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

Influência do regime hídrico na infecção de plantas cítricas jovens por
Xylella fastidiosa

Cristiane Ramos da Veiga Lima Cava

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

Piracicaba

2006

Cristiane Ramos da Veiga Lima
Engenheiro Agrônomo

Influência do regime hídrico na infecção de plantas cítricas jovens por
Xylella fastidiosa

Orientador:

Prof. Dr. ARMANDO BERGAMIN FILHO

Co-orientador:

Prof. Dr. JOÃO ROBERTO SPOTTI LOPES

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

Piracicaba

2006

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

Cava, Cristiane Ramos da Veiga Lima

Influência do regime hídrico na infecção de plantas cítricas jovens por *Xylella fastidiosa*/ Cristiane Ramos da Veiga Lima Cava. - - Piracicaba, 2006.
64 p. : il.

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

1. Bactérias fitopatogênicas 2. Balanço hídrico 3. Citricultura 4. Clorose variegada dos citros 5. Inoculação I. Título

CDD 634.3

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

Dedico.

Aos meus adorados pais, Otaviano e Márcia

À minha querida irmã, Luciana

E ao meu amado esposo, Ricardo

Tudo o que sou e tudo o que conquistei devo a vocês

Ofereço

Aos estimados Laércio e Eunize Zambolim e Francisco Xavier Ribeiro do Vale

*Pessoas maravilhosas e grandes mestres que muito me ensinaram, não só sobre
Fitopatologia, mas também sobre a vida*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Armando Bergamin Filho pela orientação e valiosa oportunidade de convivência e aprendizado.

Ao Prof. Dr. João Roberto Spotti Lopes pela co-orientação, pelo grande apoio e preciosos ensinamentos.

À equipe da Fazenda Cambuhy, por permitir a instalação dos experimentos de campo em suas dependências e pela inestimável ajuda na condução dos mesmos.

Aos integrantes do Laboratório de Insetos Vetores, principalmente à Fernanda Engels do Nascimento, pelo auxílio na condução e avaliação dos experimentos de campo e casa-de-vegetação.

SUMÁRIO

RESUMO	5
ABSTRACT	6
1 INTRODUÇÃO	7
2 DESENVOLVIMENTO	10
2.1 Revisão bibliográfica.....	10
2.1.1 Panorama atual da citricultura no Brasil	10
2.1.2 Clorose variegada dos citros	12
2.1.3 O agente causal da CVC.....	14
2.1.4 Aspectos da transmissão de <i>Xylella fastidiosa</i> por insetos vetores.....	20
2.1.5 Aspectos epidemiológicos da CVC	21
2.2 Material e Métodos	25
2.2.1 Experimento em condições naturais	25
2.2.1.1 Efeito da irrigação sobre infecções primárias por <i>X. fastidiosa</i> em plantas jovens de laranja doce.....	25
2.2.2 Experimento em casa-de-vegetação.....	30
2.2.2.1 Efeito do déficit hídrico do solo sobre a infecção primária por <i>X. fastidiosa</i> após inoculação mecânica em plantas jovens de laranja doce.....	30
2.2.2.2 Efeito do déficit hídrico do solo sobre a infecção primária de <i>X. fastidiosa</i> após inoculação por insetos vetores em mudas de laranja doce.....	32
2.3 Resultados e Discussão.....	35
2.3.1 Experimento em condições naturais.....	35
2.3.1.1 Efeito da irrigação sobre infecções primárias por <i>X. fastidiosa</i> em plantas jovens de laranja doce.....	35
2.3.2 Experimento em casa-de-vegetação.....	40
2.3.2.1 Efeito do déficit hídrico do solo sobre a infecção primária por <i>X. fastidiosa</i> após inoculação mecânica em plantas jovens de laranja doce.....	40
2.3.2.2 Efeito do déficit hídrico do solo sobre a infecção primária de <i>X. fastidiosa</i> após inoculação por insetos vetores em mudas de laranja doce.....	42
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	45

4 CONCLUSÕES.....	46
REFERÊNCIAS.....	47
ANEXO.....	67

RESUMO

Influência do regime hídrico na infecção de plantas cítricas jovens por *Xylella fastidiosa*

Cerca de 38% das árvores cítricas do Estado de São Paulo são afetadas pela Clorose Variegada dos Citros – CVC, causando perdas anuais de cerca de 100 milhões de dólares para as indústrias citrícolas. O agente causal da CVC é uma bactéria gram-negativa, fastidiosa e habitante dos vasos de xilema denominada *Xylella fastidiosa*, transmitida por cigarrinhas pertencentes à família Cicadellidae, subfamília Cicadellinae. Já foi observado que laranjas doces jovens, na faixa de 3 a 4 anos de idade, são mais sensíveis à CVC do que as plantas adultas. A doença é mais severa em regiões onde estresses adicionais ocorrem, como alta demanda atmosférica por água (decorrente do aumento da temperatura e do déficit de pressão de vapor) e déficit hídrico no solo. Os mecanismos fisiológicos e químicos que caracterizam o estabelecimento da CVC ainda não foram totalmente compreendidos, especialmente sob condições de estresse. Sendo assim, estudos que consideram a interação entre época do ano, regime hídrico e o estabelecimento da CVC em plantas jovens são necessários para auxiliar na elaboração de programas de manejo da doença. O presente trabalho avaliou a sobrevivência de infecções iniciais de *X. fastidiosa* em plantas cítricas jovens no campo, mantidas com e sem irrigação, 6, 12 e 18 meses após inoculações mecânicas realizadas no verão (mês de janeiro) e inverno (mês de julho). Visando analisar a influência do regime hídrico isoladamente foram realizadas, na época do outono (final de maio e início de junho), inoculações mecânicas e inoculações com as cigarrinhas vetoras *Bucephalogonia xanthophis* e *Dilobopterus costalimai* em plantas cítricas jovens mantidas em capacidade de campo e déficit hídrico em casa-de-vegetação; as plantas inoculadas mecanicamente foram avaliadas 5 meses após a data de inoculação, enquanto que as plantas inoculadas com insetos foram avaliadas 10 meses após a data de inoculação. Em condições naturais, foram observadas, 6 meses da data de inoculação, maiores taxas de sobrevivência de infecções iniciais de *X. fastidiosa* em plantas jovens inoculadas na época de inverno na ausência de estresse hídrico; no entanto, 12 meses da data de inoculação, as plantas inoculadas mantidas com e sem irrigação apresentavam médias populacionais bacterianas estatisticamente iguais. As plantas mantidas em casa-de-vegetação e inoculadas mecanicamente apresentaram resultados semelhantes àqueles obtidos 6 meses da data de inoculação em condições naturais; no caso da inoculação com cigarrinhas vetoras, foi detectada a presença da bactéria apenas em plantas em capacidade de campo. Estes resultados indicam que o déficit hídrico é um fator desfavorável para o estabelecimento de infecções primárias de *X. fastidiosa* em plantas cítricas jovens. Os resultados obtidos 12 meses após a inoculação mecânica em condições naturais, logo após a estação de chuva, indicam que, uma vez retirado o estresse hídrico, tal influência negativa deixa de existir e a bactéria readquire sua capacidade de infecção e colonização do hospedeiro.

