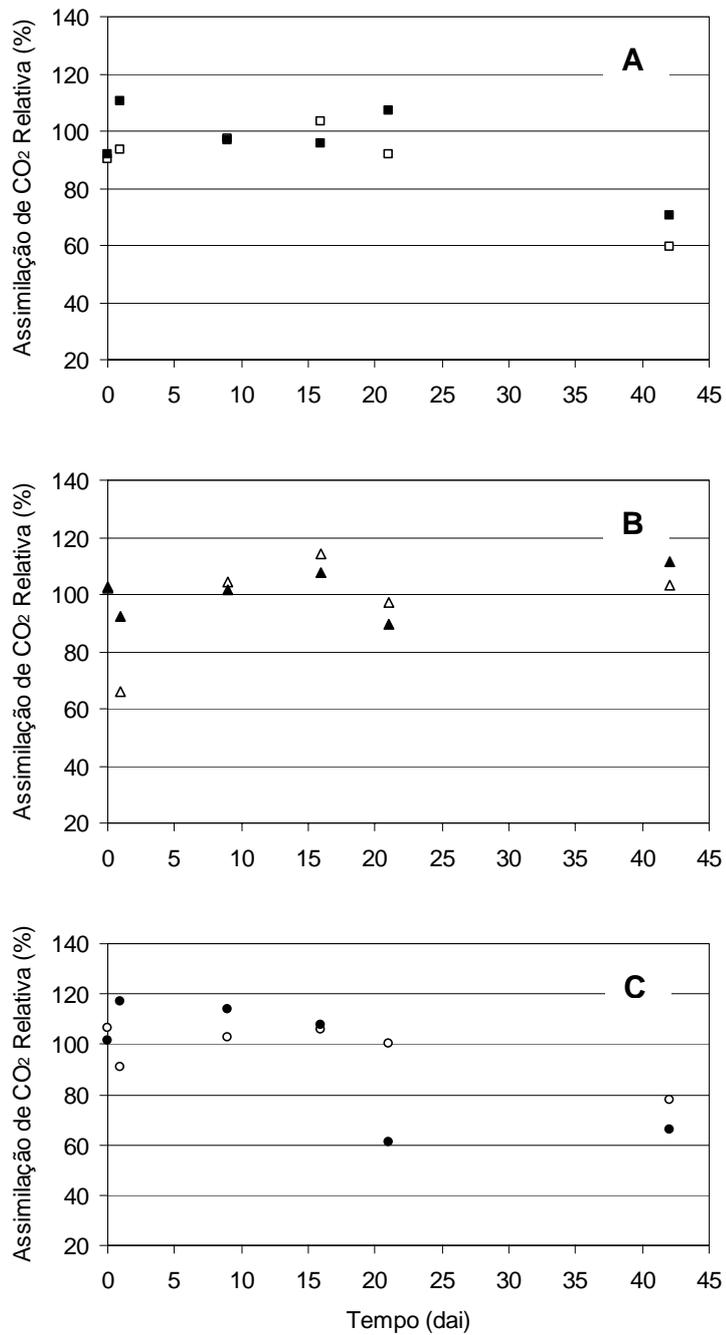
ANEXO C- Valores médios (símbolos) da taxa de assimilação de CO₂ relativa (% da testemunha) para as variedades Ponkan (A), Cravo (B) e Hamlin (C) nas severidades média (símbolo claro) e alta (símbolo escuro), durante o período de avaliação do experimento 1



ANEXO D- Valores médios (símbolos) de transpiração relativa (% da testemunha) para as variedades Ponkan (A), Cravo (B) e Hamlin (C), nas severidades média (símbolo claro) e alta (símbolo escuro), durante o período de avaliação do experimento 1

