

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA MULTIINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA

DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE XYLELLA *FASTIDIOSA* EM POMARES
DE CITROS NO ESTADO DO AMAZONAS E EM SÃO PAULO

TATIANA DA COSTA JANSEN

Tese de Doutorado

MANAUS - AM

2007

TATIANA DA COSTA JANSEN

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE XYLELLA *FASTIDIOSA* EM POMARES
DE CITROS NO ESTADO DO AMAZONAS E EM SÃO PAULO**

Tese apresentada ao Programa Multi-
intistucional de Pós-graduação em
Biotecnologia da Universidade Federal do
Amazonas, como parte dos requisitos para a
obtenção do título de Doutor em Biotecnologia,
na área de concentração agroflorestal.

Orientador: Prof. Dr. José Odair Pereira
Co-orientador: Prof. Dr. Sílvio A. Lopes

MANAUS- AM

2007

TATIANA DA COSTA JANSEN

**CARACTERIZAÇÃO FITOPATOLÓGICA E MOLECULAR DE *XYLELLA*
FASTIDIOSA (WEELS) EM POMARES DE CITROS (*Citros Sinensis*) NO
ESTADO DO AMAZONAS**

Tese apresentada ao Programa Multi-intistucional de Pós-graduação em Biotecnologia, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, na área de concentração agroflorestal.

Aprovado em: 08 de setembro de 2008

Prof. Dr. José Odair Pereira
Orientador – (UFAM)

Dra. Jania Lilia da Silva Bentes
Membro – (UFAM)

Dr. José Ferreira da Silva
Membro – (UFAM)

Dra. Yamile Benaion Alencar
Membro – (INPA)

Dr. Rogério Eiji Hanada
Membro – (UNINORTE)

Ofereço *in memória* :

A minha avó Violeta, uma grande incentivadora da minha carreira um grande exemplo de vida para mim, sei que no jardim em que ela floresce, estará feliz pela realização deste trabalho.

DEDICATÓRIA

Á minha família, que me deu base para a minha formação ética, moral e profissional.

Ao Hércules, amigo fiel, nos dias e nas madrugadas durante a elaboração deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao Meu Senhor e Meu Deus, que nunca deixou que eu esquecesse o Salmo 23,: “O Senhor é Meu Pastor e Nada Me Faltará”.

Ao Prof. Dr. José Odair Pereira pela orientação e incentivo durante minha formação profissional.

Ao Prof. Dr. Silvio Aparecido Lopes pela co-orientação e por me mostrar o incrível mundo da fitopatologia.

Á Prof.(a) Dra. Suzelei de Castro França da Universidade de Ribeirão Preto, pela longa estadia nos laboratórios da UNAERP, e por ter me ensinado a fazer ciência.

A Dra. Yamile Benaion Alencar, do Instituto Nacional de Pesquisas do Amazonas, por ter se mostrado muito mais que uma amiga, mas que uma parceira de trabalho, mais que um suporte para o desenvolvimento de minha pesquisa, uma pessoa que presa pelo “Saber Científico”.

A Prof. Msc. Simone Zampolo Torres pela amizade sincera, pelos conselhos, pelas críticas verdadeiras, pela companhia nos experimentos de inoculação e por me ensinar a cultivar a *Xylella fastidiosa*.

As Profs.Mscs. Alessandra Garcia e Patrícia G. Roberto da (UNAERP) pela colaboração nos experimentos de campo e biologia molecular e pela enorme amizade que se firmou ao longo destes anos.

Ao Vanderlei pela ajuda no plantio das mudas de citros, confecção dos caixilhos e a companhia nos experimentos de campo e em casa de vegetação.

Ao pessoal do FUNDECITROS, principalmente ao Marcão Café e contribuíram muito para meu trabalho no interior de São Paulo.

A Msc. Quezia Ribeiro pela companhia nas coletas no estado do Amazonas.

Ao Prof. José Ferreira (UFAM) pelo apoio nas análises estatísticas deste trabalho.

Aos amigos Paulo Sérgio Pereira, Vanuza, Sônia, Marquinhos e Roberta, que durante todos os anos que morei em Ribeirão Preto me fizeram sentir parte de sua família.

A Prof.Msc.Taciana Coutinho e Msc. Lucina Malinsky (Uninorte), pela amizade e ajuda na montagem da apresentação da tese.

Á Família Caetano pela amizade e os almoços de Domingo em Ribeirão Preto.

A minha grande amiga Dra. Erica Levy pela enorme amizade e incentivo á mim e a minha carreira.

A minha maravilhosa mãe, quem sem ela, eu nada seria e não teria tido todo o apoio logístico, para a confecção desta tese.

Ao Dr. Carlos André Gastão de Araújo (Doc) pela inspiração e incentivo para conclusão desta tese.

Á todos aqueles que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho.

EPÍGRAFE

“Não é o desafio que define quem somos, nem o que somos capazes de ser, mas a forma como o enfrentamos, poderá incendiar ruínas ou construir passo a passo, um caminho que nos leve à liberdade.”

RESUMO

A Clorose Variegada do Citros (CVC) popularmente conhecida como amarelinho é uma doença que vem atacando os pomares brasileiros desde 1987, tendo como agente causal a bactéria *Xylella fastidiosa* que coloniza os vasos xilemáticos principalmente das laranjas doces (*Citros sinensis*). A doença apresenta grande incidência principalmente nas regiões norte, nordeste do estado de São Paulo e triangulo mineiro, regiões de clima quente onde a bactéria apresenta maiores condições de crescimento nos vasos xilemáticos. Foram isoladas cepas de *X. fastidiosa* de treze municípios entre São Paulo e Minas Gerais. As cepas de *X. fastidiosa* foram inoculadas em *seedlings* em casa de vegetação onde verificou-se diferenças na sintomatologia das plantas e na virulência bacteriana. Dentre as cepas inoculadas as dos municípios de Neves Paulista, Matão e Jeriquara apresentaram maior freqüência de sintomas, já o município de Capela do alto, sul do estado de São Paulo apresentou a menor. A CVC já foi detectada em vários estados brasileiros, mas nenhum relato da ocorrência da CVC havia sido feito para o estado do Amazonas, onde a cultura do citros vem sendo explorada comercialmente por pelo menos três décadas. Uma avaliação amostral foi realizada em Manaus, Presidente Figueiredo, Itacoatiara e Rio Preto da Eva, no período de agosto a dezembro de 2003, março a dezembro de 2004 e 2005 e janeiro a março de 2006. Foram observados sintomas de CVC em folhas, como, manchas cloróticas dispostas na parte anterior das folhas e lesões cor palha na parte posterior. Coletaram-se 10 folhas de cada planta para o isolamento da bactéria, extração de DNA e PCR específico, para a identificação e confirmação da ocorrência do patógeno. Foram encontrados sintomas de CVC em várias localidades do estado do Amazonas, Manaus, Presidente Figueiredo e Rio Preto da Eva, as amostram sintomáticas foram confirmadas por PCR e através do isolamento da bactéria *X. fastidiosa*. De acordo com os resultados apresentados foi possível detectarmos a ocorrência de CVC nos pomares de citros do estado do Amazonas.

ABSTRACT

The Chlorosis Variegad of Citrus (CVC) popularly known as small yealow is a disease that is attacking the Brazilian orchards since 1987, with the causal agent the bacterium *Xylella fastidiosa* that colonizes the xilematic vessels mainly of sweet oranges (*Citrus sinensis*). In the states of São Paulo and Minas Gerais the disease has great impact especially in the north, northeastern state of Sao Paulo and Minas Gerais triangle, regions of warm climate where the bacteria presents major conditions for growth in xilematic vessels. There were isolated strains of *X. fastidiosa* of thirteen municipalities between Sao Paulo and Minas Gerais. The strains of *X. fastidiosa* in seedlings were inoculated in a greenhouse where there are differences in symptoms of plants and bacterial virulence. Among those inoculated strains of the municipalities Neves Paulista, Matão, Jeriquara and had greater frequency of symptoms, since the municipality Capela do Alto, southern state of São Paulo had the lowest frequency of symptoms. The CVC has been detected in several Brazilian states, but no reports of the occurrence of CVC had been done to the state of Amazonas, where the cultivation of citrus is being commercially exploited by at least three decades. An evaluation sample was held in Manaus, Presidente Figueiredo, Itacoatiara, Balbina and Rio Preto da Eva, in the period August to December 2003, March to December 2004 and 2005 and January to March 2006. Were observed symptoms of CVC in sheets, as chlorotic spots arranged in front of leaves and straw color injuries in the back. Collected up 10 leafs of each plant for the isolation of the bacterium, extracting DNA and PCR specific for the identification and confirmation of the occurrence of the pathogen. According to the results presented were unable to detect the occurrence of CVC of citrus orchards in the state of Amazonas.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I

Figura 1.1 - Mapa dos Municípios visitados no estado de São Paulo

Figura 1.2 - Escala diagramática descrita por Amorin *et al.* (1993) utilizada para a quantificação dos sintomas foliares.

Figura 1.3 - Planta com sintoma de CVC nível I, folhas sintomáticas, com manchas cloróticas.

Figura 1.4 - Ramos sintomático, marcado com tinta vermelha para acompanhar a progressão da doença no campo.

Figura 1.5 - Planta com sintomas de CVC em nível II, com lesões cloróticas e frutos pequenos.

Figura 1.6 - Planta com sintomas de CVC com nível III, com lesões cloróticas, frutos pequenos e desfolha na copa da árvore.

Figura 1.7 - Placa de Petri contendo o meio PCYE apresentando colônias de *X. fastidiosa* proveniente da fazenda Jamaica, município de Araraquara, (Localizada a noroeste do estado de São Paulo).

Figura 1.8 - Frequência de bactérias isoladas e cultivadas em meio de cultura PCYE a partir de diferentes regiões visitadas no estado de São Paulo.

Figura 1.9 - Plântulas de citros, inoculados com *X. fastidiosa*, utilizados para verificar a progressão de sintomas de CVC em casa de vegetação.

Figura 1.10 – Inoculação de *X. fastidiosa* por meio do método *pin prick*, de citros.

Figura 1.11 – Caixilho de isopor com plântulas de citros, inoculadas com *X. fastidiosa*, manifestando sintomas de CVC (A) e plântulas de citros com manchas cloróticas sintomas foliares característicos de CVC.

Figura 1.12 – Caixilho contendo plântulas de tabaco *Cleveland* inoculadas com cepas de *Xylella fastidiosa* de vários municípios do estado de São Paulo.

Figura 1.13 - Caixilho contendo plântulas de tabaco *Cleveland* inoculadas com cepas de *Xylella fastidiosa* manifestando sintomas de CVC.

Figura 1.14 – Freqüência do número de isolados de *X. fastidiosa* (UFC x10⁵), de caule e folhas em diferentes distâncias do ponto de inoculação.

Figura 1.15 - Período de incubação (dias) em plântulas de citros (*Citros sinensis*) de cepas de *X. fastidiosa* originadas de vários municípios do estado de São Paulo.

Figura 1.16 - Freqüência de sintomas de CVC em plântulas de citros (*Citros sinensis*) inoculados com *X. fastidiosa* originadas de várias localidades do estado de São Paulo.

Figura 1.17 – Variação da percentagem de sintomas foliares, presentes nas plântulas inoculadas com *X. fastidiosa* originadas de vários dos municípios do estado de São Paulo no período de 2003 a 2005.

CAPÍTULO II

Figura 2.1 - Mapa de parte do Estado do Amazonas mostrando em círculos vermelhos, os locais onde foram realizadas as coletas.

Figura 2.2 - Vista geral do pomar da fazenda Ábila Mady situada a entre Manaus e Itacoatiara

Figura 2.3 -. Vista do sítio Braga Filho, situada na rodovia Br 172 no km179 ramal do paulista, no município de Presidente Figueiredo - AM.

Figura 2.4 – Pomar de citros na fazenda Nova Esperança localizada no município de Itacoatiara – AM.

Figura 2.5– Vista do pomar da fazenda Jiquitaia situada no município de Rio Preto da Eva – AM.

Figura 2.6 – Face Abaxial da folha de laranja com manchas cloróticas, sintomas característicos de CVC.

Figura 2.7 – Face adaxial da folha de citros (*citros sinensis*). (A) Sintomas característicos de CVC, necrose foliar (bolhas de goma). (B) Necrose foliar.

Figura 2.8 – Variedades plantadas de citros (*Citros sinensis*) nos municípios visitados no estado do Amazonas.

Figura 2.9 – Isolamento em Placa de Petri contendo a bactéria *X. fastidiosa*, isolada de folhas sintomáticas de CVC, em meio de cultura PCYE, de amostras do sítio Brejo do Matão Km 14 da Br 174 (Presidente Figueiredo - AM).

Figura 2.10 – *X. fastidiosa*, isolada de folhas com sintoma de CVC, em meio de cultura PCYE, de amostras do sítio Dalva Andréa Km 58 Br 165 (Manaus - AM).

Figura 2.11 – Percentual do número de isolados de *Xylella fastidiosa* encontradas em amostras foliares, coletadas nos municípios avaliados no estado do Amazonas.

CAPÍTULO III

Figura 3.1 - Gel de eletroforese contendo as amostras de PCR (Polimerase Chain Reaction) dos seguintes pontos de coleta: no estado do Amazonas: Sítio Dalva Andréia (1); Fazenda Água Santa Claudia (2); Sítio Repouso da Pantera (3); Sítio Brejo do Matão (4); Sítio Nossa Senhora de Nazaré (5); Sítio da Gloria (6) e Sítio 1km 48 da rodovia Manaus - Rio Preto da Eva (7). Todas as amostras foram positivas para identificação de *Xylella fastidiosa*, agente causal da CVC. Na amostra (X0) foi utilizado o DNA da bactéria 9A5C (Controle positivo), na amostra (M) foi

utilizado um marcador molecular de 1Kb e na amostra (N) foi aplicado um controle negativo apenas com água.

Figura 3.2 - Gel de eletroforese contendo as amostras de PCR (Polimerase Chain Reaction) dos seguintes pontos de coleta do estado de São Paulo: (1) Jeriquara; (2) Capela do Alto; (3) Frutal; (4) Pratânea; (5) Alambari; (8) Araraquara; (9) Neves Paulista; (10) Novo Horizonte; (11) Araras; (12) Comendador Gomes; (13) Itápolis; (14) Matão; (15) Macaubal; onde mostraram-se positivas a identificação de *Xylella fastidiosa*, agente causal da CVC. (16) controle negativo e (17) Xo controle positivo.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1.1 - Fazendas e sítios com pomares de citros com sintomas de CVC em municípios visitados no estado de São Paulo.

Tabela 1.2 – Valores médios atribuídos a severidade de CVC em pomares dos municípios do estado de São Paulo

Tabela 1.3 – Tabela com número de plântulas de citros inoculadas com *Xylella fastidiosa*, número de plantas com sintomas de CVC, número de plantas controle e número de colônias de *X. fastidiosa* re-isoladas.

Tabela 1.4 – Tabela com número de plântulas de tabaco *Cleveland* inoculadas com *Xylella fastidiosa*, número de plântulas com sintomas de CVC, número de plântulas inoculadas com PBS usadas como controle negativo e número de bactérias isoladas de plantas sintomáticas.

CAPÍTULO II

Tabela 2.1 - Locais de coleta, variedades, idades das plantas estudadas, números total de plantas e número de plantas com sintomas de CVC no município de Manaus – AM.

Tabela 2.2 - Locais de coleta, variedades, idades das plantas estudadas, números total de plantas e número de plantas com sintomas de CVC no m Preto da Eva - AM.

Tabela 2.3 - Locais de coleta, variedades, idades das plantas estudadas, números total de plantas e número de plantas com sintomas de CVC no município de Presidente Figueiredo - AM.

Tabela 2.4 - Locais de coleta, variedades, idades das plantas estudadas, números total de plantas e número de plantas com sintomas de CVC no município de Itacoatiara - AM.

Tabela 2.5 - Análise de variância das notas atribuídas às idades das plantas de citros em função dos municípios no estado do Amazonas.

Tabela 2.6 - Análise de variância de notas atribuídas a severidades de CVC em plantas de citros em função dos municípios no estado do Amazonas.

Tabela 2.7 - Valores médios, em porcentagem, de notas atribuídas a incidência de CVC em plantas de citros em função dos municípios no estado do Amazonas.

Tabela 2.8 - Comparações de médias pelo teste t, de locais e notas atribuídas á plantas de citros em municípios dos estados de São Paulo e do Amazonas.

CAPÍTULO III

Tabela 3.1 - Lista de *Primers*, seqüências, temperatura de anelamento e tamanho do produto de PCR.

Tabela 3.2 – Propriedades rurais plantas com sintomas de CVC presentes no município de Manaus, número de amostras coletadas, número de amostras em meio de cultura e número de amostras detectadas por PCR.

Tabela 3.3 - Propriedades rurais com plantas com sintomas de CVC presentes no município de Rio Preto da Eva, número de amostras coletadas, número em meio de cultura e número de amostras detectadas por PCR.

Tabela 3.4 – Propriedades rurais com plantas com sintomas de CVC presentes no município de Presidente Figueiredo, número de amostras coletadas, número de amostras em meio de cultura e número de amostras detectadas por PCR.

Tabela 3.5 – Propriedades rurais com plantas com sintomas de CVC presentes no município de Itacoatiara, número de amostras coletadas, número de amostras em meio de cultura e número de amostras detectadas por PCR.

Sumário

| | |
|---|----|
| 2. Revisão de Literatura | 21 |
| 2.1 Histórico da CVC no Brasil | 21 |
| 2.2 Sintomatologia da CVC | 22 |
| 2.3 Mecanismo de ação da Bactéria | 23 |
| 2.4 Vetores | 24 |
| 2.5 Plantas Hospedeiras | 26 |
| 2.6 Distribuição Geográfica das Plantas de Citros | 27 |
| 2.7 Distribuição Geográfica da CVC | 27 |
| 2.8 Diversidade de <i>Xylella fastidiosa</i> | 28 |
| 2.9 Sequenciamento de <i>Xylella fastidiosa</i> | 29 |

Capítulo I

| | |
|--|----|
| 1. Introdução | 32 |
| 2. Material e Método | 36 |
| 2.1 Áreas de Estudo | 36 |
| 2.2 Identificação dos Sintomas | 37 |
| 2.3 Isolamento de <i>Xylella fastidiosa</i> | 40 |
| 2.4 Preservação dos isolados bacterianos | 41 |
| 2.5 Inoculação de <i>Xylella fastidiosa</i> em plântulas de citros e tabaco e cultivo em casa de vegetação | 41 |
| 3. Resultados | 43 |
| 3.1 Identificação dos sintomas | 43 |
| 3.2 Isolamento de <i>Xylella fastidiosa</i> | 44 |
| 3.3 Inoculação de <i>Xylella fastidiosa</i> em plântulas de citros e tabaco e cultivo em casa de vegetação | 50 |
| 4. Discussão | 62 |

Capítulo II

| | |
|---|----|
| 1. Introdução | 66 |
| 2. Material e Métodos | 68 |
| 2.1 Levantamento de <i>Xylella fastidiosa</i> em áreas citrícolas | 68 |
| 2.2 Avaliação visual de sintomas de CVC no estado do Amazonas | 69 |
| 2.3 Isolamento de <i>Xylella fastidiosa</i> | 69 |
| 2.4 Preservação dos Isolados bacterianos | 70 |
| 3. Resultados | 71 |
| 3.1 Coleta e Avaliação visual de CVC | 71 |
| 3.2 Isolamento de <i>Xylella fastidiosa</i> | 83 |
| 4. Discussão | 87 |

Capítulo III

| | |
|--|------------|
| 1. Introdução | 91 |
| 2. Material e Métodos | 93 |
| 2.1 PCR específico para detectar <i>X. fastidiosa</i> em plantas de citros | 93 |
| 3. Resultados | 96 |
| 3.1 PCR específico para detecção de <i>Xylella fastidiosa</i> | 96 |
| 4. Discussão | 104 |
| 3. Conclusão | 107 |
| 4. Referências Bibliográficas | 108 |
| 5. Anexos | 119 |

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior exportador de suco de laranja concentrado do mundo (FUNDECITROS, 2003). O saldo da balança comercial brasileira referente a este produto foi de U\$\$ 2,3 bilhões em 2007, recorde da história (IEA-APTA, 2008).

No Amazonas grande parte da laranja consumida é importada do sul e do sudeste do Brasil. Recentemente tem sido observado o aumento na produção local de citros conforme os dados do Instituto de Desenvolvimento Agropecuário do Estado do Amazonas, IDAM em 2006 foram colhidos 777,80 há. De acordo com Silva *et al.*, 2004 a citricultura tem grande potencial na região, devido as condições climáticas e edáficas favoráveis à cultura, além de apresentar duas colheitas anuais. No entanto os custos da produção são muito elevados, aliados ao baixo nível tecnológico dos produtos locais e a falta de incentivo a citricultura, o que dificulta a expansão desta atividade nesta região.