Palavras-chave: Déficit hídrico; Inoculação mecânica; Infecção primária

ABSTRACT

Influence of water regime in the infection of young citrus plants by *Xylella fastidiosa*

In Brazil, about 38% of the citric trees of the São Paulo State are affected by the Citrus Variegated Chlorosis - CVC, causing annual losses of about 100 million dollars for the citrus industries. The causal agent of CVC is a gram-negative, fastidious bacterium inhabitant of the xylem vessels called *Xylella fastidiosa*. It is vectored by sharpshooter leafhoppers pertaining to family Cicadellidae and subfamily Cicadellinae. It was observed that young citrus plants, between 3 and 4 years of age, are more susceptible to CVC than adult plants. The disease is more severe in regions where additional stresses occur, such as high atmospheric demand (due to the increase of temperature and vapor pressure deficit) and water deficit in the soil. The physiological and chemical mechanisms that characterize the establishment of CVC within the host have not yet been totally understood, especially under conditions of stress. Therefore, studies that consider the interaction between seasons, water regime and the establishment of CVC in young plants are necessary in the elaboration of more efficient management programs. The survival of initial infections of *X. fastidiosa* in young citrus plants mechanically inoculated during the summer and winter, and kept in the field with and without irrigation, were evaluated 6, 12 and 18 months after mechanical inoculations. To analyze the influence of water regime separately, an experiment was carried through during the autumn (final of May and beginning of June) in a greenhouse. Young citrus plants kept in field capacity and water deficit were mechanically inoculated and inoculated with sharpshooter leafhoppers *Bucephalogonia xanthophis* and *Dilobopterus costalimai*. The mechanically inoculated plants were evaluated 5 months after the date of inoculation, whereas the plants inoculated with insect vectors were evaluated 10 months after the date of inoculation. In natural conditions, 6 months of the date of inoculation, higher survival rates of initial infections of *X. fastidiosa* were detected in inoculated young plants during winter in the absence of water deficit; however, 12 months after inoculation, the young citrus plants kept with and without irrigation presented statistically equal bacterial population averages. The mechanically inoculated plants kept in the greenhouse presented similar results to those kept in natural conditions and analyzed 6 months after mechanical inoculation. In the case of inoculation with sharpshooter leafhoppers, the presence of the bacterium was detected only in plants kept in field capacity. The results demonstrate that the water deficit is unfavorable for the establishment of primary infections of *X. fastidiosa* in young citrus plants. The results obtained 12 months after mechanical inoculation in natural conditions, right after the rainy season, indicate that, once the water deficit is removed, its negative influence ceases to exist and the bacterium reacquires its capacity of infection and colonization of the host.

Keywords: Water deficit; Mechanical inoculation; Primary infection

1 INTRODUÇÃO

Cerca de 38% das árvores cítricas (aproximadamente 68 milhões de plantas) do Estado de São Paulo são afetadas pela Clorose Variegada dos Citros – CVC (CVC..., 2002; MONTEIRO et al., 2001), causando perdas anuais de cerca de 100 milhões de dólares para as indústrias citrícolas (SOUZA et al., 2005). A CVC é motivo de grande preocupação para a indústria citrícola, citricultores, técnicos e pesquisadores brasileiros (PAIVA et al., 1996) por reduzir a quantidade de frutos produzidos e o tamanho dos mesmos, tornando-os imprestáveis para o mercado industrial e consumo in natura (LEE et al., 1993). Já foi observado que a presença e desenvolvimento da CVC estão relacionados a condições ambientais e idade da planta hospedeira. Laranjas doces jovens, na faixa de 3 a 4 anos de idade, são mais sensíveis à CVC do que as plantas adultas (MACHADO, 1997). A doença é mais severa em regiões onde estresses adicionais ocorrem, como alta demanda atmosférica por água (decorrente do aumento da temperatura e do déficit de pressão de vapor) e déficit hídrico no solo (SALVA; ROBERTO; CARLOS, 1995). Nos últimos anos, a incidência da CVC permaneceu acima de 35%, atingindo 43% em 2003 e mantendo-se relativamente estável até 2006 (FUNDECITRUS, 2006). Esse quadro indica que os métodos de controle não estão sendo totalmente eficazes. Os mecanismos fisiológicos e químicos que caracterizam o estabelecimento da CVC ainda não foram totalmente compreendidos, especialmente sob condições de estresse. Sendo assim, estudos que consideram a interação entre condições ambientais e o estabelecimento da CVC são necessários para auxiliar na elaboração de programas de manejo da doença.

Xylella fastidiosa (RAJU et al., 1982; WELLS et al., 1987), uma bactéria endofítica, gram-negativa, fastidiosa e habitante dos vasos de xilema, apresenta uma ampla gama de hospedeiros que inclui pelo menos 30 famílias de plantas (SHERALD; KOSTKA, 1992), incluindo as espécies de laranja doce (*Citrus sinensis* [L.] Osb) (HARTUNG et al., 1994; LARANJEIRA; POMPEU JUNIOR; HAKAKAVA, 1995; LARANJEIRA; BERGAMIN FILHO; AMORIM, 1998), onde é responsável por diversas doenças economicamente importantes (HOPKINS, 1989; BERETTA et al., 1996; PURCELL, 1997; SILVA et al., 2001). Alguns anos depois do primeiro relato da presença de CVC no Estado de São Paulo, *X. fastidiosa* foi caracterizada como sendo seu agente causal (CHAGAS; ROSSETTI; BERETTA, 1992; CHANG et al., 1993; HARTUNG et al., 1994). Esta bactéria geralmente ocorre em áreas geográficas que

apresentam invernos moderados (PURCELL, 1980) e a temperatura ótima para o seu crescimento foi determinada como sendo de, aproximadamente, 28°C (DAVIS; PURCELL; THOMPSON, 1978).

A transmissão de *X. fastidiosa* ocorre por meio de mudas e borbulhas infectadas (LIMA, 1996; SEMPIONATO; GIROTTO; STUCHI, 1997), sendo a sua disseminação natural e penetração em tecido vegetal suscetível dependentes da ação de insetos vetores (LOPES, 1996). As cigarrinhas pertencentes à família Cicadellidae, subfamília Cicadellinae, tribos Cicadellini e Proconiini (ROBERTO et al., 1996; KRUGNER et al., 1998) constituem os vetores dessa bactéria. Como o fluido do xilema e sua tensão podem ser alterados por diversos fatores, como época do ano, hora do dia, clima, fertilização, irrigação, poda, sistema radicular (ANDERSEN; BRODBECK, 1989; ANDERSEN; BRODBECK; MIZELL III, 1989, 1992, 1995a, b; MIZELL; FRENCH, 1987), há possibilidades de manejo das populações de cigarrinhas baseadas nas manipulações das condições que influenciam a composição química do xilema para tornar as plantas hospedeiras inadequadas para sua alimentação (REDAK et al., 2004).

