

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA**

**DISSEMINAÇÃO DA CLOROSE VARIEGADA DOS CITROS (CVC)
NO RECÔNCAVO BAIANO: DISPONIBILIDADE DE INÓCULO EM
PLANTIOS E MATERIAL PROPAGATIVO**

INDIARA PEREIRA DA SILVA

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
NOVEMBRO 2015**

**DISSEMINAÇÃO DA CLOROSE VARIEGADA DOS CITROS (CVC)
NO RECÔNCAVO BAIANO: DISPONIBILIDADE DE INÓCULO EM
PLANTIOS E MATERIAL PROPAGATIVO**

INDIARA PEREIRA DA SILVA

Bióloga

Universidade do Estado da Bahia, 2012

Dissertação submetida ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola.

Orientador: Francisco Ferraz Laranjeira

Co-orientador: Emanuel Felipe Medeiros Abreu

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA

NOVEMBRO 2015

FICHA CATALOGRÁFICA

S586d

Silva, Indiara Pereira da.

Disseminação da clorose variegada dos citros (CVC) no Recôncavo Baiano: disponibilidade de inóculo em plantios e material propagativo / Indiara Pereira da Silva. – Cruz das Almas, BA, 2015.

117f.; il.

Orientador: Francisco Ferraz Laranjeira.

Coorientador: Emanuel Felipe Medeiros Abreu.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.

1.Citros – Doenças e pragas. 2.Citros – Bactérias fitopatogênicas. 3.Clorose variegada dos citros – Avaliação. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.

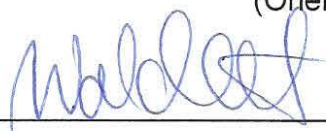
CDD: 634.3

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA
CURSO DE MESTRADO

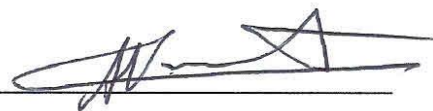
COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
INDIARA PEREIRA DA SILVA



Dr. Francisco Ferraz Laranjeira
Embrapa Mandioca e Fruticultura
(Orientador)



Prof. Dr. Waldir Cintra de Jesus Junior
Universidade Federal de São Carlos - UFSCar



Dr. Antonio Souza do Nascimento
Embrapa Mandioca e Fruticultura

“Dissertação homologada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia Agrícola em _____
conferindo o grau de Mestre em Microbiologia Agrícola
em_____.”

Mas os que esperam no Senhor renovarão as forças; subirão com asas como águias; correrão, e não se cansarão; caminharão, e não se fatigarão. Isaías 40:31

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a DEUS por estar presente em todos os momentos e em tudo não me deixa fraquejar. Obrigado Pai por cuidar de mim!

A minha família, meus pais e irmãos que sempre contribuíram com minha formação acadêmica.

Ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola. Em especial a meu orientador Francisco Ferraz Laranjeira. Agradeço o apoio, incentivo e por ter demonstrado confiança em meu trabalho.

Ao meu co-orientador, Emanuel Felipe Medeiros Abreu sou grata por toda atenção e paciência e por todas as contribuições, as quais foram enriquecedoras para a realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Mandioca e Fruticultura; a analista Andresa, e aos técnicos Vanderson e Raimundo, por todo o auxílio durante essa caminhada. Aos colegas do laboratório: Marcio que sempre colaborou com todo trabalho, as meninas Jamile, Laiana e Jocilene as quais fizeram parte da minha jornada.

Aos colegas do mestrado: Carina, Eliane e Grazielle. Sem vocês não haveria graça, tudo foi mais divertido, ainda que aparentasse assustador.

Agradeço a Embrapa Mandioca e Fruticultura pela infra-estrutura, e a FAPESB pela concessão da bolsa.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1 – Número de *quadrats* utilizados para as análises em função do seu tamanho e da área avaliada.

Tabela 2 – Incidência e Índice de Dispersão (ID) da Clorose Variegada dos citros causado pela *Xylella fastidiosa* na área 1 para os *quadrats* 2x2 e 3x3.

Tabela 3 – Incidência e Índice de Dispersão (ID) da Clorose Variegada dos citros causado pela *Xylella fastidiosa* na área 2 para os *quadrats* 2x2 e 3x3.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 3

Tabela 1 – Análise de Densidade Co-espectral entre as mesmas séries indicando com qual frequência tem maior correlação e a sua coerência.

Tabela 2 – Análise de Densidade Co-espectral entre duas séries diferentes indicando com qual frequência tem maior correlação e a sua coerência.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 4

Tabela 1 – Valores de Ct (*cycle threshold*) obtidos para o teste de quantidade máxima de folhas por amostra na detecção da bactéria *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca*.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1 – Frutos afetados em planta severamente afetada (A); sintomas foliares de CVC na face superior (B) e inferior (C) de laranja Pêra; envassouramento em planta afetada (D); fruto afetado (E).

Figura 2 – Planta com CVC (A) e a colonização da bactéria no xilema (B); esquema bloqueando à água e os nutrientes da raiz para a parte aérea da planta (C).

Figura 3 – Produção de mudas em viveiros a céu aberto na região do Recôncavo Baiano.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

Figura 1 – Incidência cumulativa da Clorose Variegada dos Citros ao longo do tempo nas áreas 1 e 2.

Figura 2 – Índice de doença da Clorose Variegada dos Citros ao longo do tempo nas áreas 1 e 2.

Figura 3 – Aplicação da lei de Taylor modificada. Relação entre o $\log(V_{obs})$ (círculos) e o $\log(V_{bin})$ (linha contínua) para área 1 e 2 tamanhos de *quadrat* 2x2 (A); e para área 1 e 2 tamanho de *quadrat* 3x3 (B).

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 3

Figura 1 – Percentagem de ramos sintomáticos (A), infecções assintomáticos (B), total de ramos infectados (C) e brotações novas (D) em áreas do município de Governador Mangabeira-BA.

Figura 2 – Autocorrelação parcial para a série ramos sintomáticos (A e B) e infecções assintomáticas (C e D) em áreas do município de Governador Mangabeira-BA.

Figura 3 – Autocorrelação parcial para a série infecção total (A e B) e brotações novas (C e D) em áreas do município de Governador Mangabeira-BA.

Figura 4 – Análise de densidade espectral para a série de ramos sintomáticos (A), infecções assintomáticos (B), infecção total (C) e brotações novas (D) em áreas do município de Governador Mangabeira-BA.

Figura 5 – Variações climáticas no período de avaliação da variável precipitação, umidade relativa e temperatura média, dados obtidos na estação meteorológica da EMBRAPA /CNPMF em Cruz das Almas – BA.

ÍNDICE

	Pág
Lista de figuras	
Lista de tabelas	
RESUMO	
ABSTRACT	
INTRODUÇÃO.....	01
CAPÍTULO 1	
Aspectos Gerais da Clorose Variegada dos Citros (CVC) e evolução dos métodos de detecção da bactéria <i>Xylella fastidiosa</i> subsp. <i>pauca</i>	03
1. Aspectos Gerais da Clorose Variegada dos Citros (CVC).....	04
1.1. Sintomas.....	04
1.2. Etiologia.....	06
1.3. Controle.....	08
1.4. Epidemiologia da CVC.....	09
1.4.1. Transmissão.....	09
1.4.2. Plantas hospedeiras.....	12
1.4.3. Aspectos temporais e espaciais.....	13
1.5. Métodos diagnósticos de <i>Xylella fastidiosa</i> e suas implicações em estudos epidemiológicos.....	15
1.6. Produção e qualidade fitossanitária das mudas cítricas.....	18
REFERÊNCIAS.....	20

CAPÍTULO 2

Análise espacial da Clorose Variegada dos Citros no Recôncavo Baiano.....	29
INTRODUÇÃO.....	32
MATERIAL E MÉTODOS.....	33
RESULTADOS.....	37
DISCUSSÃO.....	43
REFERÊNCIA.....	47

CAPÍTULO 3

Análise temporal da Clorose Variegada dos Citros no Recôncavo Baiano	51
INTRODUÇÃO.....	54
MATERIAL E MÉTODOS.....	56
RESULTADOS.....	61
DISCUSSÃO.....	73
REFERÊNCIAS.....	78

CAPÍTULO 4

Avaliação da ocorrência de <i>Xylella fastidiosa</i> subsp. <i>pauca</i> no BAG de citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura em Cruz das Almas-BA.	84
INTRODUÇÃO.....	87
MATERIAL E MÉTODOS.....	88
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	89
REFERÊNCIAS.....	91
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	93
ANEXO.....	94

RESUMO

SILVA, I. P. Disseminação da Clorose Variegada dos Citros (CVC) no Recôncavo Baiano: disponibilidade de inóculo em plantios e material propagativo.

A Bahia ocupa o segundo lugar na produção de frutas cítricas brasileiras, mas a Clorose Variegada dos Citros (CVC), uma das principais doenças de citros, está presente no estado. O agente causal é a bactéria *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca*, limitada ao xilema. Embora exista um estudo de incidência e prevalência para o Litoral Norte, ainda não existem estudos de epidemiologia comparativa para o Recôncavo. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a dinâmica espaço-temporal da CVC em plantios citrícolas e quantificar o risco de dispersão associado a material de propagação no Recôncavo Sul. Além dos plantios, foram amostrados o banco de plantas matrizes de citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Foram selecionadas duas áreas de laranja doce Pêra enxertada em Limão Cravo no município de Governador Mangabeira-BA. Determinaram-se a percentagem de ramos sintomáticos, percentagem de ramos infectados (sintomáticos + assintomáticos), e número de brotações novas. A maior expressão de sintomas ocorreu de maio a outubro com ciclos de três meses, que coincidiu com maior número de brotações. Não foi observado incremento na incidência de ramos infectados, apenas ciclos de três meses ao longo do ano. Esses ciclos podem estar relacionados às condições climáticas da região. Houve disponibilidade de inóculo e de biomassa hospedeira ao longo de todo o ano. Para determinar a dinâmica espacial da CVC, as plantas das áreas selecionadas foram avaliadas visualmente e mapeadas a cada mês. Por meio da análise do índice de dispersão (ID) e aplicação da lei de Taylor modificada, determinou-se o padrão espacial da doença. A maioria das avaliações apresentaram valor calculado de ID estatisticamente superior a 1 (X^2 , $P < 0,05$) indicando uma dependência espacial entre plantas das sub-áreas. A aplicação da lei de Taylor modificada para todos os tamanhos de quadrats apontou agregação, indicando uma interação entre plantas de uma mesma vizinhança. O padrão espacial das plantas afetadas não apresentou diferenças significativas entre as áreas avaliadas. Esses resultados

não diferem dos padrões observados para a mesma doença em outras regiões do Brasil. Para avaliar o risco de dispersão associado a material de propagação foram coletadas um total de 190 amostras de variedades diferentes no banco de plantas matrizes da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Todas as amostras apresentaram resultado negativo para a presença do patógeno da CVC.

Palavras-chave: Epidemiologia, *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca*, dispersão.

ABSTRACT

SILVA, I. P. Spread of Citrus Variegated Chlorosis (CVC) in the Recôncavo Baiano: inoculum availability in planting and propagation material.

Bahia ranks second in the production of Brazilian citrus fruits, but Citrus Variegated Chlorosis (CVC), a major citrus disease, is present in the state. The causal agent is *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* a xylem-limited bacterium. Despite some information about CVC in the Litoral Norte region of Bahia, there are no comparative epidemiological studies for the Reconcavo region in Bahia. The aim of this study was to characterize the dynamics of CVC in citrus orchards and quantify the spread risk associated with propagating material in the Reconcavo. Two orchards of Pera sweet orange grafted on Rangpur Lime were selected. The percentage of symptomatic branches, the percentage of infected branches (Asymptomatic + Symptomatic), and the number of new shoots. The greatest expression of symptoms occurred from May to October, which coincided with the largest number of shoots. There was no increasing trend in the incidence of infected branches, which had three-month cycles throughout the year. These cycles may be related to the climatic conditions of the region. There was inoculum and host biomass availability throughout the year. To determine the spatial dynamics of CVC, the plants in the selected areas were visually evaluated and mapped every month. The spatial pattern was determined by calculating the dispersion index (DI) and applying the modified Taylor's law. The DI for most evaluations showed values higher than 1 (X^2 , $P < 0,05$), indicating a spatial dependency between plants within quadrats. Similar results were observed when Taylor's law was applied for all quadrats sizes. CVC spatial pattern showed no significant differences between the evaluated areas, indicating in both cases a tendency to aggregation. These results do not differ from the patterns observed for the same disease in other regions of Brazil. To assess the risk of dispersion associated with propagation material, a total of 190 samples of different varieties were collected in the germplasm bank of Embrapa Cassava and Fruits and

analyzed by qPCR. All samples were negative for the presence of the CVC pathogen.

Keywords: Epidemiology, *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca*, spread.

INTRODUÇÃO

A citricultura brasileira se destaca pela promoção de crescimento econômico e social do País. Geradora de importantes divisas para o país, provê sustento para cerca de 5 milhões de famílias brasileiras através de empregos diretos e indiretos. Sua potência da produção deve-se ao mercado de exportação de suco de laranja doce, principal produto agroindustrial da citricultura brasileira (NEVES et al., 2010).

A produção da cadeia citrícola está distribuída por vários estados do Brasil. Apesar da notória concentração no estado de São Paulo que detêm 85% da produção, a Bahia é o segundo maior estado produtor do país, com safra obtida em 2013 de 994.817 t, em uma área cultivada de 62.303 hectares (IBGE, 2014). A produtividade dos frutos cítricos está presente quase em todas as regiões do Estado, porém mais de 90% da produção concentra-se no Litoral Norte e Recôncavo Sul. Essa produção é responsável pelo abastecimento do mercado de frutas in natura do Nordeste (BARBOSA et al., 2014; GIRARDI et al., 2015).

A citricultura no Brasil enfrenta diversos problemas de ordem fitossanitária como a Clorose Variegada dos Citros (CVC), causada pela bactéria *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca*, veiculada por insetos vetores ou por propagação de mudas contaminadas. A doença foi identificada na Bahia em 1997 na região do Litoral Norte (SANTOS FILHO et al., 1997), e em 2009 na região sul do Recôncavo da Bahia (SANTOS FILHO et al., 2010). A CVC limita a produção e a comercialização das frutas, causando um prejuízo ainda não totalmente quantificado para a citricultura baiana.

A recente disseminação da CVC nos pomares baianos requer a atenção do governo do Estado, para o esclarecimento e difusão das estratégias de manejo da praga ao citricultor. Muitos produtores ainda desconhecem sobre a sintomatologia da doença, e a falta de adoção de medidas de manejo integrado pelo mesmo contribuiu para a expansão da doença na região (OLIVEIRA et al., 2014a). Essas medidas de manejo são necessárias para contenção da doença nas áreas de ocorrência, e para a preservação das outras regiões produtoras indenens. Outro fator relevante para inibir a disseminação da CVC é a qualidade sanitária das mudas cítricas. O sistema de produção de mudas a céu aberto, praticada por

muitos viveiristas e produtores, favorece grandemente a disseminação da doença transmitida por insetos vetores (GIRARDI et al., 2015).

Poucas informações existem sobre a epidemiologia da doença na Bahia além da ausência de uma estratégia de manejo adaptada às condições da citricultura local. Laranjeira et al. (2008), em estudo de incidência e prevalência no Litoral Norte da Bahia revelaram aspectos importantes como a presença e disseminação da CVC foi relacionada ao manejo inadequado de viveiros, uso massivo de variedade copa suscetível e ausência de medidas específicas de controle da doença.

Dentro deste contexto o objetivo desse trabalho foi estudar o progresso da Clorose Variegada dos Citros no tempo, caracterizar a dinâmica espacial, visando determinar as diferenças no padrão de disseminação da doença e quantificar o risco de dispersão associado a material de propagação do Recôncavo Baiano.

O capítulo 1 apresenta a revisão bibliográfica sobre os aspectos gerais da Clorose Variegada dos Citros (CVC), aspectos temporais e espaciais, métodos diagnósticos de *Xylella fastidiosa* e suas implicações em estudos epidemiológicos, e produção e qualidade fitossanitária das mudas cítricas.

O capítulo 2 apresenta dinâmica espacial da Clorose Variegada dos Citros em duas áreas comerciais do município de Governador Mangabeira. As avaliações foram realizadas mensalmente através dos sintomas visuais, por meio da análise do índice de dispersão (ID) e aplicação da lei de Taylor modificada. O padrão espacial das plantas afetadas apresentou uma tendência a agregação em ambas as áreas.

O capítulo 3 apresenta dinâmica temporal da Clorose Variegada dos Citros em duas áreas do município de Governador Mangabeira. As avaliações foram realizadas mensalmente em cinco plantas marcadas. Determinaram-se a percentagem de ramos sintomáticos, ramos infectados (sintomáticos + assintomáticos), e número de brotações novas. A análise temporal demonstrou disponibilidade de inóculo e de biomassa hospedeira ao longo de todo o ano.

O capítulo 4 apresenta o risco de dispersão associado ao material de propagação. O levantamento foi realizado no Banco de plantas matrizes de Citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura, em 190 amostras de variedades diferentes. Todas as amostras apresentaram resultado negativo para a presença do patógeno da CVC.

CAPÍTULO 1

**Aspectos Gerais da Clorose Variegada dos Citros (CVC)
e evolução dos métodos de detecção da bactéria *Xylella
fastidiosa* subsp. *pauca***

1. Aspectos Gerais da Clorose Variegada dos Citros (CVC)

1.1. Sintomas

A CVC é uma doença caracterizada pela colonização da *X. fastidiosa* subsp. *pauca* nos vasos do xilema e a obstrução parcial ou total à passagem da água. Os sintomas mais característicos se manifestam nas folhas maduras, se estendendo para os ramos e frutos (Figura 1A). Inicialmente ocorrem pequenas manchas internervais amarelas na face superior da folha com pontuações pardas visíveis em ambos os lados do limbo foliar (Figuras 1 B,C) (LARANJEIRA et al., 2005; ROSSETTI e DE NEGRI, 2011). A essas cloroses correspondem, na face inferior, pequenas bolhas de goma cor de palha, formando áreas necrosadas que se estendem até a borda do limbo foliar. As folhas apresentam ainda sintomas de deficiência nutricionais, sobretudo de zinco, boro e carência de potássio. Tais sintomas podem aparecer apenas em um ramo ou em toda planta, levando a uma redução das brotações, acarretando em um menor desenvolvimento das plantas afetadas (LARANJEIRA et al., 2005; SANTOS FILHO et al., 2010; ROSSETTI e DE NEGRI, 2011).

Em estágios iniciais da CVC, observam-se poucos ramos afetados, mas em estágio avançado toda planta apresenta um aspecto de debilidade geral, denotado por coloração amarelada. Em plantas muito afetadas notam-se galhos salientes na parte superior da copa e desfolha nos galhos ponteiros (ROSSETTI e DE NEGRI, 2011). Segundo Laranjeira (1997), os ramos afetados comumente podem apresentar aspecto “envassourado” (Figura 1D), e as gemas tendem a brotar com frequência e vigor maiores que os observados nos aparentemente saudáveis. Essas brotações formam novos ramos doentes, debilitando mais a planta. Machado et al. (1994), observaram que as folhas de plantas afetadas pela CVC apresentam sintomas de deficiência hídrica. Sugeriu que, essa deficiência hídrica era associada à diminuição na fotossíntese e estava possivelmente relacionada a baixos valores de condutividade dos estômatos. No entanto verificaram que a atividade do estômato não foi afetada, concluindo que os sintomas de déficit hídrico são causados pelo aumento na resistência ao fluxo de água nos vasos do xilema.

Estudos desenvolvidos por Malavolta et al. (1990) ressaltaram que os frutos em ramos isolados e apicais eram pequenos e endurecidos, intensamente

amarelados, com lesões pardas e imprestáveis para o comércio. Os sintomas nos frutos surgem após o aparecimento dos sintomas foliares e em ramos já afetados (LARANJEIRA, 1997). Inicialmente o desenvolvimento dos frutos de ramos sintomáticos possui a mesma taxa de crescimento dos frutos de ramos assintomáticos, porém a taxa para os frutos afetados diminui. Tipicamente o crescimento do fruto é interrompido, que se torna duro e pequeno, adquirindo uma coloração típica de fruto maduro (Figura 1E) (PALAZZO et al., 1991). Laranjeira et al. (1999) sugerem que as alterações nas características internas dos frutos são típicas de situações de déficit hídrico e não da atuação direta do metabolismo da planta, pois podem ser observadas em plantas saudias como relatados na literatura.



Figura – 1. Frutos afetados em planta severamente afetada (A); sintomas foliares de CVC na face superior (B) e inferior (C) de laranja Pêra; envassouramento em planta afetada (D); fruto afetado (E). **Fonte.** Silva, I.P., 2015.

1.2. Etiologia

Após o surgimento da Clorose Variegada dos Citros, na segunda metade da década de 80 nos pomares dos Estados de São Paulo e Minas Gerais, várias pesquisas científicas foram realizadas sobre a causa da CVC. Em alguns casos a planta apresentava sintomas semelhantes da doença do “greening”, doença até então não existente no Brasil, e causada por organismo fastidioso limitado ao floema (ROSSETTI et al., 1990). Dentro desse aspecto amostras de folhas com sintomas foram enviadas a laboratórios franceses, e os resultados foram negativos para aquela doença. No entanto constatou-se a presença de uma bactéria semelhante a *Xylella* nos vasos xilemáticos de plantas com CVC. Segundo Rossetti e De Negri (2011), três hipóteses foram aventadas:

i) suspeitava-se tratar de um desequilíbrio nutricional como causa da CVC baseado em certas características da doença.

ii) ocorrência da bactéria semelhante à *Xylella*, patógeno da videira, ameixeira e pessegueiro.

iii) outros agentes patogênicos, como vírus viróides ou micoplasma.

Até então a causa da clorose variegada dos citros não havia sido determinada. No Brasil Leite JR. e Leite (1991), foram os primeiros a isolar a bactéria *Xylella* e cultivar *in vitro*. Por fim, a bactéria *Xylella fastidiosa* foi determinada como o agente causal etiológico da CVC, após se cumprir os postulados de Koch (CHANG et al., 1993). Estes resultados foram confirmados mais tarde por outros métodos de detecção como ELISA, DIBA e Western blot, sendo estes, considerados os testes imunoenzimáticos mais usados (LEE et al., 1992; BERETTA et al., 1992). Os testes moleculares foram iniciados por Minsavage et al. (1994), que mediante a técnica de PCR com ‘primers’ específicos para *X. fastidiosa* detectavam a bactéria como agente causal da CVC.

A bactéria *X. fastidiosa* se encontra limitada aos vasos do xilema, são filamentosas, gram-negativa, células em forma de bastonetes, medindo entre 1 e 4 µm de comprimento por 0,25 a 0,50 µm de diâmetro, e apresentam uma parede crenulada. Além disso, existem outras características importantes como não apresentar flagelos, serem nutricionalmente fastidiosas, aeróbica estritas, lento

crescimento em meio de cultura com uma temperatura ótima ao redor de 26 – 28 C, ótimo pH 6,5 – 6,9 (WEELS et al., 1987). Essa bactéria se distingue por seus mecanismos de patogenicidade, sua eficiente capacidade de adesão e colonização do xilema das plantas culminado a formação do biofilme. Ou seja, durante o seu crescimento agregam-se umas às outras e as paredes dos vasos, por meio de proteínas e polissacarídeos extracelulares produzidos e secretados por elas mesmas, e se multiplicam formando colônias de biofilme. Quando suficientemente grandes, ocluem completamente os vasos do xilema, bloqueando assim o transporte de água e seiva da raiz para a parte aérea das plantas (Figura 2) (CHATTERJEE et al., 2008).

