

# FITOPATOLOGIA

## *XYLELLA FASTIDIOSA* EM FRUTOS E SEMENTES DE LARANJA- -DOCE AFETADOS PELA CLOROSE VARIEGADA DOS CITROS

WOLNEY DALLA PRIA JÚNIOR<sup>1</sup>, PEDRO MAGALHÃES LACAVA<sup>2</sup>, WENBIN LI<sup>3</sup>,  
VICENTE S. MIRANDA<sup>1</sup>, PAULO INÁCIO DA COSTA<sup>4</sup>, PAULO ROBERTO SILVA FARIAS<sup>5</sup>,  
JOHN S. HARTUNG<sup>3</sup>, ERIDAN ORLANDO PEREIRA<sup>5</sup> e FABRÍCIO J. B. FRANCISCHINI<sup>5</sup>

### RESUMO

*Xylella fastidiosa* possui uma larga faixa de hospedeiros, inclusive citros, causando doenças que prejudicam principalmente a qualidade do fruto. O presente trabalho foi realizado no ano de 2000 no Departamento Científico do Fundecitrus e teve como objetivo avaliar a influência da CVC no desenvolvimento e germinação de sementes, e a ocorrência de *X. fastidiosa* em tecidos de frutos originários de laranjeira-doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] variedades 'Pêra', 'Valência' e 'Natal'. Dos frutos doentes e sadios retiraram-se as partes: pericarpo, mesocarpo, endocarpo, columela e septa para análise por PCR (Reação de Polimerase

---

<sup>1</sup> Departamento de Bioquímica - Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rua Professor Francisco Degni s/n.º, Caixa Postal, 355. Fone: (016) 201-6600. Telefax: (016) 222.7932. 14801-970 Araraquara (SP). Autor correspondente wpria@bol.com.br ou Rua José Doering, 161, Centro. Fone: (018) 3366-1157. 19780-000 Quatá (SP).

<sup>2</sup> Programa de Pós Graduação em Ciências Ambientais - UNITAU, estrada municipal Dr. Luiz Cembranelli, nº 5000. Fone: (012) 225-4212. 12081-010 Taubaté (SP).

<sup>3</sup> United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Fruit Laboratory, Beltsville, MD, USA.

<sup>4</sup> Laboratório de Imunologia Clínica, Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP, Araraquara (SP).

<sup>5</sup> Departamento Científico - FUNDECITRUS, Av. Dr. Adhemar Pereira de Barros, nº 201 - Vila Melhado - Caixa Postal, 391. Fone: (016) 201-7000. Fax: (016) 201-7032. 14807-040 Araraquara (SP).

em Cadeia). As sementes foram pesadas e semeadas em casa de vegetação e o percentual de germinação das variedades foi observado e determinado. Pelos resultados obtidos há evidências que a CVC prejudica o desenvolvimento das sementes, embora não tenham sido detectadas diferenças estatísticas significativas no número de sementes germinadas e na porcentagem final de emergência. Quanto ao fruto, detectou-se a presença de *X. fastidiosa* na maioria das partes analisadas das três variedades.

**Termos de indexação:** citros, doença, bactéria, *Citrus sinensis*.

## SUMMARY

### EFFECT OF *XYLELLA FASTIDIOSA* IN SWEET ORANGE FRUITS AND SEEDS AFFECTED FOR CITRUS VARIEGATED CHLOROSIS

*Xylella fastidiosa* has a wide host range, including citrus, and causes diseases that affect fruit quality. This study was carried out in 2000 at Fundecitrus Scientific Department and it aimed to evaluate the influence of Citrus Variegated Chlorosis (CVC) in the development and germination of seeds, and also the occurrence of *X. fastidiosa* in tissues of fruit originated from sweet orange cultivars 'Pêra', 'Valencia', and 'Natal'. The following parts were taken from diseased and healthy fruit: pericarp, mesocarp, endocarp, axial bundle and septa, which were analyzed by PCR (Polymerase Chain Reaction). Seeds were weighed and sowed under greenhouse conditions, by observing and collecting the percentage of germination. There are evidences that CVC damages the development of seeds, although significant statistical differences were not detected in the number of germinated seeds and in the final percentage of emergency. Concerning the fruit, *X. fastidiosa* was detected in most parts of the three varieties.

**Index terms:** Citrus, disease, bacterium, *C. sinensis*.

## 1. INTRODUÇÃO

Desde que foi constatada, no final da década dos oitentas, a clorose variegada dos citros (CVC) vem-se constituindo na mais importante doença citrícola no Brasil. Levantamentos anuais feitos pelo Fundecitrus nos pomares paulistas indicaram 23,6% de plantas contaminadas pela CVC na safra de 96/97, passando para 34% na de 97/98. Esses percentuais, associados à estimativa de existirem em torno de 172 milhões de plantas produtivas nos pomares de São Paulo e parte do Triângulo Mineiro, mostram a magnitude potencial dos prejuízos econômicos que essa doença poderá causar (BORGES et al., 2000).