A inexistência de variedades de laranjas doces resistentes à CVC torna imprescindível o desenvolvimento de medidas que possibilitem a convivência com a doença. O controle de *X. fastidiosa* é realizado, basicamente, através da implantação de pomares de citros com mudas sadias, realização de podas dos ramos que apresentarem sintomas iniciais da doença, eliminação de plantas com infecção sistêmica generalizada visando reduzir a quantidade de inóculo em pomares infectados e do controle das cigarrinhas por meio de aplicações de inseticidas nos pomares e viveiros. O controle químico precisa ser feito diversas vezes ao longo do ano e em extensas áreas devido às fontes de inóculo, ao amplo período de exposição das plantas aos vetores e à grande diversidade de potenciais vetores presentes em citros (PAIVA et al., 1996; YAMAMOTO, 1998). As aplicações freqüentes e a baixa seletividade dos inseticidas usados dificultam o manejo da CVC, oneram o custo de produção e põem em risco o manejo integrado de pragas dos citros, além de causarem diversos danos ao meio ambiente.

No decorrer dos anos, observou-se que a concentração relativa de *X. fastidiosa* era mais alta na primavera e verão (LARANJEIRA, 1997; PEREIRA, 2000, 2005; OLIVEIRA et al., 2002). Nunes (1999) já havia notado que, durante o verão, cultivares de laranja doce apresentavam sintomas severos de CVC em brotações emitidas na primavera. Oliveira et al. (2002) observaram que o número de células de *X. fastidiosa* detectado em folhas de citros

aumentava de acordo com a idade da folha; essas observações indicavam a existência de padrões de distribuição temporal e espacial de *X. fastidiosa*, respectivamente. Os resultados obtidos por Oliveira et al. (2002) confirmam aqueles relatados por Machado et al. (1997), que detectaram maiores concentrações bacterianas em folhas mais velhas. A influência de fatores sazonais na transmissão de *X. fastidiosa* por vetores em pomares de citros, visando identificar épocas de maior probabilidade de disseminação da CVC em plantas adultas, foi analisada por Pereira (2000). A análise da taxa de infecção primária da bactéria em árvores cítricas inoculadas mecanicamente sugeriu que a sobrevivência de infecções iniciais do patógeno seria menor em inoculações realizadas no inverno, e maior nos meses de verão (PEREIRA, 2000, 2005). Pereira (2005) observou que o déficit hídrico típico nos períodos de inverno e início da primavera (julho a setembro) era um fator desfavorável ao estabelecimento de infecções primárias de *X. fastidiosa* e à sobrevivência e taxa de alimentação da cigarrinha vetora, *Oncometopia facialis* (Signoret), em mudas de citros de 3 meses de idade.

Os trabalhos desenvolvidos até então foram essenciais para apontar a importância do ambiente na dinâmica da CVC em plantas adultas, porém informações sobre o efeito das estações do ano e regime hídrico no estabelecimento de infecções iniciais de *X. fastidiosa* em plantas jovens são escassas. Sua importância reside no fato de que pomares novos apresentam alto risco de infecção, pela existência de potenciais vetores capazes de inocular com sucesso a bactéria em mudas jovens e a alta suscetibilidade das mesmas. O presente trabalho objetivou avaliar a sobrevivência de infecções iniciais de *X. fastidiosa* em plantas cítricas jovens (5 meses de idade) no campo 6 e 12 meses após inoculação mecânica realizada na época do inverno de 2005 (mês de julho), com e sem irrigação. Também foram realizadas, na época do outono de 2005 (final de maio e início de junho), inoculação mecânica e inoculação com as cigarrinhas vetoras *Bucephalogonia xanthophis* e *Dilobopterus costalimai* em plantas cítricas jovens (5 meses de idade) mantidas em capacidade de campo e déficit hídrico em casa-de-vegetação objetivando avaliar a sobrevivência de infecções iniciais de *X. fastidiosa* somente sob o aspecto da influência do regime hídrico. As plantas inoculadas mecanicamente foram avaliadas 5 meses após a data de inoculação, enquanto que as plantas inoculadas com insetos foram avaliadas 10 meses após a data de inoculação.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 Panorama Atual da Citricultura no Brasil

O Brasil é o principal produtor mundial de laranjas frescas com uma produção de 18,52 milhões de toneladas métricas em 2004, o equivalente a 36,9% da produção mundial (FNP, 2005) (Tabela 2.1). A maior parte da produção brasileira de laranjas é destinada à indústria para a produção de suco, sendo o restante destinado ao mercado interno e ao mercado externo (em ambos os casos, para o consumo *in natura*) (Tabela 2.2).

Tabela 2.1 – Principais países produtores de laranjas frescas (volume em milhões de toneladas métricas)

País	2003		2004	
	Volume	%	Volume	%
Brasil	15,38	33,6	18,52	36,9
EUA	10,51	23,0	11,75	23,4
México	3,73	8,2	4,00	7,9
China	3,60	7,9	3,67	7,3
Espanha	2,86	6,3	3,09	6,2
Outros	9,66	21,2	9,13	18,2
Total	45,75	100,0	50,17	100,0

Fonte: Agrianual, 2005

Tabela 2.2 – Produção de laranjas frescas no Brasil em 2004 e sua destinação (volume em mil toneladas métricas)

Destinação	2004	
	Volume	%
Industrialização (suco)	13.218	71
Frutas Frescas (mercado interno)	5.220	28
Frutas frescas (mercado internacional)	82	1
Produção de laranjas frescas	18.520	100,0

Fonte: Agrianual, 2005

O setor da agricultura representava menos de 8% do PIB no início dos anos 90. A partir de 1994 passou a crescer, atingindo 10% do PIB de 2003 e 2004. No Estado de São Paulo, o valor da produção das principais culturas perenes e semiperenes cultivadas cresceu à taxa média anual de 6,3%. Esse resultado se deve principalmente ao aumento da produção de laranja, cujo valor, para indústria e para mesa cresceu em média 22,6% a.a. e 18,1% a.a., respectivamente, de 2000 a 2005 (CARVALHO et al., 2006) (Tabela 2.3).

Tabela 2.3 – Participação de culturas perenes selecionadas no Valor da Produção Agropecuária, São Paulo, 2000 a 2005 (em porcentagem)

Produto	Ano						Taxa ⁽¹⁾
	2000	2001	2002	2003	2004	2005	
Cana-de-Açúcar	31,8	30,5	28,1	25,9	28,6	31,6	4,8
Laranja para Indústria	3,1	7,9	10,0	8,9	7,2	6,7	22,6
Laranja para Mesa	2,2	4,7	5,5	5,0	4,0	3,9	18,1
Café Beneficiado	3,9	1,8	2,4	1,8	2,8	2,9	-1,1
Banana	1,8	1,7	1,2	1,7	1,8	1,9	5,8
Manga	1,6	1,3	1,1	0,9	1,4	1,3	-0,3
Limão	1,8	1,0	1,4	1,0	0,9	1,2	-2,3
Uva para Mesa	0,7	0,8	0,8	0,6	0,6	1,0	10,9
Tangerina	1,1	1,2	1,2	1,0	0,9	0,7	-4,6
Soma ⁽²⁾	47,9	50,9	51,8	47,0	48,3	51,2	6,3
Total ⁽³⁾	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	4,9

Fonte: Instituto de Economia Agrícola – IEA.

⁽¹⁾ Cálculo da taxa anual de crescimento entre 2000 e 2005 – valor deflacionado pelo IPCA.

⁽²⁾ Total das culturas perenes selecionadas.