Existem várias estirpes da bactéria *Xylella fastidiosa* com uma variedade de hospedeiros causando doenças em plantas economicamente importantes. A doença de Pierce (PD) em videiras, requeima do cafeeiro, escaldadura da folha da ameixeira e complexo do declínio rápido da oliveira, entre outras plantas cultivadas. A sintomatologia é caracterizada principalmente pela queima do bordo do limbo foliar com seca total ou parcial da planta afetada e redução de porte da copa. Em citros as plantas com CVC não apresentam secamento total da copa ou morte da planta afetada, sendo relatados como principais sintomas a clorose das folhas e o amadurecimento dos frutos precocemente (QUEIROZ-VOLTAN et al., 2005; CENTRO DE CITRICULTURA. 2014).

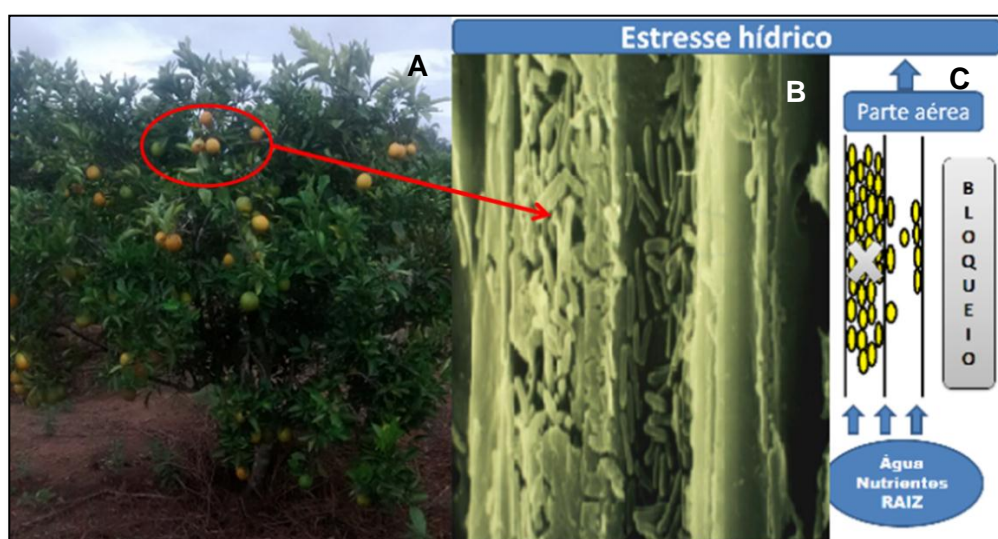


Figura 2. – Planta com CVC (A) e a colonização da bactéria no xilema (B); esquema bloqueando à água e os nutrientes da raiz para a parte aérea da planta (C) (Souza et al., 2012, com adaptações).

1.3. Controle

Na década de 80 várias medidas de controle foram sugeridas por acreditar-se ser um problema nutricional. Entretanto, após a detecção e confirmação da bactéria *Xylella fastidiosa* como agente causal da CVC novas medidas de controle foram propostas (ROSSETTI et al., 1990; CHANG et al., 1993; LEE et al., 1993). Segundo Santos Filho et al. (2010), as medidas de controle devem ser tomadas em conjunto para impedir a disseminação do patógeno, pois de maneiras isoladas não são eficientes. Na atual conjuntura é fundamental obter mudas isentas de CVC, pois porta-enxertos contaminados transmitem a doença ao enxerto sadio. É importante a utilização de borbulhas sadias produzidas em telados antiafídicas e enxertadas em mudas também produzidas em viveiros cobertos.

A eliminação de ramos com sintomas constitui uma eficiente redução do inóculo no pomar afetado. Em pomares novos cujas plantas estão entre 0 e 2 anos de idade, sugere-se a erradicação da planta, uma vez que a bactéria está distribuída por toda planta, devido a seu pequeno porte e em plantas adultas severamente atacadas. Em plantas mais velhas recomenda-se efetuar a imediata poda dos ramos, cerca de 30 cm abaixo das folhas sintomáticas. A medida torna-se mais efetiva quando o pomar está sobre controle para a detecção dos focos iniciais. Porém, a poda dos ramos em plantas adultas com sintomas severos em folhas e frutos é inviável, devendo ser erradicadas (CARVALHO et al., 1996; SANTOS FILHO et al., 2010, COLETTA-FILHO e DE SOUZA. 2014).

A inspeção por amostragem dos sintomas da CVC e o controle químico das cigarrinhas é uma das formas de prevenção. Segundo Donadio e Moreira (1997), a inspeção de cigarrinhas deve ser iniciada no momento do plantio de mudas adquiridas em viveiros com garantias de prevenção de cigarrinhas e CVC. De acordo com Yamamoto et al. (2001), o controle químico das cigarrinhas vetoras de *X. fastidiosa* tem sido realizada de forma mais sistemática em plantas novas, devido ao fato destas serem mais vulneráveis ao ataque da CVC. Yamamoto et al. (2002), realizaram um estudo com objetivo de avaliar os inseticidas, doses e métodos de aplicação no controle de *Oncometopia facialis*, (Hemiptera: Cicadellidae), vetores da bactéria *Xylella fastidiosa*. Os inseticidas foram testados no solo, no tronco e em pulverização. Os resultados indicaram que os inseticidas

testados controlam *O. facialis*, podendo ser usadas para o manejo dos vetores e que os tratamentos com método de aplicação pulverizado demonstram melhor efeito inicial que via solo e tronco.

Muitos métodos de controle estão sendo estudados. Nas pesquisas realizadas pelo Centro de Citricultura Sylvio Moreira (2012), buscam-se estratégias de manejo da doença baseadas na redução de colonização da bactéria na planta. Utilizando agentes mucolíticos que são análogos do aminoácido cisteína, denominado N-acetil cisteína (NAC), e tem a capacidade de reduzir a formação de biofilmes. O experimento foi conduzido em plantas de laranja Pera com altos níveis de população bacteriana e sintomas da doença, as quais receberam doses semanais de NAC. Observaram o efeito direto de inibição sobre o crescimento de *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* sem matar toda a população. Concluíram que estes análogos demonstraram ter um alto potencial para a agricultura, no entanto necessita buscar a melhor formulação para aplicação do composto, possivelmente através de nanopartículas (MURANAKA et al., 2013).

Além da observância destas medidas, tornam-se indispensáveis manter os tratamentos culturais exigidos pelo pomar. As medidas preventivas estabelecidas em portarias e decretos visam evitar a propagação da doença para áreas ainda indenidas.

1.4. Epidemiologia da CVC

1.4.1. Transmissão

A bactéria *Xylella fastidiosa* é transmitida por cigarrinhas das famílias Cicadellidae e Cercopidae. A família Cicadellidae é um grupo numeroso e diversificado de gêneros e espécies que estão agrupados em subfamílias distintas. Dentro da família Cicadellidae apenas a subfamília Cicadellinae foi identificada em citros como espécies vetoras de *X. fastidiosa* (GRAVENA et al., 1997; NUNES et al., 2004). A disseminação natural da CVC nos pomares ocorre pela ação dos insetos vetores que se alimentam no xilema de mudas ou árvores cítricas infectadas (MIRANDA et al., 2008). A família Cercopidae é conhecida

como vetora de outras estirpes da bactéria em outras culturas, como videira, ameixeira, cafeeiro e pessegueiro (LOPES et al., 1996).

Segundo Gravena et al. (1997), essas cigarrinhas possuem adaptações morfofisiológicas para a alimentação no xilema, característica esta aparentemente relacionado com o sucesso na transmissão da bactéria por esses insetos. As cigarrinhas transmitem a bactéria principalmente na fase adulta, pois uma vez adquirindo a bactéria estes permanecem infectivos por tempo indeterminado. As ninfas perdem a capacidade de transmissão após ecdises, pois as células bacterianas estão aderidas ao revestimento cuticular em várias partes do tubo digestivo anterior (estomodéu) dos vetores, incluindo o cibário (ou câmara de sucção), o pré-cibário e a abertura do esôfago (MARIANO et al., 2007; COLETTA-FILHO E DE SOUZA. 2014).

Segundo Donadio et al. (1997), algumas dessas cigarrinhas vivem em plantas cítricas, outras tanto em plantas de citros como na vegetação espontânea de pomares e algumas se alimentam exclusivamente em plantas invasoras, sendo ocasionalmente vistas nas plantas cítricas. Para citros foram identificadas 12 espécies de cigarrinhas como transmissoras da bactéria *X. fastidiosa*. As espécies *Dilobopterus costalimai*, *Oncometopia fascialis* e *Acrogonia citrina* são as mais representativas e quando presentes no pomar vivem predominantemente sobre as plantas cítricas, se alimentando preferencialmente em brotações novas. A *Bucephalagonia xanthophis* é mais encontrada em mudas. *Plesiommata corniculata*, *Macugonalia leucomelas*, *Ferrariana trivittata* e *Sonesimia grossa* preferem gramíneas para se estabelecerem e raramente são encontradas na laranjeira. *Acrogonia virescens*, *Homalodisca ignorata*, *Parathona gratiosa* e a *Fingeriana dúbia* vivem principalmente nas plantas cítricas (YAMAMOTO et al., 2007).

Miranda et al. (2009), após realizarem um levantamento populacional de cigarrinhas vetoras de *xylella fastidiosa* em pomares cítricos do litoral norte da Bahia, relataram que 90,2% das espécimes pertenciam a família Cicadellidae. Entre as espécies encontradas a *Acrogonia flagellata* Young, *A. citrina* Marucci e Cavichioli, *Homalodisca spottii* Takiya, Cavichioli e McKamey foram dominantes na copa das plantas cítricas, enquanto que *Hortensia similis* (Walker) e *Erythrogonia dubia* (Medler) foram dominantes na vegetação rasteira. Entre as espécies potencialmente vetoras de *Xylella fastidiosa* em citros foram observadas

apenas *A. citrina*, *Bucephalogonia xanthophis* (Berg) e *Ferrariana trivittata* (Signoret).

A distribuição de cigarrinhas nos pomares da região do Recôncavo Baiano foi catalogada por Oliveira et al. (2014b), os autores identificaram a presença de *Acrogonia citrina*, *Oncometopia clarior*, *Macugonalia leucomelas*, *Macugonalia cavifrons*, *Diedrocephala variegata*, *Homalodisca spottii*, *Tapajosa fulvopunctata*, *Hortensia similis*, e *Gypona sp* em cinco municípios avaliados. Dentre estas a *Macugonalia leucomelas* e *Acrogonia citrina* possuem eficiência na transmissão da bactéria *Xylella fastidiosa* para CVC.

Estudo realizado no noroeste do Paraná avaliou a abundância de cigarrinhas vetoras de *X. fastidiosa* em laranja-doce (*Citrus sinensis*). Os autores relataram a ocorrência de nove espécies de cicadélíneos, sendo seis potencialmente vetoras da *X. fastidiosa*. As espécies *Dilobopterus costalimai* e *Acrogonia citrina* foram consideradas de maior incidência. Essas espécies eram constantes durante o período de levantamento e a variedade Pêra apresentou o maior número de espécies vetoras capturadas (MOLINA et al., 2006; NUNES et al., 2007).

A bactéria *X.fastidiosa* pode se disseminar ainda por enxertia de borbulhas infectadas ou por garfagem de ramos infectados. Nunes et al. (2004), ao avaliarem a transmissão de *X.fastidiosa* para mudas de citros em laranja Pera através da encostia de plantas-inóculo, relataram a transmissão da bactéria para 52% das plantas, 25% apresentaram sintomas de CVC. Já a transmissão mecânica da bactéria através de instrumentos cortantes não foi constatada ainda (LARANJEIRA et al., 2000; SCHERER et al., 2000).

Outra possibilidade de transmissão estudada é através de sementes. Segundo Li et al. (2003), a bactéria está presente em sementes de frutos de laranja doce com sintomas de CVC e pode passar para as plântulas originárias dessas sementes. No entanto, após um estudo de sete anos foi descoberto por Coletta-Filho et al. (2014), que a bactéria *X.fastidiosa* não pode ser transmitida através de sementes de mudas, demonstrando que a troca de sementes é altamente viável.

De acordo com Santos Filho et al. (2010), a principal forma de disseminação à distância é a comercialização de mudas infectadas, os sintomas aparecem após pelo menos seis meses da infecção primária. Por isso é

importante que se obtenha material de propagação sadio e se produzam mudas em ambiente protegido.

1.4.2. Plantas hospedeiras

A bactéria *Xylella fastidiosa* possui ampla gama de hospedeiros. Gênero *Citrus* pertencente à família Rutacea é o mais afetado, pois as laranjas doces, tangerinas, tangores e tangelos podem apresentar os sintomas. Para os demais gêneros da família relacionadas a *citrus*, como *Fortunela*, *Poncirus*, até o momento não foram observados sintomas e nem detectada a bactéria em seu xilema (LARANJEIRA et al., 2005).

Segundo Laranjeira e Pompeu Junior (2002), as laranjas doces (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) são as mais suscetíveis à *Xylella fastidiosa* causadora da CVC, havendo apenas variação em relação à suscetibilidade. Existem relatos da ocorrência de sintomas foliares de CVC em condições de campo nas tangerinas e seus híbridos como tangores ou tangelos, em uma intensidade menor que as laranjas doces, porém foram constatadas apenas em variedades não comerciais (LARANJEIRA et al., 2005).

Laranjeira e Pompeu Junior (2002), avaliaram o desenvolvimento de sintomas e a produção de quinze cultivares de laranja-doce. Tais cultivares foram plantados dentro de uma área com alta incidência de CVC. Os autores constataram que nas variedades avaliadas havia distinção quanto à suscetibilidade e caracterizaram em três grupos como altamente suscetíveis: Barão, Pêra, Lima, Rubi, Cadenera 17 e 51, Berna e Valência; suscetíveis: Gardner, Pineapple, Sunstar, Folha Murcha e Baianinha, e moderadamente suscetíveis: Lue Gim Gong, e Westin.

Além das espécies frutíferas a bactéria *Xylella fastidiosa* afeta plantas ornamentais como hibisco, e plantas daninhas como o Capim- arroz (*Echinochloa crus-galli*) e o Capim-braquiária (*Brachiaria decumbens*) (COLETTA-FILHO E DE SOUZA, 2014). Apesar de causar doenças em diversos hospedeiros e ser classificada como uma única espécie, estudos genéticos suportam vários táxons para essa bactéria. Shaad et al. (2004), estudando as cepas da bactéria *X. fastidiosa*, isoladas de diferentes hospedeiros, determinaram o relacionamento taxonômico entre elas. As cepas de uva cultivada, alfafa, amêndoa (dois), e de

bordo foi denominada de *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa*; cepas de pêssigo, elmo, ameixa, uva pombo, sicômoro, e amêndoa (um) como *X. fastidiosa* subsp. *multiplex*, e as cepas de citros como *X. fastidiosa* subsp. *pauca*.

1.4.3. Aspectos temporais e espaciais

O estudo epidemiológico analisa os efeitos e a relevância de variáveis quantitativas medidas nos patossistemas (BERGAMIN FILHO e AMORIM, 1996). Segundo Davis e Brown (1996), a análise do padrão espacial da doença pode fornecer informações sobre a dispersão da doença, do patógeno e, também sobre seu mecanismo de sobrevivência. O padrão espacial da doença é influenciado pela quantidade de inóculo e a presença do hospedeiro.

Dentro desses aspectos a representação da epidemia é realizada através da curva de progresso da doença, expressa pela plotagem da proporção de doença *versus* tempo, permitindo caracterizar interações entre patógeno, hospedeiro e ambiente. (BERGAMIN FILHO e AMORIM, 1996). Palazzo (1993), fez o primeiro relato do progresso e severidade da CVC. A taxa de infecção foi aferida em função do tempo, quantificando os frutos sintomáticos e assintomáticos e os sintomas foliares. A autora notou que o desenvolvimento dos frutos é afetado pela CVC a partir de fevereiro, acentuando-se até o fim da colheita.

Ao caracterizar a dinâmica espacial e temporal da CVC, mapeando bimestralmente áreas de laranja-doce cultivares Pera, Hamlin e Natal, Laranjeira et al. (1997) relataram aspectos importantes na disseminação da doença. Os autores observaram diferenças nas taxas de progresso da doença entre as estações do ano, identificando primavera e verão superiores ao outono e ao inverno. As análises aplicadas indicaram ausência de influência de passagem de máquinas e da direção dos ventos predominantes na disseminação da doença, nas áreas avaliadas.

Através da geoestatística Roberto et al. (2002), analisaram a dinâmica espacial da CVC em um pomar comercial de laranja (*Citrus sinensis*) 'Valência' de cinco anos de idade, na região norte do Estado de São Paulo. Inicialmente a distribuição espacial das plantas doentes foi aleatória, posteriormente a doença apresentou padrão agregado formando reboleiras de 10 a 14 m. A distribuição da

doença ajustou-se a um modelo esférico gerando mapas de krigagem, onde foi observado que a incidência da CVC aumentou em períodos nos quais as plantas se encontravam em desenvolvimento vegetativo, coincidindo com maior ocorrência esperada de insetos vetores da bactéria no campo.

Em concordância com esse trabalho Laranjeira et al. (2004) reportaram o arranjo espacial das plantas afetadas, avaliando quinzenalmente, em três talhões de laranja-doce. Métodos espaciais como sequências ordinárias foram aplicados, observaram uma tendência à aleatoriedade na maioria das avaliações, indicando baixa transmissão a plantas imediatamente vizinhas. Para os métodos Lei de Taylor modificada, índice de dispersão, análise de dinâmica e estrutura de focos foram observados pouca diferença no padrão espacial da doença, considerado levemente agregado, entre as regiões.

Laranjeira et al. (2003b) buscaram caracterizar a dinâmica temporal da CVC em talhões de três áreas (Noroeste, Centro e Sul) de São Paulo, por um período de dois anos, em avaliações quinzenais, observaram que as curvas de progresso da CVC para todas as áreas apresentaram padrão incomum para doenças de causa biótica. Além disso, ressaltou que a velocidade da doença e aceleração do aparecimento de novas plantas doentes ocorria nos meses de primavera e verão.

Para Nunes et al. (2006), ao desenvolverem uma análise temporal da CVC e do seu agente etiológico, com o uso da reação da polimerase em cadeia (PCR), apontou o modelo logístico como o que melhor se ajustou para descrever o comportamento da doença no tempo, para todas as variedades estudadas.

Muitos trabalhos vêm sendo desenvolvidos quanto a epidemiologia da CVC, (PALAZZO e CARVALHO 1992; LARANJEIRA et al, 1997; LARANJEIRA et al., 2003a,b, 2004; NUNES et al., 2006 e 2007), buscando a melhor representação da epidemia, estudando a interação entre o patógeno e o hospedeiro afim de estabelecer estratégias de controle e prever os níveis futuros de doença (BERGAMIN FILHO e AMORIM, 1996).

Laranjeira et al. (2008), fizeram o primeiro relato na Bahia sobre a prevalência, incidência e distribuição da CVC, através da diagnose visual de sintomas em frutos e folhas, determinando a proporção entre plantas afetadas e plantas avaliadas. Os autores demonstraram aspectos importantes como a agregação espacial da CVC em três municípios da região do litoral norte.

Concluíram que a presença e disseminação da CVC estaria relacionada a fatores como manejo inadequado de viveiros, uso massivo de variedade copa suscetível, concentração de pomares de laranja doce em municípios de alta incidência e ausência de medidas específicas de controle da doença.

1.5. Métodos diagnósticos de *Xylella fastidiosa* e suas implicações em estudos epidemiológicos

Os métodos de diagnósticos de doenças são um dos principais requisitos para o sucesso das estratégias de controle de doenças, nos estudos de transmissão da doença e na relação patógeno-planta. Um dos primeiros relatos de diagnose da *Xylella fastidiosa* da CVC foi através da microscopia eletrônica de transmissão (ROSSETTI et al., 1990). A técnica de microscopia de imunofluorescência foi utilizada nos estudos de comparação da bactéria da CVC com doença semelhante em citros na Argentina causada pelo mesmo patógeno denominada “pecosita” (BRLANSKY et al., 1993).

O diagnóstico por isolamento em meio de cultura como o PW contém substâncias que estimulam o crescimento de qualquer estirpe de *Xylella fastidiosa*. Além desse meio pode ser observado o crescimento nos meios de cultura sólido de BCYE, GYE e PYE. São meios complexos que incluem peptona, triptona, soytone, e extracto de levedura a partir de várias fontes, além de cloreto de hemina ou pirofosfato férrico como uma fonte de ferro, aminoácidos, sais inorgânicos, citrato e succinato, o amido, a albumina de soro bovino, ou carvão activado (CAMPANHARO et al., 2003). O crescimento é observado ao redor de 10 a 20 dias, quando isoladas a partir de folhas ou ramos sintomáticos. Assim, a característica fastidiosa da bactéria dificulta o isolamento em meio de cultura como método de diagnose (COLETTA FILHO E DE SOUZA, 2014).

Os testes imunoenzimáticos utilizados na detecção da CVC como DIBA (“dot immubinding assay”), ELISA (“enzyme linked immunosorbent assay”) e o “Western-blot” tem sido amplamente utilizados por serem de baixo custo e de fácil execução. Nesses testes são utilizados anticorpos específicos para *X. fastidiosa* subsp. *pauca* (COLETTA FILHO e DE SOUZA, 2014). Os testes DIBA e ELISA permitem a realização de um grande número de amostras, no entanto muitas

vezes apresentam reações inespecíficas e com sensibilidade de expressão de, no mínimo, 10^4 células/mL (MINSAVAGE et al., 1994).

A técnica de PCR é um método sensível e rápido para detecção de patógenos, pois permite amplificar sequências específicas *in vitro* do DNA alvo. É empregada utilizando oligonucleotídeos (*primers*) que irão reconhecer sequências específicas no DNA de determinado patógeno. A técnica consiste de ciclos repetitivos, divididos em desnaturação do DNA, por rompimento das pontes de hidrogênio, anelamento dos primers, e extensão das sequências a ser amplificada no sentido 5' – 3' respectivamente. Posteriormente utiliza-se a eletroforese em gel de agarose para detecção do DNA amplificado com um corante, brometo de etídio, capaz de intercalar no DNA e fluorescer sob exposição a luz ultra-violeta (LIMA. 2008; NASCIMENTO et al., 2010).

Para diagnose via PCR Minsavage et al. (1994), descreveram (*primers*) específicos para estirpes de *X.fastidiosa* conhecidos como RST31 e RST33, que amplificam um fragmento de 700 pares de base (pb). Pooler e Hartung (1995), desenvolveram pares de iniciadores de PCR que podem ser utilizados para detectar qualquer subespécie de *X.fastidiosa*, e *X. fastidiosa* que causa a CVC. Foram identificadas regiões específicas do genoma da *X. fastidiosa* da CVC que por alteração de alguns nucleotídeos, podem ser distinguidas da estirpe de *X. fastidiosa* do Mal de Pierce. Beretta et al. (1997) pesquisaram várias estirpes de *X. fastidiosa* em citros, e desenvolveram *primers* específicos designadas CVC 1 e CVC 2. Esses iniciadores amplificam um fragmento de 270 pb nos isolados de *X. fastidiosa* causadores da CVC e da escaldadura da folha do cafeeiro.