A CVC prejudica, principalmente, a qualidade dos frutos, tornando-os de tamanho reduzido, imprestáveis para a comercialização *in natura* e também, em parte, para a produção de suco cítrico concentrado (ROSSETTI & DE NEGRI, 1990).

A síndrome nos frutos surge sempre após o aparecimento dos sintomas foliares e apenas nos ramos já afetados, havendo tendência à frutificação em “pencas”. Caracteristicamente, há uma interrupção no crescimento do fruto, que se torna duro, pequeno em relação àqueles normais, e adquire uma coloração típica de fruto maduro. Em adição, a casca se torna mais fina, facilitando as queimaduras pelo sol (PALAZZO & CARVALHO, 1992).

Internamente, o fruto tem as características organolépticas bastante afetadas. LARANJEIRA & PALAZZO (1994) mostraram que as médias de peso e diâmetro de fruto e sólidos solúveis totais de plantas sadias foram superiores às das plantas doentes. Obviamente, essas características são bastantes prejudiciais, tanto para a produção de suco de laranja quanto para a comercialização dos frutos *in natura*. A produção é diminuída em termos de massa e número de frutos. Segundo PALAZZO & CARVALHO (1993), plantas aparentemente sadias produziram entre 30 e 35% a mais que as doentes.

LARANJEIRA & PALAZZO (1999) avaliaram características físicas e químicas de frutos de plantas de laranja ‘Natal’ sadias ou afetadas pela clorose variegada dos citros. Os autores relataram uma relação linear e crescente entre tamanho de fruto e total de sólidos solúveis (fruto

sadio), mas decrescente entre tamanho de frutos e concentração de sólidos (fruto doente). Esse paradoxo aparente pode ser explicado pela quantidade de água armazenada pelos frutos e pela produção de açúcares, ou seja, frutos sadios armazenariam mais água, o que diluiria os sólidos produzidos a mais, dando um Brix menor. Esse raciocínio levou os autores a admitir uma interferência na fotossíntese (evidenciada pelos sintomas foliares) e uma alteração na absorção ou translocação de água.

GOODWIN et al. (1988) e MACHADO et al. (1994) observaram, em videira e citros infectados com *X. fastidiosa*, que, além da queda na taxa de fotossíntese, a presença de bactéria também está relacionada com outras alterações fisiológicas, tais como a redução na transpiração, altas concentrações de ácido abscísico, frutose, glucose,  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  e baixas concentrações de  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{K}^+$ . Além disso, a presença de clorose, altos níveis de prolina e ácido abscísico e aumento na resistência estomática estão associados à senescência foliar (BEEVERS, 1976; GOODWIN et al., 1988; MACHADO et al., 1994).

Em relação aos principais sintomas da CVC, inclusive o endurecimento e o tamanho reduzido dos frutos, tem sido sugerido que sua causa principal seria uma disfunção no sistema condutor de água, que estaria relacionado com as oclusões dos vasos do xilema por “gomos”, tiloses ou células bacterianas (ESAU, 1948; MIRCETICH et al., 1976; MOLLENHAUER & HOPKINS, 1976). Há divergências, porém, na literatura se tais oclusões seriam suficientes para causar um estresse hídrico (MIRCETICH et al., 1976; FRENCH & STASSI, 1978; HOPKINS, 1981). Outras duas hipóteses para a origem dos sintomas da doença são a da fitotoxina (MIRCETICH et al., 1976; LEE et al., 1982) e a do desbalanço de reguladores de crescimento (FRENCH & STASSI, 1978).

Não está claro que a causa principal do endurecimento e tamanho reduzido do fruto esteja relacionada somente com a oclusão dos vasos do xilema pela *X. fastidiosa*. A bactéria, uma vez presente nos tecidos do fruto, poderia estar utilizando elementos minerais e aminoácidos para o seu desenvolvimento, criando uma competição por nutrientes e, conseqüentemente, influenciando algumas propriedades do fruto e sementes dos citros. Embora, na citricultura brasileira, laranjas-doces não

sejam amplamente utilizadas como porta-enxertos, este trabalho tem como objetivos analisar a influência da CVC no desenvolvimento e germinação de sementes e determinar a ocorrência de *X. fastidiosa* em diferentes tecidos de frutos originários de laranjeira-doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck].

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### Material de plantas cítricas

**Varietades:** Testaram-se as três principais variedades comerciais de laranjeira doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] plantadas no Brasil: Pêra, Natal e Valência.

**Obtenção de frutos:** Coletaram-se os frutos doentes em árvores cítricas de pomares localizados na região de São José do Rio Preto, município de Macaúbal (SP), onde a CVC foi constatada em 1988 (DE NEGRI, 1990) e, os frutos sadios, em estufas no Fundecitrus, município de Araraquara (SP).

**Seleção de frutos:** Utilizaram-se dez frutos maduros doentes ( $\pm 50$  mm de diâmetro) oriundos de árvores com sintomas de CVC, com frutos miúdos generalizados, “estádio final”. Os dez frutos sadios foram coletados de árvores sadias sem sintomas da doença. Coletaram-se, também, folhas e ramos que serviram para confirmação da presença e da ausência da *X. fastidiosa*. O epicarpo, mesocarpo, endocarpo, columela e septa foram retirados e analisados por reação da polimerase em cadeia (PCR). A presença da *X. fastidiosa* foi analisada em seis frutos por variedade, dos quais cinco doentes e um sadio, com três repetições para cada parte do fruto analisada.