⁽³⁾ Total dos 48 principais produtos da agropecuária paulista.

Ainda segundo Carvalho et al. (2006), o fato do crescimento da agricultura brasileira ter sido baseado na exportação de sua produção explica em boa parte o avanço da cultura da laranja no Estado de São Paulo, uma vez que o suco de laranja paulista está entre os primeiros produtos colocados na pauta de exportação. O artigo cita uma análise realizada pelo Instituto de Economia Agrícola – IEA sobre o possível desempenho das frutas cítricas para a economia brasileira e paulista no curto e médio prazo, que prediz a continuação da conjuntura ascendente observada nos meses de novembro e dezembro de 2005 para as cotações internacionais até o início da próxima

safral industrial 2006 / 07; tamém foi estimada a produão potencial de laranja no Estado de São Paulo entre 357 e 367 milhões de caixas em 2007 / 08 (CARVALHO et al., 2006).

2.1.2 Clorose variegada dos citros

Estima-se que, em escala global, cerca de 20% do potencial produtivo das culturas de interesse agrônômico é perdido devido à ocorrência de doenças. Aquelas de origem bacteriana são particularmente severas nos trópicos, onde seus efeitos podem ser catastróficos nas regiões afetadas (DOW; DANIELS, 2000). No Brasil, cerca de 38% das árvores cítricas (aproximadamente 68 milhões de plantas) do Estado de São Paulo são afetadas pela clorose variegada dos citros (CVC..., 2002; MONTEIRO et al., 2001), causando perdas anuais de cerca de 100 milhões de dólares para as indústrias citrícolas (SOUZA, et al., 2005).

Quando a CVC foi descrita pela primeira vez em Macaúbal no Estado de São Paulo em 1987 (ROSSETI et al., 1990), já se encontrava distribuída nas regiões citrícolas do Brasil e Argentina (BRLANSKY et al., 1991; TUBELIS; BARROS; LEITE, 1993), sendo prontamente considerada como uma das doenças mais importantes presentes nos pomares cítricos brasileiros (LIMA, 1996). A rapidez com que a CVC se disseminou da Argentina para todas as regiões citrícolas do Brasil ilustra a grande ameaça que estirpes de *Xylella fastidiosa* que causam CVC podem representar se introduzidas nas áreas citrícolas norte-americanas (REDAK et al., 2004).

A origem da doença e a causa de ter-se tornado epidêmica no Brasil ainda não são claras. A CVC pode ter sido precedida no Brasil pela doença recentemente relatada Requeima do Cafeeiro, possivelmente endêmica nas regiões produtoras de café do Estado de São Paulo, uma vez que os agentes causais DE ambas as doenças são intimamente relacionados geneticamente (LIMA et al., 1998; QIN et al., 2001).

Sabe-se que todas as cultivares de laranja doce usadas hoje na citricultura são provenientes das espécies de *Citrus* spp. originárias da Ásia (HANCOCK, 1992), onde nunca foi relatada a CVC, apesar de centenas de anos de citricultura. Nos Estados Unidos, no Estado da Flórida, onde variedades de citros têm sido extensivamente cultivadas por mais de cem anos, ainda não foi detectada a CVC (CHEN et al., 2002). O estudo aprofundado da relação entre a ocorrência de CVC e a introdução das espécies de *Citrus* spp., presença de insetos vetores e

condições ambientais são essenciais para esclarecer as dúvidas quanto à origem e desenvolvimento da doença.

Os sintomas da CVC são caracterizados pela presença de folhas mais velhas apresentando lesões de cor palha na face abaxial e, nas áreas correspondentes na face adaxial, manchas cloróticas amareladas que podem tornar-se marrom-escuras ou necróticas (ROSSETTI et al., 1990). Folhas de plantas com CVC são geralmente menores do que aquelas pertencentes a plantas sadias, apresentando teores bem abaixo do normal de zinco e potássio (GOMES et al., 2003); coincidentemente, a clorose foliar semelhante à deficiência de zinco é o sintoma típico da CVC. Não se observam sintomas nas folhas mais jovens (ROSSETTI et al., 1990; LEE et al., 1993). Plantas com níveis avançados de infecção podem apresentar ramos com encurtamento de entrenós e aumento de brotações nas gemas, morte de ponteiros e queda de folhas. Os sintomas da infecção em longo prazo são diminuição da copa, declínio do sistema radicular, atrofia e posterior morte da planta (LARANJEIRA, 1997). A produção do pomar afetado cai rapidamente, os frutos ficam duros, pequenos e amadurecem precocemente apresentando alto teor de açúcares; a perda de peso do fruto pode chegar a 75% (FUNDECITRUS, 2006; HUANG; CHIARADIA, 1998; LEE et al., 1993; ROSSETTI et al., 1990;).

O artigo publicado por Machado et al. (1994) reforça essa idéia, uma vez que as folhas cítricas com CVC apresentam sintomas de estresse hídrico associados com redução significativa da assimilação de CO₂ e da taxa de transpiração. Já foi observado que a presença e desenvolvimento da CVC estão relacionados a condições ambientais e idade da planta hospedeira. Laranjas doces jovens são mais sensíveis a CVC do que as plantas adultas (MACHADO, 1997), sendo que a doença é mais severa em regiões onde estresses adicionais ocorrem, como alta demanda atmosférica por água (decorrente do aumento da temperatura e do déficit de pressão de vapor) e déficit hídrico no solo (SALVA; ROBERTO; CARLOS, 1995). Diversos autores observaram que os sintomas da CVC surgiam a partir do meio do verão e tendiam a acentuar-se até a chegada do outono, época em que a doença entrava em dormência (RAJU; WELLS, 1986). A ação simultânea de fatores ambientais estressantes com a CVC provavelmente provoca o mau funcionamento do metabolismo da planta que acarreta disfunções no processo metabólico (RIBEIRO; MACHADO; OLIVEIRA, 2004), sendo que a maioria dos sintomas dessa doença sugere uma disfunção do sistema condutor de água da planta (HOPKINS, 1989).

Medidas importantes para o manejo da CVC incluem controle da população de insetos vetores, plantio de mudas cítricas sadias, remoção de plantas jovens sintomáticas com menos de 2 anos de idade e poda de ramos com sintomas foliares iniciais em plantas mais velhas (FUNDECITRUS, 2000; GRAVENA et al., 1998; RODAS, 1994). Nos últimos anos, a incidência da CVC permaneceu acima de 35%, atingindo 43% em 2003 e mantendo-se relativamente estável até 2006 (FUNDECITRUS, 2006). Esse quadro indica que os métodos de controle não estão sendo totalmente eficazes. As medidas de manejo da CVC foram determinadas empiricamente (RODAS, 1994) baseadas apenas na informação de que a bactéria era limitada ao sistema vascular das plantas e transmitida para outras plantas cítricas por meio de cigarrinhas. Não há dúvidas de que mais informações sobre esse patossistema são necessárias, incluindo como a CVC é afetada pelo ambiente e quais são os mecanismos de resistência presentes em plantas de lima, limão e tangerina (LARANJEIRA et al., 1998).