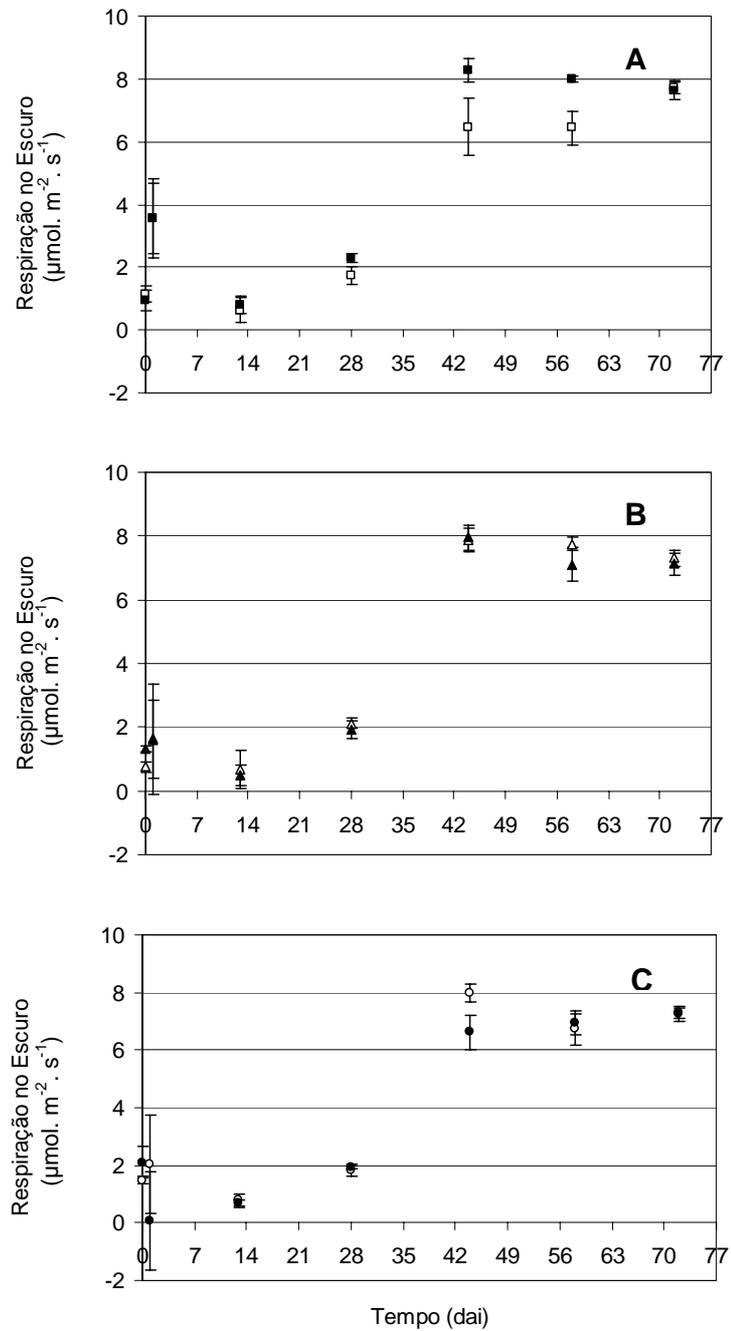


ANEXO E- Valores médios (símbolos) da taxa de assimilação de CO₂ relativa (% da testemunha) para as variedades Ponkan (A), Cravo (B) e Hamlin (C) nas severidades média (símbolo claro) e alta (símbolo escuro), durante o período de avaliação do experimento 2.



ANEXO F- Valores médios (símbolos) de transpiração relativa (% da testemunha) para as variedades Ponkan (A), Cravo (B) e Hamlin (C), nas severidades média (símbolo claro) e alta (símbolo escuro), durante o período de avaliação do experimento 2

ANEXO G- Taxa de respiração no escuro (média de cinco repetições) para as variedades Ponkan (A), Cravo (B) e Hamlin (C), no período de avaliação do experimento 1. Símbolos escuros representam severidade alta da doença e símbolos claros, severidade média. Traços representam o erro padrão de cada média



Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)