**Seleção de sementes:** Lavaram-se as sementes retiradas dos frutos e secaram-nas à sombra por 24 horas. O peso das sementes foi avaliado em 500 sementes por variedade, tomadas ao acaso, de cada tratamento, em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições.

**Semeadura:** As sementes foram separadas aleatoriamente e plantadas em estufa. Semearam-se 400 sementes de cada variedade (Pêra,

Valência e Natal), das quais 200 sadias e 200 doentes, em vasos de 14 L contendo substrato (Plantmax-citros), sendo 50 sementes por vaso, a uma profundidade de 5 cm, mantidos sob regime de irrigação diária em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. O percentual de germinação foi determinado diariamente.

**DNA total dos frutos:** As partes do fruto foram colocadas em 1 mL de tampão fosfato salino (PBS) e homogeneizadas em Polytron (Pro Scientific, Monroe, CT). O extrato foi filtrado em quatro camadas de gaze e centrifugado a 420 g durante um minuto. O líquido sobrenadante foi coletado e centrifugado a 17.900 g por 20 min. O DNA total foi extraído, conforme COSTA et al. (2000), com tampão CTAB (2% brometo de hexadecilmetil amônio, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). O precipitado foi ressuspensão em 250 µL de tampão de lise, contendo: TE (0,5 M Tris-HCl, pH = 8,0; 0,5 M EDTA, pH = 8,0) e N-lauril sarcosina (10%), complementado com proteinase K (10 mg/mL) e ribonuclease A (10 mg/mL). Posteriormente, o extrato foi incubado por uma hora a 37°C, adicionando-se-lhe 100 µL de NaCl 5 M, homogeneizado suavemente e incubado a 65°C por 10min. Em seguida, adicionaram-se-lhe 50 µL de uma solução de 10% CTAB/NaCl (0,27 M brometo de hexadecilmetil amônio e 0,7 M NaCl), sendo, finalmente, incubado a 65°C por 20min. Na etapa seguinte, realizou-se uma purificação com clorofórmio: álcool isoamílico (24:1, v/v); a mistura foi invertida suavemente e centrifugada a 17.900 g por 5min. A porção aquosa foi transferida, e seu DNA, precipitado com 0,6 volume de isopropanol por uma hora a -20°C e, em seguida, centrifugado a 17.900 g por 15min. Lavou-se o precipitado com etanol 70% gelado, centrifugando-o a 10.600 g por 5min, sendo o sobrenadante descartado. O sobrenadante excedente foi retirado por inversão sobre papel esterilizado e seco a vácuo por 10min, ressuspensando-se o DNA obtido em 20 µL de tampão TE e estocando-o a -20°C.

**Amplificação do DNA:** O DNA foi amplificado (POOLER & HARTUNG, 1995) a partir de uma alíquota de 5 µL de lisado bacteriano. Cada 20 µL da mistura de reação PCR continha: tampão de reação PCR / (20 mM Tris-HCl, pH = 8,4, 50 mM; KCl); 0,5 µM de cada “inicia-

dor” específico para *X. fastidiosa* 272-1-int (5'-CTGCACTTACCCAA TGCATCG-3') e 272-2-int (5'- AGCGGGCCAAAA CGATG CGTC - 3'); 0,2 mM de cada nucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP); 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> e 1 U da enzima Taq DNA Polymerase recombinante (Life Technologies, Grand Island, NY). Adicionou-se uma gota de óleo mineral esterilizado a cada reação para conter a perda por evaporação e realizou-se a amplificação do DNA em termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc., Watertown, MA). A reação de amplificação, inicialmente, por desnaturação a 94°C por 4min e, subseqüentemente, 34 ciclos de desnaturação a 94°C por 1min, seguido de anelamento dos “iniciadores” a 64°C por 1min e extensão a 72°C por 1min30s. A reação de PCR foi finalizada com uma incubação a 72°C por 10min. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese horizontal em gel de agarose 1,0% em tampão TAE (Tris base, ácido acético, EDTA, pH = 8,0). O processo de eletroforese foi mantido em voltagem constante de 100 V por 1h20min. Um padrão de peso molecular com diferenças de 100 bp (Gibco-BRL) foi incluído em cada gel, que foi corado com brometo de etídeo 0,5 µg/mL e fotodocumentado, utilizando filme Polaroid 667 sobre transluminação UV 300 nm.

**Análises estatísticas:** A análise estatística dos dados foi efetuada segundo delineamento experimental inteiramente casualizado. Para a da variância, aplicou-se o teste F e, para comparação das médias, o teste de Tukey ao nível de 5%. Utilizou-se um esquema fatorial 3 x 2 para análise dos dados referente a peso das sementes. Os dados em percentagem foram transformados previamente à análise estatística pela expressão arco seno  $\sqrt{x+1}$ .