A observação da presença de algumas plantas assintomáticas em pomares infectados levou a se pensar em novas abordagens para o controle da CVC. Certos pesquisadores consideraram a possibilidade de que a natureza da população microbiana endofítica presente em *C. sinensis* possa influenciar na resistência à CVC nessas plantas (ARAUJO et al, 2002). Lacava et al. (2004) analisaram as interações *in vitro* entre bactérias endofíticas e *X. fastidiosa* e constataram que o seu crescimento é diminuído ou acentuado dependendo do microrganismo ao qual está em contato, sugerindo que os sintomas de CVC em citros podem ser um resultado de um balanço populacional entre *X. fastidiosa* e duas bactérias endofíticas, *Methylobacterium* spp. e *Curtobacterium flaccumfaciens*. A elucidação de aspectos como esse com relação à CVC é essencial para o desenvolvimento de novas práticas visando o manejo mais efetivo da doença e a redução de sua incidência.

Os mecanismos fisiológicos e químicos que caracterizam o estabelecimento da CVC ainda não foram totalmente compreendidos, especialmente sob condições de estresse. Sendo assim, estudos que consideram a interação entre condições ambientais e o estabelecimento da CVC são necessários para auxiliar na elaboração de programas de manejo da doença.

2.1.3 O agente causal da CVC

Xylella fastidiosa (RAJU et al., 1982; WELLS et al., 1987) é uma bactéria endofítica, gram-negativa, fastidiosa e habitante dos vasos de xilema. Essa bactéria apresenta uma ampla gama de hospedeiros que inclui pelo menos 30 famílias de plantas (SHERALD; KOSTKA, 1992) causando diversas doenças economicamente importantes (HOPKINS, 1989; BERETTA et al., 1996; PURCELL, 1997; SILVA et al., 2001), sobretudo nas espécies de laranja doce (*Citrus sinensis* [L.] Osb) (HARTUNG et al., 1994; LARANJEIRA; POMPEU JUNIOR; HAKAKAVA, 1995; LARANJEIRA; BERGAMIN FILHO; AMORIM, 1998) onde causa a CVC.

A partir do momento em que *Xylella fastidiosa* foi detectada como agente causal da Clorose Variegada dos Citros (CHANG et al., 1993; LEE et al., 1993) seguiu-se o desenvolvimento de protocolos e a realização de testes serológicos (GARNIER et al., 1993) e moleculares (BERETTA et al., 1997; MINSVAGE et al., 1994; POOLER; HARTUNG, 1995) visando sua detecção e caracterização. O alto impacto econômico da CVC na produção citrícola levou ao empenho em seqüenciar o genoma completo da bactéria *X. fastidiosa* (estirpe 9a5c), tornando-a o primeiro patógeno de planta a ter seu genoma completamente seqüenciado (SIMPSON et al., 2000). Dow e Daniels (2000), ao analisarem a seqüência gênica da bactéria, constataram a presença de genes semelhantes àqueles de diversos outros patógenos, principalmente *Xanthomonas campestris*. Também se propôs a divisão das diversas estirpes de *X. fastidiosa* em diferentes grupos baseando-se na análise protéica das células bacterianas (WICHMAN; HOPKINS, 2002).

Com uma exceção (LEU; SU, 1993), todas as doenças causadas por *X. fastidiosa* são originárias das Américas, onde estirpes desse fitopatógeno são endêmicas na flora nativa (FREITAG, 1951; RAJU; GOHEEN; FRAZIER, 1983). Ainda não há uma explicação clara quanto à origem das diferentes estirpes causadoras da CVC e a causa de seu comportamento epidêmico no Brasil; do ponto de vista genético, estudos relatam homogeneidade das estirpes de *X. fastidiosa* encontradas em plantas com CVC no cinturão citrícola de São Paulo (ROSSATO et al., 1998), enquanto outros relatam altos valores de diferenciação genética entre estirpes oriundas de diferentes regiões citrícolas do Estado de São Paulo (COLETTA; MACHADO, 2003). A idéia de parentesco entre as estirpes de *X. fastidiosa* causadoras das doenças Requeima do Café e CVC (LIMA et al., 1998; QIN et al., 2001) é reforçada pelo fato de que a indústria citrícola substituiu a

indústria cafeeira em São Paulo após um período de declínio desta última, o que provavelmente ocasionou uma seleção de estirpes de *X. fastidiosa* patogênicas ao café que acabaram por tornar-se patogênicas também a citros (LI et al., 2001). Segundo Chen et al. (2002), a colonização de plantas cítricas e insetos vetores por *X. fastidiosa* pode estar relacionada à nutrição dessa bactéria, de uma maneira similar com o comportamento de microrganismos endofíticos. Os mesmos autores sugerem que a doença ocorre devido a uma situação ideal onde o hospedeiro fornece todos os nutrientes requeridos pela bactéria, permitindo sua rápida multiplicação e, conseqüentemente, altos níveis de densidade populacional. Ainda segundo Chen et al. (2002), a substituição da flora nativa, com sua alta e heterogênea população de *X. fastidiosa*, por extensivas áreas de monoculturas propiciou o quadro acima descrito.

Sabe-se que fitopatógenos afetam as plantas hospedeiras de diversas maneiras. Os fitopatógenos responsáveis pela oclusão dos vasos de xilema, como é o caso da bactéria *X. fastidiosa*, reduzem o fluxo da água e, conseqüentemente, induzem estresse hídrico em seus hospedeiros por aumentarem a resistência do fluxo de água, provocando o fechamento dos estômatos e redução da transpiração (SAEED et al., 1999; TYREE; SPERRY, 1989). Diversos trabalhos mostraram que a infecção por *X. fastidiosa* induz um estresse hídrico interno na planta por obstruir os vasos do xilema e aumentar sua resistência hídrica (HOPKINS, 1989,1995; BOYER, 1995; MCELNONE; SHERALD; FORSETH, 2003). Hopkins (1995) listou diversos fatores responsáveis por distúrbios no funcionamento do xilema devido à colonização por *X. fastidiosa*, como o acúmulo de polissacarídeos, produção de gel, gomas e tiloses pelo hospedeiro em resposta à infecção, e / ou acúmulo de células bacterianas que fisicamente obstruem os vasos condutores de seiva; esses fatores estão citados, também, em vários outros trabalhos (HOPKINS, 1989; ROSSETI et al., 1990; PURCELL; HOPKINS, 1996). Goodwin et al. (1988) relataram distúrbios metabólicos e fisiológicos, como a diminuição na fotossíntese em videira infectada por *X. fastidiosa*, assim como mudanças fisiológicas associadas à presença de células bacterianas, tais como, redução na taxa de transpiração, aumento da concentração de ácido abscísico, prolina, frutose, glicose, Ca^{2+} e Mg^{2+} , diminuição da concentração de K^+ e sacarose.