Dentre diversos problemas fitossanitários que a cultura da laranja apresenta, está a Clorose Variegada do Citros (CVC) causada pela bactéria *Xylella fastidiosa*. É uma doença que há mais de dez anos vem prejudicando a produtividade brasileira, tendo reflexos na exportação de sucos de laranja. Informações sobre a ocorrência da CVC na região são inexistentes. Estimar-se que a CVC esteja presente nos pomares do Amazonas a cerca de 10 anos, podendo ter sido introduzida através de mudas contaminadas importadas de outros estados.

A carência dos dados sobre esta doença pode ser devida a dificuldade no reconhecimento dos sintomas e á falta de treinamento dos técnicos para a diagnose.

Diante da ausência de informações a respeito da CVC em pomares no Amazonas e pelo potencial que a doença apresenta como limitante à citricultura brasileira, este trabalho visou realizar um levantamento diagnóstico da CVC em

pomares regionais e paulistas, utilizando ferramentas moleculares para a identificação do agente causal e diagnose da doença.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HISTÓRICO DA CVC NO BRASIL

Em 1987, a CVC foi constatada pela primeira vez no município de Macaúbal na região norte do Estado de São Paulo, reduzindo o tamanho dos frutos e conseqüentemente a produção de suco das principais variedades de laranjas doces (Rossetti & De Negri, 1990). Inicialmente, imaginou-se que a causa da CVC estava relacionada a uma desordem nutricional, pois teores foliares de zinco e potássio, em especial, eram muito reduzidos nas laranjeiras afetadas (Malavolta *et al.*, 1990). Esta hipótese inicial, entretanto, começou a ser desfeita quando Rossetti *et al.* (1990) estabeleceram uma associação, através de microscopia eletrônica, entre CVC e uma bactéria gram-negativa do xilema, onde perceberam que somente o material sintomático continha a bactéria. Essa bactéria possuía de 1 e 4µm de comprimento por 0.25 a 0.50µm de diâmetro e apresentava parede celular crenulada com três camadas (externa, interna, ou membrana citoplasmática e intermediária ou de peptídioglicanos). Esta bactéria reagiu a antígenos produzidos pela bactéria que atacava a videira e que também causava doenças em diversos outros hospedeiros como ameixeira, carvalho, café, e que foi nomeada como *Xylella fastidiosa* por Wells *et al.*, em 1987. A bactéria *X. fastidiosa* é desprovida de flagelos, aeróbica e cresce muito lentamente em meios de cultura (Wells *et al.*, 1987). De acordo com os postulados de Koch *Xylella fastidiosa* foi considerada o agente etiológico da CVC, no entanto, só pode ser implementado em 1993 (Chang *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1993; Hartung *et al.*, 1994).

2.2 SINTOMATOLOGIA DA CVC

Os sintomas mais evidentes de CVC são pequenas manchas intervenais amarelas na face superior da folha, inicialmente não muito extensas, que ao progredirem, resultam no aparecimento na face inferior de manchas pontuais ou difusas de coloração entre o vermelho e o marrom na face inferior. (Rossetti & De Negri, 1990), também conhecidas como “bolhas de gomas” (Queiroz-Voltan & Paradela Filho, 1999). Nos frutos os sintomas surgem normalmente após o aparecimento dos sintomas nas folhas e apenas nos ramos já afetados. Há uma interrupção no seu crescimento, endurecimento e amadurecimento precoce. A casca torna-se mais fina facilitando o aparecimento de queimaduras feitas pelo sol (Palazzo & Carvalho, 1992). Esta sintomatologia é mais facilmente observada nos meses mais quentes do ano e em plantas de até 6 ou 7 anos de idade (Ayres, 2000)

A distribuição da bactéria na copa das árvores se apresenta de forma irregular (Diamante *et al.*, 1999), a CVC afeta todas as variedades de laranja doce comerciais, embora exista diferença de intensidade e severidade de sintomas entre elas. Laranjeira & Pompeu Júnior, (1998) constataram, em pesquisas realizadas em 15 variedades de laranja doce, na região Nordeste do Estado de São Paulo, que nem sempre existe correlação entre sintomas foliares e perdas de produção. O caso mais marcante foi o da laranja “Rubi”, que quase nunca mostrou os sintomas foliares da CVC, mas a perda de produção foi acima de 90%.

Pompeu Júnior *et al.*, (1998) estudaram, o comportamento frente a CVC de 80 variedades da laranja, em condições naturais em distintas regiões do estado de São Paulo, e constaram que todas apresentavam sintomas embora a intensidade da doença tenha variado entre elas e em suas regiões. Em Mirassol e Barretos, os sintomas foram mais severos e estavam presentes em folhas e frutos, enquanto em

Cordeirópolis e Matão estes foram os mais amenos e se restringiram à sintomatologia foliar, sem ocasionar perdas de produção.

2.3 MECANISMO DE AÇÃO DA BACTÉRIA *X. FASTIDIOSA*

A bactéria *X. fastidiosa* exibe um estilo de vida muito peculiar, pois vive no interior dos vasos do xilema, ambiente pobre em nutrientes. Acredita-se que depois de instalada (aderida) a bactéria passa a se multiplicar e a secretar substâncias entre as quais uma grande quantidade de polissacarídeos dentre como a goma fastidiana, que contribuem para a formação de um biofilme na superfície dos vasos do xilema. Neste biofilme depositam-se mais bactérias, formando grandes agregados celulares que interrompem o fluxo de água e nutrientes (Breno Leite *et al.*, 2000). A destruição dos cloroplastos e a diminuição dos espaços intercelulares do parênquima esponjoso nas áreas foliares correspondentes às “bolhas de gomas” ou de manchas cloróticas, observados por Queiroz-Voltan & Paradela Filho (1999), explicam, em parte a queda da fotossíntese nas folhas de CVC (Machado *et al.*, 1994).

Sendo uma bactéria limitada ao xilema, a translocação pelo sistema vascular da planta hospedeira, ao que tudo indica, é um fator essencial para a sua sobrevivência, relacionado com a virulência (Hopkins, 1984 Hopkins, 1996). A distribuição na planta também varia de acordo com o hospedeiro, Lima *et al.* (1996) observaram que em cafeeiro, a bactéria se encontra distribuída por toda a planta, segundo os autores, confirmando sua translocação, como em plantas de Citros spp. Em pessegueiro a bactéria se encontra preferencialmente nas raízes (Wells *et al.*,

1980) não sendo detectada altas populações na parte aérea da planta. Este fato parece estar relacionado com o tipo de sintoma causado na planta, já que em pessegueiro se observa somente o enfezamento o que pode estar relacionado com a colonização preferencial das raízes, enquanto nas plantas onde a bactéria se encontra distribuída com maior uniformidade em toda a planta ou em maiores concentrações na parte aérea observa-se sintomas foliares como requeima ou clorose variegada. Estes sintomas devem estar associados ao diâmetros dos vasos do xilema que é maior no caule do que nas nervuras das folhas (Fry & Milholland, 1990), logo os sintomas foliares indicam uma grande concentração bacteriana nesta região, já que a oclusão dos vasos nas nervuras das folhas (Fry & Milholland, 1990).

2.4 VETORES

Nas culturas onde *X. fastidiosa* está presente, a bactéria tem sido transmitida por material propagativo e por insetos vetores denominadas cigarrinhas. (Lopes *et al.*, 1996). Em citros, confirmou-se que as três espécies de cigarrinhas mais abundantes nos pomares do estado de São Paulo (*Dilobopterus costalimai*, *Acrogonia sp*, *Oncometopia facialis*) são transmissoras de *X. fastidiosa* (Roberto *et al.*, 1996; Lopes *et al.*, 1996). Recentemente, outras oito espécies (*Pleisommata corniculata*, *Bucephalagonia xanthophis*, *Sonesimia grossa*, *Homalodisca ignorata*, *Ferrariana trivittata*, *Macugonalia leucomelas*, *Parathona gratiosa* e *Acrogonia virescens*) também foram comprovadas experimentalmente como transmissoras da *X. fastidiosa* em citros, (Fundecitrus, 1999). No entanto, a eficiência de transmissão é baixa (1.3% e 11.7%) sendo a *B. xanthophis* a mais eficiente (Lopes, 1999).

A eficiência de um vetor parece depender, pelo menos parcialmente, da frequência com que o inseto atinge o xilema em diferentes espécies de plantas, bem como do tempo despendido e modo de alimentação nos tecidos susceptíveis. O local de alimentação na planta (galhos, ramos ou folhas) também pode ter efeito na eficiência com que diferentes espécies de cigarrinha adquirem ou inoculam *X. fastidiosa* (Lopes, 1999).

No estado de São Paulo, a população das cigarrinhas geralmente aumenta após o início das chuvas, e decresce no inverno (Paiva *et al.*, 1996 Garcia Júnior *et al.*, 1997). Em anos onde ocorrem chuvas no início da primavera, a colonização dos pomares pelas cigarrinhas ocorre a partir deste momento e a população tende a ser maior, enquanto que em anos de estiagem prolongada, a infestação surge mais tardiamente, possivelmente pelo atraso na emissão de brotações (Roberto e Yamamoto, 1998).

As cigarrinhas de citros têm sido observadas em alimentação e oviposição em várias espécies vegetais (arbustos e árvores), em áreas adjacentes aos pomares. Esses habitats e hospedeiros alternativos podem estar atuando como refúgio natural ou local de multiplicação dos vetores para posterior colonização dos pomares (Lopes, 1999). Lopes *et al.*, (2003) verificaram através de PCR que populações de plantas daninhas apresentavam *X. fastidiosa*, sem apresentar qualquer sintoma aparente.

2.5 PLANTAS HOSPEDEIRAS DE *X. FASTIDIOSA*

As laranjeiras doces são, aparentemente, mais susceptíveis a *X. fastidiosa* embora dentro desse grupo de laranjas, existe diferenças bastante acentuada (Laranjeira *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1996). Tangerinas e seus híbridos, como tangores ou tangelos, podem apresentar sintomas em condição de campo, embora em intensidade bem menor que as laranjas doces. Até o momento, esses sintomas foram constatados apenas em variedades não comerciais (Pompeu Junior *et al.*, 1994; Laranjeira, *et al.*, 1996). Segundo Li (1998) tangerinas como dancy, oktisu, ponkan são resistentes a CVC. As variedades Pêra Rio, Natal e Valência apresentaram comportamento similar em relação à intensidade da doença (Ayres, 2000).

Plantas invasoras de pomares de citros com CVC foram examinados para determinar a ocorrência de possíveis hospedeiros alternativos para *X. fastidiosa* e foi constatada em: asa-peixe (*Vernonia sp.*), agrião do brejo (*Eclipta alba*), capim-carrapicho (*Cenchrus echinatus*), capim-favorito (*Rhynchelitrum repens*), capim pé de galinha (*Elesina indica*), grama jesuíta (*Axonopus compressus*), grama-seda (*Cynodon dactylon*), granxuma (*Sida sp.*), João-bravo (*Solanum sp.*), poaia-branca (*Richardia brasiliensis*) e trapoereba (*Commelina benghalensis*) (Travensolo e Leite, 1996; Lopes *et al.*, 2003). O número de células que o patógeno pode atingir no xilema destas plantas é muito baixo limitando aparentemente sua importância como reservatórios naturais de *X. fastidiosa* (Lopes *et al.*, 2003).

2.6 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DAS PLANTAS DE CITROS

As plantas cítricas são originárias da região sudeste do continente Asiático e de suas ilhas adjacentes. No Brasil, foram introduzidas, inicialmente no estado da Bahia, provavelmente pelos colonizadores europeus. Antes do final dos anos 20, a citricultura já se firmava como promissora opção de cultivo agrícola nos estados do Rio de Janeiro e São Paulo. Em 1963 instalou-se a primeira unidade industrial de processamento de suco concentrado em Araraquara - SP. A partir daí, a citricultura brasileira cresceu, o Brasil ser o maior produtor de citros do mundo.

A “zona nobre da citricultura” possui 367 municípios, dos quais 324 estão localizados nos estados de São Paulo e os outros 43 no sul do estado de Minas Gerais. Essa área abrange cerca de 12.217 milhões de hectares de terras, dos quais 850 mil hectares estão plantados com citros (Fundecitrus, 2001).

O estado do Amazonas a citricultura, iniciou-se há três décadas atrás com a importação de mudas do sudeste do Brasil. Atualmente a Protecitros, uma empresa regional produz mudas certificadas, mas os custos ainda são elevados, inviabilizando a aquisição destas por grande parte dos produtores locais.

2.7 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA CVC

A CVC esta disseminada em diversos estados Brasil (Laranjeira, 1997), havendo relatos de sua ocorrência também no Paraguai e Argentina. Neste último país existe histórico dessa doença na região de Misiones (alto Paraná) desde 1984, onde é conhecida como “Pecosita” (Contreras, 1992)

2.8 DIVERSIDADE DE *XYLELLA FASTIDIOSA*

A diversidade biológica de *Xylella fastidiosa*, esta relacionada à planta hospedeira, vinte e oito famílias seriam hospedeiras da linhagem PD (*Pierce's disease*) e outro grupo seria formado por linhagens oriundas de pessegueiro.

Li *et al.* (2001) verificaram a patogenicidade de *Xylella fastidiosa* para plantas de cafeeiro. Plantas de cafeeiro "Mundo Novo" inoculadas mecanicamente com *Xylella fastidiosa* de citros mostraram-se positivas após 3 meses da inoculação pelo teste ELISA e PCR. Sete meses após a inoculação, as plantas apresentaram sintomas apicais, folhas, desfolhação e redução dos internódios e da planta. Chagas *et al.* (1992) detectou que a bactéria da CVC é estruturalmente e morfológicamente similar a *Xylella fastidiosa*. Misavage *et al.* (1994) verificaram em protocolo de PCR para a detecção de *Xylella fastidiosa* em tecidos de plantas, utilizando fragmento ao redor de 7.4kb EcoRI do DNA genômico de linhagem do grupo PD, que a amplificação por PCR produzida por RsaI possibilitou a diferenciação de pelo menos dois patotipos de *Xylella fastidiosa*: grupo PD e grupo "Phony peach". Hartung *et al.* (1994) utilizando-se do teste de ELISA, também concluíram que a estirpe de *Xylella fastidiosa* causadora da CVC em citros poderia representar um grupo serológico intermediário entre os descritos anteriormente para essa bactéria. Almeida *et al.* (2001) concluíram que a multiplicação celular da bactéria *Xylella fastidiosa* é maior após 8 a 16 semanas em condições de laboratório. A inoculação de uma concentração de 5 UFC/g em nó distal indicou o movimento sistêmico da bactéria. Os sintomas foliares nas mudas inoculadas aparecem após 8 semanas. A população estimada nas plantas inoculadas foi de 5,8 UFC/g. Essa baixa população de *X. fastidiosa* explica a baixa taxa de transmissão.

A amplificação de produtos por RAPD-PCR podem ser usados para indicar separações genéticas em *X. fastidiosa*, por este método analisou-se onze estirpes

de diversos hospedeiros, concluindo ser possível a existência de cinco grupos: citros, ameixa-elmo, videira-Ambrosia sp., amendoeira e amoreira. Por clonagem e sequenciamento com produtos de RAPD foram desenvolvidos “primers” específicos para *X. fastidiosa* em citros, que numa região específica do genoma distingue a estirpe de CVC de uva. (Pooler e Hartung, 1994). Beretta *et al.* (1997) com amplificação de DNA por PCR de diversas estirpes de *Xylella fastidiosa*, encontrou três diferentes grupos: citros e amoreira separada das demais estirpes testadas. Segundo Lima *et al.*(1998) & Rosato *et al.* (1998), estudando a diversidade da população de *Xylella fastiosa* entre citros e café observaram que apesar da sintomatologia diferente as estirpes são idênticas geneticamente.

2.9 SEQUENCIAMENTO DE XYLELLA FASTIDIOSA

Ferreira *et al.* (1999) desenvolveu um protocolo simplificado para isolar seqüências específicas de DNA de *Xylella fastidiosa*, baseando-se nas técnicas de Kunkel *et al.*(1985). Um par de “primers” foi destinado para a amplificação de DNA dessa bactéria. Esses “primers” detectaram a estirpe de *X. fastidiosa* isolada de citrus, sendo capazes de identificar a bactéria em extratos de planta com e sem sintomas da doença (CVC). A seqüência de nucleotídeos de 16S r DNAs foi usada para a identificação de *X. fastidiosa*. Foram realizadas amplificações por PCR com dois “primers” conservados e seqüenciados de nove estirpes de *X. fastidiosa* e uma estirpe de *Xanthomonas campestris* pv, *campestris*. A seqüência 16S foi comparada com DNA de eucariotos e procariotos com dados do “GenBank”, sendo que esta seqüência nas estirpes de *X. fastidiosa* foram altamente homólogas e

caracteristicamente diferentes de outras bactérias. Portanto, concluíram que a seqüência 16S rDNA pode ser usado como característica marcante para a identificação de *X. fastidiosa* (Chen *et al.*, 2000).

Simpson *et al.* (2000) publicou a seqüência completa do genoma da *X. fastiosa* que compreende: 52,7% de CG- rica em 2.679,305 pares de bases e 2 plasmídeos de 51,158bp e 1,285bp.

CAPÍTULO I

Isolamento de *Xylella fastidiosa* (Wells) no estado de São Paulo e Minas Gerais e evolução da CVC em plântulas de citros em casa de vegetação.

1. INTRODUÇÃO

A Clorose Variegada do Citros (CVC) popularmente conhecida como amarelinho, tem como agente causal a bactéria *Xylella fastidiosa* (Wells) que coloniza os vasos xilemáticos principalmente das laranjas doces (*Citros sinensis*) (Wells *et al.*, 1987; Rossetti *et al.*, 1990). A primeira observação de *X. fastidiosa* em vasos do xilema de plantas cítricas foi realizada por meio de microscopia eletrônica (Chagas *et al.*, 1992; Rossetti *et al.*, 1990).

Os métodos sorológicos de DAS-ELISA e DIBA (Beretta *et al.*, 1991) foram utilizados por Leite Júnior e Leite, 1991, para diagnosticar a CVC em plantas sintomáticas. Posteriormente, a bactéria foi isolada de plantas de citros sintomáticas e reinoculadas em plantas sadias, confirmando os postulados de Koch (Chang *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1993).

O diagnóstico de CVC por meio de microscopia óptica também foi muito utilizado (Lima *et al.*, 1997), no entanto, com o advento da biologia molecular a técnica de PCR forneceu um diagnóstico preciso (Chen *et al.*, 1995).

Para a identificação dos sintomas no campo é necessário que se observe pequenas manchas intervenais amarelas na face superior da folha, inicialmente não muito extensas, que ao progredirem, resultam no aparecimento na face inferior de manchas pontuais ou difusas de coloração entre o vermelho e o marrom (Rossetti *et al.* 1990), também conhecidas como “bolhas de gomas” (Queiroz-Voltan & Paradela Filho, 1999). Nos frutos os sintomas surgem normalmente após o aparecimento dos sintomas nas folhas e apenas nos ramos já afetados. Há uma interrupção no seu crescimento, endurecimento e amadurecimento precoce. A casca torna-se mais fina facilitando o aparecimento de queimaduras solares (Palazzo & Carvalho, 1992). Esta

sintomatologia é mais facilmente observada nos meses mais quentes do ano e em plantas de até 6 ou 7 anos de idade (Ayres, 2000)

A distribuição da bactéria na copa das árvores se apresenta de forma irregular (Diamante *et al.*, 1999). A bactéria *X. fastidiosa* afeta todas as variedades de laranja doce comerciais, embora exista diferença de intensidade e severidade de sintomas entre elas. Laranjeira *et al.* (1998) constataram, em pesquisas realizadas em 15 variedades de laranja doce, na região Nordeste do Estado de São Paulo, que não existe correlação direta entre sintomas foliares e perdas de produção. O caso mais marcante foi o da laranja “Rubi”, sem sintomas foliares mas com perda de produção acima de 90%.

Pompeu Júnior *et al.*, (1998) estudaram o comportamento frente à CVC de 80 variedades da laranja em condições naturais, em distintas regiões do estado de São Paulo, e constaram sintomas embora a intensidade da doença tenha variado entre elas e em suas regiões. Em Mirassol e Barretos (cidades localizadas ao nordeste do estado de São Paulo), os sintomas foram mais severos e estavam presentes em folhas e frutos, enquanto em Cordeirópolis e Matão (cidades localizadas ao norte do estado de São Paulo) estes foram mais amenos e se restringiram à sintomatologia foliar, sem ocasionar perdas de produção.