A técnica PCR em tempo real (qPCR) possibilita a quantificação em tempo real do DNA amplificado, em cada ciclo de amplificação. O qPCR não requer manipulação da amostra de pós-PCR, ao contrário dos outros métodos. A técnica é caracterizada pela fase de crescimento exponencial, fase de crescimento linear e fase estacionária. O ponto que detecta o ciclo na qual a reação atinge o limiar da fase exponencial é denominado *Cycle Threshold* (Ct). O Ct permite a quantificação relativa do DNA de cada uma das amostras. Dessa forma o Ct corresponde à quantidade inicial de expressão do gene-alvo em uma determinada amostra. Para análise *in vitro* dos produtos da amplificação são utilizados compostos fluorescentes, divididos em dois grupos que são os corantes

intercalantes como o SYBR Green ou sondas de sequência específica como a *Taqman* (HEID et al.,1996; MACKAY et al.,2007; NASCIMENTO et al., 2010).

A *Taqman* destina-se a detecção de sequências específicas nos fragmentos de DNA amplificados na PCR. Para tanto são utilizados dois *primers* específicos de uma determinada sequência de DNA e uma sonda *Taqman* homóloga à região do fragmento de DNA entre os *primers*. A sonda *taqman* é um método específico para determinar a presença e ausência de sequências específicas (MACKAY et al.,2007).

Durante a qPCR a sonda *Taqman* hibridiza na região-alvo que deve ser amplificada na fita 5´- 3´ pelo *prime sense*. A sonda possui um fluoróforo ligado na extremidade 5´ denominado repórter (R), responsável pela emissão da fluorescência, e um composto localizado no terminal 3´ denominado quencher (Q) que impede a emissão da fluorescência do repórter. No processo de amplificação a sonda é degradada devido a atividade da exonuclease realizada pela DNA polimerase, separando a molécula quencher do repórter durante a extensão, resultando em um aumento da intensidade da fluorescência. A emissão da luz é aumentada de forma exponencial, que ocorre apenas quando a sonda hibridiza e quando a amplificação da sequência alvo é estabelecida (HEID et al.,1996; NOVAIS et al., 2004; NASCIMENTO et al., 2010).

Através do qPCR em tempo real Oliveira et al. (2002), quantificaram e analisaram a distribuição temporal e espacial de *X.fastidiosa* nos vasos do xilema de folhas de citros. Os resultados indicaram que a população bacteriana aumenta de acordo com a idade das folhas e está distribuída do pecíolo à nervura central superior. Francis et al. (2006), desenvolveram iniciadores para detecção e quantificação específica de *X.fastidiosa* utilizando o sistema TaqMan. *Primers* HL5 e HL6 foram projetados para amplificar uma região única comum aos genomas sequenciados de quatro estirpes de *Xylella fastidiosa*.

Dentro desse contexto, percebe-se que no estudo da epidemiologia são necessários desenvolvimento de técnicas confiáveis na detecção de patógenos com resultados precisos. Atualmente a PCR constitui o principal método de diagnóstico para a detecção da *Xylella fastidiosa*.

1.6. Produção e qualidade fitossanitária das mudas cítricas

A produção de mudas de citros no Estado da Bahia está distribuída entre o Litoral Norte e o Agreste de Alagoinhas. Essas regiões chegam a produzir anualmente cerca de 700 mil a 100 mil mudas, respectivamente, a céu aberto por viveiristas familiares. Na região do Recôncavo Baiano a produção de mudas é praticada principalmente por viveiristas familiares a céu aberto (Figura 3). Em 2012, estimou-se uma produção de cerca de 1,2 milhões de mudas cítricas para região, sendo que a produção se destina para comercialização na própria região e distribuição por todo Nordeste brasileiro (GIRARDI et al., 2015).

Em 2002, um levantamento realizado em oitenta viveiros no Estado da Bahia constatou que nenhum viveiro era registrado, não havia nenhuma assistência técnica governamental, e mais de 90% dos viveiristas utilizavam plantas de origem não certificada (PASSOS et al., 2004). Em 2012, um novo levantamento foi realizado sobre o sistema de produção de mudas cítricas no Recôncavo da Bahia, e após dez anos observou-se, praticamente, o mesmo cenário. Na ausência de uma assistência técnica por parte das instituições públicas para a produção de mudas, os viveiristas coletavam borbulhas em plantas matrizes mantidas na própria propriedade ou a campo na região, e nas propriedades vizinhas. Poucos destes utilizavam borbulhas diretamente provenientes de instituições de pesquisa como a Embrapa Mandioca e Fruticultura e a Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola (EBDA) (GIRARDI et al., 2015).

Considerando a importância sócio-econômica da citricultura no Estado da Bahia, e a necessidade de evitar a disseminação de doenças como a CVC e outras – como HLB que ainda não está presente no estado – para regiões ainda indenés, a Agência de Defesa Agropecuária da Bahia (ADAB) estabeleceu a Portaria Estadual 243/2011, que dispõe sobre a produção em viveiro telado, a entrada, o comércio e o trânsito de mudas, porta-enxerto e borbulhas de plantas cítricas no Estado da Bahia. A portaria estabelece que a partir de janeiro de 2013 a produção de porta-enxerto somente poderia acontecer em ambiente de telado; a partir de janeiro de 2014 toda produção de mudas cítricas e borbulhas deveria ser instalada em ambiente de telado (ADAB, 2011).

A muda é a base da cadeia citrícola para aquisição de plantas saudáveis e produtivas. Para tanto, necessita-se utilizar mudas cítricas de qualidade, produzidas em ambiente protegido, assegurando a formação de pomares cítricos livre de pragas. Essa é uma realidade do maior produtor de citros no Brasil, o Estado de São Paulo. As mudas são produzidas em ambiente de telado, protegendo da invasão de insetos vetores e proporcionando um controle de todo processo produtivo. No entanto, a Bahia, segundo maior produtor de citros, ainda não faz parte dos Estados produtores de mudas de citros em ambientes protegido, apesar do projeto, “Produção de mudas cítricas em ambiente protegido” elaborado pelos técnicos da EBDA, ter sido aprovado em 2014 pelo Governo do Estado (EBDA. 2014; REZENDE et al., 2014).

O projeto, financiado pelo governo, busca garantir a participação dos agricultores familiares, que há anos realizava o cultivo a céu aberto, organizados em associações viveiristas na produção de mudas de citros em viveiros de telado. Visando a instalação de sete viveiros nas regiões do Litoral Norte/Agreste Baiano e no Recôncavo. Essa iniciativa proporcionará o desenvolvimento da citricultura Baiana, favorecendo a permanência dos viveiristas familiares na atividade, e garantindo a propagação de material sadio e produtivo (EBDA. 2014; REZENDE et al., 2014). A falta de intermediação entre os viveiristas e o poder público supramencionado, bem como o perfil dos agricultores (81% com 1º grau incompleto para o Recôncavo Baiano), e o custo elevado para o investimento dessa tecnologia, retardou a implantação desse sistema de produção de mudas protegidas na Bahia (GIRARDI et al., 2015).

Vale salientar que a citricultura do Nordeste conta com a distribuição de mudas com garantia fitossanitária de instituições de pesquisas como Embrapa Mandioca e Fruticultura e a Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola (EBDA). O suporte no fornecimento de mudas para o Estado proveniente do Banco Ativo de Germoplasma de Citros (BAG) da Embrapa possui viveiros protegidos para a manutenção de germoplasma, plantas básicas e borbulheiras (REZENDE et al., 2014; GIRARDI et al., 2015). Além disso, a Embrapa busca incentivar a diversificação no uso de cultivares na região, pois há um uso massivo de cultivares copa e porta-enxerto (laranja ‘Pera’ x limão ‘Cravo’). Através do “Programa de Melhoramento genético de Citros da Embrapa”, que visa a

obtenção de porta-enxertos híbridos adaptados as condições regionais (PASSOS et al., 2004; PASSOS, 2007).



Figura 3 – Produção de mudas em viveiros a céu aberto, na região do Recôncavo Baiano. **Fonte.** Silva, I.P., 2015.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA ESTADUAL DE DEFESA AGROPECUÁRIA DA BAHIA (ADAB). Dispõe sobre a produção em viveiro, telado, a entrada, o comercio e o transito de mudas, porta-enxerto e borbulhas de plantas cítricas no Estado da Bahia e dá outras providências. **Decreto**, Port. No 243/2011.

BARBOSA, C.J.; RORIZ, A.K.P.; SILVA, S.X.B.; BARBOSA, L.V. Pragas Quarentenárias A 1 e A 2 da Citricultura Baiana. Embrapa Mandioca e Fruticultura **Comunicado Técnico 156**: 7p, 2014.

BERGAMIN FILHO, A. & AMORIM, L. **Doenças de Plantas Tropicais: epidemiologia e controle econômico**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1996.

BERETTA, M.J.G.; LEE, R.F.; DERRICK, K.F.; DAVIS, C.L.; BRLANSKY, R.H. Culture and serology of a *Xylella fastidiosa* associated with citrus variegated chlorosis in Brazil. In: INTERNACIONAL CITRUS CONGRESS, 7, Italy. p 526, 1992.

BERETTA, M.J.G.; BARTHE, G.A.; CECCARDI, T. L.; LEE, R.F.; DERRICK, K.S.A survey for strains of *Xylella fastidiosa* in citrus affected by citrus variegated chlorosis and citrus blight in Brazil. **Plant Disease**, v. 81, p.1196-1198, 1997.

CAMPANHARO, J.C; LEMOS, M.V.F.; LEMOS, E.G.M. Growth Optimization Procedures for the Phytopathogen *Xylella fastidiosa*. **Current Microbiology**, v. 46, p 99 -102, 2003.

CARVALHO, M.L.V.; BERETTA, M.J.G.; CHAGAS, C.M.; HARAKAWA, R.; PALAZZO, D.A.; ROSSETI, V. Clorose variegada dos citros – Etiologia e Manejo. **Boletim técnico**, Instituto Biológico, São Paulo, n.3, 13p.1996.

CENTRO DE CITRICULTURA SYLVIO MOREIRA. Avanço nas Pesquisas para Controle da CVC. **Informativo**. Cordeirópolis, n.200, 2012.

CENTRO DE CITRICULTURA SYLVIO MOREIRA. Novo ambiente e cultura agrícola como hospedeiros para *Xylella fastidiosa*. **Informativo n.233**. Cordeirópolis, 2014.

CHANG, C.J.; GARNIER, M.; ZREIK, L.; ROSSETI, V.; BOVÉ, J.M. Culture and serological detection of the xylem-limited bacterium causing citrus variegated chlorosis and its identification as a strain of *Xylella fastidiosa*. **Current Microbiology**, v.27, p.137-142, 1993.

CHATTERJEE, S.; ALMEIDA, R.P.P.; LINDOW, S. Living in two Worlds: The Plant and Insect Lifestyles of *Xylella fastidiosa*. **Phytopathol.** v.46, p 243-271, 2008.

COLETTA-FILHO, H.D. & DE SOUZA, A.A. Avanços no conhecimento sobre a clorose variegada dos citros: uma abordagem sobre os diferentes componentes do patossistema. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v.35, p.19-33, 2014.

DAVIS, R.I. & BROWN, J.F. Epidemiology and management of kava dieback caused by Cucumber mosaic cucumovirus. **Plant Disease**. São Paulo, v. 80, p. 917-921, 1996.

DONADIO, L.C. & MOREIRA, C.S. **Clorose variegada dos citros**. 1 ed. Bebedouro: EECB/Fundecitrus, SP, 1997.

EBDA. Agricultores familiares viveiristas estão atentos a novo sistema de produção de mudas cítricas. **Jornal Novo Dia**, 2014.

FRANCIS, M.; LIN, H.; ROSA, J.C-L.; DODDAPANENI, H.; CIVEROLO, E.L. Genome-based PCR primers for specific and sensitive detection and quantification of *Xylella fastidiosa*. **Plant Pathology**. v.115, p.203–213, 2006.

GIRARDI, E.A.; OLIVEIRA, J.R.P.; SILVA, A.C.M.; BARBOSA, D.H.S.G.; SANTOS-FILHO, H.P.; VILARINHOS, A.D.; SOARES-FILHO, W.S.; PASSOS, O.S. Atualização do diagnóstico sobre sistema de produção de mudas de citros no Recôncavo da Bahia. Embrapa Mandioca e Fruticultura Cruz das Almas, BA, **Documentos 213**, 2015.

GRAVENA, S.; LOPES, J.R.R.; PAIVA, P.E.B.; YAMAMOTO, P.T.; ROBERTO, S.R. Os vetores da *Xylella fastidiosa*. In: DONADIO, L.C.; MOREIRA, C. **Clorose variegada dos citros**. 1 ed. Bebedouro: EECB/Fundecitrus, p.37-53, 1997.

HEID, C.A.; STEVENS, J.; LIVAK, K. J.; WILLIAMS, P. M. Real time quantitative PCR. **Genome Research**, v.6, p.986-994, 1996.

IBGE. Estado da Bahia: lavouras Permanentes, 2014. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=mg&tema=lavourapermanent e2014>>. Acesso em: 15 set. 2014.

LARANJEIRA, F.F. Dez anos de clorose variegada dos citros: o quê sabemos? **Laranja**, v.18, p.123-141, 1997.

LARANJEIRA, F.F. **Dinâmica espacial e temporal da clorose variegada dos citros**. (Dissertação de Mestrado). Piracicaba. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/Universidade de São Paulo. 1997.

LARANJEIRA, F.F.; POMPEU Jr.J.; GARCIA Jr.A.; VIEIRA, M.; HAKAKAVA, R.; BERETTA, M.J.G. Screening for tolerance of citrus to *Xylella fastidiosa*, the causal agent of citrus variegated chlorosis CVC. **Fruits**, v.53, p.345-349, 1998.

LARANJEIRA, F.F.; PALAZZO, D. Danos qualitativos à produção de laranja 'Natal' causada pela clorose variegada dos citros. **Laranja**, v.20, p.77-91, 1999.

LARANJEIRA, F.F.; POMPEU JUNIOR, 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**, v.21, p.161-173, 2000.

LARANJEIRA, F.F. & POMPEU JUNIOR, J. Comportamento de quinze cultivares de laranja-doce afetadas pela clorose variegada dos citros. **Laranja**, v.23, p.401-411, 2002.

LARANJEIRA, F.F.; BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L.; LOPES, J.R.S. Comportamento sazonal da clorose variegada dos citros em três regiões do Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, 2003a.

LARANJEIRA, F.F.; BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L.; BERGER, R.; GOTTWALD, T.R. Dinâmica Temporal da clorose variegada dos citros em três regiões do Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, 2003b.

LARANJEIRA, F.F, BERGAMIN FILHO A.; AMORIM L.; GOTTWALD T.R. Dinâmica Espacial da clorose variegada dos citros em três regiões do Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, 2004.

LARANJEIRA, F.F, BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L.; VILDOSO, C.I.A.; COLETTA FILHO, H.D. Fungos, procariotos e doenças abióticas. In: MATTOS JÚNIOR, D.; DENEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JÚNIOR, J. **Citros**. Campinas - SP: Instituto Agronômico and Fundag, p.629-654, 2005.

LARANJEIRA, F.F.; Silva, L.G.; FONSECA, E.; SILVA, S.X.B.; ROCHA, J.B.; SANTOS FILHO, H.P.; LEDO, C.A.S.; HAU, B. Prevalence, incidence and distribution of citrus variegated chlorosis in Bahia, Brazil. **Tropical Plant Pathology**. v.33, p.339-347, 2008.

LEE, R.F.; BERETTA, M.J.G.; DERRICK, K.S., HOOKER, M.S. Development of a serological assay for citrus variegated chlorosis a new disease of citrus in Brazil. **Proceedings of Florida State Horticultural Society**. v.105, p.32-35, 1992.

LEE, R.F.; BERETTA, M.J.G.; HARTUNG, J.H.; HOOKER, M.E.; DERRICK, K.S. Citrus variegated chlorosis confirmation of a *Xylella fastidiosa* as the causal agent. **Summa Phytopathologica**, v.19, p.123-125, 1993.

LEITE Jr, R.P. & LEITE, R.M.V.B.C. Associação de *Xylella fastidiosa* com a clorose variegada dos citros. **Summa Phytopathologica**, v.17, p.1, 1991.

LI, W.B.; PRIA W.D.; LACAVA P.M.; QIN, X.; HARTUNG, J.S. Presence of *Xylella fastidiosa* in sweet orange fruit and seeds and its transmission to seedlings. **Phytopathology**, v.93, p.953-958, 2003.

LIMA, L.M. Conceitos Básicos de Técnicas em Biologia Molecular. **Documentos 191**, Embrapa Algodão, Campina Grande, p.27, 2008.

LOPES, J.R.S.; BERETTA, M.J.G.; HARAKAVA, R.; ALMEIDA, R.R.P.; KRÜGNER, R.; GARCIA JUNIOR, A. Confirmação da transmissão por cigarrinhas do agente causal da clorose variegada dos citros, *Xylella fastidiosa*. *Fitopatologia Brasileira*, (resumo), p.343- 343, 1996.

MACHADO, M.A.; QUAGGIO, J.A.; MAGALHÃES, A.M.; LAGÔA, A.; TICELLI, M.; FURLANI, P.R.; Trocas gasosas e relações hídricas em laranjeiras com clorose variegada dos citros. **Revista Brasileira Fisiologia Vegetal**, v.6, 53-57, 1994.

MALAVOLTA, E.; MALAVOLTA, M.L.; CABRAL, C.P.; PRATES, H.S.; VITTI, G.C. Nova anomalia dos citros - estudos preliminares. **Laranja**, v.11, p.15-38, 1990.

MARIANO, R.L.R.; SILVEIRA, E.B.; PONTES, M.F.C.; COSTA, F.M.C.; SILVA, S.J.C. Transmissão de fitobacterioses por insetos. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, v. 4, p.214-239, 2007.

MIRANDA, M.P.; VIOLA, D.N.; MARQUES R.N.; BONANI, J.P.; LOPES, J.R.S. Locais e período de alimentação da cigarrinha vetora de *Xylella fastidiosa*, bucephalogonia xanthophis (berg) (hemiptera: cicadellidae), em mudas cítricas. **Fruticultura**, v. 30, p. 913-918, 2008.

MIRANDA, M.P.; LOPES, J.R.S.; NASCIMENTO, A.S.; SANTOS, J.L.; CAVICHIOLI, R.R. Levantamento Populacional de Cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae) Associadas à Transmissão de *Xylella fastidiosa* em Pomares Cítricos do Litoral Norte da Bahia. **Neotropical Entomology**, v. 38, p. 827-833, 2009.

MINSAVAGE, G.V.; THOMPSON, C.M.; HOPKINS, D.L.; LEITE, R.M.V.B.; STALL, R.E. Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. **Phytopathology**, v. 84, p 456-461, 1994.

MOLINA, R.O.; NUNES, W.M.M.C.; GONÇALVES, A.M.O.; CORAZZA-NUNES, M.J.; ZANUTTO, C.A.; YAMAMOTO, A.Y.; VARGAS, R.G. Ocorrência de cigarrinhas vetoras de *xylella fastidiosa* em pomares cítricos do município de loanda, no noroeste do Paraná. **Laranja**, v.27, p 243-250, 2006.

MURANAKA, L.S.; GIORGIANO, T.E.; TAKITA, M.A.; FORIM, M.R.; SILVA, L.F.C.; COLETTA-FILHO, H.D.; MACHADO, M.A.; SOUZA, A.A. N-Acetylcysteine in agriculture, a novel use for an old molecule focus on controlling the plant-pathogen *Xylella fastidiosa*. **PLOS- ONE**, 2013.

NASCIMENTO, S.; SUAREZ, E.R.; PINHAL, M.A.S. Tecnologia de PCR e RT-PCR em tempo real e suas aplicações na área médica. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 67, p. 1-8, 2010.

NEVES, M.F.; TROMBIN, V.G.; MILAN, P.; LOPES, F.F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. **O retrato da citricultura brasileira**. Elaboração: Markestrat Centro de Pesquisa e Projetos em Marketing e Estratégia. 2010.

NOVAIS, C.M. & PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real: uma inovação tecnológica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, 2004.

NUNES, W.M.C.; MEDINA, C. L.; MACHADO, M.A.; MACHADO, E.C.; CORAZZA-NUNES, M.J.; MÜLLER, E.G.W. Transmissão de *Xylella fastidiosa* para mudas de citros através da encostia de plantas-inóculo. **Laranja**, Cordeirópolis, v.25, p.349-356, 2004.

NUNES, W.M.C.; ZANUTTO, C.A.; CORAZZA NUNES, M.J.; MOLINA, R.O. Análise espaço-temporal da clorose variegada dos citros no Noroeste do Paraná, com uso de PCR para detecção de *Xylella fastidiosa*. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 28, p. 421-425, 2006.

NUNES, W.M.C.; ALBUQUERQUE, F.A.; CORAZZA NUNES, M.J.; MACHADO, M.A.; MOLINA, R.O.; ZANUTTO, C.A. Flutuação Populacional de Cigarrinhas Vetoras de *Xylella fastidiosa* Wells em Pomares Comerciais de Citros no Noroeste do Paraná. **Neotropical Entomology**, v.36, p. 254-260 2007.

OLIVEIRA, A.C.; VALLIM, M.A.; SEMIGHINI, C.P.; ARAÚJO, W.L.; GOLDMAN, G.H.; MACHADO, M.A. Quantification of *Xylella fastidiosa* from Citrus Trees by Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay. **Phytopathology**, v. 92, p.1048-1054, 2002.

OLIVEIRA, I.S.; SILVA, S.X.B.; CAVALCANTE, A.K.S.; NASCIMENTO, A.S. Status fitossanitário da Clorose Variegada dos Citros (CVC) na Bahia e perfil dos citricultores. **Bahia Agrícola**, v. 9, p. 88-93, 2014a.

OLIVEIRA, I.S.; ASSIS, P.D.; NASCIMENTO, A.S.; SILVA, S.X.B.; AZEVEDO FILHO, W.S. Cigarrinhas de Xilema Vetoras da Clorose Variegada dos Citros (CVC) Catalogadas para o Recôncavo Baiano. Reunião Comitê Gestor do Projeto Sistema Ecologicamente Intensivo de Produção de Frutas (Seifrut), Resumos. Aracaju, SE. Embrapa Tabuleiros Costeiros p. 123-124, 2014b.

PALAZZO, D.A.; BERETTA, M.J.G.; CARVALHO, M.L.V.; BACH, E.E.; ROSSETI, V. Resultados preliminares de estudos sobre o desenvolvimento da Clorose Variegada dos Citros (CVC), pelo seu efeito em frutos no estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, v.16, p.48, 1991.

PALAZZO, D.A. & CARVALHO, M.L.V. Desenvolvimento e progresso da Clorose Variegada dos Citros (CVC) em pomares de Colina, SP. **Laranja**, v.13, p.489-502, 1992.

PASSOS, O.S.; SANTOS-FILHO, H.P.; SOBRINHO, A.P.C.; COELHO, Y.S.; SOARES-FILHO, W.S.; NASCIMENTO, A.S.; MAGALHÃES, A.F.J.; RITZINGER, C.H.S.P. Certificação de diversificação da citricultura do nordeste Brasileiro. Cruz

das Almas, BA: EMBRAPA-Mandioca e Fruticultura, EMBRAPA- Mandioca e Fruticultura. **Comunicado Técnico**, 101 2004.

PASSOS, O.S.; SOARES-FILHO, SOBRINHO, A.P.C.; SOUZA, A.S., SANTOS, L.C.; PEIXOUTO, L.C. Banco Ativo de Germoplasma de Citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical: passado, presente e futuro. Cruz das Almas, BA: EMBRAPA- Mandioca e Fruticultura. **Documento 163**, 2007.