O mecanismo de patogenicidade das doenças causadas por *X. fastidiosa* não foi ainda totalmente esclarecido. Evidências levam à hipótese de que o mecanismo de patogenicidade estaria relacionado ao estresse hídrico ocasionado pela obstrução dos vasos do xilema (HOPKINS, 1989; MACHADO et al., 1994, HABERMANN et al., 2003a, 2003b; RIBEIRO;

MACHADO; OLIVEIRA, 2003). Hopkins (1989) assinalou que a habilidade de estirpes de *X. fastidiosa* em se mover através dos vasos do xilema seria um indicativo de sua patogenicidade e propôs diversos mecanismos de patogenicidade: disfunção do sistema de condução de água, produção de fitotoxinas e desequilíbrio na síntese e distribuição de reguladores de crescimento. No patossistema *Xylella* - videira existe uma forte associação entre o grau de migração da bactéria no interior do pecíolo e o grau de resistência do hospedeiro à infecção (FRY; MILHOLLAND, 1990), confirmando a hipótese de Hopkins (1989). No caso de plantas sintomáticas, pesquisadores observaram que *X. fastidiosa* encontrava-se envolta por uma matriz translúcida extracelular, deduzida como sendo exopolissacarídeos (EPS) por ela produzidos; os EPS têm sido associados à adesão e formação de biofilme (agregado de células bacterianas), mecanismos essenciais para obstrução dos vasos e patogenicidade (SIMPSON et al., 2000; SILVA et al., 2001). Mais recentemente, observou-se que a bactéria pode ser encontrada nos vasos do xilema como células livres, “planktons”, ou como biofilme; as características químicas do fluido do xilema são capazes de influenciar a capacidade dessas células em formar agregados ou permanecer por mais tempo como células livres no interior dos vasos do xilema (LEITE; ISHIDA; ANDERSEN, 2004). As células bacterianas componentes do biofilme apresentam maior resistência a biocidas, detergentes e antibióticos, o que permite uma maior adaptação e capacidade de competição no interior dos vasos do hospedeiro (HOYLE; COSTERTON, 1991; RAMEY et al., 2004). Um estudo realizado por Newman et al. (2003) considerou a obstrução dos vasos como sendo uma consequência da colonização bacteriana e não uma tática do fitopatógeno visando à colonização e multiplicação no hospedeiro. A bactéria *X. fastidiosa* geralmente coloniza os vasos do xilema em pequenos agregados e de maneira não uniforme, sendo que não há sintomas nessas condições; por outro lado, vasos de xilema apresentando biofilmes formados por alta densidade populacional bacteriana são menos frequentes, mas característicos de uma colonização sintomática (NEWMAN et al., 2003). Souza et al. (2005) descreveram a patogenicidade de *X. fastidiosa* como sendo um resultado da formação de biofilme no interior dos vasos de xilema levando à sua obstrução e, conseqüentemente, ao estresse hídrico.

A anatomia e morfologia dos vasos condutores de xilema podem ser associadas com resistência à infecção por *X. fastidiosa* (QUEIROZ-VOLTAN et al., 1998; QUEIROZ-VOLTAN; PARADELA, 1999). As plantas de citros apresentam os vasos do xilema pontuados que são mais resistentes ao fluxo de água e ao movimento lateral, o que torna esses hospedeiros mais resistentes

à ação da bactéria (LEPEREN; MEETEREN; GELDER, 2000). Alves et al. (2004) compararam a porcentagem de vasos colonizados em pecíolos de folhas de café e citros com a severidade dos sintomas observados e constataram que a severidade dos sintomas refletia uma maior colonização dos vasos de xilema no caso de café, mas que essa relação não existia para citros; além disso, a porcentagem de vasos colonizados foi maior no café do que em citros, reforçando a idéia de que citros apresenta uma maior resistência à infecção por *X. fastidiosa*. É possível que não só a morfologia, mas também a composição do fluido do xilema influencie na colonização bacteriana (ANDERSEN; BRODBECK, 1991). Altas concentrações de íons monovalentes podem aumentar a condução hidráulica, enquanto que altas concentrações de cátions divalentes podem diminuí-la, fenômeno este que favorece o processo de colonização da bactéria (LEPEREN; MEETEREN; GELDER, 2000). A presença de cálcio e magnésio no processo de colonização dos vasos foi indicada por Leite et al. (2002) e Leite, Ishida e Andersen (2003) como uma explicação para a atração de *X. fastidiosa* pelas paredes do xilema, uma vez que os EPS formados são carregados negativamente e, conseqüentemente, atraem cargas positivas (cátions). Osiro et al. (2004) observaram que células bacterianas virulentas apresentavam valores baixos de concentrações de EPS, similares àqueles de células virulentas pouco agressivas, indicando que grandes quantidades de EPS não são necessárias para adesão nas paredes do xilema. Os mesmos autores desenvolveram um modelo cinético para adesão de *X. fastidiosa*, formação de biofilme e virulência, baseado na atração eletrostática entre a superfície das proteínas bacterianas e as paredes do xilema.

Acredita-se que a expressão de sintomas seja uma resposta à infecção por *X. fastidiosa*, influenciada pelo tempo em que essa bactéria leva para acumular-se nos vasos e pelo ponto no qual a multiplicação bacteriana teve início (FRY; MILHOLLAND, 1990). Várias hipóteses têm sido propostas visando explicar a expressão dos sintomas em citros, incluindo o desencadeamento de mecanismos de defesa do hospedeiro como a produção de toxinas, antibióticos e seqüestro de íons (LEE et al., 1982; SIMPSON et al., 2000), desequilíbrio dos sistemas reguladores de crescimento devido à presença do fitopatógeno (FRENCH; STASSI, 1978; HOPKINS, 1989) e seqüestro de nutrientes, principalmente cálcio, magnésio e zinco, que são atraídos pela alta concentração de cargas negativas do biofilme produzido pela agregação de células bacterianas (LEITE et al., 2002). A hipótese do seqüestro de nutrientes proposta por Leite et al. (2002) foi condizente com o trabalho realizado por Alves, Kitajima e Leite (2003) no qual plantas de tabaco

inoculadas com *X. fastidiosa* apresentaram regressão de sintomas iniciais após serem desbastadas e submetidas à fertilização. Autores sugeriram que os sintomas foliares causados por *X. fastidiosa* tornam-se severos apenas quando o hospedeiro é submetido, simultaneamente, a outro tipo de estresse (HOPKINS, 1989; SHERALD et al., 1983). McElrone, Sherald e Forseth (2003) verificaram que ocorria o aumento da severidade dos sintomas em períodos de estresse hídrico na espécie de videira silvestre *Parthenocissus quinquefolia* infectada por *X. fastidiosa*, devido à ação conjunta da colonização bacteriana e do estresse hídrico, essa por colonizar os vasos de xilema e este por reduzir a condutância hidráulica, dificultando a passagem dos elementos de vaso. No estudo realizado por Ribeiro, Machado e Oliveira (2004) foi observado que a obstrução do xilema associada ao alto crescimento e à alta temperatura foliar em mudas de laranja doce infectadas provocaram a diminuição da taxa de assimilação de CO₂, resultado este tido como parcialmente responsável pelo menor crescimento e / ou produtividade de plantas com CVC localizadas em regiões com altas temperaturas.