A CVC esta presente no estado de São Paulo em 134 municípios afetando 36% dos seus pomares (Tubelis *et al.*, 1993), em Minas Gerais, Rio de Janeiro, Paraná, Rio Grande do Sul, Goiás, Distrito Federal, Bahia (Santos Filho *et al.*, 1999), Sergipe (Leite Júnior *et al.*, 1996) e também há relatos de sua ocorrência na Argentina, Paraguai (Contreras, 1992) e Costa Rica (Aguilar *et al.*, 2005) no entanto ainda não havia sido detectada no estado do Amazonas, apesar de já existirem relatos da ocorrência no estado do Pará (Oeiras, 2002).

A difusão da CVC no estado de São Paulo iniciou a partir do município de Macaúbal (cidade localizada ao norte do estado de São Paulo) em 1987, (Rossetti *et al.*, 1990, Malavolta *et al.*, 1990) alastrando-se de forma explosiva por todo o estado (Tubelis, 1995). Em Minas Gerais a difusão ocorreu no ano de 1990, devido a proximidade do triângulo mineiro com o estado de São Paulo. No Rio de Janeiro esta ocorreu em 1989 a partir de mudas contaminadas enviadas de São Paulo. No Paraná, tal fato ocorreu em 1992, quando os viveiros de São Paulo forneceram mudas para a formação emergente da região citrícola. No Rio Grande do Sul a difusão da CVC ocorreu em 1993 em Três Passos, tendo em vista a região estar próxima à província de Misiones, na Argentina, região também afetada pela CVC (Contreras, 1992).

O monitoramento da Clorose Variiegada do Citros no campo é de grande importância para citricultura no Brasil, no entanto, existem parâmetros que não podem ser perfeitamente medidos, como a quantificação, migração e tecido preferencial da bactéria nas plantas, estes estudos são realizados em casa de vegetação. A maioria dos estudos epidemiológicos da CVC é realizada em casas de vegetação (Laranjeira *et al.*, 2000).

Lopes *et al.*, (2000), utilizaram experimentos em casa de vegetação para realizar o método de inoculação de *Xylella fastidiosa* em plântulas de citros para acompanhar a manifestação e a progressão dos sintomas de CVC. Nesse mesmo trabalho os autores utilizaram plantas de tabaco como hospedeiras alternativas. Garcia, (2007) também realizou experimentos em casa de vegetação para verificar as diferentes manifestações de sintomas de CVC em diversas variedades de citros.

O presente estudo teve como um dos objetivos identificar os sintomas de CVC nos municípios de Araraquara, Alambari, Araras, Comendador Gomes,

Jeriquara, Capela do Alto, Macaubal, Matão, Neves Paulista, Novo Horizonte e Pratânea, visando isolar *X. fastidiosa*. As bactérias isoladas serão inoculadas em plântulas de citros e monitorada a progressão dos sintomas em casa de vegetação.

2.2 IDENTIFICAÇÃO DOS SINTOMAS

A identificação dos sintomas de CVC no campo é realizada através de observações visuais das folhas, onde se verificam manchas amarelas e lesões cloróticas (Rossetti et al., 1990; Queiroz-Voltan e Paradela Filho, 1999) e atrofia dos frutos.

Para auxiliar na identificação e na quantificação de CVC no campo, Amorin *et al.* (1993) elaboraram uma escala diagramática utilizando como unidade de amostragem as folhas (Figura 1.2).

Fundecitros, 2001 classificou a sintomatologia de CVC no campo através de níveis, onde plantas com nível I apresentam folhas com manchas cloróticas, plantas com nível II, apresentam folhas com intensas lesões cloróticas e frutos atrofiados e plantas com nível III, onde os ramos apresentam desfolha e frutos atrofiados.

A identificação dos sintomas no campo foi realizada segundo Fundecitros, 2001 e a quantificação dos sintomas, onde podemos verificar a severidade, foi feita através de Amorin *et al.*, 1993

As plantas sintomáticas foram marcadas com fitas amarelas e os ramos com tinta vermelha, para que fossem acompanhadas as evoluções dos sintomas. Para a obtenção de dados contundentes, a avaliação não foi realizada por uma única pessoa, sendo necessária uma equipe de três avaliadores. Os dados obtidos pela equipe de avaliadores foram comparados para obter uma média.

Para o acompanhamento das coletas e progressão da doença no campo foram elaborados mapas das fazendas nos municípios visitados (Tabela 1.1).

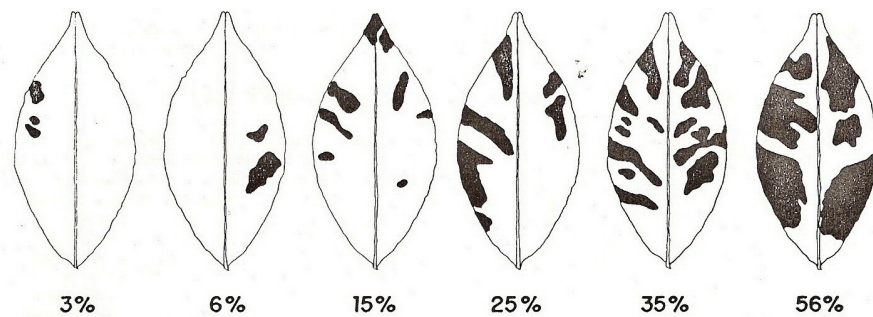


Figura 1.2 - Escala diagramática descrita por Amorim *et al.* (1993) utilizada para a quantificação dos sintomas foliares.

Tabela 1.1 - Fazendas e sítios de citros com sintomas de CVC em municípios visitados no estado de São Paulo.

| Nome da Propriedade | Variedade | Município |
|----------------------------|----------------------------------|------------------|
| F. Monjolinho | Valência | Jeriquara |
| Estância Josefa | Pêra Rio | Neves Paulista |
| S. Terra Seca | Pêra Rio | Neves Paulista |
| F. Araras | Pêra Rio | Araras |
| F. Comendador Gomes | Pêra Rio | Comendador Gomes |
| F. Itápolis | Pêra Rio | Itápolis |
| F. Matão | Valência | Matão |
| F. Macaubal | Natal | Macaubal |
| Sônia Maria | Pêra Rio | Alambari |
| F. Novo Horizonte | Valência | Novo Horizonte |
| S. São Pedro | Valência/ Cravo ¹⁾ | Pratânea |
| F. Frutal | Valência/ Cravo ¹⁾ | Frutal |
| S. Pedro Tadeu | Valência/ Cravo ¹⁾ | Araraquara |
| Jamaica | Valência | Araraquara |
| S. Santana | Valência | Capela do Alto |

¹⁾Cavalo de limão-cravo e porta-enxerto de laranja da variedade Valência

2.3 ISOLAMENTO DE *XYLELLA FASTIDIOSA*

Foram coletadas amostras de folhas sintomáticas de CVC em 13 municípios do estado de São Paulo no período de 2003 a 2006. Em cada município, 10 folhas de 10 plantas foram coletadas manualmente. No laboratório de fitopatologia da Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP foram realizadas, previamente, lavagens superficiais das folhas com água corrente e sabão e com auxílio de um bisturi foram retirados o pecíolo e a nervura central de cada folha. Depois de lavadas, as amostras passaram pela técnica de desinfestação de superfície. As amostras foram imersas em etanol 70% por um minuto, e em hipoclorito de sódio contendo 1% de cloro ativo por 3 minutos e lavadas duas vezes em água autoclavada durante três minutos. As amostras foram cortadas em pequenos segmentos e maceradas em 900µl de tampão PBS (Phosphate Buffer Saline- PBS) (10mM Na₂ HPO₄; 1,7 mM KH₂ PO₄; 0,14 mM NaCl; 2,7 mM KCl; pH7,0). O macerado foi diluído de 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ e 10⁻⁴ em PBS esterilizado, 20µl, da diluição 10⁻³ e 10⁻⁴ foram dispensadas em meio BCYE (Extrato de levedura 10g, carvão ativado 2g, gelrite 10g, tampão ACES 10g, pirofosfato de ferro 0.25g/10mL de água cisteína 0.4g/10mL de água ph 7.0) e em PCYE (Extrato de levedura 10g, carvão ativado 2g, gelrite 10g, sulfato de ferro 0.25g, KH₂PO₄ 1g, K₂HPO₄. 3 H₂O 1.09g, MgSO₄.7H₂O 0.4g, pH:6.9). As placas de Petri foram mantidas fechadas dentro do fluxo laminar para absorção do líquido pelo meio de cultura. Todas as placas foram vedadas e incubadas por um período de até 30 dias a 28 °C. Durante o período de incubação foram realizadas observações diárias, para eliminar qualquer tipo de crescimento de fungos ou de outras bactérias oportunistas. A contagem das colônias de *X. fastidiosa* foi realizada após 30 dias do isolamento.

2.4 PRESERVAÇÃO DOS ISOLADOS BACTERIANOS

Após o isolamento primário todos os isolados foram purificados por tríplice clonagem. A partir de cada isolado bacteriano foram feitos repiques em tampão fosfato salino (Phosphate Buffer Saline- PBS)(10mM Na₂ HPO₄; 1,7 mM KH₂ PO₄; 0,14 mM NaCl; 2,7 mM KCl; pH7,0) para a obtenção de uma solução concentrada (CC:3 da Escala de McFarland). A suspensão foi homogeneizada e uma alíquota de 60ul foi adicionada a tubos contendo 200ul de tampão de preservação SPS (Succinato Citrato Fosfato) (8,6mM K₂HPO₄; 7,3mM KH₂PO₄; 7,3mM succinato dissódico; 3,4mM citrato) e armazenada em freezer -80°C.

2.5 INOCULAÇÃO DE *XYLELLA FASTIDIOSA* EM PLÂNTULAS DE CITROS E TABACO E CULTIVO EM CASA DE VEGETAÇÃO

O método *pin prick* foi um método descrito por Lopes *et al.*, 2002 , onde uma suspensão de *Xylella fastidiosa* é inoculada no superfície lenhosa das plântulas de citros com o auxílio de uma seringa de insulina.

Neste experimento foram utilizadas 30 plântulas de citros (Valência) (*Citrus sinensis*) com seis plantas controle (inoculadas com tampão PBS) e 30 plântulas de tabaco (*Nicotiana clevelandii*) com 6 plantas controle.

As colônias de *X. fastidiosa* foram isoladas a partir de plantas de citros naturalmente infectadas do estado de São Paulo e Minas Gerais e foram semeadas em meio de cultura PCYE (Extrato de levedura 10g, carvão ativado 2g, gelrite 10g, sulfato de ferro 0.25g, KH₂PO₄ 1g, K₂HPO₄. 3 H₂O 1.09g, MgSO₄.7H₂O 0.4g, ajustar o pH:6.9). após o crescimento as colônias foram transferidas para tampão fosfato

salino (PBS) (NaCl 137mM 8,0g KCl 2,7 mM 0,2 Na₂HPO₄ 7 H₂O 11,5g KH₂PO₄ 0,2g) foram utilizadas no experimento de inoculação trinta dias após a sua semeadura.

Para a quantificação das células bacterianas usadas no inoculo, foi realizada uma diluição seriada, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ e 10⁻⁴ e as amostras foram comparadas a escala de Mc Farland. O inoculo tinha aproximadamente 10⁸ UFC por mL.

As inoculações foram realizadas empregando 10μL das suspensões bacterianas em pontos do caule de 0- 30cm, 40 a 60cm e de 80 a 100cm, com ajuda de uma pipeta automática, e com o auxílio de uma agulha de insulina a qual proporcionava pequenos ferimentos no caule permitindo total absorção da suspensão pelo tecido da planta. Este método de inoculação foi comprovado como o mais eficiente no teste de patogenicidade de *X. fastidiosa* em citros resultando em 80% de plantas sintomáticas após cinco meses de inoculação (Lopes, 2002).

Após a inoculação, as mudas foram transplantadas para bandejas de isopor com 72 células, com substrato plantmax citros (Eucatex) e osmocote (14:14:14) (N/P/K), estas foram cultivadas em casa de vegetação aproximadamente por aproximadamente 3 a 5 meses.

Avaliações periódicas foram realizadas em plântulas de citros e tabaco, por um período de cinco meses. Após este período as bactérias foram isoladas e em PCYE por aproximadamente 30 dias a 28°C em culturas estacionárias.

3. RESULTADOS

3.1 IDENTIFICAÇÃO DOS SINTOMAS

Todas as fazendas visitadas no estado de São Paulo foram mapeadas (Anexo I), onde foram delimitadas todas as ruas, árvores mortas, falhas nos talhões e plantas com sintomas de CVC.

Os sintomas de CVC foram observados de acordo com metodologia descrita no item 2.2. No campo, os sintomas foram evidentes em níveis I e II (Figura 1.2), (Figura 1.3) e (Figura 1.4). Raras foram as plantas com intensas lesões nas folhas e frutos atrofiados e desfolha na copa das árvores (nível III de CVC) (Figura 1.5).

De acordo com a Tabela 3.1 podemos observar severidade dos sintomas de CVC nas folhas analisadas segundo escala diagramática descrita por Amorin *et. al.*, 1993. Os municípios de Frutal, Araraquara e Alambari apresentaram a maior porcentagem de folhas com sintomas de CVC. Em contraponto os municípios de Novo horizonte, Capela do Alto e Itapópolis apresentaram a menor porcentagem de folhas com sintomas de CVC.

Tabela .1.2 - Valores médios atribuídos severidade de CVC em pomares em municípios do estado de São Paulo.

| Municípios | Médias das notas de sintomas de CVC (%) | Idade média (anos) das plantas de citros |
|-------------------|--|---|
| Frutal | 5.50 a | 3.0 |
| Araraquara | 5.00 b | 5.2 |
| Alambari | 4.70 c | 4.0 |
| Neves Paulista | 4.50 d | 3.0 |
| Pratânea | 4.46 d | 4.0 |
| Araras | 4.30 e | 4.0 |
| C. Gomes | 4.30 e | 4.7 |
| Macaubal | 4.20 f | 3.0 |
| Jeriquara | 4.10 g | 4.7 |
| Matão | 3.80 h | 4.2 |
| Novo Horizonte | 3.71 i | 6.0 |
| C. do Alto | 3.70 i | 7.2 |
| Itápolis | 3.20 j | 4.2 |



Figura 1.3 - Planta com sintoma de CVC nível I, folhas sintomáticas, com manchas cloróticas.



Figura 1.4 - Ramos sintomáticos, marcados com tinta vermelha para acompanhar a progressão da doença no campo.



Figura 1.5 - Planta com sintomas de CVC em nível II, com lesões cloróticas e frutos pequenos.



Figura 1.6 - Planta com sintomas de CVC com nível III, com lesões cloróticas, frutos pequenos e desfolha na copa da árvore.

3.2 ISOLAMENTO DE *XYLELLA FASTIDIOSA*

A bactéria *Xylella fastidiosa* (Figura 1.6) foi isolada em quase todos os municípios visitados. O único município onde não foi possível isolar *X. fastidiosa* foi em de Capela do Alto, região sul do estado de São Paulo.

De acordo com os resultados apresentados, pode-se constatar que o município de Neves Paulista apresentou a maior frequência de colônias isoladas de *X. fastidiosa* com 1717 colônias, seguido de Araraquara com 1476 colônias e Macaúbal com 1452 colônias. As variedades plantadas eram Pêra Rio, Valência-cravo e Natal.

A Figura 1.7 evidencia as regiões onde foi possível isolar as bactérias *X. fastidiosa* (região Noroeste, Centro e Norte do estado de São Paulo) não foi possível obter nenhum isolado bacteriano da região sul do estado de São Paulo.

Nas Tabela 1.4 verificou-se por meio da análise de variância e teste de médias que as plantas analisadas apresentavam idades entre 7 a 2 anos.

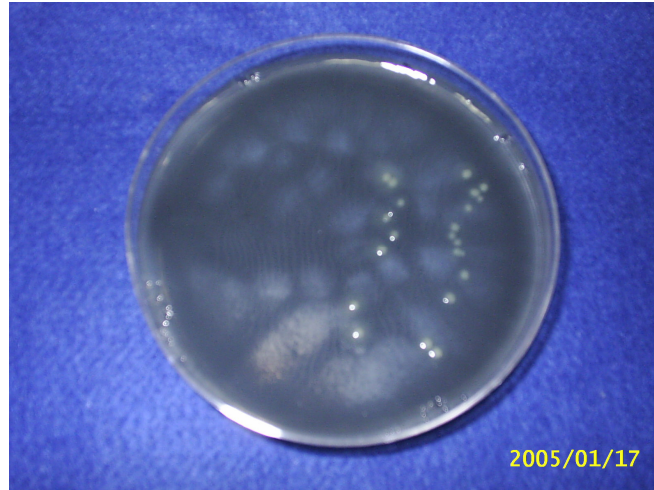


Figura 1.7 - Placa de Petri contendo o meio PCYE apresentando colônias de *X. fastidiosa* proveniente da fazenda Jamaica, município de Araraquara, (Localizada a noroeste do estado de São Paulo).

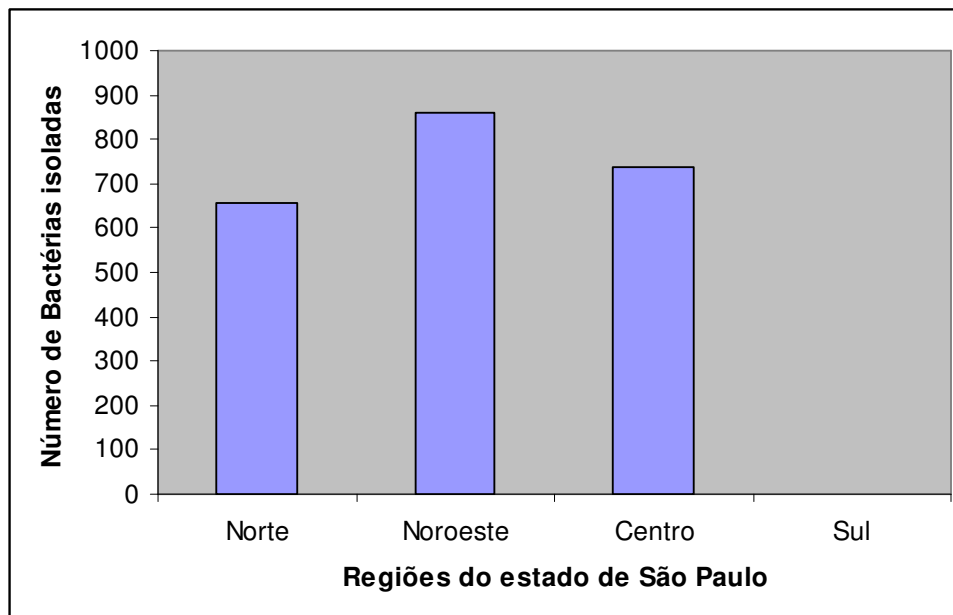


Figura 1.8 - Frequência de bactérias isoladas e cultivadas em meio de cultura PCYE a partir de diferentes regiões visitadas no estado de São Paulo.

3.3 INOCULAÇÃO DE *XYLELLA FASTIOSA* EM PLÂNTULAS DE CITROS E TABACO E CULTIVO EM CASA DE VEGETAÇÃO

Decorridos vinte dias após a inoculação de *X. fastidiosa* foram observados os primeiros sintomas de CVC em plântulas de citros (Figura 1.8 e 1.9), manchas cloróticas na região anterior das folhas, e lesões cor palha na região posterior (Figura 1.10).

Vinte dias após a inoculação de *X. fastidiosa* em tabaco *Cleveland* (Figura 1.11) foram observados sintomas de CVC (Figura 1.12) uma visível atrofia dos ramos e lesões cloróticas. Devido à facilidade de evidenciar os sintomas o tabaco vem sendo usado controle positivo para experimentos de inoculação.

Após o surgimento dos sintomas de CVC em plântulas de citros e tabaco foi realizada uma avaliação amostral do experimento, que foi realizado com 30, 60 e 120 dias. Observa-se na Tabela 2.1 que algumas plântulas manifestaram mais sintomas do que outras, isso se explica ao fato de terem sido inoculadas com cepas de *X. fastidiosa* de municípios diferentes, e conseqüentemente apresentam diferenças na agressividade das cepas. No experimento de citros foi observado que as plântulas inoculadas com cepas do município de Araraquara foram as que mais manifestaram sintomas, seguida dos municípios de Alambari e Pratânia. No experimento foram inoculadas plântulas com PBS, usado como controle negativo e nenhuma planta manifestou sintoma, mostrando claramente a eficiência do experimento de inoculação. De acordo com a Tabela 2.1 observa-se que nem sempre a frequência de isolamento é igual à manifestação de sintomas, haja vista que o município onde mais isolou-se *X. fastidiosa* foi do município de Macaúbal, seguido do município de Matão e Comendador Gomes.