POOLER, M.R. & HARTUNG, J.S. Specific PCR detection and identification of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chlorosis. **Current Microbiology**. v. 31, p.377-381, 1995.

QUEIROZ-VOLTAN, R.B.; CABRAL, L.P.E., PARADELA FILHO, O.; CARELLI, M.L. C.; FAHL, J.I, FAZUOLI, L.C. Efeito da *Xylella fastidiosa* em cafeeiros em diferentes regiões edafoclimáticas. **Bragantia**, v.64, p.89-100, 2005.

REZENDE, J. O., SOUZA, L. S., SHIBATA, R.T. Produção de mudas cítricas em ambiente protegido. **Bahia Agrícola**, 2014.

ROSSETTI, V.; GARNIER, M.; BOVÉ, J.M.; BERETTA, M.J.G.; TEIXEIRA, A.R.; QUAGGIO, J.A.; DE NEGRI, J.D. Présence de bactéries dans le xylème d'orangers atteints de chlorose variégée, une nouvelle maladie des agrumes au Brésil. **C. R. Academie Sciences**, v.310, p.345-349, 1990.

ROSSETTI, V. & DE NEGRI, J.D. Clorose variegada dos citros - revisão. **Laranja**, Cordeirópolis, v.32, p.61-66, 2011.

ROBERTO, S.R.; FARIAS, P.R.S.; BERGAMIN FILHO, Geostatistical analysis of spatial dynamics of Citrus Variegated Chlorosis. **Fitopatologia Brasileira** v.27, p.599-604. 2002.

SCHAAD, N.W.; POSTNIKOVA, E.; LACY, G.; FATMI, M.B; CHUNG-JAN, C. *Xylella fastidiosa* subspecies: *X. fastidiosa* subsp. *piercei*, subsp. nov. *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* subsp. nov., and *X. fastidiosa* subsp. *pauca* subsp. **Systematic and Applied Microbiology**, v.27, p.290-300, 2004.

SCHERER, M.C.; CRAVALHO, 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**, v.25, p.330, (Suplemento), 2000.

SANTOS-FILHO, H.P.; BARBOSA, C.J.; MEISSNER-FILHO, P.E.; RIBEIRO, J.S.; SANTOS, J.L.; MATRANGOLO, W.J.R.; MIRANDA, M.P.; SODRÉ, G.S. Ocorrência da clorose variegada dos citros em pomares do Estado da Bahia. **Fitopatologia Brasileira**, v. 22, p. 234-235, 1997.

SANTOS FILHO, H.P.; BARBOSA, C.J.; LARANJEIRA, F.F.; SILVA, S.X.B. Clorose variegada dos citros ameaça a citricultura do Recôncavo Sul. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, **Citros em Foco 34**, 2p, 2010.

WELLS, J.M.; RAJU, B.C.; HUNG, H.Y.; WEISBURG, W.G.; MANDELCO-PAUL, L.; BRENNER, D.J. *Xylella fastidiosa* gen. nov., sp. nov.: Gram-negative, xylem-limited, fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.37, p.136-143, 1987.

YAMAMOTO, P.T.; ROBERTO, S.R.; DALLA PRIA JUNIOR, W.; FELIPPE, M.R.; FREITAS, E.P. Flutuação Populacional de Cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae) em Pomar Cítrico em Formação. **Neotropical Entomology**, v.30, p.175-177, 2001.

YAMAMOTO, P.T.; DALLA PRIA JÚNIOR, W.; ROBERTO, S.R.; FELIPPE, M.R.; ALMEIDA, E.J.; FREITAS, E.P. Controle químico da cigarrinha em citros. **Laranja**, v.23, p.141-154, 2002.

YAMAMOTO, P.T; BASSANEZI, R.B.; LOPES, S.A. **Manual de CVC**. São Paulo: FUNDECITRUS, 2006.

CAPÍTULO 2

Análise espacial da Clorose Variegada dos Citros no Recôncavo Baiano

Manuscrito a ser submetido à Revista Tropical Plant Pathology

RESUMO

SILVA, I. P. Análise espacial da Clorose Variegada dos Citros no Recôncavo Baiano.

A Clorose Variegada dos Citros (CVC) é uma das principais doenças de citros que ocorrem na Bahia, segundo maior produtor de frutas cítricas do Brasil. O agente causal é a bactéria *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca*, transmitida por cigarrinhas que se alimentam no xilema. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a dinâmica espacial da CVC no Recôncavo Sul da Bahia. Foram selecionadas duas áreas de laranja doce Pêra enxertada em Limão Cravo no município de Governador Mangabeira-BA, avaliadas visualmente e mapeadas a cada mês. Por meio da análise do índice de dispersão (ID) e aplicação da lei de Taylor modificada, determinou-se o padrão espacial da doença, analisando a incidência de plantas afetadas em cada *quadrat*. A maioria das avaliações apresentaram valor calculado de ID estatisticamente superior a 1 (X^2 , $P < 0,05$) indicando uma dependência espacial entre plantas das sub-áreas. A aplicação da lei de Taylor modificada para todos os tamanhos de *quadrats* apontou agregação, indicando uma interação entre plantas de uma mesma vizinhança. O padrão espacial das plantas afetadas não apresentou diferenças significativas entre as áreas avaliadas, indicando em ambos os casos uma tendência à agregação. Esses resultados não diferem dos padrões observados para a mesma doença em outras regiões do Brasil.

Palavras-chave: epidemiologia, incidência da doença, *Xyella fastidiosa*.

ABSTRACT

SILVA, I. P. Spatial analysis of Citrus Variegated Chlorosis in Reconcavo Baiano.

Citrus Variegated Chlorosis (CVC) is a major citrus disease that occur in Bahia State, the second largest producer of citrus fruits in Brazil. The causal agent is *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca*, a xylem-limited bacterium transmitted by leafhoppers that feed on xylem. The aim of this study was to characterize the spatial dynamics of CVC in the Reconcavo region of Bahia. Two orchards of Pera sweet orange grafted on Rangpur Lime were selected, visually assessed and mapped every month. To determine the spatial dynamics of CVC, the plants in the selected areas were visually evaluated and mapped every month. The spatial pattern was determined by calculating the dispersion index (DI) and applying the modified Taylor's law. The DI for most evaluations showed values higher than 1 (X^2 , $P < 0,05$), indicating a spatial dependency between plants within quadrats. Similar results were observed when Taylor's law was applied for all quadrats sizes. CVC spatial pattern showed no significant differences between the evaluated areas, indicating in both cases a tendency to aggregation. These results do not differ from the patterns observed for the same disease in other regions of Brazil.

Keywords: epidemiology, incidence of disease, *Xylella fastidiosa*.

INTRODUÇÃO

A Clorose Variegada dos Citros (CVC) é um dos principais problemas fitossanitários enfrentados pela citricultura e afeta quase todos cultivares comerciais de laranjas doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) no Brasil (Laranjeira & Pompeu Junior 2002). A bactéria *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* está associada como agente causal da CVC (Chang et al. 1993; Shaad et al. 2004). Esse patógeno, transmitido por cigarrinhas das famílias Cicadellidae e Cercopidae (Lopes et al. 1996), possui a capacidade de adesão e colonização do xilema das plantas (Chatterjee et al. 2008). Os sintomas se iniciam de forma setorizada em um único ramo e com um tempo evoluem por toda copa. Apresentando clorose foliar e redução no tamanho dos frutos, que se tornam endurecidos e amadurecidos precocemente, impróprios para o consumo (Laranjeira et al. 2005; Santos Filho et al. 2010; Rossetti & De Negri 2011).

O primeiro relato da CVC na Bahia foi em 1997 na região do Litoral Norte (Santos Filho et al. 1997), e em 2009 na região sul do Recôncavo da Bahia (Santos Filho et al. 2010). A citricultura está presente quase em todas as regiões do Estado, porém mais de 90% da produção concentra-se no Litoral Norte e Recôncavo Sul (Girardi et al. 2015). Laranjeira et al. (2008) fizeram um estudo de incidência e prevalência para o Litoral Norte, em que as plantas foram avaliadas visualmente em busca de sintomas da CVC nas folhas e frutos. Os autores demonstraram aspectos importantes como a agregação espacial da CVC em três municípios da região do Litoral Norte. Além disso, concluíram que a presença e disseminação da CVC estaria relacionada a fatores como manejo inadequado de viveiros, uso massivo de variedade copa suscetível, concentração de pomares de laranja doce em municípios de alta incidência e ausência de medidas específicas de controle da doença.

A ADAB (Agência Estadual de Defesa Agropecuária da Bahia) fez um levantamento em 2013 e apontaram que a CVC está presente em 84% dos municípios da região do Litoral Norte e em 32% dos municípios do Recôncavo Sul (Silva 2013). Recentemente Oliveira et al. (2014a), relataram o status fitossanitário da CVC na Bahia. No levantamento não foram detectados sintomas da CVC na Chapada Diamantina e no Oeste Baiano. Os autores indicaram em seis municípios do Recôncavo Baiano uma prevalência inferior a seis por cento (6%) e no município de Governador Mangabeira uma prevalência de vinte por cento (20%) de plantas sintomáticas.

Apesar das constatações apontadas por Laranjeira et al. (2008), Silva (2013) e Oliveira et al. (2014a), são desconhecidos detalhes da epidemiologia da doença na região do Recôncavo sul da Bahia. A CVC limita a produção e a comercialização das frutas, causando um prejuízo ainda não totalmente quantificado para a citricultura baiana. Não há conhecimentos sobre o padrão espacial das plantas doentes e proporção de plantas afetadas da doença na região. Dessa forma impossibilita a estimativa de risco de dispersão da doença na região ou dela para outras regiões e de elaborar medidas adequadas de controle da doença nas regiões citrícolas.

O objetivo desse trabalho foi caracterizar a dinâmica espacial da CVC, visando determinar as possíveis diferenças no padrão de disseminação da doença em duas áreas no Recôncavo Sul da Bahia.

MATERIAL E MÉTODOS

Áreas

As avaliações foram realizadas em duas áreas comerciais com CVC no município de Governador Mangabeira, Recôncavo Baiano. A variedade de citros

estudada foi laranja 'Pêra' (*Citrus sinensis* L. Osbeck) enxertada em limão 'Cravo' (*Citrus limonia* Osbeck).

(i) Área 1, Fazenda Gravatá. Pomar com oito anos de idade ao iniciar o trabalho. O espaçamento de plantio das plantas de citros foi de 6m entre linhas e 4m entre plantas. A área era composta por 13 linhas de plantio, totalizando 338 plantas. O agricultor realizava o manejo integrado de plantas invasoras, mantinha a diversidade de espécies vegetais, roçava as entrelinhas, e o uso de herbicida era minimizado. Para essa área os vetores da bactéria foram quantificados por Oliveira et al. (2014b), e identificada as espécies.

(ii) Área 2, Fazenda Barruada. Pomar com sete anos de idade ao iniciar o trabalho. O espaçamento de plantio das plantas de citros foi de 4,80m entre linhas e 3,10m entre plantas. A área era composta por 10 linhas totalizando 218 plantas. O agricultor não mantinha os tratos culturais durante o ano, o mato prevalecia e poucas vezes a área era roçada. Em alguns meses eram observados plantações de outras culturas entre as linhas de citros.

Avaliações

As avaliações foram executadas mensalmente de abril de 2014 a abril de 2015. O diagnóstico foi feito em todas as plantas, para cada área, por meio de sintomas visuais, característicos da doença, como a clorose internerval das folhas e frutos duros e amarelados. A cada avaliação o status fitopatológico e a posição relativa de cada planta eram registrados. O status foi determinado por 0 – não apresentava sintomas nas plantas; 1 – sintomas nas folhas em poucos ramos; 2 – sintomas nas folhas em toda copa; 3 – sintomas em alguns frutos da copa; 4 – sintomas nos frutos em toda a copa. Obtendo-se assim um mapa de cada área,

confeccionados para cada data de avaliação. Os mapas cumulativos consideram que uma planta sintomática numa avaliação será sempre doente nos mapas seguintes, mesmo que não tenha apresentado sintomas em algumas das avaliações posteriores (Laranjeira et al. 2004; Nunes et al. 2006).

Análise espacial

Para a determinação dos parâmetros espaciais da doença os mapas de cada área foram divididos em *quadrats* de tamanho 2x2 e 3x3. *Quadrats* são como unidades de amostragem e são definidos em função do tamanho da área e da quantidade e distribuição das plantas (Tabela 1) (Bergamin Filho et al. 2007). Para cada *quadrat* foi determinada a proporção de plantas afetadas (p) e calculada a incidência da doença na área, através da equação: $P = \sum X_i / Nn$ em que $\sum X_i$ é o somatório do número de plantas doentes em cada *quadrat* i , n é o número de plantas em cada *quadrat* e N número total de *quadrats* em cada área.

Os padrões de disseminação foram avaliados submetendo-se os mapas às análises de Índice de dispersão e aplicação da lei de Taylor modificada. Esses métodos determinam se há relação de dependência espacial entre plantas de uma mesma sub-área (Laranjeira et al., 2004). Os dados obtidos foram utilizados como base para o estudo do cálculo do Índice de dispersão e aplicação da Lei de Taylor modificado.

Tabela 1 – Número de *quadrats* utilizado para as análises em função do seu tamanho e da área avaliada.

Área	Tamanho do <i>Quadrat</i>	
	2X2	3X3
Área 1	85	38
Área 2	54	25

Índice de Dispersão

O índice de dispersão (*ID*) foi obtido através da relação entre a variância observada e a variância binomial (Bergamin Filho et al. 2007). A distribuição beta-binomial considera-se a possibilidade de existirem diferentes probabilidades de sucesso entre as unidades amostrais (Mendonça et al. 2004). O *ID* foi calculado para cada avaliação por meio da equação: $ID = V_{obs} / V_{bin}$ em que $V_{OBS} = \sum (X_i - np)^2 / n^2 (N - 1)$; $V_{bin} = p(1 - p)/n$. Sendo que X_i é o somatório do número de plantas sintomáticas em cada '*quadrat*' *i*; N é o número total de '*quadrats*' em cada área; p é a incidência na parcela; n o número de plantas por '*quadrats*';

O afastamento de aleatoriedade foi determinado por meio do teste X^2 , com $n - 1$ graus de liberdade ao nível de 5 % de significância. Valores de X^2 para graus de liberdade usado e para o nível de significância escolhido foram calculados através da equação: $X^2 = \frac{1}{2} [1,645 + \sqrt{2 \cdot gl - 1}]^2$ em que gl é o número de graus de liberdade. Valores de *ID* significativamente maiores que 1 indicam padrões agregados de plantas sintomáticas, valores de *ID* iguais a 1 indicam padrões aleatórios, e valores de *ID* menores que 1 indicam regularidade.

Aplicação da lei de Taylor modificada

A lei de Taylor modificada (LTM) caracteriza o arranjo espacial de uma epidemia ao longo do tempo e entre locais. Relacionando, por meio da regressão linear, o logaritmo da variância observada (V_{obs}) e o logaritmo da variância esperada (V_{bin}) numa situação de aleatoriedade. Quando os dados são expressos em incidência, a distribuição binomial é a que propicia melhor ajuste para condições de aleatoriedade (Bergamin Filho et al. 2007). Assim: $\log(V_{obs}) = \log(A) + b \log(V_{bin})$ em que A e b são parâmetros.

As regressões foram calculadas por meio do aplicativo Statistica 7. Considerou-se como variável independente o logaritmo das variâncias binomiais estimadas para cada avaliação, e como variável dependente o logaritmo das variâncias observadas. A significância foi determinada pelo teste F a 5% de probabilidade e adequação do ajuste do modelo aos dados foi avaliada por meio do coeficiente de determinação (R^2) (Laranjeira et al. 2004).

A igualdade do parâmetro $b=1$ foi testada através do teste t usando a estimativa do parâmetro e seu erro padrão. A hipótese alternativa foi de $b > 1$. Valores de b diferentes de 1 ao nível de 5% de probabilidade foram considerados indicativo de agregação, a qual varia com a incidência da doença. Para valores de b estatisticamente iguais a 1 e $\log(A)$ igual a 0 indicam aleatoriedade, e valores de $b < 1$ estatisticamente indicam padrão regular (Bergamin et al. 2007).

RESULTADOS

Incidência da doença

Foram observados padrões semelhantes na incidência da doença para as duas áreas. A incidência acumulada demonstra que o aumento no número de

plantas doentes foi mais intenso de maio a agosto, após esse período observa-se um leve crescimento, quase que constante (Figura 1). O índice de doença para ambas as áreas analisadas apresentaram valores entre [0 – 1]. O gráfico indica que o nível de doença (0,1, 2, 3 e 4) foi crescente ao longo do ano para ambas as áreas, porém o índice de doença para área 2 foi mais elevado do que para área 1 (Figura 2).

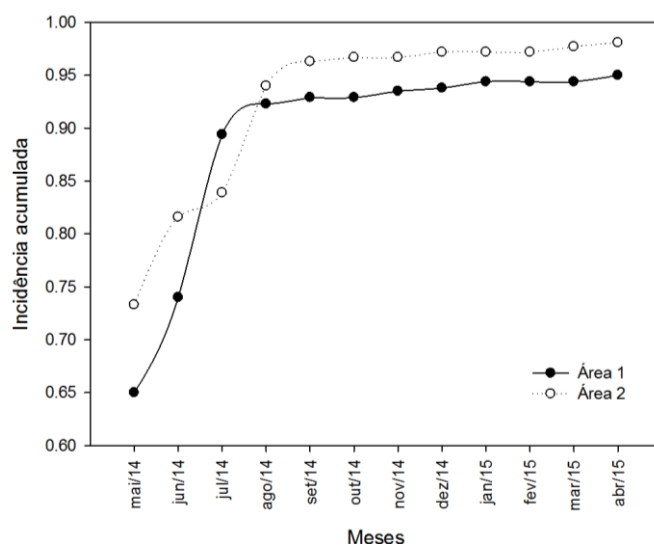


Figura 1 – Incidência cumulativa da Clorose Variegada dos Citros ao longo do tempo nas áreas 1 e 2.

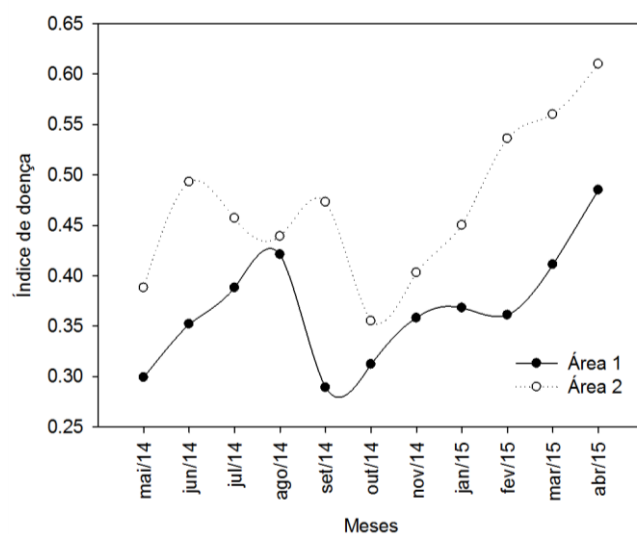


Figura 2 – Índice de doença da Clorose Variegada dos Citros ao longo do tempo nas áreas 1 e 2.

A incidência foi elevada em todas as avaliações, sempre com mais de 70% de plantas sintomáticas. A proporção de plantas afetadas na quarta avaliação ocupou quase 100% da área total em estudo. Após esse período houve um decréscimo da incidência das plantas doentes em ambas as áreas, no entanto mais expressivo para área 1. A partir da sétima avaliação ocorre um incremento da proporção de plantas doentes, seguido de um declínio e novamente um incremento (Tabela 2 e 3).

Tabela 2 – Incidência (proporção de plantas afetadas) e Índice de Dispersão (ID) da Clorose Variegada dos citros causado pela *Xylella fastidiosa* na área 1 para os quadrats 2x2 e 3x3.

Área 1				
Avaliações	Quadrat 2x2		Quadrat 3x3	
Mensais	Incidência	ID	Incidência	ID
1	0.73	2.32*	0.78	4.04*
2	0.83	2.00*	0.85	2.47*
3	0.95	1.42*	0.96	0.97
4	0.97	0.91	0.98	0.87
5	0.85	1.49*	0.89	1.53*
6	0.77	1.48*	0.81	1.81*
7	0.88	1.49*	0.91	2.24*
8	0.90	1.28*	0.92	2.50*
9	0.87	1.48*	0.90	2.09*
10	0.74	1.26*	0.76	1.12*
11	0.93	1.44*	0.95	2.61*

*Valores significativamente maiores que 1 pelo teste de X^2 a 5% de probabilidade.

Tabela 3 – Incidência (proporção de plantas afetadas) e Índice de Dispersão (ID) da Clorose Variegada dos citros causado pela *Xylella fastidiosa* na área 2 para os *quadrats* 2x2 e 3x3.

Área 2				
Avaliações	Quadrat 2x2		Quadrat 3x3	
Mensais	Incidência	ID	Incidência	ID
1	0.80	1.44*	0.82	2.23*
2	0.88	1.43*	0.88	2.12*
3	0.90	1.48*	0.91	2.21*
4	0.97	1.35*	0.97	2.64*
5	0.93	2.26*	0.95	2.09*
6	0.94	1.70*	0.94	1.71*
7	0.94	1.57*	0.95	1.37*
8	0.95	1.68*	0.96	1.79*
9	0.84	1.42*	0.85	2.05*
10	0.74	1.40*	0.74	2.36*
11	0.86	1.61*	0.88	2.14*

*Valores significativamente maiores que 1 pelo teste de X^2 a 5% de probabilidade.

Índice de dispersão (ID)

Para cálculo dos valores dos índices de dispersão das duas áreas experimentais adotaram-se *quadrats* de tamanho 2x2 e 3x3.

Para área 1 os valores de ID seguiram padrões similares para os dois tamanhos de *quadrats* (Tabela 2). Inicialmente com 0,75 de proporção de plantas afetadas, observa-se valores altos de ID para os dois tamanhos de *quadrats*. Em

seguida, com 0,80 de proporção de plantas afetadas, houve uma tendência generalizada para redução nos valores de ID. Para os dois *quadrats* essa diminuição do ID após 0,80 não foi contínua ora apresentando valores maiores, ora menores que o anterior. O ID mínimo significativo entre aleatoriedade e agregação variou conforme o tamanho de *quadrat*. Em função desse ID mínimo na terceira avaliação para o *quadrat* 3x3, e na quarta avaliação para ambos os *quadrats*, foi observado valores de ID = 0,978, ID = 0,918 e ID = 0,873, respectivamente, não significativos pelo teste χ^2 ($P < 0,05$), indicando regularidade no padrão da doença. No entanto para os demais valores de ID, de ambos os *quadrats*, que variaram de 1,123 a 4,046, foram significativamente maiores que 1, evidenciando padrão agregado de distribuição da doença.

Para área 2 foi observado um padrão de doença agregado e todos os valores de ID foram significativamente maiores que 1,0 pelo teste χ^2 a 5% de probabilidade. Inicialmente observaram-se para os *quadrats* 2X2 e 3X3 valores de ID = 1,446 e ID = 2,233, respectivamente, com 80% de incidência de plantas afetadas. Posteriormente, houve redução nos valores de ID, que variaram sem padrão, ora com um aumento, ora com diminuição que o valor anterior, até o fim da epidemia (Tabela 3).