O papel do déficit hídrico no estabelecimento da infecção e multiplicação de *X. fastidiosa* tem recebido cada vez mais a atenção. Boyer (1995) propôs dois mecanismos para explicar como o estresse hídrico aumenta a suscetibilidade de plantas ao ataque de fitopatógenos: (1) a redução na geração de produtos fotossintéticos causada pela falta de água impossibilita a defesa da planta contra o fitopatógeno e / ou (2) o crescimento da planta é reduzido sem, porém, ocorrer a redução da habilidade de multiplicação do fitopatógeno ocasionando, assim, o aumento do progresso da doença e da severidade dos sintomas no hospedeiro. McElrone, Sherald e Forseth (2001) confirmaram a idéia de que estresse hídrico acentua a severidade e o progresso da doença ao longo do caule da planta *Parthenocissus quiquefolia* infectadas com *X. fastidiosa*. Os mesmos autores também concluíram que tal acentuação é devida à redução da condutividade hidráulica ocasionada pelo entupimento dos vasos de xilema, além de demonstrarem a existência de interações entre estresse hídrico e infecção por *X. fastidiosa* no sistema condutor de água da planta, na condutividade hidráulica e na expressão da doença (MCELRONE; SHERALD; FORSETH, 2003). Em *Parthenocissus quiquefolia*, o estresse hídrico acentuou a severidade dos sintomas e taxa de propagação da bactéria (MACELRONE; FORSETH, 2004).

Os estudos que vêm sendo realizados sobre o genoma bacteriano e fisiologia do hospedeiro estão sendo capazes de aprofundar o entendimento sobre o desenvolvimento de sintomas e progresso da doença, essenciais para se conseguir manejar a CVC de forma eficaz. No

entanto, estudos sobre a fisiologia do hospedeiro ainda são necessários para elucidar o mecanismo existente entre estresse hídrico e a infecção por *Xylella fastidiosa*.

2.1.4 Aspectos da transmissão de *Xylella fastidiosa* por insetos vetores

A bactéria *X. fastidiosa* é transmitida por espécies de cigarrinhas da ordem Hemiptera, família Cicadellidae, tribos Cicadellini e Proconiini, que se alimentam do fluido do xilema das plantas cítricas (HILL; PURCELL, 1995a; PURCELL; HOPKINS, 1996; RAVEN, 1984; REDAK et al., 2004; ROBERTO, 1996). Várias doenças causadas por essa bactéria e transmitidas por esses vetores não têm cura e causam danos produtivos e econômicos consideráveis (HOPKINS; PURCELL, 2002; PURCELL, 1979; 1989). Os pomares cítricos brasileiros abrigam cerca de 20 espécies de cigarrinhas que se alimentam do xilema das plantas e, portanto, possíveis transmissoras de *X. fastidiosa*, sendo que em estudos recentes com estirpes de *X. fastidiosa* causadoras da CVC no Brasil, outras 11 espécies de 10 gêneros de Cicadellinae foram identificadas (KRÜGNER et al., 1998; FUNDECITRUS, 1999; ROBERTO et al., 1996; YAMAMOTO et al., 2002). A tendência de cigarrinhas vetoras em preferirem brotações novas para se alimentarem (PURCELL, 1979) faz com que os últimos fluxos de brotações sejam a parte da planta com maior probabilidade de estarem infectadas com *X. fastidiosa* (REDAK et al., 2004).

Estudos mostraram que a disseminação da bactéria entre pomares pode ser rápida (LARANJEIRA; BERGAMIN FILHO; AMORIM, 1998), o que sugere eficiência na transmissão. Entretanto, Krüger et al. (1998) constataram que a CVC apresenta um longo período de incubação e que a eficiência de transmissão de cinco espécies de cigarrinhas vetoras é baixa (1% a 12% por espécie). Redak et al. (2004) obtiveram 1% - 5% de eficiência de transmissão nas espécies analisadas, sendo *B. xanthophis* aquela com porcentagem mais elevada, ultrapassando 10%. Sabe-se hoje que a eficiência de transmissão de *X. fastidiosa* varia muito e depende da interação entre espécie vetora e planta hospedeira (PURCELL, 1989). Verificou-se que a densidade populacional de *X. fastidiosa* em laranja doce é quase 100 vezes mais baixa do que em videira, o que representa uma possível explicação para as taxas mais baixas de transmissão observadas de planta para planta (ALMEIDA et al., 2001). Além disso, uma menor proporção de vasos de xilema são colonizados por *X. fastidiosa* nos pecíolos das folhas de citros infectados

(6,4% - 13,5%) (ALVES et al., 2003) do que em videiras (40%) (MOLLENHAUER; HOPKINS, 1976).

No caso das espécies de cigarrinhas vetoras mais estudadas, observou-se que mudanças nas propriedades químicas e na tensão do xilema aparentam determinar a alimentação diurna e sazonal nas plantas hospedeiras (RICHARD et al., 2004). Flutuações naturais na composição química do xilema das plantas hospedeiras durante o dia e no decorrer das estações do ano aparentam determinar o comportamento diário e sazonal dos insetos vetores quanto a sua alimentação (ANDERSEN; BRODBECK; MIZELL III, 1989; BRODBECK et al., 1990; MIZELL; FRENCH, 1987). A tensão do xilema raramente afeta a alimentação das cigarrinhas quando as plantas hospedeiras estão bem irrigadas, porém, para aquelas plantas em vasos e sob estresse hídrico, a frequência de alimentação das cigarrinhas cai exponencialmente em função da tensão do xilema nessas condições (REDAK et al., 2004). Como o fluido do xilema e sua tensão podem ser alterados por diversos fatores, como época do ano, hora do dia, clima, fertilização, irrigação, poda (ANDERSEN; BRODBECK; MIZELL III, 1989; 1992; 1995a; 1995b; MIZELL; FRENCH, 1987), há possibilidade de manejo das populações de cigarrinhas através da manipulação das condições que influenciam a composição química do xilema para tornar as plantas hospedeiras inadequadas para sua alimentação (REDAK et al., 2004).

Historicamente, as medidas de controle e manejo de *X. fastidiosa* e seus insetos vetores não têm se mostrado muito eficazes (HEWITT; FRAZIER; FREITAG, 1949; PURCELL, 1979). Simplesmente controlar a população de insetos vetores em pomares afetados visando limitar a incidência e disseminação da doença é raramente uma medida bem sucedida. Além da densidade populacional do inseto vetor e de seu comportamento, sua dispersão temporal e espacial e a seleção dos sítios de alimentação no hospedeiro aparentam ser mais importantes para a epidemia da doença do que a eficiência de transmissão e devem ser consideradas em qualquer programa de manejo da doença e de seus vetores (REDAK et al., 2004).

Transmissões por raízes e por enxertia também já foram relatadas (HE et al., 2000), porém essas fontes de inóculo não são tão significativas quanto à transmissão por cigarrinhas vetoras.

2.1.5 Aspectos epidemiológicos da CVC

Não há muitos trabalhos disponíveis no que diz respeito à epidemiologia da CVC. Apesar da escassez de estudos epidemiológicos, observações importantes com relação ao comportamento da doença foram relatadas (PALAZZO; CARVALHO, 1992; GOTTWALD et al., 1993; LARANJEIRA, 1997; NUNES, 1999; MARTINS et al., 2000; PEREIRA, 2000), como principais fontes de inóculo, não influência de vento ou passagem de máquina na disseminação, épocas de maior aparecimento de plantas doentes, o que propiciou o aumento da eficiência do manejo da CVC.