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação ao peso das sementes, observa-se - Tabela 1 - que os tratamentos apresentaram diferenças significativas entre peso de sementes e variedades. O experimento revelou um coeficiente de variação de 3,42%, indicando ótima precisão experimental. O peso das sementes doentes nas três variedades foi afetado pela doença, que lhes retardou o desen-

volvimento. Resultados semelhantes foram obtidos por DALLA PRIA JR. et al. (2000), ROBERTO et al. (2000) e LARANJEIRA et al. (2000). Em relação à diferença estatística encontrada entre a Pêra e as demais variedades, foi, provavelmente, influenciada pelo estado fisiológico das plantas matrizes doadoras das sementes analisadas, características genéticas das variedades ou suscetibilidade de cada variedade à *X. fastidiosa*.

Tabela 1. Peso médio de sementes de frutos das variedades Pêra, Natal e Valência, originárias de plantas afetadas ou não pela clorose variegada dos citros

Tratamentos	Peso médio de cem sementes		
	Pêra	Natal	Valência
	g		
Sadia .....	16,6 aB	18,5 aA	19,2 aA
Doente .....	12,8 bB	16,1 bA	15,9 bA

Letras minúsculas diferentes indicam que as médias na mesma coluna (em relação à doença) diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $p < 0,01$ ), enquanto as letras maiúsculas indicam na mesma linha (entre variedades) diferenças estatísticas ( $p > 0,05$ ).

De acordo com LARANJEIRA & PALAZZO (1994), o fruto, internamente, tem suas características afetadas. Essas alterações nas suas características são muito mais resultantes do déficit hídrico que da atuação direta no metabolismo da planta. Em conseqüência, tem-se o tamanho dos frutos reduzido e, conseqüentemente, afetado o desenvolvimento das sementes.

Esses resultados referentes a peso de sementes estão de acordo com PALAZZO & CARVALHO (1992). Eles mostraram que a CVC não afetou a formação de frutos e sementes, mas retardou seu desenvolvimento meses após o pegamento, ou seja, a ocorrência de frutos e sementes de menor tamanho e peso, provavelmente, em razão da menor disponibilidade de água e assimilados.



Os produtos formados nas folhas, pelo processo fotossintético, e os armazenados em outras partes da planta, são translocados para as sementes em formação, sendo aí transformados e utilizados tanto como material de construção como futuro material de reserva. Para que esse processo de transformação, deposição e aproveitamento de material fotossintetizado se realize, é necessário que o meio em que a deposição está ocorrendo seja bastante aquoso. Em outras palavras, para que esse material se transforme, deposite e seja utilizado na semente, é preciso que ela esteja bastante úmida; caso contrário, isso não ocorrerá. Durante toda a fase em que as sementes estão acumulando matéria seca, o teor de água é mantido em altos níveis, havendo, inclusive, no início da maturação, um leve acréscimo dessa característica. Por outro lado, à medida que a semente mantém um alto teor de água e seu conteúdo de matéria seca cresce ininterruptamente, aumenta também sua intensidade respiratória. Evidentemente, nessa fase da maturação, a quantidade de matéria seca depositada no interior da semente é muito maior do que aquela perdida por respiração. Em determinado momento, porém, a semente atinge aquele conteúdo de matéria seca para o qual está geneticamente programada, se o meio ambiente o permitiu (CARVALHO & NAKAGAWA, 2000). Assim, se a *X. fastidiosa* bloqueia parcialmente a translocação de água e assimilados para o fruto, afetando-lhe o desenvolvimento, prejudica, conseqüentemente, a formação da semente, diminuindo a quantidade de matéria seca depositada no seu interior.

Reforçando essa hipótese de que o fator primordial das alterações internas dos frutos seja o bloqueio na translocação de água causado pela bactéria, GAZZOLA et al. (1991) observaram resultados semelhantes em comparações de frutos sadios, porém de tamanhos diferentes, ou seja, o fundamental é a redução do peso e do tamanho do fruto, causada pelo baixo fluxo de água. De fato, ERICKSON & RICHARDS (1955) mostraram que plantas sadias submetidas a estresse hídrico produzem frutos de menor tamanho.

Os percentuais de germinação das variedades Natal, Pêra e Valência encontram-se na Figura 1. Os dados referem-se às quantidades de sementes sadias e doentes germinadas.