Aplicação da Lei de Taylor modificada (LTM)

A partir dos valores do logaritmo da variância observada e o logaritmo da variância binomial estimada foi possível determinar os valores dos parâmetros b e A . Nos gráficos (Figura 3) são mostrados os valores de b , a indicação de sua significância ou não pelo teste t e os valores de A para cada *quadrat*, em cada região. São apresentadas também as retas de ajustes dos dados para cada *quadrat*,

considerando as duas áreas, além das equações e coeficientes de determinação (R^2).

A análise da distribuição espacial da doença apresentou estatisticamente comportamento similar para área 1, e diferenciado para área 2. A área 1 os parâmetros $\log(A)$ e b diferiram significativamente de 0 e 1, respectivamente, pelo teste t a 5% de probabilidade para o tamanho de *quadrat* 2x2. O *quadrat* 3x3 apesar de ter o parâmetro b não superior a 1, apresentou o A superior a 0 significativamente. A área 2 os parâmetros A e b para o *quadrat* 2x2 não apresentaram valores significativos. Apenas o *quadrat* 3x3 teve o parâmetro A superior a 0 significativamente. Esses resultados para ambas as áreas indicam um padrão agregado de distribuição da doença, demonstrando uma interação entre plantas de uma mesma vizinhança.

Para cada uma das situações houve relação significativa entre $\log(V_{obs})$ e $\log(V_{bin})$. Para o *quadrat* 2x2 a área 1 apresentou um valor de R^2 de 0,947 e a área 2 apresentou um valor de R^2 de 0,937 (Figura 3A), para o tamanho de *quadrat* 3x3 apresentaram valores de R^2 entre 0,842 e 0,944 respectivamente (Figura 3B). Os valores dos parâmetros A e b das regressões foram sempre maiores para o maior tamanho de *quadrat*.

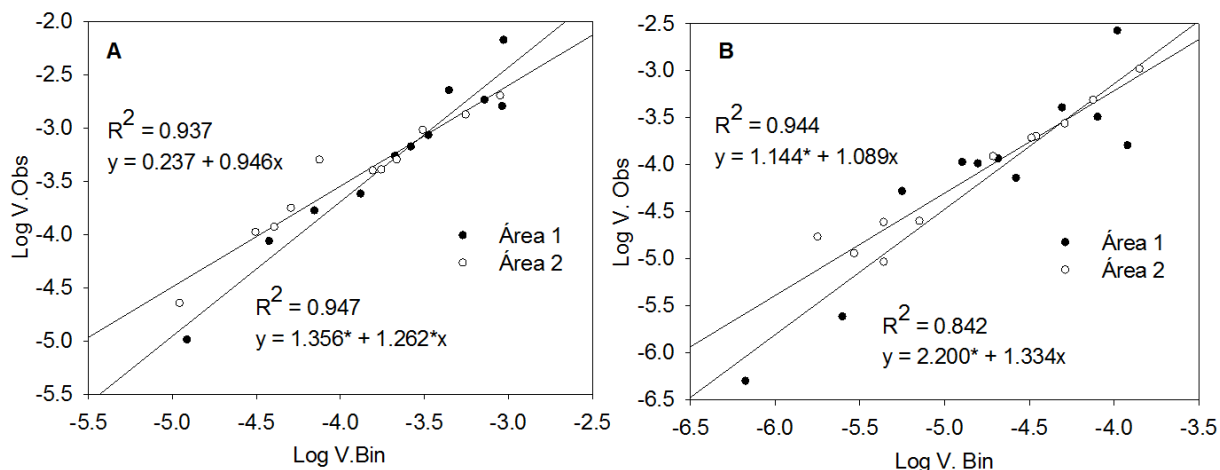


Figura 3 – Aplicação da lei de Taylor modificada. Relação entre o log (V_{obs}) (círculos) e o log (V_{bin}) (linha contínua) para área 1 e 2 tamanhos de *quadrat* 2x2 (A); e para área 1 e 2 tamanho de *quadrat* 3x3 (B).

DISCUSSÃO

Incidência da doença

A elevada incidência de plantas afetadas era esperada, pois foi neste município que se detectou o primeiro foco da CVC no Recôncavo da Bahia (Santos Filho et al. 2010). Os resultados deste trabalho não foram qualitativamente distintos dos observados no Litoral Norte da Bahia por Laranjeira et al. (2008). O autor reportou que as maiores médias de incidência estavam associadas a proximidades com focos iniciais da doença.

Neste trabalho não foi possível observar os períodos rápidos ou lentos do progresso da doença devido a elevada incidência das áreas analisadas. No entanto foi observada diferença no índice de doença entre as áreas. Essas diferenças podem estar associadas as características gerais das áreas. A área 2, na qual foi observado maior índice, não apresentava condições de manejo adequada, não era roçada constantemente, e o plantio era mais adensado. Para área 1 o agricultor

realizava o manejo das plantas constantemente, o controle de plantas invasoras era mantido, havia um maior espaçamento entre as plantas e diversidade de espécies vegetais entre as entrelinhas.

A incidência elevada da doença pode estar relacionada a diversos fatores. Dentre eles a presença constante dos vetores da bactéria nos pomares. Oliveira et al. (2014b), relataram a presença de quatro espécies de cigarrinhas transmissoras da CVC na área 1, dentre elas está *Acrogonia citrina* com 2,3% de eficiência de transmissão da CVC (Fundecitrus 2007). As condições climáticas favoráveis é outro fator preponderante que influencia a incidência de plantas doentes. A região do Recôncavo Baiano é caracterizada por chuvas bem distribuídas ao longo do ano, com umidade relativamente próxima de 90% e uma temperatura variando entre 21°C e 25°C (Embrapa/CNPMPF 2014).

Além disso, a utilização de mudas infectadas na formação do pomar pode ter contribuído significativamente para a disseminação da bactéria nos pomares. Casais et al. (2014), analisaram a diversidade haplotípica de *Xylella fastidiosa* no Estado da Bahia. Os autores observaram uma similaridade entre as populações do Recôncavo Sul, com amostras provenientes da área 1 estudada, e as amostras de São Paulo, dando indicativos que a introdução da bactéria nessa região pode ser decorrente da introdução a partir de mudas contaminadas do Estado de São Paulo e não da disseminação da bactéria existente na região do Litoral Norte (Laranjeira et al. 2008).

Destaca-se que o principal efeito negativo da CVC é a redução do tamanho da fruta cítrica. Além dessa alta incidência no pomar, observou-se que a maioria das plantas já apresentavam sintomas nos frutos, amadurecidos precocemente. Esses resultados corroboram com Oliveira et al. (2014a), que após realizarem um

levantamento fitossanitário da CVC na Bahia, relataram que a prevalência no município de Governador Mangabeira foi da ordem de 20% de plantas sintomáticas para amostragem de 1% da área plantada com citros.

Distribuição espacial da doença

Índice de dispersão (ID)

Considerou-se que valores de ID estatisticamente superiores a 1 ao nível de 5% de significância pelo teste X^2 , agregação de plantas sintomáticas, valores de ID significativamente iguais a 1 aleatoriedade, e valores de ID significativamente menores que 1 regularidade na distribuição da doença.

Foram observados valores de ID entre 1,4 e 2,0 nas duas áreas para todos os tamanhos de *quadrats*, apresentando um padrão levemente agregado. Para as duas áreas amostradas e os dois tamanhos de *quadrats*, não foram observados padrões de evolução de ID em função da incidência de plantas sintomáticas. No entanto, foi observada que a proporção de plantas afetadas em um mês foi a mesma em alguns meses (Tabela 2). O comportamento do padrão espacial da doença para área 1 pode ser explicado pela introdução da bactéria na região através de mudas contaminadas, como suposto por Casais et al. (2014).

Roberto et al. (2002), estudaram a análise espacial da CVC através da geoestatística, observaram um padrão agregado da doença para todos os tamanhos de *quadrats*. Sendo que, na primeira avaliação quando a incidência foi de 11%, considerou a distribuição espacial das plantas doentes como aleatório. No entanto, tal qual aqui, observou-se regularidade, para área 1, na quarta avaliação quando a incidência foi de 90% das plantas doentes (Tabela 2).

Resultados similares ao padrão de distribuição verificado no presente trabalho foram descritos por Laranjeira et al. (2000) ao fazerem uma análise preliminar da distribuição espacial da CVC, indicando agregação entre as plantas doentes. Mais tarde esse padrão entre as plantas doentes foi confirmado pelo mesmo autor (Laranjeira et al. 2004), avaliando a dinâmica espacial em três regiões de São Paulo, que considerou como levemente agregado.

Aplicação da Lei de Taylor modificada (LTM)

A aplicação da LTM caracteriza o arranjo espacial ao longo do tempo, testando interação entre plantas de uma mesma vizinhança. O parâmetro b da LTM funciona como um superíndice de dispersão, pois resume todos os dados dentro da regressão. O parâmetro A da LTM funciona como um índice de dispersão relacionado ao início da epidemia.

O ajuste a lei de Taylor pode ser considerado mais sensível que o cálculo do ID, uma vez que a agregação de todo o conjunto de dados é descrita pelo menor número de parâmetros (A e b). O emprego do parâmetro b , obtido pela aplicação da LTM, é considerado como um índice de agregação: quando $b > 1$ significativamente indicam agregação; quando $b = 1$, aleatoriedade; quando $b < 1$, regularidade. Apenas para área 1 no *quadrat 2x2* foram obtidos valores de b para a regressão denotando agregação. No entanto os valores A apresentaram-se maiores que 0 para todos os *quadrats*, exceto o *quadrat 2x2* da área 2, indicando que a agregação embora existente foi levemente agregada. Essa distribuição espacial denota que há uma interação entre plantas afetadas pela CVC de uma mesma vizinhança.

Os resultados aqui obtidos para a distribuição espacial da CVC, com aplicação da LTM não foram diferentes dos relatados por Laranjeira et al. (2004).

Esses autores constataram uma leve agregação das plantas doentes com CVC, independentemente do tamanho do *quadrat* amostrado para as três regiões estudadas do Estado de São Paulo (Noroeste, Centro e Sul).

Além disso, o padrão espacial não apresentou diferenças significativas entre as áreas avaliadas. Portanto, os resultados do Recôncavo não apresentaram diferença no padrão espacial da doença dos encontrados em outras regiões do Brasil.

REFERÊNCIAS

Bergamin Filho A & Amorim L, Hau B, Laranjeira FF (2007) Análise Espacial e Temporal de Epidemias de Patógenos de Solo. In: Poltronieri LS, Verzignassi JR (Eds.) Fitossanidade na Amazônia: inovações tecnológicas. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA. pp 17-36.

Casais VO, Patrocínio E, Oliveira SAS, Schnadelbach AS, Barbosa CJ, Barbosa LV (2014) Diversidade genética de *Xylella fastidiosa* em regiões produtoras de citros na Bahia. Pesquisa Agropecuária Brasileira 49:26-33.

Chatterjee S, Almeida RPP, Lindow S (2008) Living in two Worlds: The Plant and Insect Lifestyles of *Xylella fastidiosa*. Summa Phytopathologica 46: 243-271.

Chang CJ, Garnier M, Zreik L, Rosseti V, Bové JM (1993) Culture and serological detection of the xylem-limited bacterium causing citrus variegated chlorosis and its identification as a strain of *Xylella fastidiosa*. Current Microbiology 27: 137-142.

Embrapa/CNPMPF (2014) Dados meteorológicos. Estação meteorológica da Embrapa Mandioca e Fruticultura em Cruz das Almas – BA.

Fundecitrus (2015) Levantamento mostra que manejo aplicado para a CVC fez efeito, mas que parte dos citricultores estão deixando de erradicar o HLB. Revista Citricultor 31:8-11.

Girardi EA, Oliveira JRP, Silva ACM, Barbosa DHSG, Santos-Filho HP, Vilarinhos AD, Soares-Filho WS, Passos OS (2015) Atualização do diagnóstico sobre sistema de produção de mudas de citros no Recôncavo da Bahia. Documentos 213, Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, 64p.

Laranjeira FF, Gottwald TR, Amorim L, Berger RD, Bergamin Filho A (2000) Spatio-Temporal Dynamics of Citrus Variegated Chlorosis: A Preliminary Analysis. Fourteenth IOCV Conference, Insect-Transmitted Prokaryotes 223-231

Laranjeira FF, Pompeu Junior J (2002) Comportamento de quinze cultivares de laranja-doce afetadas pela clorose variegada dos citros. Laranja 23:401-411.

Laranjeira FF, Bergamin Filho A, Amorim L, Gottwald TR (2004) Dinâmica Espacial da clorose variegada dos citros em três regiões do Estado de São Paulo. Fitopatologia Brasileira 28:56-65.

Laranjeira FF, Bergamin Filho A, Amorim L, Vildoso Cia, Coletta Filho HD (2005) Fungos, procaríotos e doenças abióticas. In: Mattos Júnior D, Denegri Jd, Pio Rm, Pompeu Júnior J (Eds.) Citros. Instituto Agronômico and Fundag. pp. 629-654.

Laranjeira FF, Silva LG, Fonseca E, Silva SXB, Rocha JB, Santos Filho HP, Ledo CAS, Hau B (2008) Prevalence, incidence and distribution of citrus variegated chlorosis in Bahia, Brazil. Tropical Plant Pathology 33:339-347.

Lopes JRS, Beretta MJG, Harakava R, Almeida RPP, Krügnier R & Garcia JRA (1996) Confirmação da transmissão por cigarrinhas do agente causal da clorose variegada dos citros, *Xylella fastidiosa*. Fitopatologia Brasileira (resumo) 343-343.

Mendonça LA, Bearzoti E, Aquino LH, Ferreira DF (2004) Métodos de estimação por intervalo do coeficiente de correlação intraclasse, para dados com distribuição beta-binomial. Revista Matemática e Estatística 22:7-21.

Nunes WMC, Zanutto CA, Corazza-Nunes MJ, Molina RO (2006) Análise espaço-temporal da clorose variegada dos citros no Noroeste do Paraná, com uso de PCR para detecção de *Xylella fastidiosa*. Acta Scientiarum. Agronomy 28:421-425.

Oliveira AC, Vallim MA, Semighini CP, Araújo WL, Goldman GH, Machado MA (2002) Quantification of *Xylella fastidiosa* from Citrus Trees by Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay. Phytopathology 92:1048-1054.

Oliveira IS, Silva SXB, Cavalcante AKS, Nascimento AS (2014a) Status fitossanitário da Clorose Variegada dos Citros (CVC) na Bahia e perfil dos citricultores. Bahia Agrícola 9: 88-93.

Oliveira IS, Assis PD, Nascimento AS, Silva SXB, Azevedo Filho WS (2014b) Levantamento populacional de cigarrinhas (hemiptera: cicadelidae), associadas à transmissão de *xylella fastidiosa* em pomar de citros no Recôncavo da Bahia. Congresso Brasileiro de Fruticultura (resumo expandido).

Rossetti V, De Negri JD (2011) Clorose variegada dos citros - revisão. Laranja 32:61-66.

Roberto SR, Farias PRS, Bergamin Filho A (2002) Geostatistical analysis of spatial dynamics of Citrus Variegated Chlorosis. *Fitopatologia Brasileira* 27:599-604.

Santos Filho HP, Barbosa CJ, Laranjeira FF, Silva SXB (2010) Clorose variegada dos citros ameaça a citricultura do Recôncavo Sul. *Citros em Foco* 34. Cruz das Almas, Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz Almas BA, 2p.

Schaad NW, Postnikova E, Lacy Gn, Fatmi Chang CJ (2004) *Xylella fastidiosa* subspecies: *X. fastidiosa* subsp. *piercei*, subsp. nov., *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* subsp. nov., and *X. fastidiosa* subsp. *pauca* subsp. *Systematic and Applied Microbiology* 27:290-300.

Silva SX (2013) Relatório técnico de levantamento de pragas da citricultura. Salvador: Agencia Estadual de Defesa Agropecuária da Bahia 5p.

CAPÍTULO 3

Análise temporal da Clorose Variegada dos Citros no Recôncavo Baiano

Manuscrito a ser submetido à Revista Tropical Plant Pathology

RESUMO

SILVA, I. P. Análise temporal da Clorose Variegada dos Citros no Recôncavo Baiano.

A Clorose Variegada dos Citros (CVC) é uma das principais doenças de citros no Brasil, e está presente na Bahia. Causada por *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca*, veiculada por cigarrinhas, é caracterizada por clorose foliar e redução no tamanho dos frutos. O presente trabalho objetivou estudar o padrão temporal do patógeno, do hospedeiro e da doença no Recôncavo Sul da Bahia. Foram selecionadas duas áreas de laranja doce Pêra enxertada em limão cravo no município de Governador Mangabeira-BA. Determinaram-se a percentagem de ramos sintomáticos, ramos infectados (sintomáticos + assintomáticos), e número de brotações novas. Para tanto, foram marcadas ao acaso cinco plantas sintomáticas em cada área, e avaliadas mensalmente no período de abril de 2014 a abril de 2015. A detecção da bactéria foi feita por qPCR, utilizando-se os *primers* CVC-1 e CCSM-1 e sonda *TaqMan* específica. A maior expressão de sintomas ocorreu de maio a outubro com ciclos de três meses, que coincidiu com maior número de brotações. Não foi observado incremento na incidência de ramos infectados, apenas ciclos de três meses ao longo do ano. Esses ciclos podem estar relacionados às condições climáticas da região. Houve disponibilidade de inóculo e de biomassa hospedeira ao longo de todo o ano.

Palavras-chave: epidemiologia, disponibilidade de inóculo e hospederio, qPCR.

ABSTRACT

SILVA, I. P. Temporal analysis of Citrus Variegated Chlorosis in Reconcavo Baiano.

The Citrus Variegated Chlorosis (CVC) is a major citrus diseases in Brazil, and is present in Bahia. Caused by *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca*, conveyed by sharpshooters, it is characterized by leaf chlorosis and reduced fruit size. This study investigated the temporal pattern of the pathogen, host and disease in the Reconcavo South of Bahia. Two orchards of Pera sweet orange grafted on Rangpur lime were selected. The percentage of symptomatic branches infected branches (Asymptomatic + Symptomatic), and the number of new shoots were evaluated monthly in five randomly chosen symptomatic plants in each area. The detection of the bacteria was made by qPCR using the CVC-1 primers and CCSM-1 and specific TaqMan probe. The greatest expression of symptoms occurred from May to October with cycles of three months, which coincided with the largest number of shoots. There was no increasing trend in the incidence of infected branches, which had three-month cycles throughout the year. These cycles may be related to the climatic conditions of the region. There was inoculum and host biomass availability throughout the year.

Keywords: epidemiology, availability of inoculum and host, qPCR.

INTRODUÇÃO

A Bahia ocupa o segundo lugar na produção de frutas cítricas brasileiras, e a Clorose Variegada dos Citros (CVC), uma das principais doenças de citros, está disseminada no Estado, especialmente na região do Litoral Norte. No Brasil, as variedades de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) são as mais suscetíveis a *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* causadora da CVC (Laranjeira & Pompeu Junior, 2002; Shaad et al. 2004, Santos Filho et al. 2010).

A disseminação natural da bactéria nos pomares ocorre pela ação dos insetos vetores, cigarrinhas das famílias Cicadellidae e Cercopidae (Lopes et al. 1996), que se alimentam no xilema de mudas ou árvores cítricas infectadas (Miranda et al. 2008). Os sintomas mais característicos se manifestam nas folhas maduras, caracterizada por clorose foliar se estendendo para os ramos, e os frutos apresentam-se endurecidos com um tamanho reduzido (Laranjeira et al. 2005; Santos Filho et al. 2010; Rossetti e De Negri 2011).

Após 25 anos de convivência com a CVC avanços consideráveis foram obtidos, desde o primeiro relato no Estado de São Paulo em 1987 (Rossetti et al. 1990) e sua associação com a *Xylella fastidiosa* (Chang et al. 1993). Estudos epidemiológicos da CVC no estado de São Paulo revelaram aspectos importantes para o manejo como: variação da incidência e da severidade da CVC entre a região norte e sul devido as diferenças climáticas, sintomas nas plantas estão distribuídos de forma irregular, plantas sem irrigação apresentam maior incidência de ramos com sintomas que plantas irrigadas, aumento da incidência da CVC nas plantas em fase de desenvolvimento vegetativo (Roberto et al. 2002; Laranjeira et al. 2003a; Gonçalves et al. 2010; Gonçalves et al. 2014).

A citricultura na Bahia concentra sua produção, mais de 90%, no Litoral Norte e Recôncavo Sul (Girardi et al. 2015). A CVC foi descoberta na região do Litoral Norte em 1997 (Santos Filho et al. 1997) e na região sul do Recôncavo da Bahia em 2009 em pomares constituídos de laranja pera doce enxertada em limão cravo (Santos Filho et al. 2010). Segundo Laranjeira et al. (2008), que relataram uma alta incidência para o Litoral Norte, a ausência do controle da doença, o manejo inadequado dos viveiros, e o uso de grande quantidade de copa suscetível contribuíram para a presença e disseminação da CVC na região. Atualmente, a CVC no Litoral Norte está presente em 84% dos municípios da região e no Recôncavo Sul em 32% dos municípios (Silva 2013). Até o presente momento não foram relatados sintomas da CVC na Chapada Diamantina e no Oeste Baiano (Oliveira et al. 2014a).

A detecção confiável de *Xylella fastidiosa* é essencial para o acompanhamento da disseminação do patógeno. A técnica PCR em tempo real (qPCR) possibilita uma detecção do patógeno de modo mais acurado e rápido, mesmo em baixas concentrações do DNA alvo. No Brasil a detecção deste patógeno usando qPCR com *TaqMan* foi recentemente descrita por Oliveira et al. (2002). Os autores realizaram a quantificação da CVC avaliando a distribuição espacial e temporal da bactéria nos vasos do xilema de folhas de citros, utilizando iniciadores e sonda com base na sequência alvo. Após o ensaio concluíram que a técnica qPCR é simples, rápida e reprodutível para a detecção de *Xylella fastidiosa* e bem-sucedida para a quantificação das células bacterianas em tecidos de citrinos.

A realização de pesquisas extensivas na região do Recôncavo da Bahia permitirá conhecer a dinâmica temporal da doença na região, as principais fontes de inóculo, a proporção de plantas afetadas e a época de maior aparecimento de plantas doentes. Esse estudo possibilitará à tomada de medidas de controle

adequadas à citricultura da região, e ao seu nível tecnológico. O objetivo desse trabalho foi caracterizar a dinâmica temporal da CVC utilizando a técnica qPCR como ferramenta para detecção de *Xylella fastidiosa*, visando determinar as possíveis diferenças no padrão de disseminação da doença, em duas áreas no Recôncavo Sul da Bahia.

MATERIAL E MÉTODOS

Áreas

A avaliação foi realizada em duas áreas comerciais com CVC no município de Governador Mangabeira, Recôncavo Baiano. A variedade de citros estudada foi laranja 'Pêra' (*Citrus sinensis* L. Osbeck) enxertada em limão 'Cravo' (*Citrus limonia* Osbeck).

(i) Área 1, Fazenda Gravatá. Pomar com oito anos de idade ao iniciar o trabalho. O espaçamento de plantio das plantas de citros foi de 6m entre linhas e 4m entre plantas. A área era composta por 13 linhas de plantio, totalizando 331 plantas. O agricultor realizava o manejo integrado de plantas invasoras, mantinha a diversidade de espécies vegetais, roçava as entrelinhas, e o uso de herbicida era minimizado. Para essa área os vetores da bactéria foram quantificados por Oliveira et al. (2014b), e identificada as espécies.

(ii) Área 2, Fazenda Barruada. Pomar com sete anos de idade ao iniciar o trabalho. O espaçamento de plantio das plantas de citros foi de 4,80m entre linhas e 3,10m entre plantas. A área era composta por 10 linhas totalizando 221 plantas. O agricultor não mantinha os tratos culturais, durante o ano o mato prevalecia e poucas vezes a área era roçada. Em alguns meses eram observadas plantações de outras culturas entre as linhas de citros.