Na Figura 2.5 observa-se os sintomas de CVC em tabaco no controle positivo e sem a presença da doença nos controle negativos. Na Tabela 2.2 verifica-se o número plantas inoculadas em tabaco manifestando sintomas de CVC, as cepas dos municípios que mais manifestaram sintomas foram, Macaúbal, Jeriquara e Frutal, também foi inoculado PBS em algumas plantas, usado como controle positivo, e nenhuma planta manifestou sintoma.

No experimento com tabaco a frequência de isolamento foi maior nos municípios de Macaúbal, Alambari e Novo Horizonte. É importante salientar que tanto no experimento de citros como de tabaco verificamos uma maior severidade de CVC nas plantas do município norte e nordeste do estado de São Paulo, regiões mais afetadas pela CVC.

A análise dos resultados descritos na Figura 2.6, evidencia que a bactéria migra lentamente dentro do xilema das plantas, considerando-se que a frequência de maior isolamento foi de 0 a 30cm do ponto de inoculação.

A bactéria coloniza folhas e caules, no entanto, a frequência de isolamento foi maior nas folhas. Fato que tem relação com a quantidade de tecido lenhoso do caule dificultando a maceração total dos tecidos e conseqüentemente o isolamento das bactérias comprometendo este órgão.

Os resultados experimentais da inoculação de cepas originadas de diferentes regiões do estado de São Paulo em citros pode ser observado na Figura 2.7, cepas do município de Matão apresentaram maior período de incubação com aproximadamente 110 dias, e o menor período de incubação foi observado para cepas de Araraquara. Estes dados são importantes para verificar que a manifestação dos sintomas está relacionada ao período de incubação e conseqüentemente a disseminação da doença. Haja vista que o município de

Araraquara foi o que manifestou um maior número de plantas com sintomas de CVC e também apresentou o menor período de incubação. Estirpes bacterianas que apresentam menor tempo de incubação dentro da planta oferecem mais riscos de disseminação da doença. Nesses casos tornam-se necessárias medidas preventivas como a produção de mudas em viveiro telado, monitoramento das fazendas, poda periódica e quebra-ventos (Fundecitros, 2003).

A frequência dos sintomas também é um parâmetro importante para o controle da CVC, haja vista que muitas plantas podem apresentar-se assintomáticas. Podemos observar, na Figura 2.8, que os municípios de Araraquara, Alambari e Pratânea apresentaram a maior frequência de sintomas. Em contrapartida verifica-se que o município como Capela do Alto, apresenta a menor frequência de sintomas. De acordo com os dados exibidos na Figura 2.9, pode-se observar a variação da frequência de sintomas nos anos de 2003 a 2005. No ano de 2003, o experimento não foi bem sucedido pois, muitas plantas morreram, devido à falta de irrigação. No entanto as plantas inoculadas com cepas de *X. fastidiosa* dos municípios como, Araraquara, Jeriquara e Pratânea apresentaram maior número de sintomas de CVC. No ano de 2004 as plântulas inoculadas com cepas procedentes dos municípios que mais manifestaram sintomas foram os municípios de Araraquara, Alambari e Pratânea. Em 2005 as maiores frequências de sintomas foram nas cepas dos municípios de Neves Paulista, Araraquara e Alambari.

Tabela 1.3 – Tabela com número de plântulas inoculadas com *Xylella fastidiosa*, número de plântulas com sintomas de CVC, número de plântulas controle e número de colônias de *X. fastidiosa* re-isoladas.

| Local Amostra | Plantas Inoculadas com <i>X.</i> <i>fastidiosa</i> (C. +) | Plantas com sintomas | Plantas Inoculadas com PBS (C. -) | Plantas com sintomas | X. <i>fastidiosa</i> isolada do (C.+) |
|--------------------------------|--|---|--|---|--|
| Alambari | 30 | 19 | 6 | 0 | 1.510 ⁵ |
| Araraquara | 30 | 23 | 6 | 0 | 4.710 ⁵ |
| Araras | 30 | 5 | 6 | 0 | 0 |
| C. do Alto | 30 | 3 | 6 | 0 | 0.510 ⁵ |
| C.Gomes | 30 | 11 | 6 | 0 | 6.410 ⁵ |
| Frutal | 30 | 14 | 6 | 0 | 1.810 ⁵ |
| Itápolis | 30 | 11 | 6 | 0 | 0 |
| Jeriquara | 30 | 13 | 6 | 0 | 4.810 ⁵ |
| Macaubal | 30 | 5 | 6 | 0 | 12.010 ⁵ |
| Matão | 30 | 10 | 6 | 0 | 8.010 ⁵ |
| N. Horizonte | 30 | 6 | 6 | 0 | 3.010 ⁵ |
| N. Paulista | 30 | 15 | 6 | 0 | 3.210 ⁵ |
| Pratânea | 30 | 19 | 6 | 0 | 2.2.10 ⁵ |

C.+ = Controle Positivo

C. -= Controle Negativo

Tabela 1.4 – Tabela com número de plântulas inoculadas com *Xylella fastidiosa* em tabaco *Cleveland*, número de plântulas com sintomas de CVC, número de plântulas inoculadas com PBS usadas como controle negativo e número bactérias isoladas das plantas sintomáticas.

| Local Amostra | Plantas Inoculadas com X. <i>fastidiosa</i> (C.+) | Plantas com sintomas | Plantas Inoculadas com PBS (C. -) | Plantas com sintomas | X. <i>fastidiosa</i> isolada do (C.+) |
|--------------------------------|--|---|--|---|--|
| Alambari | 30 | 14 | 6 | 0 | $13 \cdot 10^{-4}$ |
| Araraquara | 30 | 20 | 6 | 0 | $10 \cdot 10^{-4}$ |
| Araras | 30 | 13 | 6 | 0 | $7 \cdot 10^{-4}$ |
| C. do Alto | 30 | 2 | 6 | 0 | $2 \cdot 10^{-4}$ |
| C. Gomes | 30 | 10 | 6 | 0 | $5 \cdot 10^{-4}$ |
| Frutal | 30 | 19 | 6 | 0 | $3 \cdot 10^{-4}$ |
| Itápolis | 30 | 0 | 6 | 0 | 0 |
| Jeriquara | 30 | 24 | 6 | 0 | $8 \cdot 10^{-4}$ |
| Macaubal | 30 | 24 | 6 | 0 | $15 \cdot 10^{-4}$ |
| Matão | 30 | 11 | 6 | 0 | $6 \cdot 10^{-4}$ |
| N. Horizonte | 30 | 18 | 6 | 0 | $11 \cdot 10^{-4}$ |
| N. Paulista | 30 | 15 | 6 | 0 | $3 \cdot 10^{-4}$ |
| Pratânea | 30 | 7 | 6 | 0 | $4 \cdot 10^{-4}$ |

C.+ = Controle Positivo

C. -= Controle Negativo



Figura 1.9 - Plântulas de citros, inoculados com *Xylella fastidiosa*, utilizados para verificar a progressão de sintomas de CVC em casa de vegetação.

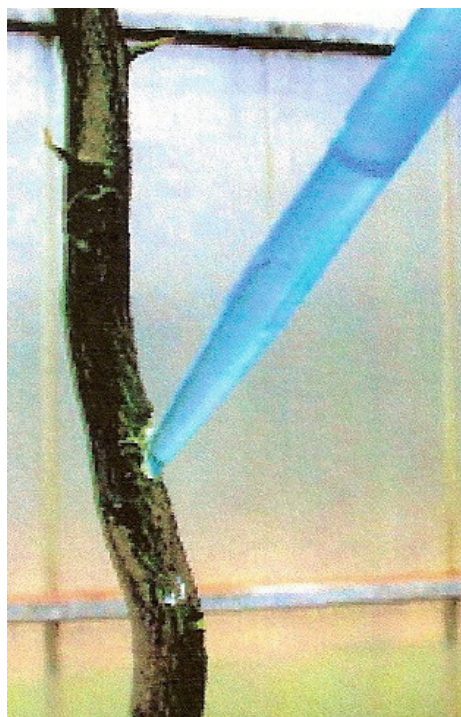


Figura 1.10 – Inoculação de *Xylella fastidiosa* por meio do método *pin prick*, em plântulas de citros.



Figura 1.11 – Caixilho de isopor com plântulas de citros, inoculados com *X. fastidiosa*, manifestando sintomas de CVC (A) e plântula de citros com manchas cloróticas sintoma foliar característico de CVC (B).



Figura 1.12 – Caixilho contendo plântulas de tabaco Cleveland inoculadas com cepas de *Xylella fastidiosa* de vários municípios do estado de São Paulo.



Figura 1.13 - Caixilho contendo plântulas de tabaco Cleveland inoculadas com cepas de *Xylella fastidiosa* manifestando sintomas de CVC.

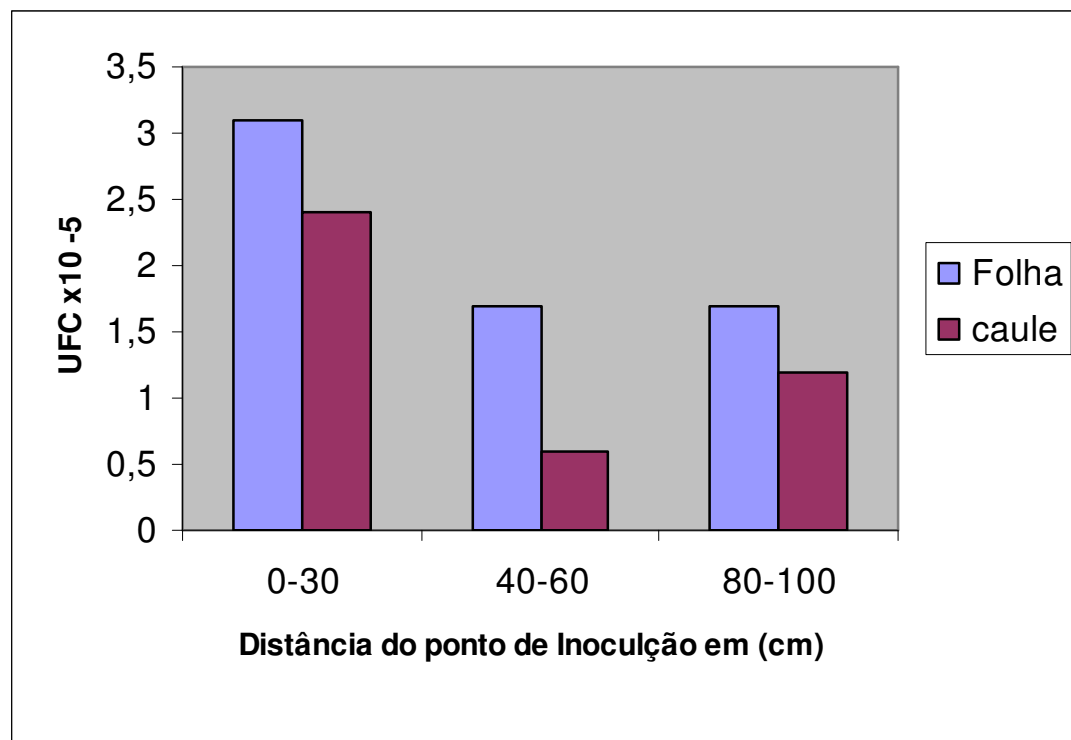


Figura 1.14 – Frequência do número de isolados de *Xylella fastidiosa* (UFC x 10⁵), de caule e folhas em diferentes distâncias do ponto de inoculação.

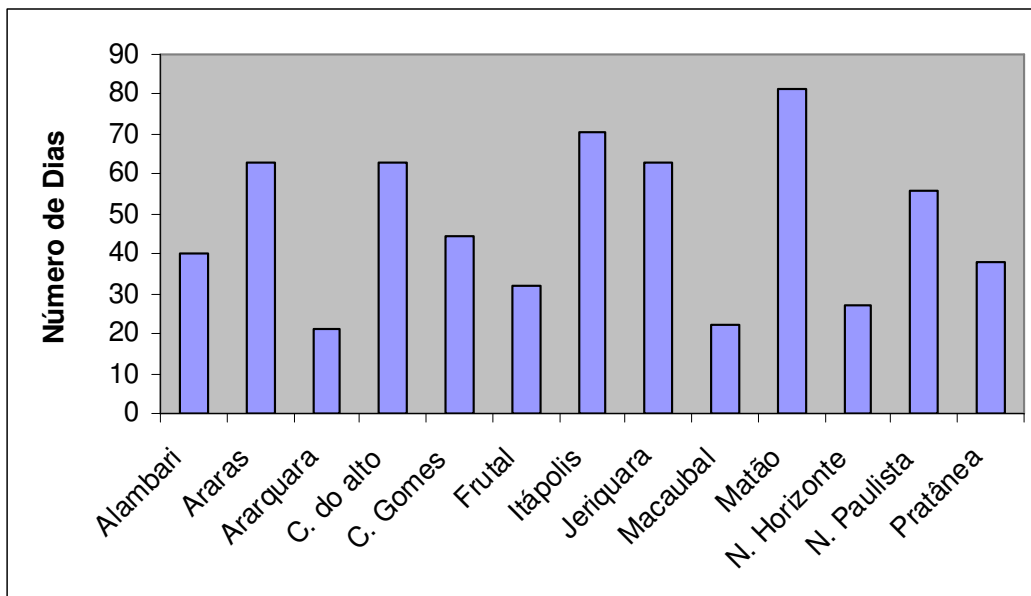


Figura 1.15 - Período de incubação (dias) de cepas de *Xylella fastidiosa* em plântulas de citros (*Citrus sinensis*), isoladas de vários municípios do estado de São Paulo.

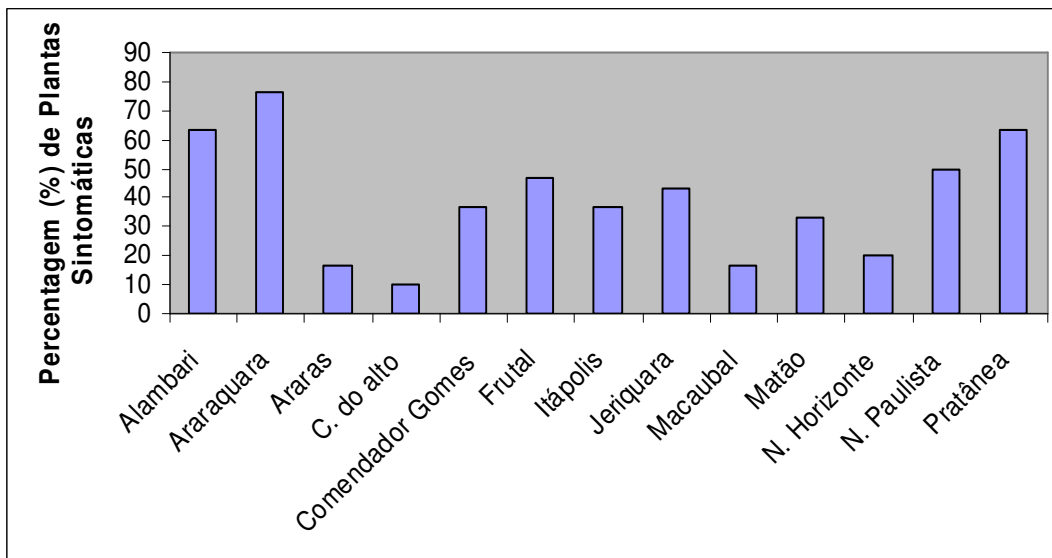


Figura 1.16 - Frequência de plântulas de citros (*Citrus sinensis*) inoculados com *Xylella fastidiosa* apresentando sintomas de CVC de várias localidades do estado de São Paulo.

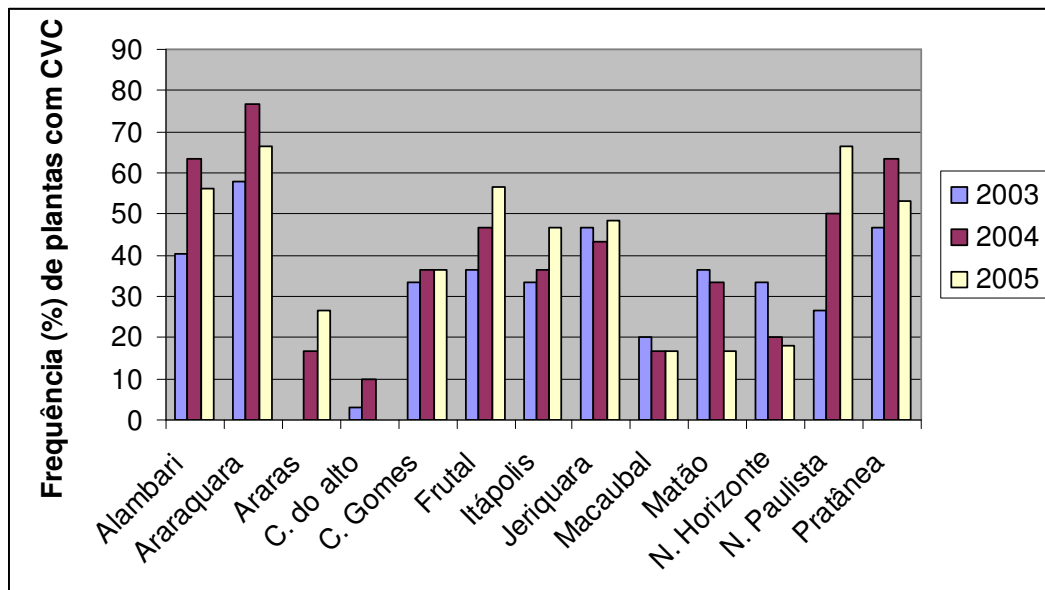


Figura 1.17 – Variação da percentagem de sintomas foliares, presentes nas plântulas inoculadas com *X. fastidiosa* originadas de vários dos municípios do estado de São Paulo no período de 2003 a 2005.

4. DISCUSSÃO

O estado de São Paulo e o triângulo mineiro são os maiores produtores de citros no Brasil, os quais apresentam a maior incidência de Clorose Variegada do Citros. O estado de São Paulo se caracteriza ainda por apresentar o melhor monitoramento da CVC realizado pelos técnicos do Fundecitrus (Fundo de defesa da citricultura)

A identificação dos sintomas de CVC, no campo, é muitas vezes dificultada devido à semelhança com o sintoma de deficiência de zinco (Rossetti, 1990). No entanto, as folhas mais velhas tornam-se cloróticas devido à presença da bactéria *Xylella fastidiosa* que habita os vasos do xilema. Outra característica importante segundo Rossetti *et al.* (1990) é a superfície abaxial das folhas, onde surgem lesões de cor marrom-clara que correspondem às áreas das lesões e podem tornar-se marrons escuras ou necróticas. A identificação de sintomas de CVC é inicialmente realizada por meio visual, no entanto, é necessária a confirmação da presença do agente causal por meio de isolamento *in vitro*. Estas características evidenciam a importância do treinamento de técnicas de identificação dos sintomas de CVC no campo.

Os municípios visitados no estado de São Paulo apresentaram distribuição variada do patógeno. Como observado na Tabela 1.2, o município de Macaubal apresentou 1717, colônias isoladas de *Xylella fastidiosa* ao passo que no município de Capela do Alto não foi possível obter nenhum isolado.

A bactéria *X. fastidiosa* é uma bactéria fastidiosa tendo como consequência a demora por até 30 dias para crescer em meio de cultivo *in vitro* (Holt, 1994). Na maioria das vezes outras bactérias, como as endofíticas, crescem impedindo ou

dificultando o seu isolamento. Devido a este fato tornam-se necessários outros testes de detecção da bactéria em plantas. A técnica de sorologia tem como vantagem maior rapidez na preparação do material, porém o PCR demonstra maior sensibilidade (Paradela Filho *et al.*, 1997).

A Manifestação dos sintomas é um parâmetro importante para o monitoramento e controle da CVC.