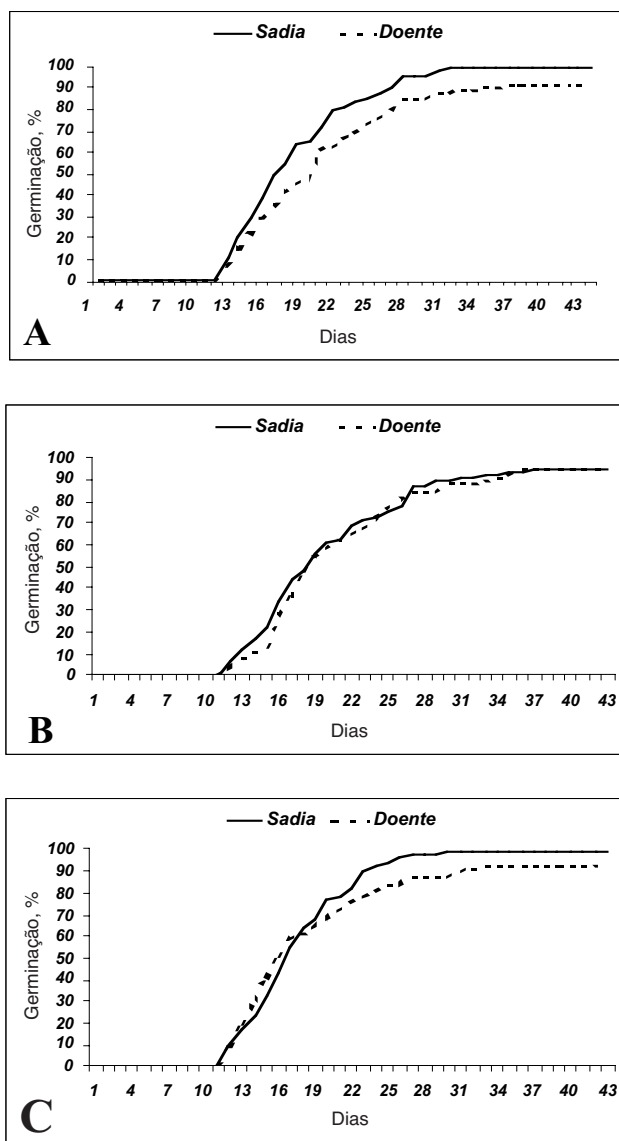


Figura 1. Percentual de germinação de sementes oriundas de plantas sadias e doentes pela clorose variegada dos citros das variedades Pêra (A), Natal (B) e Valência (C).

Observa-se, na Figura 1 e na Tabela 2, que, para todas as variedades, o número de sementes germinadas e o percentual final de plantas emergidas entre os grupos das sementes doentes e sadias não diferem estatisticamente entre si.

Tabela 2. Porcentagem final de plantas emergidas de sementes das variedades Pêra, Natal e Valência, originárias de plantas afetadas ou não pela CVC

Tratamentos	Final de plantas emergidas (200 sementes/tratamento)		
	Pêra	Natal	Valência
Sadia .....	100 A	95 A	99 A
Doente .....	91 A	95 A	93 A

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si ( $p > 0,05$ ). As percentagens foram transformadas em  $\sqrt{x + 1}$ , para realizar a análise estatística.

Esses resultados contrariam os obtidos por ROBERTO et al. (2000), que relacionaram o menor potencial de germinação ao menor peso das sementes de frutos afetados, resultando em menor disponibilidade de reservas nos cotilédones para o desenvolvimento do embrião ou problemas durante sua formação, em consequência da deficiência no fluxo de água pelos vasos do xilema.

LARANJEIRA et al. (2000) estudaram a germinação e o crescimento de plântulas provenientes de sementes de frutos de laranja Natal afetados pela CVC. Os autores observaram que as primeiras plantas começaram a emergir duas semanas após o plantio, mas não houve, também, diferenças significativas nos números de sementes germinadas e na porcentagem final de emergência, permitindo concluir que a CVC, mesmo interferindo no desenvolvimento da semente, não afetou sua germinação.

Na Tabela 3, observam-se as partes de frutos doentes analisadas por PCR: a bactéria esteve presente em todas elas. Resultados semelhantes foram obtidos por SCHERER et al. (2000), demonstrando a ocorrência do transporte, via xilema, da bactéria do ramo para o fruto.

Tabela 3. Detecção de *Xylella fastidiosa* por PCR em partes de laranjas das variedades Pêra, Natal e Valência, originárias de plantas afetadas ou não pela clorose variegada dos citros

	Partes do fruto analisadas				
	Epicarpo	Mesocarpo	Endocarpo	Septa	Eixo central
<b>Pêra</b>					
1D ....	+	+	+	+	+
	+	+	+	-	+
	+	+	+	+	+
2D ....	+	+	+	-	+
	-	+	+	+	+
	+	+	+	+	+
3D ....	+	+	+	+	+
	-	+	+	+	+
	+	+	+	+	+
4D ....	+	-	+	+	+
	+	+	+	+	+
	-	+	+	-	+
5S .....	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-
<b>Natal</b>					
1D ....	-	+	-	+	-
	-	-	+	-	+
	-	-	-	-	+
2D ....	-	-	+	+	+
	-	+	-	-	+
	+	+	-	+	+

Continua

Tabela 3. Conclusão

	Partes do fruto analisadas				
	Epicarpo	Mesocarpo	Endocarpo	Septa	Eixo central
3D ....	+	-	+	-	+
	-	+	-	+	+
	-	-	-	-	+
4D ....	-	-	-	-	+
	-	-	+	-	+
	+	+	-	+	+
5S .....	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-
<b>Valência</b>					
1D ....	-	+	+	-	+
	-	-	-	-	+
	-	-	-	+	+
2D ....	-	+	-	-	+
	-	-	-	-	+
	-	-	+	-	+
3D ....	-	-	-	+	+
	-	+	+	-	+
	-	-	+	-	+
4D ....	-	+	-	-	+
	-	+	+	+	+
	-	-	-	+	+
5S .....	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-

D: Doente, S: Sadio.