Avaliações

Para a realização da caracterização epidemiológica intra-plantas foram marcadas ao acaso cinco plantas com sintomas de CVC, nas duas áreas, após o primeiro mapeamento em abril de 2014. A análise foi feita por meio de três processos: estimativa da percentagem de ramos sintomáticos, estimativa da percentagem de ramos infectados (folhas sintomáticas + folhas assintomáticas positivas), e estudo da dinâmica de fluxos de brotação. Nos dois primeiros casos as avaliações foram mensais, enquanto que a dinâmica de fluxos de brotação foi realizada quinzenalmente (Laranjeira et al. 2003a; Nunes et al. 2006).

Estimativa da Percentagem de Ramos Sintomáticos

Das plantas marcadas de cada área foram retiradas ao acaso vinte folhas por mês, tomando-se o cuidado de se retirar apenas uma folha por ramo. Não houve direcionamento da coleta para folhas sintomáticas, de maneira que a amostragem fosse representativa, mas foram coletadas apenas folhas maduras com coloração típica. As folhas foram levadas ao laboratório e separadas em sintomáticas e assintomáticas, determinando-se assim $[(\text{número de folhas sintomáticas}/\text{número total de folhas}) * 100]$ a percentagem de ramos sintomáticos para cada planta, em cada área e cada mês (Laranjeira et al. 2003a).

Estimativa da Percentagem de Ramos Infectados

Para essa variável foram utilizadas as folhas assintomáticas separadas durante o processo de estimativa da percentagem de ramos sintomáticos. Cada uma das folhas representava uma amostra e seu pecíolo e nervura central foram picados manualmente com auxílio de bisturi, em fatias de 1 a 3 mm de espessura. Foi

pesado 35 mg do material e acondicionados em tubo de 2mL para realização de extração de DNA. A presença da bactéria foi determinada por qPCR, calculando-se então a proporção entre amostras positivas e negativas para cada uma das cinco plantas selecionadas, em cada área e cada avaliação. A estimativa do percentual de ramos infectados foi feita somando-se o número de folhas sintomáticas com o número de folhas assintomáticas positivas e dividindo-se o resultado pelo número total de folhas coletadas. A partir desses dados foram obtidas duas variáveis: Infecção em Folhas Assintomáticas e Infecção Total (Laranjeira et al. 2003).

Protocolo de extração de DNA de *Xylella fastidiosa*

A análise das amostras para detecção do patógeno foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA. O isolamento de DNA do material vegetal assintomático (laranja 'Pêra') foi realizado de acordo com o protocolo de extração de Murray e Thompson. (1980) (com adaptações) [Anexo A]. Para a confirmação da concentração do DNA, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio. Posteriormente foi realizado o teste de detecção da bactéria por qPCR.

Detecção de *Xylella fastidiosa* pela técnica de qPCR

Para detecção da bactéria *Xylella fastidiosa* através do qPCR foi utilizado 2 µl de DNA extraído no processo anterior. Dois iniciadores (*primers*) específicos de *Xylella fastidiosa* de citros foram utilizados. A sequência para o iniciador direto CVC-1 CIRev (5' AGA TGA AAA CAA TCA TGC AAA 3') foi desenvolvido por Pooler e Hartung (1995), e o iniciador inverso CCSM-1 CIFo (5' GCG CAT GCC AAG TCC ATA TTT 3') foi obtido por Oliveira et al. (2002). A sonda *Taqman* utilizada para

detectar o alvo foi a TAQCVC (6FAM) AAC CGC AGC AGA AGC CGC TCA TC (MGBNFQ) descrita pela primeira vez, com base na sequência alvo, por Oliveira et al. (2002), e tem a capacidade de detectar especificamente o DNA alvo.

Para as reações de amplificação foi preparado um Mix contendo um volume final de 13 μ L. Reações como controle negativo foram realizadas utilizando H₂O livre de nucleases como amostra. As condições da qPCR foram as seguintes: um ciclo inicial de 50 °C a 2 minutos de desnaturação; um ciclo de 95 °C a 10 minutos de desnaturação, 40 ciclo de amplificação de 95 °C a 15 s e extensão final de 60 °C a 1 m (Oliveira et al. 2002).

Dinâmica de Fluxos de Brotação

Para essa variável a avaliação ocorreu quinzenalmente. O número total de brotações foi contada nas plantas marcadas de cada área. Considerou-se como novas as brotações verde-claras com ramo de seção transversal ainda triangular.

Dados climáticos

Os dados foram obtidos na estação meteorológica da EMBRAPA/CNPMPF (2014), em Cruz das Almas, distante cerca de 15km das áreas monitoradas. Foram consideradas informações de precipitação, umidade relativa e temperatura média. As variáveis associadas a clima foram submetidas ao procedimento *Trend Subtract*, ajuste que permite eliminar tendências de aumento ou diminuição nos valores.

Análise Estatística

Análise de Autocorrelação para Séries Temporais

Uma série temporal é um conjunto de observações ordenadas no tempo e que apresentam uma dependência serial. A autocorrelação é a correlação entre observações de uma série temporal separadas por unidade de tempo t , ou seja, usada para detectar as possíveis tendências de curto prazo. As autocorrelações parciais foram calculadas até 6 *lags* (espaço de tempo entre as avaliações). Esta análise permite identificar como evolui a tendência da série, se existe ou não sazonalidade dentro do período de um ano (Morettin e Tolo, 2006; Barros, 2005).

Para essa análise, realizada no programa Statistica 7.0, foram utilizadas as seguintes séries em frequência mensal, para cada local: percentagem de ramos sintomáticos, percentagem de ramos assintomáticos infectados, percentagem total de ramos infectados e brotações novas.

Análise de Densidade Espectral de Séries Temporais

A análise de densidade espectral tem como objetivo explorar a periodicidade nos dados, apontando frequências de picos na série. Essa análise ajusta combinações de funções seno e cosseno às séries, onde os valores da série são consecutivos tomados em intervalos iguais. Por meio da análise dos picos das curvas são observadas em qual período de tempo o mesmo fenômeno se repete (Laranjeira et al. 2003a; Morettin e Tolo 2006).

Para eliminar as tendências de crescimento ou diminuição de valores e restar apenas a tendência cíclica foi aplicada a todas as séries a transformação *Trend Subtract*. As estimativas de densidade espectral foram suavizadas pela janela *Hamming* de largura 3.

A fim de analisar se existia alguma correlação entre as variáveis estudadas foram realizadas também as análises de densidade co-espectral. A análise compara as duas séries indicando qual frequência tem mais correlação, ou seja, se os ciclos são parecidos, e a sua coerência. Vale destacar que para essa análise consideraram-se significativas as correlações com coerência acima de 75%.

Para essas análises, em ambas as áreas, foram avaliadas as séries referentes a ramos sintomáticos, infecções assintomáticas, infecção total e brotações (Laranjeira et al. 2003a).

RESULTADOS

Padrão das variáveis

Para todas as variáveis aqui estudadas os resultados são demonstrados nos gráficos da figura 1. A percentagem de ramos sintomáticos mostrou uma tendência crescente no período de maio até outubro, seguido de um declínio no período de novembro a abril, para as duas áreas amostradas, porém com um pico em novembro para área 1 e outubro para área 2 (Figura 1A).

Para as infecções assintomáticas – infecções detectadas apenas em folhas que não manifestavam sintomas – a presença da bactéria foi confirmada através de qPCR. Em citros, o Ct correspondente para a detecção de *xylella fastidiosa* apresenta um limiar dentro de 40 ciclos de PCR (CT <40) (Oliveira et al. 2002). Neste trabalho os Ct_s (*cycle threshold*), ponto que determina a presença e ausência da bactéria na amostra, variaram entre 18 e 36. O padrão temporal dessa variável apresentou uma similaridade entre as duas áreas observadas. A evolução se deu com alternância de valores, foi observado um declínio entre os meses de junho a agosto, com picos em outubro e novembro (Figura 1B).

O gráfico do padrão temporal da infecção total descreve as infecções detectadas em folhas assintomáticas e folhas sintomáticas. A evolução de ramos infectados apresentou tendência de diminuição não linear nos valores, mas com altos e baixos em relação ao valor anterior, seguindo um padrão semelhante ao encontrado para os ramos sintomáticos, para as duas áreas amostradas (Figura 1C).

Para as brotações novas foram observados uma tendência a diminuição nos valores, para as duas áreas. No entanto a diminuição nos valores não ocorreu de maneira linear e sim com altos e baixos (Figura 1D).

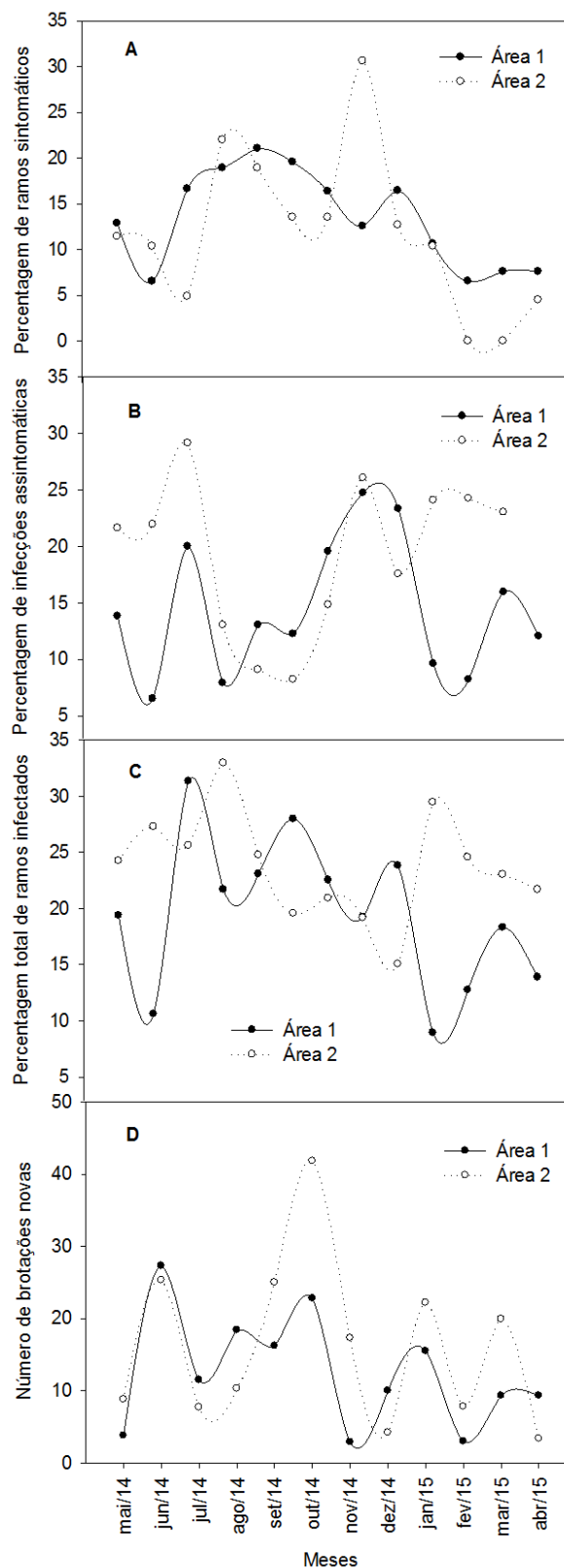


Figura 1 – Percentagem de ramos sintomáticos (A), infecções assintomáticos (B), total de ramos infectados (C) e brotações novas (D) em áreas do município de Governador Mangabeira-BA.

Com o objetivo de avaliar os possíveis padrões temporais das curvas foram feitas as análises de autocorrelação. Foram avaliadas as séries referentes a ramos sintomáticos, infecções assintomáticas, infecção total (sintomáticos + assintomáticos) e brotações. A autocorrelação aponta a influência dos valores de uma variável no intervalo de tempo t sobre os valores da mesma variável nos tempos $t + n$.

Na área 1 quando considerado a série ramos sintomáticos o *lag* 1 mostrou-se com correlação positiva significativa (0,572) (Figura 2A). Para área 2 não foram constadas autocorrelações significativas para nenhum *lag* (Figura 2B).

Na análise das séries temporais infecções assintomáticas não foram observadas autocorrelações significativas para nenhum *lag*, ou seja, os dados de um mês não têm correlação com os dados dos meses seguintes para ambas as áreas (Figura 2C e D).

A autocorrelação parcial das séries das infecções totais não foram constatadas autocorrelações significativas para nenhum *lag*. No entanto foi observada a existência de um padrão entre os meses na detecção de ramos infectados, para as duas áreas amostradas (Figura 3A e B).

O estudo das séries brotações os dados para *lag* 1 estão correlacionados negativamente com os dados do mês seguinte. Além disso, não foram observados autocorrelações significativas para nenhum *lag* em ambas as áreas amostradas (Figura 3C e D).

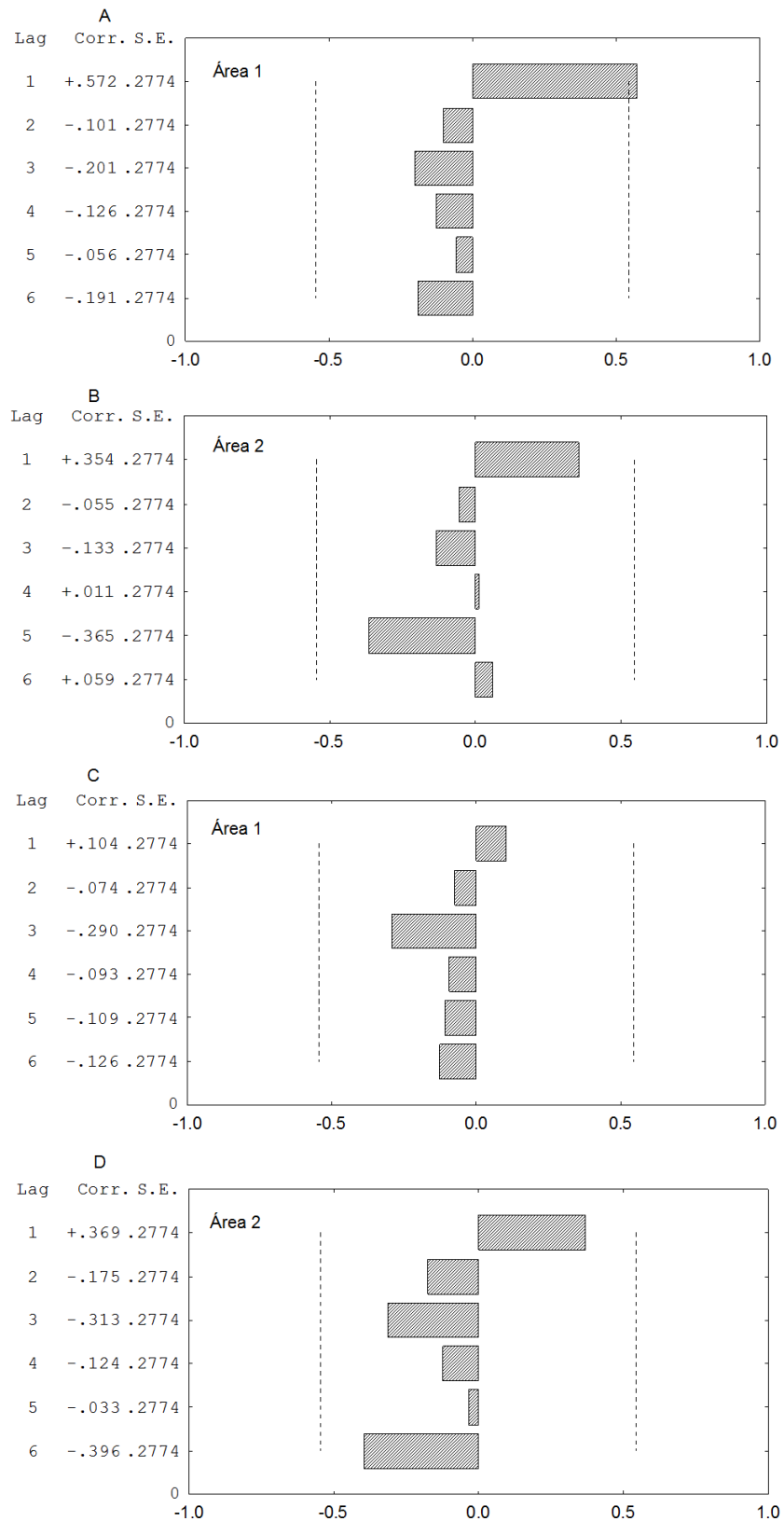


Figura 2 – Autocorrelação parcial para a série ramos sintomáticos (A e B) e infecções assintomáticas (C e D) em áreas do município de Governador Mangabeira-BA.

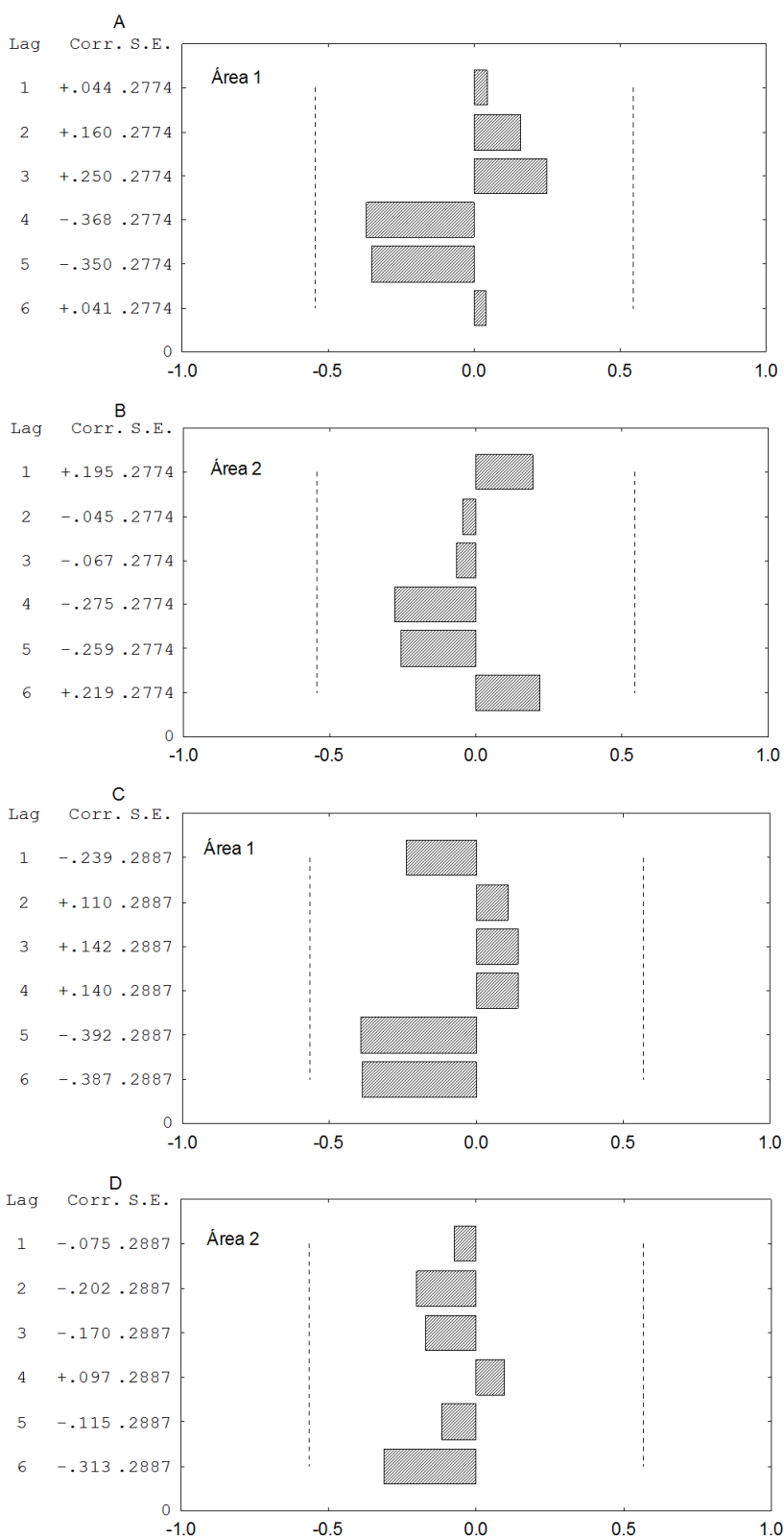


Figura 3 – Autocorrelação parcial para a série infecção total (A e B) e brotações novas (C e D) em áreas do município de Governador Mangabeira-BA.

Em geral para as análises de autocorrelação parcial, mesmo não sendo significativas as correlações, foi observado um padrão entre os meses. Esses padrões poderiam ser indicativos de ciclos ao longo do ano. A fim de confirmar essa observação foi realizada uma análise posterior, a análise de densidade espectral.

Em todas as análises os picos foram identificados por um número e a letra P, indicando o período ou intervalo de tempo em meses que ocorrem. Foram avaliadas as séries referentes a ramos sintomáticos, infecções assintomáticas, infecção total (ramos sintomáticos + assintomáticos) e brotações.

Na análise de densidade espectral referente a ramos sintomáticos para área 1 e 2 coincidiram apresentando um pico de 2P (Figura 4A). Quando consideradas as séries de infecções assintomáticas para área 1 foi observado um pico de 6P e para área 2, pico de 4P (Figura 4B). Para a série de infecção total à análise de densidade espectral em ambas as áreas foram observados picos de 3P (Figura 4C). Já para a análise da série de brotações foi detectado um pico de 6P para área 1 e um pico de 4P para área 2 (Figura 4D).

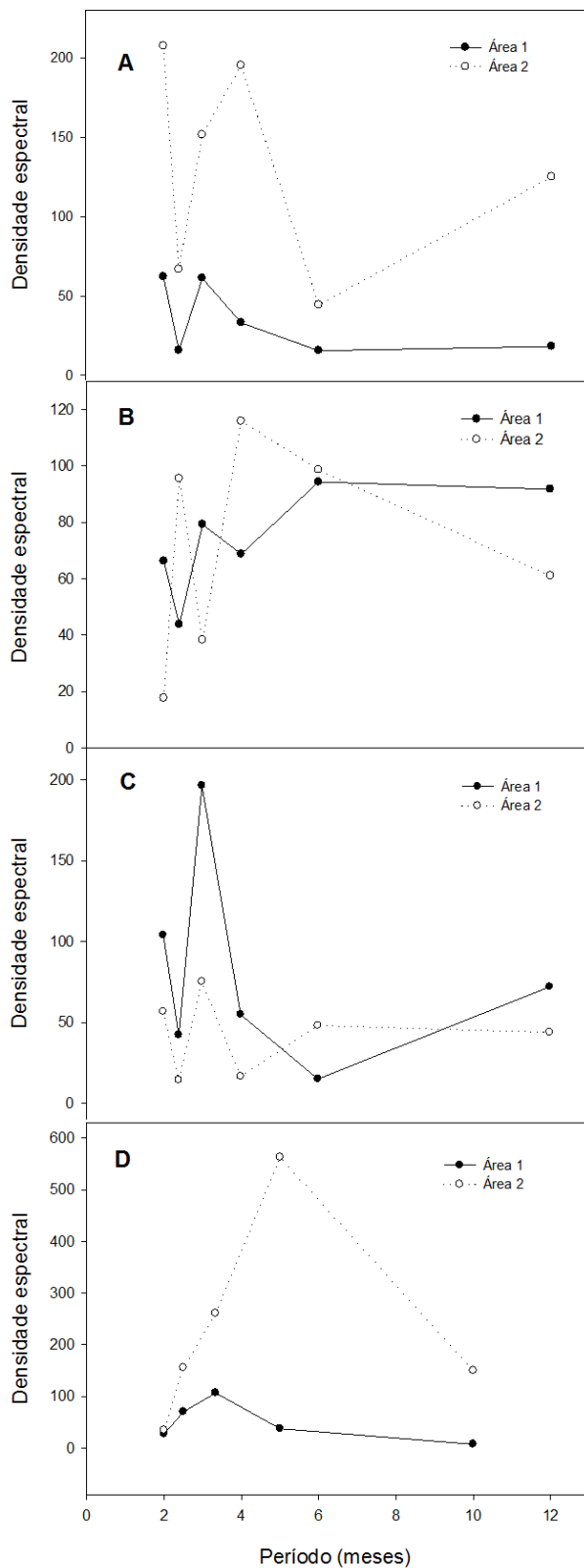


Figura 4 – Análise de densidade espectral para a série de ramos sintomáticos (A), infecções assintomáticos (B), infecção total (C) e brotações novas (D) em áreas do município de Governador Mangabeira-BA.