Como podemos observar na Tabela 1.6, a maioria dos municípios visitados apresentou sintomas, no entanto, os municípios com maior concentração de CVC estavam no Noroeste do estado. Diferenças na incidência e severidade da doença entre as regiões citrícolas do estado de São Paulo foram realizadas por Ayres (2000) onde foi observada ocorrência de gradiente de incidência entre as regiões citrícolas: Norte> Noroeste>Centro>Sul. O autor sugeriu que aspectos climáticos seriam responsáveis pelas diferenças da ocorrência de CVC. Laranjeira (2003) observou ainda a ocorrência de maior quantidade de brotações novas e ramos sintomáticos na região noroeste do estado de São Paulo, já na região sul ocorre uma maior quantidade de ramos assintomáticos, mas não ocorrem diferenças significativas quanto a concentração da bactéria dentro da planta.

Dados do Fundecitrus, 2006 mostram que a doença encontra-se em 69,74% na região norte, 56,25% na região noroeste, 51,96% na região central, 9,50% na região oeste e 4,75% na região sul. De acordo com os dados apresentados na Figura 1.7, observa-se que o maior número de bactérias foi proveniente da região noroeste, centro e norte, fortalecendo as informações obtidas a partir dos isolamentos.

Os resultados desta pesquisa confirmam resultados anteriores de monitoramento da CVC no estado de São Paulo e a sua execução foi extremamente

importante como atividade de treinamento em técnicas de monitoramento de campo e laboratório para permitir a continuidade dos estudos nos pomares do estado do Amazonas.

Capítulo II

Detecção de *Xylella fastidiosa* (Wells) em pomares de citros (*Citros sinensis*) nos principais municípios produtores do Estado do Amazonas.

1. INTRODUÇÃO

O Estado do Amazonas apresenta uma citricultura de subsistência, com aproximadamente três décadas de existência e que foi implantada a partir da importação de mudas do sudeste do Brasil. A produção concentra-se, principalmente o município Iranduba, Itacoatiara, Manaus, Manacapuru, Presidente Figueiredo e Rio Preto da Eva.

Segundo o Instituto de Desenvolvimento Agropecuário do Estado do Amazonas, IDAM em 2006 a região apresentava uma área colhida de 777,80 ha. A produção de frutos segundo o IDAM em 2006 era de 57.800,35 frutos distribuídos em torno de propriedades de 430 propriedades em todo o Estado. Os municípios produtores são divididos de acordo com calha dos rios da região amazônica. Região do Alto Solimões apresenta um total de 6 produtores somando 15,00 ha. Região do rio Jutaí, Solimões e Juruá possui 17 produtores e 12,00 ha de área plantada. A região do rio Madeira apresenta 35 produtores com 27,50 ha. A região do rio Negro e Solimões é a região onde se concentra a maior produção de citros do estado do Amazonas, com 286 produtores com uma área plantada 876,00 hectares. Na região do médio Amazonas possui um total de 93 produtores com 275 há de área plantada, em contrapartida a região do Baixo Amazonas apresenta 1 produtor com 1 ha da área plantada.

Um pequeno número de propriedades nos municípios e muitas vezes com baixa produção de frutos é insuficiente para satisfazer a demanda de consumo interno. Outro fator importante é o número de produtores que é bastante irregular assim como a baixa produtividade destas propriedades Estes fatos são decorrentes das dificuldades geográficas encontradas na região amazônica onde para o

escoamento da produção há de transpor rios em embarcações inadequadas. Os períodos de chuvas torrenciais também dificultam a colheita e o transporte dos frutos para o comércio varejista das cidades.

Apesar já ter sido relatada por Poltronieri *et al.*, (2005) em municípios do Estado do Pará, não havia nenhum relato de sua presença no Estado do Amazonas.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a possível ocorrência da CVC nas principais regiões produtoras de laranja do Estado do Amazonas, através de levantamento de campo.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 LEVANTAMENTO DE *XYLELLA FASTIDIOSA* EM ÁREAS CITRÍCOLAS DO AMAZONAS

Para a definição das áreas que seriam examinadas foi realizado um levantamento bibliográfico nos acervos do IDAM onde foi possível localizar as principais áreas citrícolas do estado do Amazonas para que pudéssemos traçar um roteiro das áreas a serem examinadas.

Foram realizadas coletas em quatro municípios de Manaus, Presidente Figueiredo, Rio Preto da Eva e Itacoatiara (Figura 3.1). Em cada ponto foram analisadas 15 propriedades produtoras de citros. Em cada propriedade os pomares foram analisados observando os sintomas típicos da CVC.

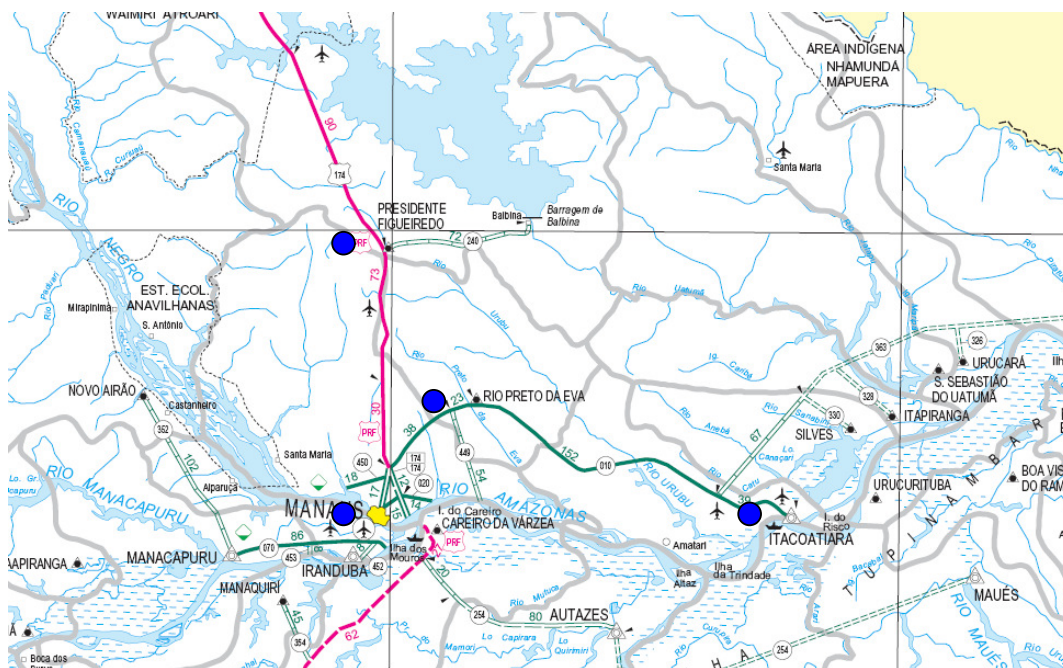


Figura 2.1 – Mapa de parte do Estado do Amazonas mostrando em círculos vermelhos, os locais onde foram realizadas as coletas (Fonte:IBGE)

2.2 AVALIAÇÃO VISUAL DE SINTOMAS DE CVC NO ESTADO DO AMAZONAS

As avaliações dos sintomas foram feitas no campo através de observações visuais, por meio de sintomas foliares, característicos de CVC. Posteriormente amostras de folhas sintomáticas foram colhidas em laboratório foi realizado o isolamento de *Xylella fastidiosa*. A partir da nervura central das folhas sintomáticas foi realizado o PCR específico para confirmação do patógeno. Foram avaliadas 10 folhas por planta e os frutos foram avaliados apenas visualmente.

2.3 ISOLAMENTO DE XYLELLA FASTIDIOSA

Para a o isolamento de *X. fastidiosa* foram coletadas, 10 folhas de 15 plantas sintomáticas por propriedade, cada folha foi pesada, em balança de precisão. Posteriormente foram lavadas com água corrente e sabão. Com auxílio de um bisturi, foram retirados o pecíolo e a nervura central de cada folha. Em seguida foi feita a desinfestação superficial que consistiu em imersão das amostras etanol 70% por um minuto, em hipoclorito de sódio 1% por 3 minutos e duas lavagens de 3 minutos cada em água autoclavada. Em seguida, os pecíolos e nervuras foram cortados em pequenos fragmentos com o auxílio de um bisturi e maceradas em 900µl de tampão fosfato salino (PBS). O macerado foi diluído em série de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} em PBS estéril, sendo que 20µl das diluições 10^{-3} e 10^{-4} foram transferidos para a superfície do meio de cultura PCYE (Extrato de levedura 10g, carvão ativado 2g, gelrite 10g, sulfato de ferro 0.25g, KH_2PO_4 1g, K_2HPO_4 3 H_2O 1.09g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4g, ajustar o pH:6.9) (LOPES & TORRES, 2006) e BCYE (Extrato de levedura 10g, carvão ativado 2g, gelrite 10g, tampão aces 10g,

pirofosfato de ferro 0.25g/10mL de água cisteína 0.4g/10mL de água) (Wells *et al.*, 1981). As placas de Petri contendo os referidos meios foram inclinadas para que o líquido inoculado escorresse por mais ou menos 5 cm e a seguir foram mantidas dentro do fluxo laminar por um período de aproximadamente 20 minutos para que o líquido fosse absorvido pelo meio de cultura. As placas foram vedadas com parafilme e incubadas por um período de até 30 dias a 28 °C. Durante o período de incubação foram realizadas observações diárias, para o monitoramento do crescimento de *Xylella fastidiosa*.

As colônias de *Xylella fastidiosa* foram contadas 30 dias após o plaqueamento, sendo estimada a concentração de unidades formadoras de colônias da bactéria por grama de tecido foliar, com base nas diluições em que cresceram e no peso das amostras.

2.4 PRESERVAÇÃO DOS ISOLADOS BACTERIANOS

Após o isolamento primário, todos os isolados foram purificados por tríplice clonagem, em meio de cultura semi-sólido PCYE , sendo que na última clonagem as colônias foram transferidas para 10µl PBS para a obtenção de uma solução bacteriana concentrada. Um alíquota de 60µl foi adicionada a criotubos novos e autoclavados contendo 200 µl de tampão de preservação Succinato Citrato Fosfato (SPS) (8,6mM K₂HPO₄; 7,3mM KH₂PO₄; 7,3mM succinato dissódico; 3,4mM citrato, 200mL de água destilada 60mL de glicerol a 39%, pH 7) foi mantido a -70°C para preservação dos isolados bacterianos.

3. RESULTADOS

3.1 Coleta e Avaliação visual de CVC

A maior parte das plantas analisadas era das variedades Natal, Pêra e Valência (figura 3.7) as quais conhecidas popularmente no estado como “laranja Paulista”, e apresentavam entre 5 a 10 anos de idade (Figura 3.10). Não foram encontrados experimentos de novas variedades adaptadas ao solo e ao clima amazônico.

Verificou-se que faltam tratamentos culturais nos pomares, e que as plantas com CVC não são erradicadas, e nem podados os ramos sintomáticos. Os pomares são constituídos de plantas velhas juntamente com plantas jovens. Pomares são formados com outras culturas como, por exemplo, banana e cupuaçu.

Nas áreas visitadas, não se observou demarcações e nem formação de ruas na maioria dos pomares. A pulverização para o controle das cigarrinhas vetoras não é realizado.

Folhas com sintomas de CVC foram encontradas em todos os municípios visitados (Figuras 3.3, 3.4, 3.5 e 3.6) destacando principalmente o município de Presidente Figueiredo e a região da hidrelétrica de Balbina, onde ocorrem várias propriedades rurais com grandes áreas plantadas apresentando sintomas típicos de CVC como pode-se observar nas Figuras 3.8 e 3.9, em plantas das variedades Pêra e Valência.

Os sintomas de CVC foram mais facilmente detectados nos meses de julho a novembro, época de maior intensidade de calor e seca. Nos meses de dezembro a

julho, épocas de grande quantidade de chuvas, os sintomas foram menos visível devido, provavelmente, ao período de maior vegetação das plantas.



Figura 2.2 - Vista geral do pomar da fazenda Ábila Mady situada a km 84 na rodovia entre Manaus e Itacoatiara (AM 010).



Figura 2.3 - Vista do sítio Braga Filho, situada na rodovia Br 174 no km179 ramal do paulista, no município de Presidente Figueiredo - AM.



Figura 2.4– Pomar de citros na fazenda Nova Esperança localizada no município de Itacoatiara – AM.



Figura 2.5 - Vista do pomar da fazenda Jiquitaia situada no município de Rio Preto da Eva – AM.



Figura 2.6 – Face adaxial da folha de laranja com manchas cloróticas, sintoma característico de CVC.

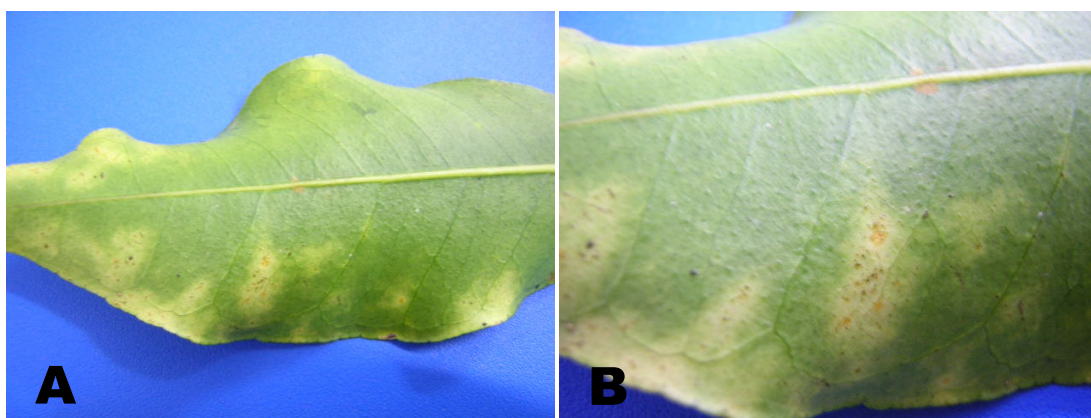


Figura 2.7 – Face adaxial da folha de Citros (*Citros sinensis*). A) sintomas característicos de CVC, necrose foliar (Bolhas de goma). B) Necrose foliar .

Tabela 2.1 - Locais de coleta, variedades, idades das plantas amostradas, número total de plantas e número de plantas com sintomas de CVC no município de Manaus – AM.

| Local | Variedade | Idade da Planta (anos) | N. total plantas | N. de plantas com sintomas | % de plantas com sintoma de CVC |
|---|-----------------|------------------------------|---------------------|----------------------------------|---|
| F. D. Jacinta Km 80 | Pêra/Valência | 10 | 35 | 8 | 22,8 |
| F. Ábila Mady Km 84 | Valência | 8 | 50 | 14 | 28 |
| S. do Bigode km 86 | Valência | 7 | 450 | 10 | 2,2 |
| S. Boas Novas km 45 | Pêra/Valência | 10 | 100 | 8 | 8 |
| S. Dalva Andréia Km 58 | Pêra/Valência | 12 | 50 | 14 | 28 |
| S. da Viola Tarumã | Natal | 7 | 15 | 10 | 66,6 |
| S. da Érica Km 34 | Natal | 3 | 50 | 5 | 10 |
| S. Salomito km 35 | Natal /Valência | 5 | 100 | 35 | 35 |
| S. Dr. Modesto V-Tarumã | Valência | 10 | 30 | 30 | 100 |
| S. Cleanto Antony Km 55 | Valência | 3 | 40 | 20 | 50 |
| S. Zé Teixeira Km 10 | Natal /Valência | 8 | 15 | 10 | 66,6 |
| S. M. P. Dourada | Natal/Valência | 9 | 20 | 10 | 50 |
| S. Salles Km 24 R.1 | Pêra | 15 | 25 | 7 | 28 |
| S. Pasárgada Km 70 | Pêra | 10 | 150 | 60 | 40 |
| N ^a . S ^a . de Nazaré km 26 | Natal/Valência | 8 | 30 | 24 | 80 |

Tabela 2.2 - Locais de coleta, variedades, idades das plantas amostradas, número total de plantas e número de plantas com sintomas de CVC no município de Rio Preto da Eva - AM.

| Local | Variedade | Idade da Planta (anos) | N. total de plantas. | N. de plantas com sintomas | % de plantas com sintoma de CVC |
|--------------------------|------------------|------------------------------|----------------------------|----------------------------------|---|
| Seringal Pioneiro | natal | 8 | 2000 | 500 | 25 |
| Fazenda Louvor | Pêra | 8 | 1000 | 250 | 25 |
| S. do Libermam | natal | 5 | 1000 | 200 | 20 |
| Sítio Marial | Valencia | 5 | 500 | 250 | 50 |
| Sítio D. Joaquina | Natal/pêra/lima | 10 | 200 | 40 | 20 |
| S. N. S. de Nazaré Km 26 | Natal/pêra | 12 | 80 | 40 | 50 |
| S. Glória e Louvor Km 75 | Natal/ pêra | 4 | 45 | 3 | 6,6 |
| Fazenda Monte Sinai | Natal/pêra | 5 | 500 | 150 | 30 |
| S. Felipe Dal Km 35 | natal | 7 | 100 | 15 | 15 |
| S. Andreia Km 58 | natal | 10 | 150 | 15 | 10 |
| S. A. Passarada Km 85 | Pêra | 8 | 80 | 8 | 10 |
| S. Siqueira Pinto Km 63 | Bahia/pêra/ | 12 | 45 | 10 | 22,2 |
| F. Progresso Km 115 | Natal/pêra | 7 | 1000 | 400 | 40 |
| F. do Japonês Km 24 | Sunki/natal/lima | 10 | 3000 | 334 | 11,1 |
| S. Canoas Km 85 | Natal | 8 | 100 | 10 | 10 |

Tabela 2.3 - Locais de coleta, variedades, idades das plantas estudadas, número total de plantas e número de plantas com sintomas de CVC no município de Presidente Figueiredo - AM.

| Local | Variedade | Idade da Planta (anos) | N. total de plantas. | N. de plantas com sintomas | % de plantas com sintoma de CVC |
|-------------------------------------|--------------------|------------------------------|-------------------------|----------------------------------|---|
| S. Carlos Vanderlei - AM 240 Km 3 | Natal | 8 | 100 | 40 | 40 |
| | Valencia | | | | |
| S. Edson Barcelos Br 174 Km 101 | Natal | 5 | 500 | 250 | 50 |
| S. F. Oliveira Br 174 Km 120 | Pêra | 10 | 150 | 100 | 66,6 |
| S. F. Fermim Br 174 Ramal do P. | Pêra | 10 | 300 | 100 | 33,3 |
| J. Eufrásio Br. 174 R.Paulista Km 5 | Natal | 15 | 100 | 15 | 15 |
| S. da Lia AM 240 Km 14 lote 24 | Natal/pêra | 8 | 50 | 15 | 30 |
| S. L. de Abreu AM 240 Km 179 | Valencia/ Natal | 8 | 50 | 15 | 30 |
| S. J. Maria dos Sntos Am 240, Km | Natal | 10 | 80 | 25 | 31,2 |
| S. repouso da Pantera | Pêra | 7 | 15 | 10 | 66,6 |
| S. Maria Íris Am 240 Km 46 M/D | Pêra | 6 | 35 | 10 | 28,5 |
| S. N. Matias Am 240, Km 32 Rm 06 | Pêra | 10 | 100 | 10 | 10 |
| S. Osni Am 240, Km 42 m/D | Pêra | 10 | 150 | 15 | 10 |
| S. Ozéias Br 174, Km 180, Ramal | Natal | 10 | 150 | 15 | 10 |
| S. Sebastiana Br 174, Km 179, | Pêra | 8 | 35 | 15 | 42,8 |
| S. Brejo do Matão Br 174 Km 15 | Valência/ Pêra | 20 | 4000 | 800 | 20 |

Tabela 2.4 - Locais de coleta, variedades, idades das plantas estudadas, número total de plantas e número de plantas com sintomas de CVC no município de Itacoatiara - AM.

| Local | Variedade | Idade da Planta (anos) | N. total de plantas | N. de plantas com sintomas | % de plantas com sintoma de CVC |
|--|----------------|------------------------------|---------------------------|-------------------------------------|---|
| Sítio Nossa S. de Nazaré | Natal/Pêra | 15 | 400 | 150 | 3,7 |
| Sítio Boa Esperança | Natal | 10 | 350 | 100 | 28,5 |
| Sítio Fé em Deus | Natal | 8 | 1000 | 150 | 15 |
| Sítio Boas Novas | Pêra | 10 | 400 | 100 | 25 |
| Sítio da Luzia | Pêra | 10 | 150 | 50 | 33,3 |
| S. da Conceição Km 240 Rama 06 L. 321 C. Cristã | Natal | 10 | 400 | 150 | 3,7 |
| Sítio do Pelado | Natal | 8 | 400 | 40 | 10 |
| Fazenda Sakai Am 010 Km 170 | Natal | 7 | 10.000 | 1000 | 10 |
| S. Aurinéia | Pêra | 10 | 150 | 15 | 10 |
| S. Raimundo Santos | Natal | 15 | 400 | 40 | 10 |
| S. Maria | Natal | 20 | 150 | 15 | 10 |
| S. Raimundo Marques | Pêra /Valencia | 10 | 150 | 15 | 10 |
| S. Vicente Pinto | Natal | 10 | 350 | 35 | 10 |
| S. Neide | Natal | 8 | 300 | 30 | 10 |
| S. João Couto | Bahia/Natal | 5 | 300 | 150 | 5 |

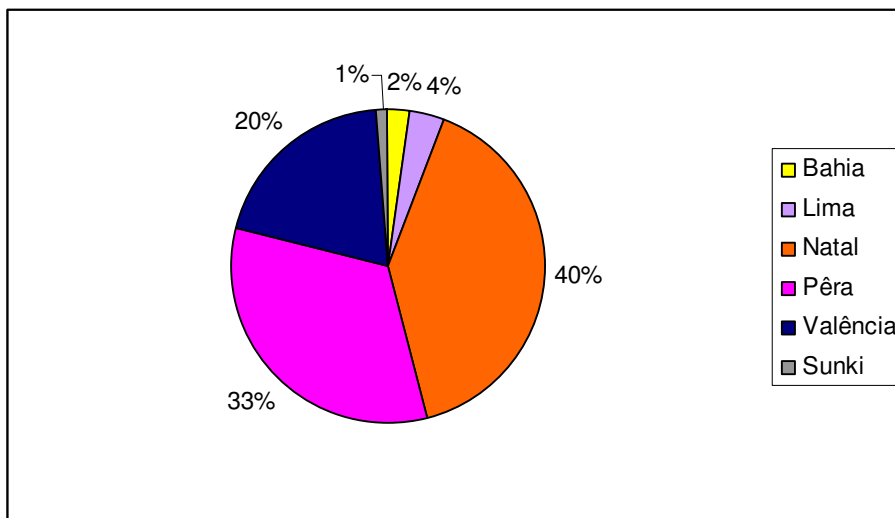


Figura 2.8 – Variedades plantadas de citros (*Citros sinensis*) nos municípios visitados no estado do Amazonas.