Na variedade Pêra, foi detectada *X. fastidiosa* no dobro das reações de PCR do que na Natal e na Valência. Preferencialmente, foi detectada no eixo central, depois muito semelhantemente no mesocarpo, no endocarpo e na septa e, em menor grau, no epicarpo (Figura 2). Esta seqüência pode estar relacionada à movimentação da bactéria no fruto.

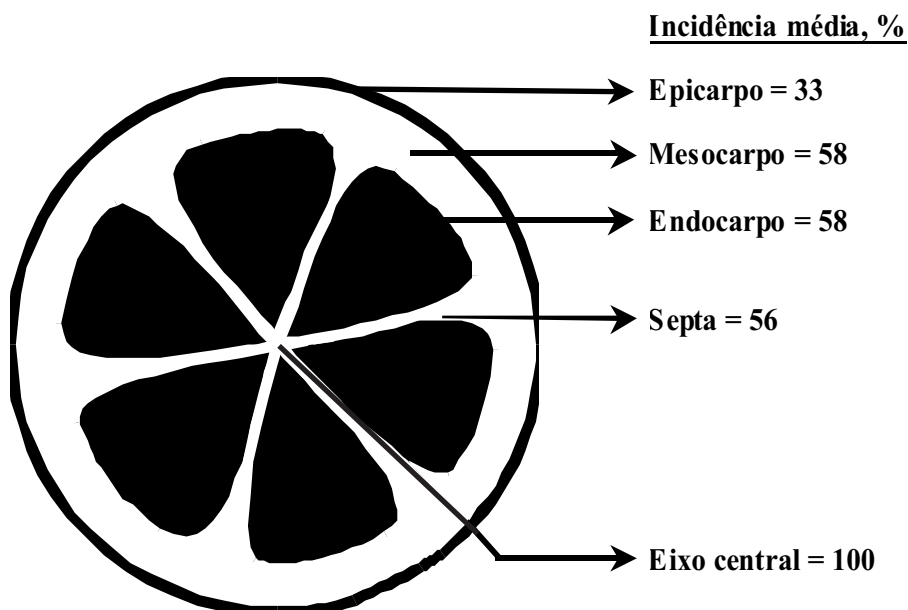


Figura 2. Diagrama de distribuição média de ocorrência da bactéria *Xylella fastidiosa* em laranjas, detectada por reações de PCR.

De acordo com ESAU (1974), o hesperídeo é o fruto das plantas pertencentes ao gênero *Citrus*; esse fruto, com casca coriácea, está em uma categoria próxima à baga, sendo constituído do pericarpo e da semente. Seu pericarpo é diferenciado em três partes principais. O mais

externo ou epicarpo, de tecido colenquimatoso, denominado de flavedo, onde se encontram glândulas de óleo (esta é a parte colorida da casca); um mesocarpo esponjoso, o albedo (parte branca da casca) e um endocarpo que origina vesículas de suco. Estas são comparáveis a pêlos multicelulares, originados subepidermicamente, formando com a epiderme uma camada única. Nessas regiões, o xilema e o floema associados ocorrem comumente em cordões, os feixes vasculares. Tais conjuntos de vasos xilema-floema estão distribuídos pelo fruto, permitindo a contaminação dessas regiões por *X. fastidiosa*. REUTHER et al. (1989), através de microfotografia, observaram, também, a ocorrência e a distribuição de feixes vasculares em fruto maduro da laranja 'Valência'.

QUEIROZ-VOLTAN & PARADELA FILHO (1999), utilizando frutos com sintomas de CVC, observaram obstrução dos vasos por "goma" e grande quantidade de cristais de hesperidina no interior das células do pericarpo, assim como nos feixes vasculares, enquanto nos frutos sem sintomas visuais a obstrução dos vasos por goma era ausente ou muito discreta, e a quantidade de hesperidina, muito menor. Comparando-se os frutos com sintomas visuais entre os cultivares Pêra e Valência, não se detectaram diferenças.

Sabe-se, ainda, que, em laranjeiras sadias, a hesperidina é um constituinte de frutos imaturos, a qual produz glicose sob hidrólise (STRONG, 1940). É possível que a alta concentração de hesperidina nos frutos com CVC seja causada pela menor disponibilidade de água, em vista da obstrução dos vasos do xilema; em consequência do acúmulo desses cristais, o fruto torna-se endurecido (QUEIROZ-VOLTAN & PARADELA FILHO, 1999).