A análise de densidade espectral mostrou similaridade para ramos sintomáticos e infecção total entre as duas áreas. Assim, com o intuito de analisar se existia alguma correlação entre as variáveis estudadas foram realizadas também as análises de densidade co-espectral. Essa análise compara as duas séries indicando com qual frequência elas apresentam uma maior correlação. Na Tabela 1 encontram-se as correlações feitas entre as variáveis. Cada análise de correlação foi feita para as duas áreas.

A princípio correlacionaram-se as séries da área 1 com as mesmas séries da área 2. A análise buscou detectar se havia alguma relação na expressão de sintomas entre as áreas 1 e 2. Foi constatado que as duas séries têm ciclos de três meses, com uma coerência de 75% entre as curvas nesse período. No entanto, os ciclos estão defasados dois meses e meio, com expressão de sintomas da área 2 anterior à da área 1. Para as infecções assintomáticas foi observado que as séries tem ciclos de seis meses, mas não foram coerentes.

A correlação para a série de infecção total entre as áreas 1 e 2 apresentou ciclos de três meses em períodos diferentes, pois os ciclos estão defasados dois meses. Essa série pode ser relacionada com ciclos de detecção da bactéria na planta, com o período de detecção para a área 1 anterior ao da área 2. Essa relação foi altamente significativa com coerência de 94%.

Na análise da série de brotações entre as áreas 1 e 2 as duas tem ciclos coincidentes de três meses. Essa correlação foi altamente coerente com 92%, porém os ciclos estão defasados em cerca quinze dias, com emissão de brotações na área 1 anterior à da área 2.

Tabela 1 – Análise de Densidade Co-espectral entre as mesmas séries indicando com qual frequência tem maior correlação e a sua coerência.

Variáveis	Ciclos em meses	Coerência	Defasagem
Sintomas área 1 X Sintomas área 2	3	75%	2,5 meses
Assintomáticas área 1 X Assintomáticas área 2	6	–	15 dias
Infecção total área 1 X Infecção total área 2	3	94%	2 meses
Brotação área 1 X Brotação área 2	3	92%	15 dias

Após realizar a correlação entre as mesmas séries, porém de áreas distintas, foi feita a correlação entre série brotações e as demais variáveis da mesma área (Tabela 2).

A análise densidade co-espectral para a série brotações (variável independente) versus expressão de sintomas (variável dependente) apresentaram ciclos coincidentes de cinco meses para área 1, e ciclos coincidentes de dez meses para área 2, porém para nenhuma das áreas a correlação foi coerente.

A relação de brotações versus infecções assintomáticas para área 1 foram observados ciclos coincidentes de três meses, porém a correlação não foi coerente. Os ciclos apresentam-se defasados cerca de quase dois meses. Para área 2 a correlação entre as séries observou-se ciclos similares de cinco meses, com uma defasagem de quase cerca de um mês. Essa correlação apresentou uma coerência de 95%.

A análise de brotações versus infecção total foi observado ciclos coincidentes de dois meses e meio, sendo que os ciclos estão defasados dois meses para área 1. Essa relação apresentou uma coerência de 78%. Para área 2 os ciclos coincidem em cinco meses, porém a correlação não foi coerente.

Tabela 2 – Análise de Densidade Co-espectral entre duas séries diferentes indicando com qual frequência tem maior correlação e a sua coerência.

Área	Variáveis	Ciclos em meses	Coerência
1	Brotação x Expressão de Sintomas	5	-
2	Brotação x Expressão de Sintomas	10	-
1	Brotação X Infecções Assintomáticas	3	-
2	Brotações X Infecções Assintomáticas	5	95%
1	Brotações X Infecção Total	2,5	78%
2	Brotações X Infecção Total	5	-
1	Precipitação X Infecções Assintomáticas	2,5	94%
2	Precipitação X Infecções Assintomáticas	2,5	93%
1	Umidade Relativa X Brotações	2,5	94%
2	Umidade Relativa X Brotações	2,5	94%
1	Temperatura média X Expressão Sintomas	4	93%
2	Temperatura média X Sintomas	4	75%

Foram testadas também correlações entre dados climáticos (Figura 5). No entanto foram apresentados os resultados no qual coincidiam os períodos nas duas áreas (Tabela 2).

As análises para precipitação pluviométrica (variável independente) versus infecções assintomáticas (variável dependente) mostraram ciclos coincidentes de dois meses e meio em ambas às áreas, altamente coerentes com 94% para área 1 e 93% para área 2.

A densidade co-espectral para umidade relativa versus brotações também apresentaram ciclos coincidentes de dois meses e meio, com uma significância de 94% para ambas às áreas. Foi analisada também se o padrão das temperaturas médias estava correlacionado com os sintomas. Para essas variáveis observou ciclos similares de quatro meses com 93% de coerência para área 1 e 75% para área 2.

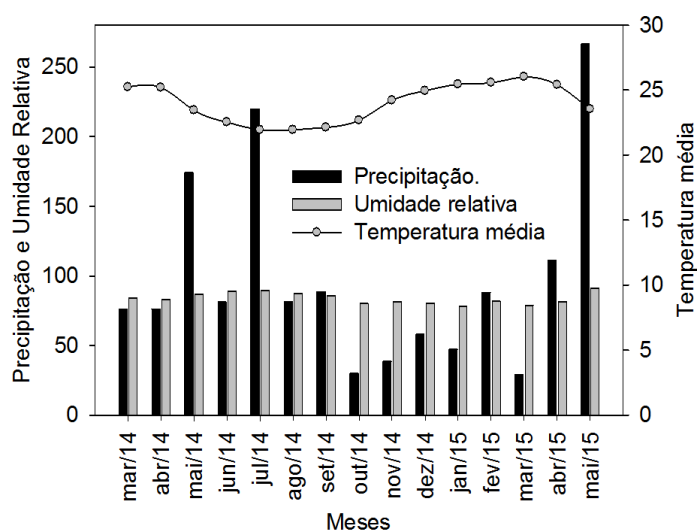


Figura 5 – Variações climáticas no período de avaliação da variável precipitação, umidade relativa e temperatura média dados obtidos na estação meteorológica da EMBRAPA /CNPMPF em Cruz das Almas – BA.

DISCUSSÃO

Padrão das variáveis

Os gráficos das variáveis estudadas apresentaram padrões semelhantes entre as duas áreas. A porcentagem de ramos sintomáticos para ambas as áreas observada ao longo do ano, embora com uma alternância de valores, indica que a expressão de sintomas é acentuada na região. Sendo que a área 2 mostrou valores maiores do que para área 1. Essa alternância nos valores foi observada conforme a estação do ano por Laranjeira et al (2003a), em três regiões do estado de São Paulo. No entanto, para região aqui estudada a hipótese sugerida é que essas características podem estar relacionadas com as condições climáticas favoráveis durante todo ano. As chuvas são bem distribuídas ao longo do ano, a região é caracterizada com umidade reativamente próxima de 90% e uma temperatura variando entre 21°C e 25°C (Embrapa/CNPMF 2014).

Haja vista que foi observado um declínio nos ramos sintomáticos de novembro a abril, com pico em outubro, esse declínio poderia estar relacionado com o aumento do número de brotações (Laranjeira et al 2003a). No entanto, a maior quantidade de brotações foi observada quando havia maior quantidade de ramos sintomáticos. Os resultados corroboram com os relatados por Laranjeira et al (2003a). De acordo com os autores, os sintomas da CVC são mais expressivos durante o período de setembro a março, correspondentes a primavera e o verão. Aqui foi observada maior expressão de sintomas de maio a outubro, bem como maior número de brotações.

Esses dados complementam as indagações de Laranjeira et al (2003a), referente a picos de incidência na primavera e verão, e vales no outono e inverno

relacionado as brotações. Assim, de maneira complementar, observa-se que a expressão de sintomas pode estar ligada com o clima de cada região.

Para as curvas de infecções assintomáticas (folhas assintomáticas positivas) foram observados alguns picos coincidentes com vales da proporção de ramos sintomáticos. Porém, com uma diminuição nos valores como consequência da incidência de ramos sintomáticos. Em ambas as áreas foram observadas variação nos valores com altos e baixos, que ocorreram no mesmo período ao longo do ano. Destaca-se que a proporção de ramos assintomáticos para área 2 foi sempre maior do que para área 1.

A infecção total contabiliza todas as infecções detectadas – folhas sintomáticas + folhas assintomáticas. Não foi observado incremento na incidência dos ramos infectados. Observa-se alternância nos valores com alguns picos coincidentes com as variáveis anteriores. A área 2 apresenta maior proporção de ramos infectados do que a área 1. Essa diferença pode ser explicada, não apenas pelas questões climáticas regionais, mas pelos fatores locais de cada propriedade.

Na área 2, para a qual foram observados maiores valores nas variáveis supramencionadas, as condições de manejo eram inadequadas, não era roçada constantemente, e as plantas eram mais condensadas. Para área 1 o agricultor realizava o manejo das plantas constantemente, o controle de plantas invasoras era mantido, havia um maior espaçamento entre as plantas e diversidade de espécies vegetais entre as entrelinhas.

Além disso, a alta incidência nas duas áreas e os valores altos para as variáveis de ramos sintomáticos e infecções assintomáticas podem estar associados a utilização de mudas infectadas na formação do pomar (Casais et al., 2014), uma vez que boas condições climáticas e plantas precocemente infectadas

apresentariam maior expressão de sintomas. Considerando as diferenças climáticas Laranjeira et al. (2003a), relataram que a maior expressão sintomas para região noroeste do estado de São Paulo estava associada a alta incidência de CVC na região. Segundo os autores a região sul apresentava maiores valores de infecções assintomáticas, levantando a hipótese que o alto nível de infecção poderia estar associado a utilização de mudas infectadas, e consequentemente associado a condições ambientais desfavoráveis à expressão de sintomas.

A emissão de brotações foi observada ao longo de todo ano com altos e baixos. Para tanto o maior fluxo de brotação foi observado nos períodos de maio a outubro. Esses resultados seguiram mesmo padrão observado por Laranjeira et al. (2003a), o aumento do número de brotações no inverno. O desenvolvimento das brotações sofre influência acentuada do clima, principalmente da temperatura e da umidade (Medina et al., 2005). A abundância de água, nutrientes e temperatura favorece a regularidade na emissão de novas brotações. Assim, os fluxos aqui observados ao longo de todo ano podem estar relacionados com os fatores climáticos da região.

Análise de Autocorrelação Parcial

A análise de autocorrelação parcial objetivou detectar os possíveis padrões temporais. Em geral as correlações não foram significativas. No entanto foi notado nos gráficos um padrão entre os meses. Esses dados mostraram que um dado valor de um mês tem influência no valor do mês seguinte, indicando a existência de ciclos ao longo do ano.

Análise de Densidade Espectral e Co-espectral

A análise de densidade espectral confirmou os padrões cíclicos ocorrendo em um determinado período de tempo observados na análise anterior. Na análise da série ramos sintomáticos para as duas áreas amostradas foram observados ciclos de dois meses. Esses ciclos para essa variável podem se relacionar aos ciclos de expressão de sintomas. Para as séries de infecções assintomáticas foram detectados ciclos semestrais para área 1, e para área 2, ciclos de quatro meses.

Quando consideradas as séries de infecção total as áreas apresentaram ciclos similares de três meses. Esses ciclos podem ser relacionados com o ciclo de multiplicação da bactéria dentro da planta, e implica que no Recôncavo da Bahia, a CVC apresenta diversos ciclos de infecção ao longo de um ano. Sendo que as condições climáticas são preponderantes para o aparecimento de sintomas, mesmo considerando que não se conhece com exatidão o período de incubação da bactéria (Laranjeira et al. 2003b). Para a série de brotações foram observados ciclos de seis meses para área 1 e para área 2 ciclos de quatro meses.

Para a região do Recôncavo Sul da Bahia os ciclos de dois e três meses, para as variáveis supramencionadas, diferem dos resultados encontrados por Laranjeira et al (2003a), que observaram ciclos semestrais e anuais. Os autores relataram que não encontraram um padrão cíclico na expressão de sintomas entre as regiões estudadas. Além disso, foi observado que a presença do patógeno em árvores assintomáticas é maior no sul do que no norte de São Paulo. Segundo eles a razão para essa diferença poderia estar relacionada com as condições climáticas regionais. A hipótese de Laranjeira et al. (2003a), foi confirmada por Gonçalves et al. (2014), que devido as diferenças climáticas a incidência e a severidade da CVC são mais elevadas na região norte de São Paulo do que na região sul.

Em geral foram observados ciclos coincidentes das mesmas variáveis entre as áreas estudadas. Assim, procedeu-se a análise co-espectral com o intuito de analisar se existia alguma correlação entre as variáveis e entre as áreas.

Ao correlacionar a série expressão de sintomas da área 1 com a mesma série da área 2, observou-se uma alta coerência, porém em períodos diferentes. Para a série infecções assintomáticas entre a área 1 e 2 não foi observada coerência. As séries infecções totais das áreas 1 e 2 foram coerentes com uma defasagem de dois meses. Para as brotações observou-se uma coerência entre as séries, porém com uma defasagem de 15 dias.

Para as séries que apresentaram coerência, porém em períodos diferentes, é provável que os fatores locais possam ser importantes para a expressão desses ciclos. Dentre eles o vigor da planta, manejo e conservação do solo, presença de plantas invasoras, a infiltração e o armazenamento de água no solo em níveis adequados para a cultura de citros, fatores que proporcionam a fertilidade e a produtividade ao longo do tempo (Azevedo 2014). As áreas estudadas apresentavam diferenças nesses fatores citados, os quais poderiam influenciar na defasagem dos ciclos.

Em citros a bactéria adere e coloniza o xilema, com a formação do biofilme que obstrui o transporte da seiva da raiz para a parte aérea. Gonçalves et al. (2014), ao analisar o desenvolvimento de sintomas da CVC em três níveis de irrigação na região norte de São Paulo, relataram que a irrigação reduziu sintomas da CVC em árvores, especialmente o número de frutos sintomáticos por árvore.

Considerando a análise entre série brotações e as demais variáveis da mesma área, apenas infecções assintomáticas e infecção total para área 2 apresentaram coerência. Esperava-se que houvesse correlação entre brotações e

sintomas, pois nas análises anteriores foi observado maior expressão de sintomas no mesmo período de emissão de brotações. Além disso, as brotações cítricas são local preferido de alimentação das cigarrinhas (Miranda et al. 2008). Esses resultados corroboram com os de Laranjeira et al. (2003a), que relataram a ausência de correlação entre brotações e expressão de sintomas.

Para as correlações entre dados climáticos, foram apresentados os resultados no qual coincidiam os períodos nas duas áreas. A correlação entre precipitação versus infecções assintomáticas foi coerente para ambas às áreas. A umidade relativa versus brotações também apresentou ciclos coincidentes e foram coerentes. E observou-se uma coerência entre a correlação de temperaturas médias versus sintomas.

Em geral os fatores ambientais, aspectos fisiológicos do hospedeiro e biologia do patógeno podem estar associados à periodicidade destes ciclos. Os dados climáticos indicam que o Recôncavo Baiano não apresenta longos períodos sem chuva, favorecendo a interação patógeno-hospedeiro nesse patossistema. O citros é uma planta perene, e os pomares sintomáticos atuam como importantes fontes de inóculo. Assim, a abundância de inóculo durante o ano, devido às condições climáticas favoráveis, e a presença do vetor na região favorece a disseminação da CVC para as áreas citrícolas indenens.

REFERÊNCIAS

Azevedo CLL. Produção Integrada de Citros: Tratos culturais (2007) Disponível em: sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Citros/CitrosBahia_2ed/tratoscultura.htm. Acessado em 10 de Janeiro, 2016.

Barros M (2005) Processos Estocásticos. 1ªEd. Introdução às Séries Temporais e aos Modelos Arima. Rio de Janeiro, RJ. Publit.

Casais VO, Patrocínio E, Oliveira SAS, Schnadelbach AS, Barbosa CJ, Barbosa LV (2014) Diversidade genética de *Xylella fastidiosa* em regiões produtoras de citros na Bahia. Pesquisa Agropecuária Brasileira 49:26-33.

Chang CJ, Garnier M, Zreik L, Rosseti V, Bové JM (1993) Culture and serological detection of the xylem-limited bacterium causing citrus variegated chlorosis and its identification as a strain of *Xylella fastidiosa*. Current Microbiology 27:137-142.

Embrapa/CNPMF (2014) Dados meteorológicos. Estação meteorológica da Embrapa Mandioca e Fruticultura em Cruz das Almas – BA.

Girardi EA, Oliveira JRP, Silva ACM, Barbosa DHSG, Santos-Filho HP, Vilarinhos AD, Soares-Filho WS, Passos OS (2015) Atualização do diagnóstico sobre sistema de produção de mudas de citros no Recôncavo da Bahia. Documentos 213, Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, 64p.

Gonçalves FP (2010) Progresso poliético e quantificação de danos da Clorose Variegada dos Citros em laranjeira 'Natal' submetidas a déficits hídricos. Tese doutorado, Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz, Piracicaba, SP.

Gonçalves FP, Stuchi ES, Lourenço SA, Kriss AB, Gottwald TR, Amorim L (2014) The effect of irrigation on development of citrus variegated chlorosis symptoms. Crop Protection 57:8-14.

Laranjeira FF, Pompeu Junior J (2002) Comportamento de quinze cultivares de laranja-doce afetadas pela clorose variegada dos citros. Laranja 23:401-411.

Laranjeira FF, Bergamin Filho A, Amorim L, Lopes JRS (2003a) Comportamento sazonal da clorose variegada dos citros em três regiões do Estado de São Paulo. *Fitopatologia Brasileira* 28:633-641.

Laranjeira FF, Bergamin Filho A, Amorim L, Berger R, Gottwald TR (2003b) Dinâmica temporal da clorose variegada dos citros em três regiões do Estado de São Paulo. *Fitopatologia Brasileira* 28:481-488.

Laranjeira FF, Bergamin Filho A, Amorim L, Vildoso Cia, Coletta Filho HD (2005) Fungos, procariotos e doenças abióticas. In: Mattos Júnior D, DeNegri JD, Pio Rm, Pompeu Júnior J (Eds.) Citros. Instituto Agronômico and Fundag. pp. 510-566.

Laranjeira FF, Silva LG, Fonseca E, Silva SXB, Rocha JB, Santos Filho HP, Ledo CAS, Hau B (2008) Prevalence, incidence and distribution of citrus variegated chlorosis in Bahia, Brazil. *Tropical Plant Pathology* 33:339-347.

Lopes JRS, Beretta MJG, Harakava R, Almeida RPP, Krügner R & Garcia JRA (1996) Confirmação da transmissão por cigarrinhas do agente causal da clorose variegada dos citros, *Xylella fastidiosa*. *Fitopatologia Brasileira* (resumo) 343- 343.

Miranda MP, Viola DN, Marques RN, Bonani JP, Lopes JRS (2008) Locais e período de alimentação da cigarrinha vetora de *Xylella fastidiosa*, *Bucephalagonia xanthophis* (berg) (hemiptera: cicadellidae), em mudas cítricas. *Fruticultura* 30:913-918.

Medina CL, Rena AB, Siqueira DLE, Machado EC (2005) Fisiologia dos citros. In: Mattos Júnior D, et al. (Ed.). Citros. Instituto Agronômico. Fundag pp.149-184.

Morettin PA, Toloí CMC (2006) Análise de Séries Temporais. 2ª ed. São Paulo, SP. Blücher.

Murray MG, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research 8:4321-4325.

Nunes WMC, Zanutto CA, Corazza-Nunes MJ, Molina RO (2006) Análise espaço-temporal da clorose variegada dos citros no Noroeste do Paraná, com uso de PCR para detecção de *Xylella fastidiosa*. Acta Scientiarum. Agronomy 28:421-425.

Nascimento S, Suarez ER, Pinhal MAS (2010) Tecnologia de PCR e RT-PCR em tempo real e suas aplicações na área médica. Revista Brasileira de Medicina 67:7-19.

Novais CM & Pires-Alves M (2004) PCR em tempo real: uma inovação tecnológica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento 33:10-13.

Oliveira AC, Vallim MA, Semighini CP, Araújo WL, Goldman GH, Machado MA (2002) Quantification of *Xylella fastidiosa* from Citrus Trees by Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay. Phytopathology 92:1048-1054.

Oliveira IS, Silva SXB, Cavalcante AKS, Nascimento AS (2014a) Status fitossanitário da Clorose Variegada dos Citros (CVC) na Bahia e perfil dos citricultores. Bahia Agrícola 9:88-93.

Oliveira IS, Assis PD, Nascimento AS, Silva SXB, Azevedo Filho WS (2014b) Levantamento populacional de cigarrinhas (hemiptera: cicadelidae), associadas à

transmissão de *Xylella fastidiosa* em pomar de citros no Recôncavo da Bahia. Congresso Brasileiro de Fruticultura (resumo expandido).

Pooler MR, Hartung JS (1995) Specific PCR detection and identification of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chlorosis. *Current Microbiology* 31:377-381.

Rossetti V, Garnier M, Bové JM, Beretta MJG, Teixeira AR, Quaggio JÁ, De Negri JD (1990) Présence de bactéries dans le xylème d'orangers atteints de chlorose variégée, une nouvelle maladie des agrumes au Brésil. *Academie Sciences* 310: 345-349.

Rossetti V, De Negri JD (2011) Clorose variegada dos citros - revisão. *Laranja* 32: 61-66.

Roberto SR, Farias PRS, Bergamin Filho A (2002) Geostatistical analysis of spatial dynamics of Citrus Variegated Chlorosis. *Fitopatologia Brasileira* 27:599-604.

Santos-Filho HP, Barbosa CJ, Meissner-Filho PE, Ribeiro JS, Santos JL, Matrangolo WJR, Miranda MP, Sodr e GS (1997) Ocorrência da clorose variegada dos citros em pomares do Estado da Bahia. *Fitopatologia Brasileira* 22:234-235.

Santos Filho HP, Barbosa CJ, Laranjeira FF, Silva SXB (2010) Clorose variegada dos citros ameaça a citricultura do Recôncavo Sul. *Citros em foco* 34, Cruz das Almas. Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz Almas BA 2p.

Schaad NW, Postnikova E, Lacy Gn, Fatmi Chang CJ (2004) *Xylella fastidiosa* subspecies: *X. fastidiosa* subsp. *piercei*, subsp. nov., *X. fastidiosa* subsp. *multiplex*

subsp. nov., and *X. fastidiosa* subsp. *pauca* subsp. Systematic and Applied Microbiology 27:290-300.