Tabela 2.5 - Análise de variância das notas atribuídas às idades das plantas de citros em função dos municípios no estado do Amazonas.

| F. V. | G.L. | S. Q. | Q. M. | F |
|--------------|-------------|--------------|--------------|----------|
| Municípios | 3 | 59.,8 | 19,79 | 2,46 |
| Rep | 14 | 162,83 | 11,63 | 1,08 |
| Resíduo | 42 | 450,36 | 10,72 | |
| C.V. (%) | 36,05 | | | |

*Não Significativo a 5% de probabilidade ao teste F.

Tabela 2.6 - Análise de variância de notas atribuídas a incidência de CVC em plantas de citros em função dos municípios no estado do Amazonas.

| F. V. | G.L. | S. Q. | Q.M. | F |
|--------------|-------------|--------------|-------------|----------|
| Municípios | 3 | 3838,07 | 1279,35 | 3,259* |
| Rep | 14 | 4796,58 | 342,61 | 0,873 |
| Resíduo | 42 | 16487,63 | 392,56 | |
| C. V. (%) | 68,09 | | | |

*Significa a 5% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 2.7 - Valores médios, em porcentagem, de notas atribuídas a incidência de CVC em plantas de citros em função dos municípios no estado do Amazonas.

| Municípios | (1) |
|--------------------|--------------|
| Rio Preto | 40.66 a |
| Itacoatiara | 32.26 a |
| Manaus | 22.99 b |
| P. Figueiredo | 20.45 b |
| Média geral | 29,09 |

(1) Médias na vertical com a mesma letra, não diferem a 5% de probabilidade pelo teste de SKott-Knott.

Tabela 2.8 - Comparações de médias de idade em ano, pelo teste t, de locais e notas atribuídas à plantas de citros em municípios dos estados de São Paulo e do Amazonas.

Idade

| Estado | Médias⁽¹⁾ | Probabilidade |
|---------------|-----------------------------|----------------------|
| São Paulo | 4.44b | 0.0001** |
| Amazonas | 9.08a | |

Nota

| Estado | Médias⁽¹⁾ | Probabilidade |
|---------------|-----------------------------|----------------------|
| São Paulo | 4.26b | 0.0000** |
| Amazonas | 29.09a | |

(1) Médias na vertical com a mesma letra, não diferem a 1% de probabilidade pelo teste de t.

** Significa a 1% de probabilidade pelo teste t ($p \leq 0.001$)

A análise de variância das notas atribuídas às idades das plantas (Tabela 3.6) nos municípios do estado do Amazonas foi significativa.

Os pomares dos municípios do estado do Amazonas estão infectados em 29,09% (Tabela 3.9) A percentagem de notas atribuídas a incidência das plantas mostra que o município de Rio Preto da Eva apresenta 40,66% dos seus pomares afetados, seguido do município de Itacoatiara 32,26%, Manaus 22,99% e 20,45% e Presidente Figueiredo. Estes dados mostram a formação de dois blocos, um formado entre o município de Rio Preto da Eva e Itacoatiara e outro entre Manaus e Presidente Figueiredo, isto se explica a proximidade geográfica entre estas regiões.

Foram realizadas comparações entre as médias obtida das idades e as notas de incidência das plantas através do teste t (Tabela 3.8). As médias indicam que a idade das plantas no estado de São Paulo é 4,440 para a incidência de CVC nas plantas, e de 9,08 para o estado do Amazonas. Isso pode ser explicado fato da região Amazônica apresentar uma temperatura mais elevada e maior intensidade de luz, logo as plantas formam um camada cerosa na folha maior, tornando-as mais resistentes á infecções. As médias referentes a severidade de CVC nas plantas de citros foi maior no estado do Amazonas do que em São Paulo, devido, aos cuidados fitossanitários que os citricultores do estado de São Paulo têm.

3.2 ISOLAMENTO DE *XYLELLA FASTIDIOSA*

A metodologia descrita no item 2.4 permitiu o isolamento da bactéria *Xylella fastidiosa* (Figura 3.11 e 3.12). Os meios de cultura usados são extremamente ricos em nutrientes, o que propiciou o crescimento de uma grande quantidade de

microorganismos, contaminantes que dificultaram o isolamento da bactéria causadora da CVC. A Figura 3.13, observamos placas com isolados de *X. fastidiosa*. Presidente Figueiredo foi o município onde foram isoladas a maior quantidade de bactérias 35 placas isoladas, seguido do município de Rio Preto da Eva 29 placas, Itacoatiara 17 placas e Manaus 9 placas.



Figura 2.9 – Isolamento em Placa de Petri contendo a bactéria *X. fastidiosa*, isolada de folhas sintomáticas de CVC, em meio de cultura PCYE, de amostras do sítio Brejo do Matão Km 14 da BR 174 (Presidente Figueiredo - AM).

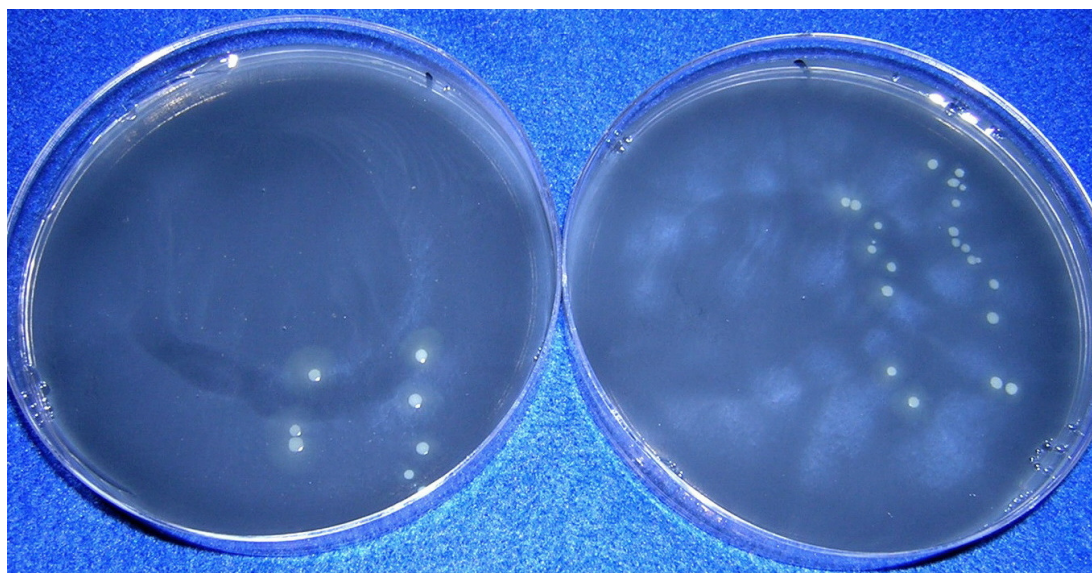


Figura 2.10 – *X. fastidiosa*, isolada de folhas com sintoma de CVC, em meio de cultura PCYE, de amostras do sítio Dalva Andréa Km 58 BR 165 (Manaus - AM).

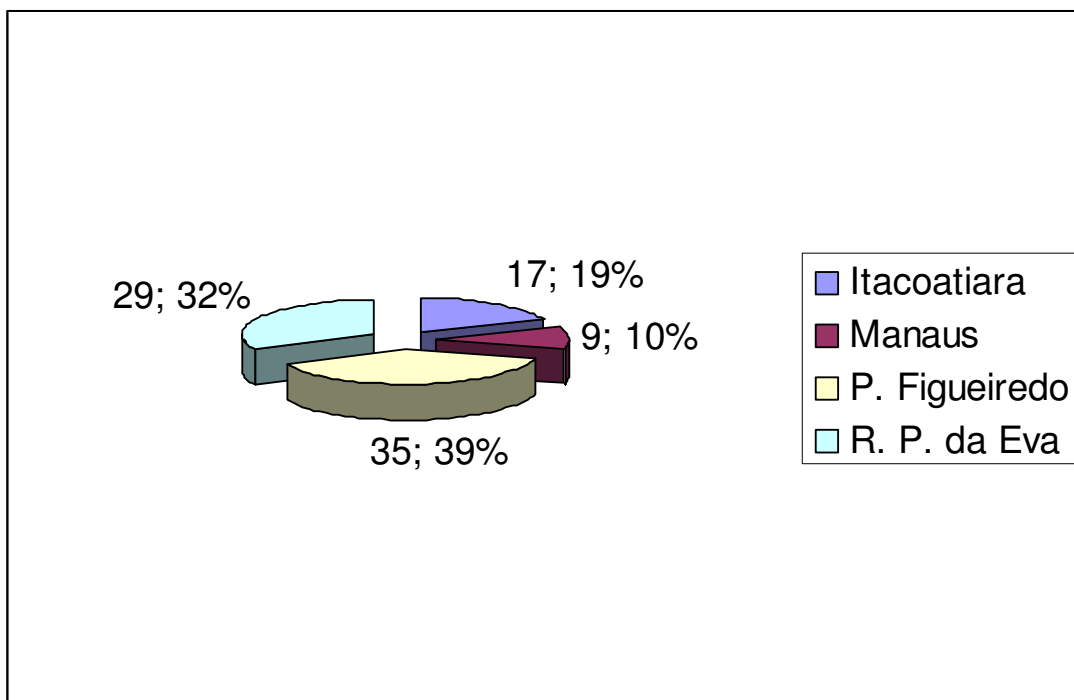


Figura 2.11 – Percentual do número de isolados de *Xylella fastidiosa* encontradas em amostras foliares coletadas nos municípios avaliados no estado do Amazonas.

4. DISCUSSÃO

A CVC esteve presente em todos os municípios visitados no Amazonas. As plantas analisadas apresentaram sintomas característicos de CVC como manchas cloróticas nas folhas e frutos atrofiados, similares aos observados no estado de São Paulo. O diagnóstico de CVC foi confirmado por meio de isolamento da bactéria *Xylella fastidiosa* em meio de cultura. A morfologia das colônias da bactéria *X. fastidiosa* também foi idêntica às cepas isoladas no estado de São Paulo.

A incidência de CVC dos municípios visitados no estado do Amazonas foi de 29,09% sendo mais severa nos municípios de Rio Preto e Itacoatiara.

As variedades mais plantadas no Estado do Amazonas foram Natal e Valência, sabidamente suscetíveis à CVC. Seria estratégico para a região o desenvolvimento de variedades mais adaptadas ao solo amazônico e resistente ao patógeno.

De acordo com a análise de variância, verificou-se que idade das plantas afetadas não apresentou diferença significativa. A temperatura em nossa região é muito mais elevada do que na região do sudeste do Brasil, com isso, as plantas de citros na região amazônica apresentam uma camada cerosa maior do que as plantas de São Paulo tornando-as menos susceptíveis a CVC.

O isolamento de *Xylella fastidiosa* em folhas sintomáticas do Estado do Amazonas foi dificultado devido a grande diversidade de microrganismos endofíticos encontrados no tecido foliar. Isso explica a baixa quantidade colônias bacterianas isoladas. Em plantas sintomáticas de CVC do estado de São Paulo foi mais fácil o isolamento de *Xylella fastidiosa* do que no estado do Amazonas.

A citricultura já existe no estado há pelo menos três décadas e muitas mudas trazidas do estado de São Paulo possivelmente estariam contaminadas. Carvalho (2001) e Salva, (2001) detectaram a disseminação de CVC nos pomares por meio de mudas contaminadas.

Pomares contaminados são fontes de inoculo para pomares saudáveis, assim como foi demonstrado nos estudos de Laranjeira *et al.*, (1998). Nas principais áreas analisadas no estado do Amazonas, existem pomares contaminados ao lado de pomares saudáveis, assim como existem plantas jovens e saudáveis ao lado de plantas velhas e contaminadas.

Segundo Pria Júnior *et al.*, (2003) é possível transmissão de CVC por meio de sementes contaminadas que após germinarem espalham a doença para as plântulas. Este também pode ter sido um dos fatores de disseminação da doença no estado haja vista que as sementes foram importadas do estado de São Paulo e Minas Gerais.

Torna-se necessário desenvolver medidas preventivas e erradicar os focos da doença que se encontra em pomares já afetados no estado do Amazonas.

Valle e Salles Filho, (2001) propuseram adoção do uso de viveiros telados para a produção de mudas cítricas. Viveiros telados poderiam ser construídos pelos órgãos de agricultura competentes do Estado para que mudas certificadas pudessem ser distribuídas aos pequenos agricultores.

A correlação entre o estado do Amazonas e o estado de São Paulo, mostra que os pomares do estado de São Paulo apresentam um número maior de variedades plantadas e suscetíveis a CVC.

As diferenças se explicam devido nossa região apresentar condições climáticas diferentes. De acordo com Machado *et al.*(2007) a temperatura e a

deficiência hídrica torna os sintomas de CVC mais evidentes. As plantas no estado do Amazonas não sofrem por deficiência hídrica, impedindo a visualização de sintomas foliares de CVC nos pomares amazônicos.

O clima no Amazonas é quente e úmido e no estado de São Paulo é quente e seco. O solo amazônico é ácido e necessita constantemente de correção, o solo em São Paulo é de terra roxa propício para as plantações de citros. Outro fator preponderante é a localização dos pomares no estado do Amazonas que estão sempre próximos a mata nativa. Esse fato já foi sugerido por Laranjeira *et al.* (1998) que demonstra em seus estudos que os ventos interferem na transmissão de CVC, por este motivo atualmente são plantadas paliteiras como quebra-ventos nos pomares de São Paulo para tentar impedir a dispersão da doença através de insetos vetores.

Capítulo III

Detecção de *Xylella fastidiosa* (Wells) em pomares de citros (*Citrus sinensis*) através de PCR específico.

1. INTRODUÇÃO

A utilização da PCR com finalidade de diagnosticas patógenos provocou uma verdadeira revolução na biologia devido à sua facilidade, rapidez, e sensibilidade. Segundo Coletta Filho (1999), havia a necessidade de uma técnica que detectasse o patógeno, no caso *X. fastidiosa*, em baixas concentrações, que apresentasse especificidade em relação ao patógeno e certa rapidez na sua execução. Foi então desenvolvido o protocolo de PCR para detecção de *X. fastidiosa* em plantas infectadas com CVC realizado por Minsavage *et al.*, (1994). A especificidade do teste de PCR deriva do desenvolvimento de sondas (primers) de oligonucleotídeos que reconhecem seqüências específicas no DNA do patógeno. Os “primers” desenvolvidos por Minsavage *et al.* (1994) são conhecidos como RST31 e RST33, os quais amplificam um fragmento de 700 pares de base (pb). Os “primers” 272-1 e 272-2-int são específicos à estirpe de citros, distinguindo-a da estirpe de videira, mas não de cafeeiro, e, amplificam uma região no genoma da bactéria com comprimento de aproximadamente de 500pb (Pooler & Hartung, 1995). Quando são comparados resultados obtidos por meio da PCR com os obtidos com o teste de ELISA, observa-se que a técnica da PCR se mostra mais eficiente, pois não necessita de uma grande quantidade de células além de ser 100 vezes mais sensível, com um limite de detecção é de 1×10^2 ufc/mL.

O uso de PCR para detecção de CVC proporcionou o desenvolvimento de outras técnicas e alavancou as pesquisa sobre doença. Usando “primers” arbitrários foi possível distinguir as diferenças entre amostras de *X. fastidiosa* provenientes de videira, ameixa, café e citros e verificar seus coeficientes de similaridade (Costa *et al.*, 2000).

O presente trabalho teve como objetivo realizar PCR específico para a detecção da bactéria *Xylella fastidiosa*, agente causal da Clorose Variegada do Citros em pomares do estado de São Paulo e Manaus.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 PCR específico para detectar *X. fastidiosa* em plantas de citros

Amostras de plantas foram obtidas de cultivares de laranja doce do estado de São Paulo e do Amazonas. Para proceder as análises a seiva foi extraída após a obtenção de um macerado das folhas. O protocolo utilizado foi descrito por Lopes *et al.*, (2003)

O PCR foi realizado segundo Pooler e Hartung, (1995) e os primers utilizados foram XF5 reverso XF5 forward, 272-1 e 272-2 (Tabela 4.1).

Para detecção da CVC, amostras de folhas de citros foram removidas e maceradas com tampão PBS. O macerado foi adicionado aos tubos de Eppendorf e Centrifugado durante 3 minutos a 12 mil rpm e recebeu 1 ml de tampão de extração (0.5 M tris-HCl pH 8,2; 2% PVPP; 140mM NaCl; 0,05% tween20). Após agitação em vortex por alguns segundos o material foi centrifugado 3 minutos a 12 mil rpm. Descartou-se o sobrenadante e o pellet foi ressuspensos em 20 µl de água Mili Q estéril. Após a fervura por 10 minutos deixou-se esfriar a temperatura ambiente. Para a reação da PCR foram usados 10,25 µl de água milli-Q estéril, 2,5µl de tampão 10x, 1,0 µl de dNTPs a 2,5 mM, 2,0 µl de Cloreto de Magnésio (MgCl₂) a 50 mM, 0,25 µl de Taq polimerase, 2,0 µl de cada primer Xf5R e Xf5F, específico para *X. fastidiosa* (Lopes *et al.* 2000), e 5,0 µl das amostras. As reações de ampliações foram realizadas em termociclador (PTC100) onde foram submetidos a um ciclo de 94°C por 4 minutos, 35 ciclos de 92°C por 2 minutos, 58°C por 1 minuto e 30 segundos, e 72°C por 1 minuto, e um ciclo final de 72°C por 10 minutos. As

amostras foram visualizadas em gel de agarose 1%, com auxílio do transluminador de luz ultravioleta e a seguir foram fotografadas

Tabela 3.1 - Lista de Primers, seqüências, temperatura de anelamento e tamanho do produto de PCR.

| Primers | Seqüência | Temp. de anelamento (°C) | Tamanho do produto de PCR (bp) |
|--------------------------------|--|--------------------------|--------------------------------|
| Xf5 R e Xf5 F | CGT CTG CTA TTT ATT GCA TTT G CAA CGT GTA GCG CAA ACG | 62 | 500 |
| 272-1 272-2 | AGC GGG CCA ATA TTC AAT TGC AGC GGG CCA AAA CGA TGC GTG | 62 | 500 |

3. RESULTADOS

3.1 PCR ESPECÍFICO PARA A DETECÇÃO DE *XYLELLA FASTIDIOSA*

Os produtos de polimerase chain reaction (PCR) foram amplificados a partir do DNA genômico de *Xylella fastidiosa*, (Figura 4.1) agente causal da CVC (Clorose Variegada do Citros) utilizando-se de primers específicos XF5 R, XF5 F, 272-1 e 272-2 separados por gel de agarose. As linhas 1,2,3,4,5,6,7 demonstraram a presença de *X. fastidiosa* nas seguintes plantas originadas de propriedades rurais no estado do Amazonas: Sítio Dalva Andréia(1); Fazenda Água Santa Claudia (2), Sítio Repouso da Pantera (3), sítio Brejo do Matão (4), Sítio Nossa Senhora de Nazaré (5), Sítio da Gloria (6) e Sítio 1 do km 48 / da rodovia Manaus - Rio Preto da Eva (7). Na amostra (X0) foi utilizado o DNA da bactéria 9A5C e na amostra (M) foi utilizado um marcador molecular de 1Kb. De acordo com estes resultados foi possível detectar pela primeira vez no estado do Amazonas o agente causal a Clorose Variegada do Citros. A técnica de PCR se mostrou eficiente para diagnóstico rápido de plantas sintomáticas. Ao contrário da técnica de PCR, a técnica do isolamento apresentou muitas dificuldades devido a presença de um grande número de outras bactérias endofíticas não fastidiosas, que apresentavam crescimento mais rápido, dificultando o isolamento de *X. fastidiosa* em meio de cultura.