Plantas com sintomas de CVC, além da alta concentração de hesperidina em fruto, apresentam também deficiência em zinco e potássio (BERETTA et al., 1991). Entre as funções do potássio na planta estão a translocação de açúcares e a abertura estomática (RAINS, 1976). O zinco é um nutriente essencial para a síntese do triptofano (VARNER & HO, 1976). Plantas deficientes em zinco apresentaram entrenós, pecíolos e pedicelos curtos e área foliar e frutos menores, que são as mesmas

características morfológicas externas reveladas pelas plantas infectadas por *X. fastidiosa*. Em síntese, pode-se sugerir que a presença da bactéria na planta, de algum modo, reduziu o teor de zinco, ocasionando menor síntese de ácido indolacético (IAA) (QUEIROZ-VOLTAN & PARADELA FILHO, 1999). Concordam com essa hipótese os resultados obtidos por HOPKINS (1985) ao verificar que aplicações foliares de IAA e cinetina inibiram o desenvolvimento dos sintomas e a colonização de *X. fastidiosa* em cultivares de *Vitis vinifera* moderadamente resistentes, mas não impediram o aparecimento dos sintomas nos altamente suscetíveis.

Segundo CHANG & DONALDSON (1993), *X. fastidiosa* requer ácidos tricarbóxicos para o seu desenvolvimento e possui o ciclo de Krebs para obtenção de energia. Além desses ácidos, muitos aminoácidos fazem parte do meio necessário para o seu desenvolvimento, assim como os elementos minerais potássio e magnésio, entre outros. O papel dos aminoácidos e dos ácidos tricarbóxicos no desenvolvimento dessa bactéria pode esclarecer, em grande parte, os sintomas de deficiência em elementos minerais e o desbalanço hormonal apresentados pelas plantas com alto grau de sintomas. É possível que a bactéria, além de dificultar o fluxo de água através da planta, entre em competição por nutrientes, resultando num desbalanço nutricional e hormonal para a planta, principalmente em situações de estresse de um ou mais fatores ambientais (QUEIROZ-VOLTAN & PARADELA FILHO, 1999).

#### 4. CONCLUSÕES

1. A CVC, além de afetar o desenvolvimento do fruto, também prejudicou o peso das sementes.
2. As sementes não apresentaram redução em seu potencial germinativo e no percentual final de emergência.
3. Pelo teste PCR, foi possível detectar a presença da *X. fastidiosa* nos diferentes tecidos do fruto das três variedades testadas.



**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- BEEVERS, L. Senescence. In: BONNER, J. & VARNER, J. E. **Plant biochemistry**. 3. ed. New York: Academic Press, 1976. p. 771-794.
- BERETTA, M.F.G.; BACH, E.E.; ROSSETTI, V.; LEE, R.F. & DERRICK, K. S. Serological comparison of citrus blight from Florida with declinio and citrus variegated chlorosis in Brazil. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 17, n. 1, p.51, 1991.
- BORGES, R. DE SÁ; ALMEIDA, F.J.; SCARANARI, C.; MACHADO, M.A.; CARVALHO, S.A.; COLETTA FILHO, H.D. & AGUILAR-VILDOSO, C.I. Programa IAC/EMBRAPA/CNPq de incentivo à produção e difusão de mudas de citros isentas da clorose variegada dos citros e outras doenças. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 21, n. 1, p. 205-224, 2000.
- CARVALHO, N.M. DE & NAKAGAWA, J. **Semente: ciência, tecnologia e produção: patologia de sementes; significado e atribuições**. 4.ed. Jaboticabal: Funep, 2000. 588p.
- CHANG, C.J. & DONALDSON, R.C. *Xylella fastidiosa*: cultivation in chemically defined medium. **Phytopathology**, St. Paul, v. 83, n. 2, p.192-194, 1993.
- COSTA, P. I.; FRANCO, C. F.; MIRANDA, V. S.; TEIXEIRA, D. C. & HARTUNG, J. S. Strains of *Xylella fastidiosa* rapidly distinguished by arbitrarily primed-PCR. **Current Microbiology**, v. 40, p. 279-282, 2000.
- DALLA PRIA JR., W.; LI, W.; TEIXEIRA, D.C.; MIRANDA, V.S.; SILVA, M.R.R. & AYRES, A.J. Clorose variegada dos citros diminui tamanho de sementes de laranja doce e afeta sua germinação. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 26, n. 1, p. 128, 2000.
- DE NEGRI, J.D. **Clorose variegada dos citros: nova anomalia afetando pomares em São Paulo e Minas Gerais**. Campinas: CATI, 1990. 6 p. (Comunicado técnico, n.82)
- ERICKSON L.C. & RICHARDS, S.J. Influence of 2-4D and soil moisture on size and quality Valencia oranges. **American Society for Horticultural Science Proceedings**, Alexandria, v.65, p.109-112, 1955.

- ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes**; tradução: Berta Lange de Morretes. São Paulo: Edgar Blücher, 1974. 293 p. Título original: Anatomy of seed plants.
- ESAU, K. Anatomic effects of the viruses of Pierce's disease and phony peach. **Hilgardia**, Berkeley, v. 8, n.12, p.423-482, 1948.
- FRENCH, W.J. & STASSI, D.L. Response of phony-infected peach trees to gibberellic acid. **HortScience**, St. Joseph, v.13, n.2, p.158-159, 1978.
- GAZZOLA, R.; OLIVEIRA JUNIOR, J.P.; CORREA, G.C.; FONSECA, E.B.A.; PAULA, C.M.P.; ALMEIDA, N.A. & ROCHA, M.R. Correlação entre características químicas e físicas nos frutos de laranjeira (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Natal). **Ciência e Prática**, v.15, p 154-158, 1991.
- GOODWIN, P.H.; DE VAY, J.E. & MEREDITH, C.P. Physiological responses of *Vitis vinifera* cv. Chardonnay to infection by the Pierce's disease bacterium. **Physiological Molecular and Plant Pathology**, New York, v. 2, p.17-32, 1988.
- HOPKINS, D.L. Effects of plant growth regulators on development of Pierce's disease symptoms in grapevine. **Phytopathology**, St. Paul, v. 69, n.11, p.944-946, 1985.
- HOPKINS, D.L. Seasonal concentration of the Pierce's disease bacterium in grapevine stems, petioles and leaf veins. **Phytopathology**, St. Paul, v.74, p.415-418, 1981.
- LARANJEIRA, F.F. & PALAZZO, D. Danos qualitativos à produção de laranja 'Natal' causados pela clorose variegada dos citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 20, n. 1, p. 77-91, 1999.
- LARANJEIRA, F.F. & PALAZZO, D. Determinação preliminar dos efeitos da clorose variegada dos citros em características físico-químicas de frutos de laranja Natal. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 9, agosto, p.309, 1994. Suplemento.
- LARANJEIRA, F.F.; POMPEU JÚNIOR, J & PALAZZO, D. Sementes de frutos de laranja 'Natal' afetados pela clorose variegada dos citros: germinação, crescimento de plântulas e não-transmissão de *Xylella fastidiosa*. **Laranja**, Cordeirópolis, v.21, n.1, p. 161-173, 2000.

- LEE, R.F.; RAJU, B.C.; NYLAND, G. & GOHEEN, A.C. Phytotoxin(s) produced in culture by the Pierce's disease bacterium. **Phytopathology**, St. Paul, v.72, p.886-888, 1982.
- MACHADO, E.C.; QUAGGIO, J.A.; LAGÔA, AM.M.A; TICELLI, M. & FURLANI, P.R. Trocas gasosas e relações hídricas em laranjeiras com clorose variegada dos citros. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, São Carlos, v. 6, n. 1, p.53-57, 1994.
- MIRCETICH, S.M.; LOWE, S.K.; MOLLER, W.J. & NYLAND, G. Etiology of almond leaf scorch disease and transmission of the causal agent. **Phytopathology**, St. Paul, v. 66, p. 17-24, 1976.
- MOLLENHAUER, H.A. & HOPKINS, D.L. Xylem morphology of Pierce's disease-infected grapevines with different levels of tolerance. **Physiology of Plant Pathology**, New York, v. 9, p.95-100, 1976.
- PALAZZO, D.A. & CARVALHO, M.L.V. Desenvolvimento e progresso da clorose variegada dos citros (CVC) em pomares de Colina, SP. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 13, n. 2, p. 489-502, 1992.
- PALAZZO, D.A. & CARVALHO, M.L.V. Estimativas de perdas em laranja Natal, por clorose variegada dos citros (CVC), nas colheitas de 1991/92, em Colina, SP. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.18, agosto, p.295, 1993. Suplemento.
- POOLER, M. R. & HARTUNG, J. S. Specific PCR detection and identification of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chlorosis. **Current Microbiology**, New York, v.31, p.377-381, 1995.
- QUEIROZ-VOLTAN, R.B. & PARADELA FILHO, O. Caracterização de estruturas anatómicas de citros infectados com *Xylella fastidiosa*. **Laranja**, Cordeirópolis, v.20, n.1, p.55-76, 1999.
- RAINS, D.W. Mineral metabolism. In: BONNER, J. & VARNER, J.E. **Plant biochemistry**, 3. ed. New York: Academic Press, 1976. p. 561-597.
- REUTHER, W.; BATCHELOR, L.D. & WEBBER, H.J. The citrus industry: In: SCHNEIDER, H. **The anatomy of citrus**. Berkeley: University of California, 1989. v.2, p. 1-85.
- ROBERTO, S.R.; SANCHES, A.L. & CAETANO, A.C. Avaliação de sementes de frutos de laranja 'Valência' (*Citrus sinensis* [L.] Osb) afetados pela CVC. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 22, n. 3, p. 478-480, 2000.

- ROSSETTI, V. & DE NEGRI, J.D. Clorose variegada dos citros (CVC). **Laranja**, Cordeirópolis, v. 11, n. 1, p. 1-14, 1990.
- SCHERER, M.C.; CARVALHO, S.A.; COLETTA FILHO, H.D. & MACHADO, M.A. Avaliação da presença de *Xylella fastidiosa* em frutos, sementes e plântulas de citros, por PCR. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.25, p.330, 2000. Suplemento
- STRONG, R.K. Glucosides. In: STRONG, R.K. **Kingzett's chemical encyclopaedia: a digest of chemistry and its industrial applications**. 6.ed. London: Baillière, Tindall and Cox, 1940. p. 448.
- VARNER, J.E. & HO, D.T. Hormones. In: BONNER, J. & VARNER, J.E. **Plant biochemistry**. 3.ed. New York: Academic Press, 1976. p. 713-770.