Silva SX (2013) Relatório técnico de levantamento de pragas da citricultura. Salvador: Agencia Estadual de Defesa Agropecuária da Bahia 5p.

CAPÍTULO 4

Avaliação da ocorrência de *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* no BAG de citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura em Cruz das Almas-BA

Manuscrito a ser submetido à Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira

RESUMO

SILVA, I. P. Avaliação da ocorrência de *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* no BAG de citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura em Cruz das Almas-BA.

O objetivo desse trabalho foi quantificar o risco de dispersão associado com material de propagação na região do Recôncavo Bahia, visando inferir a respeito da disponibilidade de inóculo da bactéria *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* e sobre o risco de disseminação da CVC na região. Para essa análise foi necessário definir a quantidade máxima de folhas para um maior teste da amostra *X. fastidiosa* subsp. *pauca* fosse positiva pela técnica de qPCR.. Os resultados indicam que é possível detectar o patógeno em amostras compostas artificialmente de até oito folhas quando apenas um delas está infectado. Todas as amostras testadas apresentaram-se positivas com Cts entre 26 e 33, independente da quantidade de folhas por amostra ou variedade cítrica. Após a otimização da técnica, a presença da bactéria *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* foi analisada por qPCR utilizando sete folhas por amostra composta. As amostras foram coletadas de plantas matrizes no banco germoplasma de citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Um total de 190 amostras de variedades diferente foram coletadas. Todas as amostras apresentaram resultado negativo para a presença do patógeno da CVC.

Termos para indexação: citros, CVC, biomassa hospedeira, mudas, qPCR.

ABSTRACT**SILVA, I. P. *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* occurrence evaluation in Embrapa Cassava and Fruits citrus germplasm bank in Cruz das Almas, Bahia**

The objective of this study was to quantify the risk of dispersion associated with propagation material in the Recôncavo region of Bahia, aiming to infer about the availability of inoculum of *X. fastidiosa* subsp. *pauca* bacteria and the risk of spread of CVC in the region. For this analysis it was necessary to determine the maximum number of leaves for a bulk sample test *X. fastidiosa* subsp. *pauca* positive by qPCR technique. The results indicated that it is possible to detect the pathogen in artificially constructed bulk samples of up to eight leaves when only one of them is infected. All tested constructed samples were positive with Cts between 26 and 33, regardless of the number of leaves per sample or citrus variety. After the technical optimization, the presence of *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* was analyzed by qPCR using seven leaves in the bulk samples. Samples were collected from the mother plants collection in the citrus germplasm bank of Embrapa Cassava and Fruits. A total of 190 samples of different varieties were collected. All samples were negative for the presence of the pathogen of CVC.

Index terms: citrus, CVC, host biomass, seedlings, qPCR.

INTRODUÇÃO

A cultura de citros se destaca como um dos principais produtos agrícolas da Bahia. Esse estado é o segundo maior produtor do Brasil, com produção concentrada no Litoral Norte (70% da produção estadual) e no recôncavo sul (20% da produção estadual). No Recôncavo da Bahia é expressiva a área cultivada, com 62.303 hectares (IBGE, 2014), a grande maioria dos produtores compreende agricultores familiares. Essa região destaca-se na produção tradicional de mudas de citros utilizadas no Estado e em outras regiões (Girardi et al., 2015).

A muda é o principal insumo de um pomar cítrico. Ao garantir a sua qualidade sanitária contribuirá com as medidas de controle da disseminação de doenças tais como a clorose variegada dos citros (CVC) para áreas indenens. Essa doença é ocasionada pela bactéria *Xylella fastidiosa*, que possui a capacidade de adesão e colonização dos vasos do xilema, com formação de biofilme que obstrui o transporte da seiva da raiz para a parte aérea (Chatterjee et al., 2008). É um dos principais patógenos que afetam os pomares de laranja doce no Brasil, veiculada por insetos da família Cicadellidae e Cercopidae. É caracterizada por clorose foliar e redução no tamanho dos frutos, que se tornam endurecidos e amadurecidos prematuramente, inadequados para o consumo (Santos filho et al., 2010).

A transmissão da bactéria via enxertia de borbulhas infectadas é um dos fatores que favorecem a disseminação da bactéria. Assim como a produção de mudas cítricas a céu aberto, ou seja, sem proteção dos telados antiafídeos (Coletta Filho & De Souza, 2014). No Recôncavo a grande maioria dos viveiristas utilizam sementes e borbulhas obtidas na própria propriedade ou na região do entorno do viveiro, e produzem mudas no chão e a céu aberto, empregando práticas culturais como enxertia por borbulhia (Girardi et al., 2015).

A Embrapa Mandioca e Fruticultura é responsável pela melhoria da qualidade genética e fitossanitária do material propagativo. Impedir um surto de CVC requer um diagnóstico sensível que permita a detecção precoce da bactéria. Assim é necessário avaliar periodicamente a presença da bactéria nas plantas básicas para o fornecimento de borbulhas, garantindo a sanidade do material

propagativo. Dentro desse contexto o objetivo desse trabalho foi verificar o risco de dispersão da bactéria *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* eventualmente associado ao material de propagação produzido pela Embrapa Mandioca e Fruticultura.

A análise das amostras para detecção do patógeno foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Mandioca e Fruticultura de Cruz das Almas, BA. Inicialmente foi necessário definir a quantidade máxima de folhas por amostra composta para que a presença da bactéria fosse positiva. Para o teste foram coletadas amostras de quatro variedades diferentes das plantas matrizes do BAG de citros da Embrapa Mandioca e fruticultura: Laranja Pera, Lima ácida Tahiti, Tangelos Page e Sincorá. De cada variedade separaram-se amostras compostas de 1, 2, 4, 5, 6, 7 e 8 folhas saudáveis, adicionando-se uma folha sintomática de uma planta infectada proveniente de um pomar cítrico da região com CVC. Para a composição das amostras foram retirados os pecíolos das folhas e picotado, obtendo um *pool* de 300mg (miligramas) para fazer a extração de DNA. As extrações foram realizadas de acordo com o protocolo desenvolvido Murray & Thompson. (1980) (com adaptações) [Anexo A]. Posteriormente foi realizado o teste de detecção da bactéria por qPCR.

Para detecção da bactéria em DNA extraído das plantas, utilizaram-se dois iniciadores (*primers*) específicos de *Xylella fastidiosa* de citros. A sequência para o iniciador direto CVC-1 CIRev (5' AGA TGA AAA CAA TCA TGC AAA 3') foi desenvolvido por Pooler & Hartung (1995), e o iniciador inverso CCSM-1 CIFo (5' GCG CAT GCC AAG TCC ATA TTT 3') foi obtido por Oliveira et al. (2002). A sonda *Taqman* utilizada para detectar o alvo foi a TAQCVC (6FAM) AAC CGC AGC AGA AGC CGC TCA TC (MGBNFQ) descrita pela primeira vez, com base na sequência alvo, por Oliveira et al. (2002), e tem a capacidade de detectar especificamente o DNA alvo. Para as reações de amplificação foi preparado um mix contendo 1,08 µl de cada primers; 0,54 µl da sonda *probe*; 6,75 µl da sonda *Taqman*; 2,0 µl do DNA alvo e completado com água MiliQ autoclavada a um volume final de 13 µL. Reações como controle negativo foram realizadas utilizando H₂O livre de nucleases como amostra. As condições da qPCR foram realizadas de acordo com Oliveira et al. (2002).

Após os resultados da otimização do protocolo de extração e do qPCR foi utilizado um *pool* de sete folhas nas análises das plantas matrizes do BAG de citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Para os testes foram amostradas 190 cultivares diferentes [Anexo B], as folhas foram coletadas nos diferentes quadrantes da planta e testadas para a presença de *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca*.

É possível detectar o patógeno em folhas assintomáticas coletando-se amostras compostas de até oito folhas. Em citros o Ct correspondente para a detecção da bactéria *xylella fastidiosa* apresenta um limiar dentro de 40 ciclos de PCR (CT <40) (Oliveira et al., 2002). Neste experimento, as amostras com um aumento no sinal fluorescente acima de um limiar pré-definido dentro de 37 ciclos de PCR foram consideradas positivas (CT < 37). Todas as amostras apresentaram-se positivas com Ct_s entre 25 e 33, independente da quantidade de folhas por amostra ou variedade cítrica (Tabela 1).

Tabela 1 – Valores de Ct (*cycle threshold*) obtidos para o teste de quantidade máxima de folhas por amostra na detecção da bactéria *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca*

Variação da quantidade de folhas	Valores de Ct			
	Laranja Pêra	Lima ácida Tahiti	Tangelo Page	Tangelo Sincorá
1	30,2	31,7	31,1	29,9
2	28,2	31,9	25,1	30,4
4	29,6	30,1	30,2	29,6
5	28,5	30,9	29,1	32,9
6	31,5	30,5	28,5	26,8
7	29,0	31,4	30,9	27,7
8	29,0	32,9	27,18	28,4
Controle	Indeterminado	–	–	–

De acordo com Pooler & Hartung (1995), a técnica PCR permite a detecção de *X. fastidiosa* em tecido de plantas tão pouco quanto 10-100 bactérias por reação de amplificação. Em plantas

assintomáticas de citros de 2 a 8 meses Oliveira et al. (2002), constataram através da técnica qPCR, que a população bacteriana aumenta de acordo com a idade da folha. Patógenos sistêmicos como *Xylella fastidiosa* podem estar presentes em plantas saudáveis e muitas vezes sobrevivem no hospedeiro sem sintomas.

Para o banco de plantas matrizes de citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura das 190 amostras de cultivares diferentes analisadas apresentaram resultado negativo para a presença de *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca*. Esse resultado negativo está de acordo com os estudos de Velame et al. (2011), que demonstraram, através da técnica de PCR convencional, que as plantas matrizes e mudas da borbulheira da Embrapa Mandioca e Fruticultura não estavam infectadas com CVC ou HLB (*Huanglongbing*).

Destacando a importância da citricultura na região, urge a necessidade de controle na produção e fornecimento de material propagativo com segurança fitossanitária. O diagnóstico da CVC nas mudas através dos sintomas visuais é inviável, uma vez que o período de incubação do patógeno é no mínimo de 6 meses até no máximo de 14 meses (Laranjeira et al., 2003).

A indexação de plantas pode ser feita através de vários métodos como detecção da presença do DNA/RNA do patógeno por reação em cadeia da polimerase (PCR), sorologia por ELISA, exame de amostras no microscópio eletrônico (Meissner Filho, 2010). Impedir um surto de CVC requer um diagnóstico sensível que permita a detecção precoce da bactéria. O método baseado na reação da polimerase em cadeia em tempo real (qPCR) é um método sensível e específico para detecção da bactéria. O qPCR possibilita a quantificação em tempo real do DNA amplificado, em cada ciclo de amplificação, utilizando iniciadores (*primers*) que irão reconhecer sequências específicas no DNA da bactéria *Xylella fastidiosa* (Nascimento et al., 2010).

O principal meio de disseminação da CVC é através de mudas cítricas contaminadas. As plantas infectadas mesmo sem apresentar qualquer sintoma são fontes de inóculo da bactéria. Recentemente um levantamento realizado pelo Fundecitrus (2015), relatou uma queda de 94% da incidência de CVC em plantas jovens. Os pesquisadores relataram que esses índices foram

alcançados devido a mudança no sistema de produção de mudas cítricas, que permitiu que as plantas fossem introduzidas mais saudáveis nos pomares.

A análise das plantas do matrizeiro da Embrapa Mandioca e Fruticultura via qPCR demonstrou ausência de produtos de amplificação ou sinal fluorescente em reações contendo o DNA gnômico para CVC. Dentro desse aspecto não há risco de dispersão associado a material de propagação proveniente do Banco de plantas matrizes de citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura.

REFERÊNCIAS

CHATTERJEE, S.; ALMEIDA, R.P.P.; LINDOW, S. Living in two Worlds: The Plant and Insect Lifestyles of *Xylella fastidiosa*. **Phytopathol.** v.46, p.243-271, 2008.

COLETTA-FILHO, H.D. & DE SOUZA, A.A. Avanços no conhecimento sobre a clorose variegada dos citros: uma abordagem sobre os diferentes componentes do patossistema. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v.35, p.19-33, 2014.

FUNDECITRUS. Levantamento mostra que manejo aplicado para a CVC fez efeito, mas que parte dos citricultores estão deixando de erradicar o HLB. **Citricultor**, v.7, p.8-11, 2015.

GIRARDI, E. A.; OLIVEIRA, J.R.P.; SILVA, A.C.M.; BARBOSA, D.H.S.G.; SANTOS-FILHO, H.P.; VILARINHOS, A.D.; SOARES-FILHO, W.S.; PASSOS, O.S. Atualização do diagnóstico sobre sistema de produção de mudas de citros no Recôncavo da Bahia. Embrapa Mandioca e Fruticultura Cruz das Almas - BA, **Documentos 213**, 2015.

IBGE. **Estado da Bahia: lavouras Permanentes**, 2014. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=mg&tema=lavourapermanente2014>>. Acesso em: 15 set. 2015.

LARANJEIRA, F.F.; BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L.; BERGER, R.; GOTTWAL, T.R.; Dinâmica temporal da clorose variegada dos citros em três regiões do Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, p.481-488, 2003.

MEISSNER-FILHO, P.E. **Indexação de plantas para viroses**. Agrosoft Brasil, 2010. Disponível em: <www.agrosoft.org.br/agropag/216397.htm>. Acesso em: 12 out. 2015.

OLIVEIRA, A.C.; VALLIM, M. A.; SEMIGHINI, C.P.; ARAÚJO, W.L.; GOLDMAN, G.H.; MACHADO, M.A. Quantification of *Xylella fastidiosa* from Citrus Trees by Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay. **Phytopathology**, v.92, p.1048-1054, 2002.

MURRAY, M. G.; THOMPSON, W. F.. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, v.8, p.4321-4325, 1980.

NASCIMENTO, S.; SUAREZ, E.R.; PINHAL, M.A.S. Tecnologia de PCR e RT-PCR em tempo real e suas aplicações na área médica. **Revista Brasileira de Medicina**, v.67, p.7-9, 2010.

POOLER, M. R.; HARTUNG, J. S. Specific PCR detection and identification of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chlorosis. **Current Microbiology**, v.31, p.377-381, 1995.

SANTOS FILHO, H.P.; BARBOSA, C.J.; LARANJEIRA, F.F.; SILVA, S.X.B. Clorose variegada dos citros ameaça a citricultura do Recôncavo Sul. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, **Citros em foco**, 34, p.2, 2010.

VELAME, K.V.C.; ABREU, E.F.M.; RORYZ, A.K.P.; ANDRADE, E.C.; PEREIRA, N.; BARBOSA, C.J. Diagnóstico molecular de bactérias sistêmicas dos citros na Embrapa Mandioca e Fruticultura. **5ª Jornada Científica** – Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas -BA, 2011.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A disseminação da Clorose Variegada dos Citros nos pomares do Recôncavo Baiano requer a atenção de autoridades competentes para a difusão de estratégias de manejo da praga ao agricultor. O padrão espacial das plantas afetadas não apresentou diferenças marcantes entre as áreas avaliadas, indicando em ambos os casos uma tendência à agregação. Esses resultados não apresentaram diferença dos encontrados em outras regiões do Brasil, podendo ser caracterizado como levemente agregado. A elevada incidência de plantas afetadas era esperada, pois foi neste município que se detectou o primeiro foco da CVC no Recôncavo da Bahia. Os resultados deste trabalho não foram qualitativamente distintos dos observados no Litoral Norte da Bahia.

Para o padrão temporal da doença observou-se que os ciclos coincidentes das variáveis ramos sintomáticos e brotações podem estar relacionados com os fatores locais de cada propriedade. Além disso, houve disponibilidade de inóculo e de biomassa hospedeira ao longo de todo o ano, o que requer a adoção de medidas de manejo integrado durante todo o ano.

Não há risco de dispersão associado a material de propagação proveniente das plantas matrizes do Banco Ativo de Germoplasma de citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura. No entanto observa-se ainda a produção de mudas a céu aberto na região, sem garantia fitossanitária. Dentro desse contexto, é necessário o incentivo, a viabilização por parte do governo aos pequenos agricultores para produção de mudas sadias protegidas por telados antiafídicos.

Apesar da maioria dos produtores da região do Recôncavo ser de agricultores familiares é necessário conscientizar os mesmos para a realização do manejo integrado das áreas afetadas. Para as regiões do Brasil que possuem a CVC, medidas como utilização de mudas sadias, controle do vetor e poda ou eliminação de plantas doentes foram suficientes para redução da CVC em 82% no índice de plantas contaminadas. Assim, faz-se necessária a criação um pacote de medidas para o Recôncavo Baiano, que apresenta baixas condições tecnológicas na produção de citros, para obter a redução do impacto da CVC e evitar a saída do produtor da citricultura.

ANEXO

ANEXO A – Protocolo de extração de DNA segundo Murray e Thompson (1980) (com adaptações)

1. Picotar 300mg (miligramas) de pecíolos ou nervura central de folhas e colocar em tubo de 2mL.
2. Adicionar 625 µL do Tampão 1 e em seguida adicionar 2 esferas de aço inox de 5mm.
3. Homogeneizar as amostras no macerador de tecidos “TissueLyser” utilizando a ciclagem: 2 ciclos de 3 minutos, a 30 hertz, cada.
4. Adicionar 725 µL do tampão 2 e misturar em agitador de tubos ou por inversão.
5. Incubar por 30 min a 60 C° em forno ou estufa (banho maria).
6. Centrifugar por 5 min a 10.000 RPM.
7. Transferir 600 µL do sobrenadante para um tubo de 1,5 mL.
8. Adicionar 500 µL de acetato de potássio 5M, agitar vigorosamente e incubar por 20 minutos em gelo.
9. Centrifugar por 10 minutos a 14.000 RPM e remover 900 µL do sobrenadante para um novo tubo de 1,5 mL.
10. Adicionar 600 µL de Álcool Isoproponal Absoluto gelado e homogeneizar por inversão.
11. Centrifugar 5 minutos a 13 RPM e descartar o sobrenadante.
12. Lavar o precipitado com 300 µL de etanol 70%.
13. Centrifugar por 5 minutos a 14.000 RPM e descartar o sobrenadante.
14. Secar o pelete em forno ou estufa a 37 C° por 15 minutos.
15. Dissolver o pelete em 30 µL de 1/10 TE/RNase.
16. Incubar por 30 minutos a 37 C° em forno estufa.

ANEXO B – Tabela das plantas básicas do matrizeiro da Embrapa Mandioca e Fruticultura.

NUMERAÇÃO	ESPÉCIE	NOME DA CULTIVAR	QUANTIDADE
PB 001	Laranja	Bahia 101	2
PB 002	Laranja	Baianinha 03	2
PB 003	Laranja	Salustiana	2
PB 004	Laranja	Lima	2
PB 005	Laranja	Rubi	2
PB 006	Laranja	Mel Rosa	2
PB 007	Laranja	Cara Cara	2
PB 008	Laranja	Aquiri	2
PB 009	Laranja	Barão	2
PB 010	Laranja	Jaffa = Shamouti	2
PB 011	Laranja	Kona	2
PB 012	Laranja	Lima Verde	2
PB 013	Laranja	Russas 01	2
PB 014	Laranja	Russas 02	2
PB 015	Laranja	Russas 03	2
PB 016	Laranja	Russas 04	2
PB 017	Laranja	Russas 05	2
PB 018	Laranja	Russas 06	2
PB 019	Laranja	Russas 07	1
PB 019 A	Laranja	Russas 08	1
PB 020	Laranja	Sanguínea	2

PB 021	Laranja	Sincorá	2
PB 022	Laranja	Sunstar	2
PB 023	Laranja	Hamilin 20	2
PB 024	Laranja	Natal 112	2
PB 025	Laranja	Pera D6	2
PB 026	Laranja	Pera D9	2
PB 027	Laranja	Pera B12	2
PB 028	Laranja	Pera C21	2
PB 029	Laranja	Pera B12	2
PB 030	Laranja	Pera D25	2
PB 031	Laranja	Pineapple	2
PB 032	Laranja	Cara Cara Variegada = Rubra Cara	2
PB 033	Laranja	Lima Sukkari	2
PB 034	Laranja	Westin	2
PB 035	Laranja	Flor	2
PB 036	Laranja	Valência Delta	2
PB 037	Laranja	Valência Tuxpan	2
PB 038	Laranja	Valência Miontemorelos	2
PB 039	Laranja	Folha Murcha	2
PB 040	Laranja	Valência Midknigth	2
PB 041	Laranja	Diva	2
PB 042	Laranja	Lui Gin Gong	2

PB 043	Laranja	Comum da GM	2
PB 044	Laranja	Hamilin 02	2
PB 045	Mexerica	Mexerica	2
PB 046	Híbrido (Clem. X Ponkan)	Fremont	2
PB 047	Tangerina	Ponkan	2
PB 048	Tangerina	Swatow	2
PB 049	Tangerina	Clemenules	2
PB 050	Tangerina	Dancy	2
PB 051	Tangerina	Sumb	1
PB 051 A	Tangor	Tangerina X Tangor Fallglo	1
PB 052	Tangor	BRS Salibe = Murcott CNPMF	1
PB 053	Tangor	Murcoti	2
PB 054	Tangor	Murcot Afure	2
PB 055	Tangelo	Mineola	2
PB 056	Tangelo	Nova	2
PB 057	Tangelo	Page	2
PB 058	Tangerina	Tangor BRS Piemonte	2
PB 059	Tangor	Ortanique	2
PB 060	Mexerica	Montenegrina	2
PB 061	Pomelo	Flame	2
PB 062	Lima Ácida	Malay Lemon	2

PB 063	Lima Ácida	Tahiti BRS Passos	2
PB 064	Lima Ácida	Tahiti Chapada	2
PB 065	Lima Ácida	Tahiti CNPMF 01	2
PB 066	Lima Ácida	Tahiti CNPMF 02	2
PB 067	Lima Ácida	Tahiti CNPMF 2000	2
PB 068	Lima Ácida	Tahiti CNPMF 2001	2
PB 069	Lima Ácida	Tahiti Bearss	2
PB 070	Lima Ácida	Tahiti Persian	2
PB 071	Lima Ácida	Tahiti CNPMF 5059	2
PB 072	Limão	Fino	2
PB 073	Lima	da Pérsia	2
PB 074	Lima	Doce de Umbigo	2
PB 075	Limão	Cravo Sta. Cruz	2
PB 076	Tangerina	Sunki Tropical	2
PB 077	Citrandarin	Indio	2
PB 078	Citrandarin	Riverside	2
PB 079	Citrandarin	San Diego	2
PB 080	Citrango	C 35	2
PB 081	Citrango	Troyer	2
PB 082	Citrumelo	Swingle	2
PB 083	Citrango	Rusk	2
PB 084	Limão	Galego	2
PB085	Tangerina	Cleopatra	2
PB 086	Limão	Rugoso	2

PB 087		SK x TR 001	2
PB 088		TSKC x CTSW 033	2
PB 089		LYK x L CR 038	2
PB 090		HTR 051	2
PB 091		TSKC x (L CR x TR) 059	2
PB 092		HTR 069	2
PB 093		TRKC x TRFD 003	2
PB 094		TRKC x CTSW 028	2
PB 095		TSKC x CTTR 002	1
PB 096		TSKC x CTSW 041	1
PB 097		TSKC x TRF 006	1