Para a detecção de *X. fastidiosa* de plantas sintomáticas coletadas no estado de São Paulo, o PCR também se mostrou eficiente. Foi possível detectarmos a presença do agente causal em todas as amostras coletadas, (Figura 4.2).

Nos municípios do estado do Amazonas foi realizada ainda uma análise comparativa da frequência de isolamento de *X. fastidiosa* em meio de cultura em

relação à detecção do patógeno por meio do teste de PCR, (Tabelas 4.2, 4.3, 4.4 e 4.5 respectivamente). As avaliações evidenciam que o diagnóstico por meio de PCR é mais eficiente e mais rápido do que o isolamento do patógeno em meio de cultura.

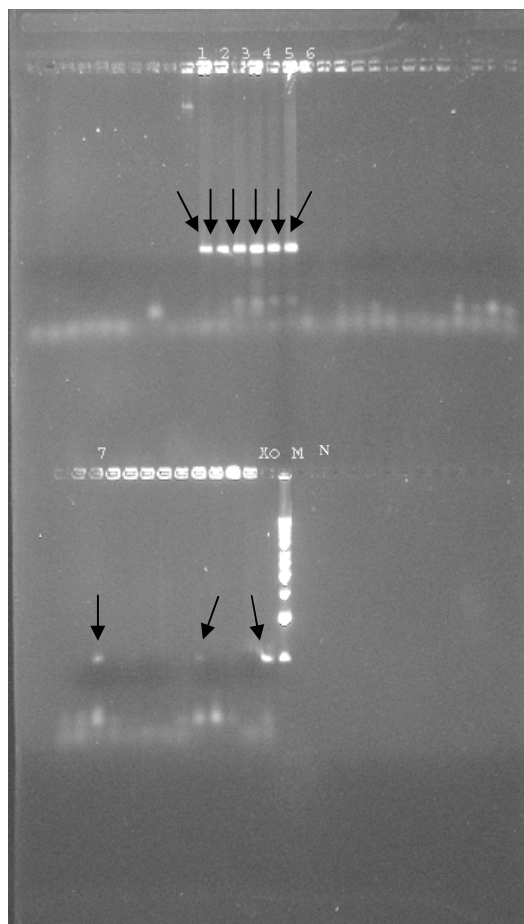


Figura 3.1 - Gel de eletroforese contendo as amostras de PCR (Polimerase Chain Reaction) dos seguintes pontos de coleta: no estado do Amazonas: Sítio Dalva Andréia (1); Fazenda Água Santa Claudia (2); Sítio Repouso da Pantera (3); Sítio Brejo do Matão (4); Sítio Nossa Senhora de Nazaré (5); Sítio da Gloria (6) e Sítio 1km 48 da rodovia Manaus - Rio Preto da Eva (7). Todas as amostras foram positivas para identificação de *Xylella fastidiosa*, agente causal da CVC. Na amostra (X0) foi utilizado o DNA da bactéria 9A5C (Controle positivo), na amostra (M) foi utilizado um marcador molecular de 1Kb e na amostra (N) foi aplicado um controle negativo apenas com água.

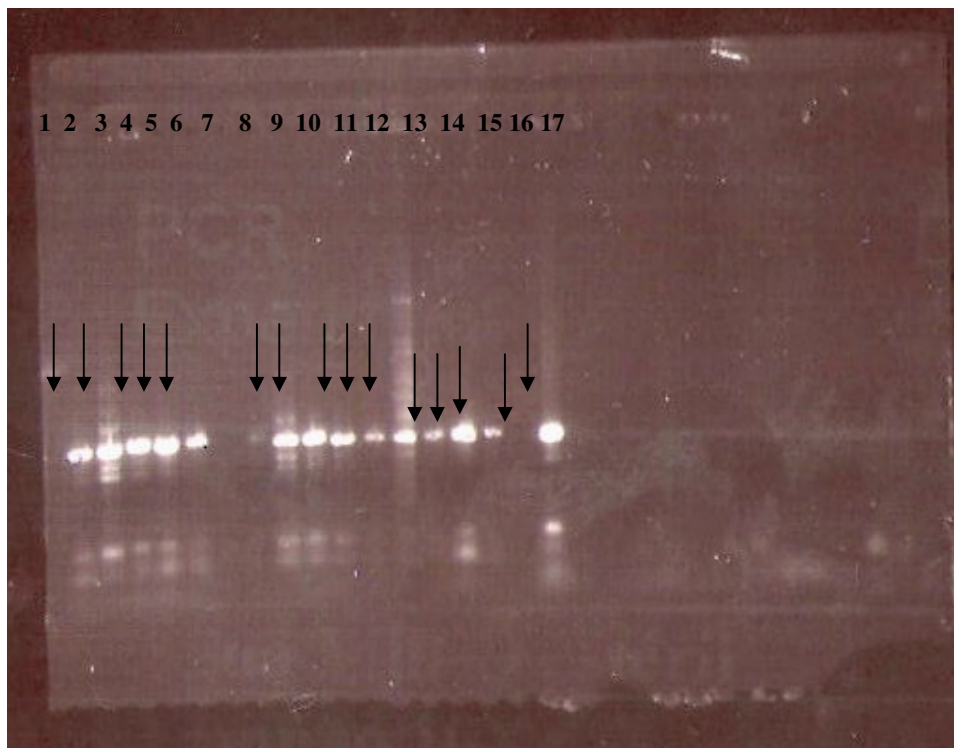


Figura 3.2 - Gel de eletroforese contendo as amostras de PCR (Polimerase Chain Reaction) dos seguintes pontos de coleta do estado de São Paulo: (1) Jeriquara; (2) Capela do Alto; (3) Frutal; (4) Pratânea; (5) Alambari; (8) Araraquara; (9) Neves Paulista; (10) Novo Horizonte; (11) Araras; (12) Comendador Gomes; (13) Itápolis; (14) Matão; (15) Macaubal; onde mostraram-se positivas a identificação de *Xylella fastidiosa*, agente causal da CVC. (16) controle negativo e (17) controle positivo.

Tabela 3.2 – Propriedades rurais plantas com sintomas de CVC presentes no município de Manaus, número de amostras coletadas, número de amostras em meio de cultura e número de amostras detectadas por PCR.

| Locais | No. de amostras coletadas | Número de amostras isoladas em meio de cultura | No. de amostras detectadas por PCR específico |
|---|----------------------------------|---|--|
| F. D. Jacinta Km 80 | 15 | 0 | 4 |
| F. Ábila Mady Km 84 | 15 | 0 | 2 |
| S. do Bigode km 86 | 15 | 0 | 2 |
| S. Boas Novas km 45 | 15 | 0 | 7 |
| S. Dalva Andréia Km 58 | 15 | 2 | 6 |
| S. da Viola Tarumã | 15 | 0 | 4 |
| S. da Érica Km 34 | 15 | 2 | 8 |
| S. Salomito km 35 | 15 | 2 | 8 |
| S. Dr. Modesto -Tarumã | 15 | 0 | 5 |
| S. Cleanto Antony Km 55 | 15 | 0 | 9 |
| S. Zé Teixeira Km 10 | 15 | 0 | 5 |
| S. M. Magalhães P. Dourada | 15 | 0 | 8 |
| S. Salles Magalhães Km 24 | 15 | 0 | 10 |
| S. Passárgada Km 70 | 15 | 3 | 8 |
| N ^a S ^a . de Nazaré | 15 | 0 | 5 |

Tabela 3.3 - Propriedades rurais com plantas com sintomas de CVC presentes no município de Rio Preto da Eva, número de amostras coletadas, número de amostras em meio de cultura e número de amostras detectadas por PCR.

| Locais | No. de amostras coletadas | Número de amostras isoladas em meio de cultura | No. de amostras detectadas por PCR específico |
|----------------------------|----------------------------------|---|--|
| Seringal Pioneiro | 15 | 0 | 5 |
| Fazenda Louvor | 15 | 0 | 8 |
| S. do Libermam | 15 | 0 | 15 |
| Sítio Marial | 15 | 1 | 10 |
| Sítio D. Joaquina | 15 | 3 | 10 |
| S. N. S. de Nazaré Km 26 | 15 | 1 | 15 |
| S. Glória e louvor Km 75 | 15 | 0 | 10 |
| Fazenda Monte Sinai | 15 | 5 | 12 |
| S. Felipe Dal Km 35 | 15 | 4 | 8 |
| S. Andreia Km 58 | 15 | 2 | 10 |
| S. Aprisco Passarada Km 85 | 15 | 0 | 7 |
| S. Siqueira Pinto Km 63 | 15 | 3 | 15 |
| Fazenda Progresso Km 115 | 15 | 3 | 15 |
| Fazenda do Japonês Km 24 | 15 | 4 | 12 |
| S. Canoas Km 85 | 15 | 3 | 14 |

Tabela 3.4 – Propriedades rurais com plantas com sintomas de CVC presentes no município de Presidente Figueiredo, número de amostras coletadas, número de amostras em meio de cultura e número de amostras detectadas por PCR.

| Locais | No. de amostras coletadas | Número de amostras isoladas em meio de cultura | No. de amostras detectadas por PCR específico |
|---------------------------------------|----------------------------------|---|--|
| S. Carlos Vanderlei - AM 240 Km 3 | 15 | 3 | 15 |
| S. Edson Barcelos Br 174 Km 101 | 15 | 1 | 12 |
| S. F. Oliveira Br 174 Km 120 R.B. Es | 15 | 0 | 10 |
| S. F. Fermim Br 174 R do Paulista | 15 | 5 | 5 |
| J. Eufrásio Br. 174 R.P Km 5 | 15 | 6 | 6 |
| S. da Lia AM 240 Km 14 lote 24 M/D | 15 | 5 | 12 |
| S. L. de Abreu AM 240 Km 179 R P Km 8 | 15 | 0 | 15 |
| S. J. Maria dos Santos Am 240, Km 54 | 15 | 0 | 14 |
| S. Repouso da Pantera | 15 | 0 | 10 |
| S. Maria Íris Am 240 Km 46 M/D | 15 | 3 | 10 |
| S. N. Matias Am 240, Km 32 L 322 | 15 | 1 | 12 |
| S. Osni Am 240, Km 42 m/D | 15 | 5 | 8 |
| S. Ozéias Br 174, Km 180, R do Km 6,5 | 15 | 0 | 5 |
| S. Da Sebastiana Br 174, Km 179, R P | 15 | 3 | 10 |
| S. Brejo do Matão Br 174 Km 15 | 15 | 3 | 15 |

Tabela 3.5 – Propriedades rurais com plantas com sintomas de CVC presentes no município de Itacoatiara, número de amostras coletadas, número de amostras em meio de cultura e número de amostras detectadas por PCR.

| Locais | No. de amostras coletadas | Número de amostras isoladas em meio de cultura | No. de amostras detectadas por PCR específico |
|---------------------------------|----------------------------------|---|--|
| Sítio Nossa S. de Nazaré | 15 | 0 | 4 |
| Sítio Boa Esperança | 15 | 2 | 8 |
| Sítio Fé em Deus | 15 | 1 | 10 |
| Sítio Boas Novas | 15 | 0 | 12 |
| Sítio da Luzia | 15 | 0 | 14 |
| S. da Conceição Km 240 Ramal 06 | 15 | 0 | 15 |
| Sítio do Pelado | 15 | 1 | 10 |
| Fazenda Sakai Am 010 Km 170 | 15 | 0 | 15 |
| S. Aurinéia | 15 | 0 | 15 |
| S. Raimundo Santos | 15 | 5 | 10 |
| S. Maria | 15 | 3 | 10 |
| S. Raimundo Marques | 15 | 0 | 10 |
| S. Vicente Pinto | 15 | 2 | 15 |
| S. Neide | 15 | 2 | 8 |
| S. João Couto | 15 | 1 | 5 |

4. DISCUSSÃO

Segundo Henson e French (1993), o método de PCR é altamente sensível na detecção de *X. fastidiosa*, sendo o mais recomendado apesar de não permitir quantificação da bactéria na planta.

X. fastidiosa tem sido detectada em diversos hospedeiros pelo método de PCR, como em citros (Beretta *et al.*, 1997), videira (Purcell & Saunders, 1999) e cafeeiro (Lima *et al.*, 1998) entre outros, com resultados precisos devido à alta sensibilidade do teste.

Um dos empecilhos para a execução da técnica de PCR é a extração de DNA que pode, em alguns casos liberar compostos que inibem as reações de polimerização em cadeia e, portanto, mascarar a presença da bactéria. Lopes *et al.*, (2000) introduziram uma pequena modificação na técnica utilizando um tampão de extração que ajuda a neutralizar os compostos fenólicos.

O Amazonas já possui uma cultura de citros há pelo menos 3 décadas, mas no entanto ainda não havia sido citada a ocorrência de CVC nos pomares do estado. Acredita-se que a CVC já se encontrava presente a pelo menos uma década, devido a idade de algumas plantas analisadas.

O surgimento da CVC no Amazonas deve ter ocorrido devido ao transporte de mudas contaminadas trazidas do estado de São Paulo e Minas Gerais, e o fato de até o presente momento não ter sido detectada a presença do patógeno deve-se ao não aprimoramento das técnicas de diagnóstico nos pomares do estado.

Por meio da PCR foi possível diagnosticar a CVC nos municípios visitados no estado de São Paulo e Amazonas. No estado Amazonas foi possível identificar um número maior de plantas com CVC em comparação as técnicas de isolamento em

meio de cultura. O diagnóstico de CVC através do método de PCR se mostrou eficiente e seguro.

3. CONCLUSÕES

- ❖ No estado do Amazonas a maior incidência de CVC ocorre nos municípios de Rio Preto da Eva e Itacoatiara
- ❖ O PCR específico mostrou-se a melhor ferramenta para o diagnóstico de CVC.
- ❖ A CVC esta presente nos pomares dos municípios de Manaus, Presidente Figueiredo, Rio Preto da Eva e Itacoatiara.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABECITRUS. **Produção de laranja** – série histórica. (www.abecitros.com.br/safrano)
Ribeirão Preto, 2000.

ALMEIDA, R. P. P.; PEREIRA, E. F.; PURCELL, A. H. ; LOPES J. R. S. **Multiplication and movement of a citrus strain of *Xylella fastidiosa* within sweet orange**. Plant Disease, (4), 382-386, 2001.

AMORIM, L. BERGAMIN FILHO, A., PALAZZO, D. A. , BASSANEZI, R. B., GODOY, C. V., TORRES, G. A. M. **Clorose Variegada do Citrus: uma escala diagramática para a avaliação da doença**. Fitopatologia Brasileira, v. 18, n.2, p. 174-180 1993.

AUSUBEL, F. M., BRENT, R., KINGTON, R. E., MOORE, D. D. SEIDMAN J. G. SMITH, J. A., STRUHL, K. (1992) **Current procols in molecular biology**, vol. I New York: Greene Publishing association and Wiley Interscience.

AYRES, A. J. Intensidade da Clorose Variegada do Citros em pomares comerciais de laranja do estado de São Paulo e sul do Triângulo Mineiro. Jaboticabal: Diss. (Mestrado) Universidade Estadual Paulista (**UNESP**).2000.

BERH, M. A., WILSON, M. A., GILL W. P., SALAMOM, H., SCHOOLNIK, G.K., RANE, S., AND SMALL, P. M. **Comparative genomics of BCG vaccines by whole genome DNA microarray**. Science 284: 1520-1523. 1999.

BERGAMIN FILHO, A.; HAU, B.; AMORIM, L.; LARANJEIRA, F. F. **Análise espacial de epidemias**. Revisão Anual de Patologia de Plantas, Viçosa, v. 10, p. 155-218, 2002.

BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. **Doenças com período de incubação variável em função da fenologia do hospedeiro**. Fitopatologia Brasileira, Brasília, v. 27, p. 561-565, 2002.

BASSANEZI, R B ; LARANJEIRA, Francisco Ferraz. **Spatial Patterns of Leprosis and its Mite Vector in Commercial Citrus Groves in Brazil**. Plant Pathology, no prelo, v. 56, p. 97-106, 2007.

BERETTA, M. J. G., BACH, E. F., ROSSETTI, V., LEE, E. F., DERRICK, K. S. **Serological detection of *Xylella fastidiosa* associated with Citrus Variegated Chlorosis disease in Brazil.** Summa Fitopathol. Jaguariúna, v. 17, n.1, p.10, 1991.

BERETTA, M. J. G. ; BARTHE, G. A.; CECCARDI, T. L.; LEE, R. F.; DERRICK, K. S. **Survey for strains of *Xylella fastidiosa* in citrus affected by citrus variegated chlorosis and citrus blight in Brazil.** Plant Disease. V. 81, n. 10, p.1196-1198, 1997.

BRENO L., PASCHOLATI, S. F., KITAJIMA, E. W., ISHIDA, M, L. **Adesão a fitopatógenos** (Rev.) RAPP Piracicaba. 2000

BOTEON, M. & VIDAL, A. J. **Safra menor cenário incerto.** Citricultura Atual Ano VI no.34 p. 4. 2003

CHAGAS C. M.; ROSSETTI, V.; BERETTA, M. J. G. **Electron-microscopy studies of Xylem-limited bacterium in sweet orange affect with citrus variegated chlorosis disease in Brazil.** Journal of Phytopatology-Phytopathologische Zeitschrift V. 134, n4, p.306-312, 1992.

CHEN, J. C.; BANKS, D.; JARRET, R. L.; CHANG, C. J.; SMITH, B. J. **Use of 16s rDNA sequences as signatures characters to identify *Xylella fastidiosa*.** Current microbiology. V.40, n.1, p.29-33, 2000.

CHEN, J. O.; LAMIKARA, C. J.; CHANG, AND D. L. HOPKINS. **Randomly amplified polymorphic DNA analysis os *Xylella fastidiosa* Pierce's disease and oak leaf scorch pathotypes.** Appl. Environ. Microbiol. 61:1688-1690 1995.

CHANG, C. J., GARNIER, M.,ZREIK, L. ROSSETI, V. &BOVÉ, J.M. **Citrus variegated chlorosis: cultivation of the causal bacterium and experimental reproduction of the disease.** Proceedings, 12th International Organization of Citrus Virologists Congress, 294-300. 1993.

COLETTA FILHO, H. D. ; BORGES, KLEBER MARTINS ; MACHADO, MARCOS A. **Diversidade genética em isolados de *Xylella fastidiosa* obtidos de diferentes cultivares de laranja doce.** In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Curitiba. Fitopatologia Brasileira (suplemento), 1999. v. 24. p. 248, 1999.

COSTA, H. S.; E. RAETZ, T. R. PINCKARD, C. GISPERT, R. HERNANDEZ-MARTINEZ, C. K. DUMENYO, AND D. A. COOKSEY. **Plant hosts of *Xylella fastidiosa* in near southern Califórnia vineyards.** Plant Dis. 88:1255-1261, 2004.

CONTRERAS, J. DEL V. **Pecosita ou falsa mancha grasieta na Argentina.** Laranja e Cia. (Matão) 31:6 1992.

DIAMANTE, A., ZUBRZYCKI, H., DOCAMPO, D., HAETELMAN, R. **CVC Clorosis Variegada de los citros: Una enfermedad que afeta la citricultura comercial.** Bella Vista: INTA, 10p.1999.

FERREIRA, H.; NETOJ. R.; GONÇALVES, E. R.; ROSATO, Y. B. **A simplified of subtractive hybridization protocol used to isolate DNA sequences specific to *Xylella fastidiosa*.** Microbiology- UK. V.145, n.8 p.1967-1975, 1999.

FRY, S. M.; MILHOLLAND, R. D. **Response of resistant, tolerant, and susceptible grapevine tissues to invasion by Pierce's disease bacterium, *Xylella fastidiosa*.** Phytopathology, v. 80, n.1, p. 66-69, 1990.

FUNDECITRUS. Descobertos mais sete vetores de CVC. Revista do Fundecitrus, Araraquara, Ano XIV, no. 94, p.7-8, 1999.

FUNDECITRUS. Manual de Manejo CVC. Revista do Fundecitrus, Araraquara, Ano XVI, 10 p, 2001.

FUNDECITRUS. CVC diminui em plantas novas. Levantamento amostral registra menor índice em sete anos. Revista do Fundecitrus. Araraquara, Ano XVII, no. 111, p.14-15, 2002.

GARCIA, A. L. Quantificação de parâmetros patológicos envolvidos em interações citros *Xylella fastidiosa*. Dissertação, Universidade de Ribeirão Preto, São Paulo, 2007.

GARCIA A. JR ; LOPES J. R. S. ; BERETTA M. J. G. **Population survey of leafhopper vectors of *Xylella fastidiosa* in citrus nurseries.** In Brazil International Congress of Citrus Nurserymen N°5, Montpellier , FRANCE, vol. 52, n° 6 p. 371-374, 1997.

HARTUNG J. S. BERETTA J., BRLANSKY R. H., SPISSO J., LEE R. F. Citrus variegated chlorosis bacterium: axenic culture, pathogenicity, and serological relationships with other strains of *Xylella fastidiosa*. **Phytopatology** 84: 591-97, 1994.

HENSON, J. M.; FRENCH, R. **The polymerase chain reaction and plant diseases diagnosis.** Annu. Rev. Phytopathol. 1993 31:81-109, 1993.

HOPKINS, D. L. AND THOMPSON, C. M. Seasonal concentration of the Pierce's disease bacterium in "Carlos" and "Welder" muscadine grapes compared with "Schuyler" bunch grape. **HortScience** 19:419-420, 1984.

HOPKINS, D. L. **Induced resistance to Pierce's disease of grapevine by weakly virulent strains of *Xylella fastidiosa*.** CFREC-Leesburg Research Report LBG93-2c, University of Florida, 1996.

HOPKINS, D. L. ***Xylella fastidiosa*: Xylem-limited bacterial pathogen of plants.** Annual Review of Phytopathology 27:271-290. 1989.

JAMES, W.C. & TENG, P.S. **The quantification of production constraints associated with plant diseases.** Applied Biology, 1979

KUNKEL, L. M., MONACO, A. P., MIDDLESWORTH, W., OCHS, H. D. & LATT, S. A. **Specific cloning of DNA fragments absent from DNA of a male patient with an X chromosome deletion.** Proc Natl Acad Sci USA 82, 4778-4782, 1985.

KRÜNGER, R., LOPES, M. T. C. V., SANTOS, J. S., BERETTA, M. J. G., LOPES, J. R. S. **Transmission efficiency of *Xylella fastidiosa* to citros by sharpshooters and identification of two new vector species.** In: conference of IOCV, 14, Campinas, abstracts, p. 81. 1998.

LARANJEIRA F. F.; BERGAMIM FILHO, A.; AMORIM L.; LOPES, J. R. **Comportamento sazonal da Clorose Variegada dos Citros em três regiões do estado de São Paulo.** Fitopatologia Brasileira. 28:633-641. 2003

LARANJEIRA, F. F. Epidemiologia da Clorose variegada dos citros no estado de São Paulo. (Tese de doutorado). Piracicaba. Escola superior de Agricultura Luiz de Queiroz/ Universidade de São Paulo. 2003.

LARANJEIRA, F. F., GOTTWALD, T. R., AMORIM, L., BERGER, R. D., AND BERGAMIN FILHO A. **Spatio-temporal dynamics of citrus variegated chlorosis: a preliminary analysis.** Pages 223-231 in: Proc. 14th Conf. Int. Org. Citrus Virol. Brazil. 2000.

LARANJEIRA, F. F. POMPEU JR., J., HARAKAVA, R., FIGUEIREDO, J. O., CARVALHO, S. A., COLETTA FILHO, H. D. **Screening for tolerance of citrus to *Xylella fastidiosa*, the causal agent of citrus variegated chlorosis CVC.** Fruit, Paris, V. 53, N. 5, p. 345-349, 1998a.

LARANJEIRA, F. F., POMPEU JR., J., HARAKAVA, R., FIGUEIREDO, J. O., CARVALHO, S. A., COLETTA FILHO, H. D. **Cultivares e espécies cítricas hospedeiras de *Xylella fastidiosa* em condições de campo.** Fitopatol. Bras 23:147-154.1998b.

LARANJEIRA, F. F., POMPEU JÚNIOR & HARAKAVA, R. **Seleção de variedades de Citros tolerantes e/ou resistentes à clorose variegada dos Citros (CVC)** Fitopatologia Brasileira 20: 324. 1995.

LARANJEIRA, F. F., HARAKAVA, R., CARVALHO, S. A., POMPEU JÚNIOR, J., FIGUEREDO, J. O. **Avaliação serológica e sintomológica da ocorrência de *Xylella fastidiosa* e Clorose Variegada do Citros (CVC) no banco ativo de germoplasma do IAC.** Fitopatologia Brasileira, V 21, p335, 1996.

LARANJEIRA, F. F. **Dez anos de Clorose Variegada do Citros. O que sabemos?** Laranja 18: 123-141. 1997.

LARANJEIRA, F. F., POMPEU JÚNIOR, J., HARAKAVA, R. **Seleção de variedades resistentes e/ou tolerantes à Clorose Variegada do Citros (CVC).** Fitopatol. Bras., Brasília, V.20, p. 324 suplemento. 1995.

LEE, R. F., BERETTA, M. J. G., HARTUNG, J. S., HOOKER, M. E., DERRICK, K. S. **Citrus Variegated Chlorosis confirmation of *Xylella fastidiosa* as the causal agent.** Summa Ohytopathol., Jaguariúna, v. 19, p. 123-125, 1993.

LEITE JÚNIOR, R. P., LEITE, R. M. V. B. C. **Associação de *Xylella fastidiosa* com clorose Variegada do Citrus.** Summa Phytopathol., Jaguariúna, V.17, no. 1, p.1, 1991.

LEITE JR, R. P. **Constatação da clorose variegada dos citros causada por *Xylella fastidiosa* no estado de Sergipe.** in: xix Congresso Paulista de Fitopatologia, Campinas, SP, 1996a.

LEITE JR, R. P. **Caracterização de isolados de *Xylella fastidiosa* de citros através da análise de proteínas totais por eletroforese em gel de sds-poliacrilamida.** in: xix Congresso Paulista de Fitopatologia, Campinas, SP, 1996b.

LEITE Júnior, R. P. **Estudo da variabilidade de isolados de *xylella fastidiosa* obtidos de cafeeiro e citros através da análise de proteínas totais.** in: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Campo Grande, MS, 1996c.

LEITE Júnior, R. P. **Aspectos moleculares de determinantes da interação entre plantas e bactérias fitopatogênicas.** In 3º. Encontro paranaense de genética, Curitiba, PR, 1996d.

LI, W.B., AYRES, A. J., MIRANDA, V. S. TEIXEIRA, D. C., COUTINHO, A., ZAVATTI, E. R., PALMA, R. R. **Patogenicidade de *Xylella fastidiosa*, agente causal da Clorose Variegada do Citros em laranja doce.** Fitopatol. Bras., Brasília, v. 24, p.260, Suplemento.1999a.

LI W. B., PRIA W. B., TEIXEIRA, C. , MIRANDA, V. S., AYRES A. J. P. FRANCO, C. F., COSTA, M. G.; HE, C. X. ; COSTA, P. I.; HARTUNG, J. S. **Coffe leaf scorch caused by a strain of *Xylella fastidiosa* from citrus.** Plant Disease (5), 501-505, 2001.

LI, W. B., SEMPIONATO, O. R. ROSSETTI, V., BERETTA, M. J. G. **Clone selection of sweet orange “Pera” (*C. sinensis* (L) Osbeck) to citros Variegated Chlorosis** In: International Society of Citriculture. Cape town. Proceedings. P280-282. 1996.

LI, W. B.; HE, C. X.; AYRES, J. A.; DONADIO, L. **Susceptibility of tangerines to citrus variegated clorosis (CVC) disease.** Acta Horticultures, 1998.

LI, W. B., ZREIK, L., FERNANDES, N. G., MIRANDA, V. S., TEIXEIRA, D. C., AYRES, A. J., GARNIER, M. BOVÉ, J. M. **Triply cloned strain of *Xylella fastidiosa* multiples and induces of Citros Variedated Cloroses in sweet orange.** Curr. Microbiol., New York, v. 39, n. 2, p. 106-108, 1999b.

LIMA, J. E. O.: MIRANDA, V. S.; COUTINHO, A. ROBERTO, S. R.; CARLOS E. F. **Distribuição de *Xylella fastidiosa* no cafeeiro, nas regiões cafeeiras, e seu isolamento *in vitro*.** Fitopatologia Brasileira, v. 21, n. 3 p.392-393, 1996.

LIMA, J. E. O.; MIRANDA, V. S.; HARTUNG, J. S.; BRLANSKY, R. H.; COUTINHO, A; ROBERTO, S. R.; CARLOS, E. F. **Coffee leaf scorch bacterium axenic culture, pathogenicity, and comparison with *Xylella fastidiosa* of citrus.** Plant disease. V.82, n. 1, p.94-97, 1998.

LIMA , J. E. O.; MIRANDA, V. S.; ROBERTO, S. R.; COUTINHO, A.; PALMA, R. R.; PIZZOLITO, A. C. **Diagnose da clorose variegada dos citros por microscopia ótica.** Fitopatologia Brasileira, V.22, n. 3, p. 370-374, 1997.

LOPES, S.A.; TORRES, S. C. Z. **An effective and low-cost culture medium for isolation and growth of *Xylella fastidiosa* from citrus and coffee plants.** Current Microbiology, v. 56, p. 467-469, 2006.

LOPES, S. A.; TEIXEIRA, D. C.; FERNANDES, NELSON G; AYRES, A. J.; TORRES, S. C. Z.; BARBOSA, J. C.; LI, W. An effective experimental system to study citrus/*Xylella fastidiosa* interactions. Plant Disease, Estados Unidos, v. 89, n. 3, p. 250-254, 2005.

LOPES, S. A. ; RIBEIRO, D. M. ; ROBERTO, P. G. ; FRANÇA, S. C. ; SANTOS, J. M. ***Nicotiana tabacum* as an experimental host for the study of plant- *Xylella fastidiosa* interactions.** Plant Disease, Estados Unidos, v. 84, n. 8, p. 827-830, 2000.

LOPES, S. A. ; NUNES, LUIS R ; OLIVEIRA, REGINA C . **Genes de patogenicidade em *Xylella fastidiosa*.** Summa Phytopathologica, v. 28, p. 140-141, 2002.

LOPES, J. R. S. **Estudos com vetores de *Xylella fastidiosa* e implicações no manejo da Clorose Variegada do citros.** Laranja, Cordeirópolis, V. 20, n. 2, p. 329-344, 1999.

LOPES, J. R. S, BERETTA, M. J. G., HARAKAVA, R., ALMEIDA, R. P. P., KRÜGNER, R., GARCIA JÚNIOR, A. Confirmação da transmissão por cigarrinhas do agente causal da Clorose Variegada do Citros, *Xylella fastidiosa*. Fitopatol. Bras., Brasília, v. 21, p. 343 suplemento. 1996.

LOPES, S. A., MARCUSI, S., TORRES, S. C. Z., SOUZA, V., FAGAN, C., FRANÇA, S. C. **Weeds as alternative hosts of the citrus, coffee, and plum strains of *Xylella fastidiosa* in Brazil.** Plant Dise. Vol. 87 No. 5, p. 544-549. 2003.

MACHADO, E. C., QUAGGIO, J. A., LAGOA, A. M. M. A., TCELLI, M., FURLANI, P. R. **Trocas gasosas e relações hídricas em laranjeiras com Clorose Variegada do Citros.** Ver. Bras. Fisiol. Veg., Brasília, v. 6, n.1, p. 53-57, 1994.

MALAVOLTA, E., MALAVOLTA, M. L., CABRAL, C. P., PRATES, H. S., VITTI, G. C. **Nova anomalia dos citros- estudos preliminares.** Laranja, Cordeirópolis, v. 11, no. 10, p. 15-38. 1990

MC KOY, R. E. **Chronic and insidious disease: the fastidious vascular pathogens.** In Mout, M. s. & Lacy, G. H. (ed.). Phytopathogenic Prokaryotes, vol. I, New York, academic press, p. 475-489. 1982

MISAVAGE, 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, n.5, p.456-461, 1994.

NUNES, L. R. ROSATO, Y. B., MUTO, N. H., YANAI, G. M., SILVA, V. S., LEITE, D. B., GONÇALVES, E. R., SOUZA, A. A., COLETTA-FILHO, H. D., MACHADO, M. A., LOPES, S. A., OLIVEIRA, R. C. **Microarray analyses of *Xylella fastidiosa* provide evidence of coordinated transcription control of laterally transferred elements.** *Genome Research* v. 13p.570-578. 2003.

OEIRAS, A. H. L. **Manejo Integrado de pragas e doenças no estado do Pará.** Capitão Poço, 35p. 2002.

PAIVA, P. E. B., SILVA, J. L., GRAVENA, S., YAMAMOTO, P. T. **Cigarrinhas do xilema em pomares de laranja do estado de São Paulo.** *Laranja*. Cordeirópolis, v. 17, nº1, p. 41-54, 1996.

PALAZZO FILHO, D. A., CARVALHO, M. L. V. **Desenvolvimento e progresso da Clorose Variegada dos Citros (CVC) em pomares de colina, SP.** *Laranja*, Cordeirópolis, v. 13, n. 2, p. 489-502. 1992.

PARADELA FILHO, O.; SUGIMORI, M. H.; RIBEIRO, I. J. A.; GARCIA JÚNIOR, A.; BERETTA, M. J.; HARAKAWA, R.; MACHADO, M. A.; LARANJEIRA, F. F.; RODRIGUES NETO, J. R.; BERIAM, L. O. S. **Constatação de *Xylella fastidiosa* em cafeeiro no Brasil.** *Summa Phytopathologica*, V.23, N. 1, p. 46-49, 1997

POMPEU JÚNIOR, J., LARANJEIRA, F. F., HARAKAVA, R., BERETTA, M. J. G. **Primeira constatação de sintomas foliares de Clorose Variegada do Citros em tangerinas e híbridos de tangerina.** *Fitopatologia Brasileira* 19:318.1994.

POMPEU JÚNIOR J., LARANJEIRA, F. F., HARAKAVA, R., FIGUEIREDO, J. O., CARVALHO, S. A., COLETTA FILHO, H. D. **Deteção dos sintomas da Clorose variegada do Citros e *Xylella fastidiosa* em plantas cítricas infectadas em condição de campo.** *Laranja*, Cordeirópolis, v. 19, n. 2, p. 321-330. 1998.

PRIA JÚNIOR, W. D.; LACAVA, P. T.; MESSIAS, C. L.; AZEVEDO, J. L.; LACAVA, P. M. **Avaliação do bioensaio de *Metarhizium anisopliae* (metchnikoff) sorokin (deuteromycota: hyphomycetes) contra *Oncometopia facialis* (signoret) (hemiptera: cicadellidae).** *Brazilian Journal of Microbiology*, 2008.

POOLER, R. M., HARTUNG, J. S. **Specific PCR detection and identification of *Xylella fastidiosa* strains causing Citrus Variegated chlorosis.** Curr. Microbiology, V. 31, p. 377-381. 1995.

PURCELL, A. H. AND SAUNDERS, S. R. **Fate of Pierce's disease strains of *Xylella fastidiosa* in common riparian plants in California.** Plant Disease. 83: 825-830, 1999.

PURCINO, R. P. ; MEDINA ; MARTINS ; WINK ; MACHADO ; MAZZAFERA, P. ***Xylella fastidiosa* disturbs nitrogen metabolism and causes a stress response in the sweet orange Citrus sinensis cv. Pêra.** Journal of Experimental Botany, v. 58, p. 2733-2734, 2007.

QUEIRÓZ-VOLTAN, R. B., PARADELA FILHO, O. **Caracterização de estruturas anatômicas de citros infectadas com *Xylella fastidiosa*.** Laranja, Cordeirópolis, v. 20, n.1, p. 55-76. 1999.

RIBEIRO, R. V.; MACHADO, E. C.; OLIVEIRA, R. F.; PIMENTEL, C. Efeitos da alta temperatura na resposta da fotossíntese à luz em laranjeira doce infectada por *Xylella fastidiosa*. **Brazilian Journal of Plant Physiology.** vol.15 no.2 Londrina 2003.

ROBERTO, S. R., YAMAMOTO, P. T. **Flutuação populacional e controle químico de cigarrinhas em citros.** Laranja, Cordeirópolis, v. 19, n. 2, p. 263-284, 1998.

ROBERTO, S. R., COUTINHO, A., LIMA, J. E. O., MIRANDA, V. S., CARLOS, E. F. **Transmissão de *Xylella fastidiosa* pelas cigarrinhas *Dilobopterus costalimai*, *Acrogonia terminalis* e *Oncometopia facialis* em citros.** Fitopatol. Bras., Brasília, v. 21, no, 4, p. 517-518, 1996.

ROSATO, Y. B.; NETO, J. R.; MIRANDA, V. S.; CARLOS E. F.; MANFITO, G. P. **Diversity of a *Xylella fastidiosa* population isolated from citrus sinensis affected by citrus variegated chlorosis in Brazil.** Systematic and applied microbiology. V. 21, N. 4, p. 593-598, 1998

ROSSETTI, V., GARNIER, M., BOVÉ, J. M., BERETTA, M. J. G., TEIXEIRA, A. R.R., QUAGGIO, J. A., DE NEGRI, J. D. **Présence de bactéries dans le xylème d'oranges atteints de chlorose variégée, une nouvelle maladie des agrumes au Brésil.** C. R. Sci., Paris série 3, v. 310, p.345-349. 1990.

SALVA, T. J. G.; LASEKAN, O.O.; DE LIMA, P. F.; TEIXEIRA, J.P.F. **Effect of germination and heat treatment on amylases of acha (*Digitaria exilis* Stapf)**. In: IV Congresso Latino Americano de Ciência de Alimentos, Campinas. Livro de Resumos do IV Congresso Latino Americano de Ciência de Alimentos. v. 1. p. 89-89, 2001.

SANTOS FILHO, H. P.; BARBOSA, C.J. MATRANGOLO, W.J.R. Ocorrência da Clorose Variegada dos Citros (CVC) no Estado da Bahia Fitopatologia Brasileira, 1999.

SIMPSON A. J. G. REINACH, F. C.; ARRUDA, P. *et al.* The genome sequence of the plant pathology *Xylella fastidiosa*. Nature 406:151-157, 2000.

SILVA, S.E.L.; BERNI, R.F.; SOUZA, A.G.C.; SOUZA, M.G.; TAVARES, A.M. Recomendações para a produção de citros no estado do Amazonas. *Circular técnica Embrapa Documento* 33. Embrapa Amazônia Ocidental. 25pp. 2004.

TRAVENSOLO, R. F. ; LEITE JR, R. P. Hospedeiros alternativos de *Xylella fastidiosa* entre plantas invasoras de pomares de citros com clorose variegada. Fitopatologia Brasileira. 21 (suplemento) agosto de 1996.

TUBELIS, A. Clima fator que afeta a produção e qualidade da laranja. Laranja 16:179-211. 1993

VALLE, M. G. **Produção de Mudas Cítricas sob os Efeitos da CVC no Estado de São Paulo**. In: 3º Congresso Internacional de Economia e Gestão dos Negócios Agroalimentares, Ribeirão Preto. Anais do 3º Congresso Internacional de Economia e Gestão dos Negócios Agroalimentares,. v. 1, 2001.

WELLS, J. M., RAJU, B. C., HUNG, H. Y., WEISBURG, W. G. MADELCO-PAUL, L., BRENNER, D. J. ***Xylella fastidiosa* gen nov., sp. Nov.: gram-negative, xylem-limited, fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas spp.*** Int. J. syst. Bacteriol., Washigton, v. 37, no, 2, p. 136-143. 1987.

WELLS J. M.; RAJU, B. C., NYLAND, G. LOWE, S. K. **Medium for isolation and growth of bacteria associated with plum leaf scald and phony peach diseases.** Appl. Environ. Microbiolo. 42:357-63. 1980.