Uma escala diagramática para a avaliação da severidade da CVC foi criada por Amorim et al. (1993) facilitando as análises no campo e universalizando os dados de severidade utilizados em pesquisas relacionadas a CVC, inclusive aquelas realizadas por Gottwald et al. (1993) e Laranjeira, Bergamin e Amorim (1998) sobre a epidemiologia da CVC baseada nos sintomas das plantas avaliadas.

No decorrer dos anos, observou-se que a concentração relativa de *X. fastidiosa* era mais alta na primavera e verão (LARANJEIRA, 1997; PEREIRA, 2000, 2005; OLIVEIRA et al., 2002). Nunes (1999) já havia notado que, durante o verão, cultivares de laranja doce apresentavam sintomas severos de CVC em brotações emitidas na primavera. Oliveira et al. (2002) observaram que o número de células de *X. fastidiosa* detectado em folhas de citros aumentava de acordo com a idade da folha e que a bactéria não era detectada na seção superior da nervura principal das folhas coletadas; essas observações indicavam a existência de padrões de distribuição temporal e espacial de *X. fastidiosa*, respectivamente. Os resultados obtidos por Oliveira et al. (2002) confirmam aqueles relatados por Machado et al. (1997), que detectaram maiores concentrações bacterianas em folhas mais velhas.

Gottwald et al. (1993) realizaram avaliações anuais em talhões de citros e concluíram que CVC de uma única árvore infectada pode se disseminar para 90% das árvores localizadas em um raio de 20 hectares em 12 anos, e que o progresso da doença seguia o modelo simples de Gompertz. Nunes (1999) obteve resultados similares aos de Gottwald et al. (1993) ao realizar avaliações bimestrais em talhões de citros reafirmando a escolha desse modelo. Laranjeira (1997) observou em seu trabalho que ocorriam picos de velocidade da doença bem definidos: aumento intenso da incidência na primavera e verão e quase paralisação do progresso entre o outono e o

inverno, afirmando que, caso fossem realizadas análises anuais, seriam obtidos resultados similares ao de Gottwald et al (1993), uma vez que as avaliações bimestrais apresentaram um progresso mais rápido do que o esperado. Ao se analisar a epidemiologia da CVC no Brasil, os padrões de incidência da doença nas áreas amostradas mostravam uma curva do tipo sigmóide, com crescimento logístico nas árvores doentes (LARANJEIRA; BERGAMIN FILHO; AMORIM, 1998), o que era coerente com o padrão de disseminação de CVC de árvore para árvore, indicando que o avanço da CVC em um talhão ocorre devido, principalmente, à transmissão da doença de uma árvore infectada às árvores vizinhas. Já Oliveira et al. (2002) não obtiveram resultados que levassem à escolha de um modelo matemático adequado para descrever o progresso da CVC, além de detectarem, na região Sul do Estado de São Paulo, um progresso muito mais rápido do que aquele suposto por Gottwald et al. (1993). Existe a hipótese de que picos de velocidade da CVC estejam relacionados a determinados picos de emissão de brotações (LARANJEIRA et al., 2003b), já que as cigarrinhas preferem tecidos novos e tenros para se alimentarem (LOPES, 1999). As pesquisas desenvolvidas possibilitaram a montagem de um modelo conceitual do patossistema em questão envolvendo o comportamento dos insetos vetores e o surgimento de novas brotações. (Figura 2.1).

Figura 2.1 - Modelo conceitual do progresso da Clorose Variegada dos Citros e os diversos fatores envolvidos.

Fonte: Bergamin, comunicação pessoal.

No Estado de São Paulo, as regiões Norte, Noroeste e Centro apresentam incidência significativamente maior de CVC quando comparadas com as regiões Oeste e Sudeste (AYRES, 2000); acredita-se que essa diferença estivesse ligada a fatores climáticos, à população de vetores e ao inóculo inicial (SALVA; ROBERTO; CARLOS, 1995; LARANJEIRA, 1997; AYRES, 2000). Outra explicação para as diferenças em incidência e severidade da doença entre as regiões seria o fato de diferentes estirpes de *X. fastidiosa* estarem presentes em diferentes áreas produtoras (WENDLAND, 2000; QIN et al., 2001) e da existência de diferenças entre as áreas produtoras em relação à flutuação de insetos vetores (PEREIRA, 2000). Ao se analisar o comportamento sazonal da CVC em pomares das regiões Noroeste, Centro e Sul do Estado de São Paulo foi concluído que existe maior quantidade de brotações novas e de ramos sintomáticos na região Noroeste (BARBOSA, 2002) e maior quantidade de ramos assintomáticos da região Sul (LARANJEIRA et al., 2003b), o que fez com que se presumisse que essa não visualização de sintomas seja devida ao plantio de mudas infectadas e ambiente desfavorável para a expressão de sintomas; como não houve diferença de concentração bacteriana nos pomares avaliados, pôde-se cogitar a hipótese de que o clima não influencia a multiplicação de *X. fastidiosa* dentro da planta (LARANJEIRA et al., 2003b). Com o objetivo de aprofundar os conhecimentos sobre a dinâmica da CVC nas zonas Noroeste, Centro e Sul do Estado de São Paulo, os mesmos autores tentaram ajustar as curvas de progresso obtidas em modelos matemáticos previamente conhecidos sem, no entanto, obter bons ajustes (LARANJEIRA et al., 2003a). Segundo o FUNDECITRUS (2006), o fato de a CVC ser inicialmente detectada nas regiões Norte e Noroeste do Estado mostra que a doença existe há mais tempo nessas áreas e, conseqüentemente, apresenta maiores índices de severidade; além disso, o clima quente e seco das regiões Norte e Noroeste favorece a expressão de sintomas e são nessas regiões que se encontram as maiores populações das cigarrinhas transmissoras da doença quando comparadas ao Sul do Estado. Os estudos epidemiológicos existentes sobre a CVC concentram-se nas regiões citrícolas do Estado de São Paulo. É importante que outras pesquisas sejam realizadas nas demais regiões citrícolas do País para possibilitar um maior entendimento sobre a dinâmica da doença.

Maiores informações são necessárias para a caracterização do papel da densidade populacional bacteriana no progresso da doença no decorrer das estações do ano, assim como a importância epidemiológica de hospedeiros alternativos de *X. fastidiosa* para que seja possível a elaboração de um programa de manejo mais eficaz do que temos hoje.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Experimento em condições naturais

2.2.1.1 Efeito da irrigação sobre infecções primárias por *X. fastidiosa* em plantas jovens de laranja doce

Com o objetivo de investigar o estabelecimento de infecções primárias de *X. fastidiosa* em plantas cítricas jovens irrigadas e não irrigadas realizou-se uma inoculação mecânica da bactéria em 12 de julho de 2005 (período de seca) aos 5 meses após o plantio. O experimento de campo foi instalado na Fazenda Cambuhy, localizada no município de Matão, região citrícola central do Estado de São Paulo. Foram plantadas 160 mudas de laranja doce ‘Valência’ [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] enxertadas sobre citrumelo ‘Swingle’ [*Citrus paradisi* Macfad. x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] em janeiro de 2005. Foram disponibilizadas 60 mudas mantidas em sacos plásticos dentro de casa-de-vegetação para servirem como controle positivo do inóculo bacteriano recém utilizado na inoculação. Dentre as mudas plantadas no campo, 32 foram mantidas como testemunhas (controle negativo), sendo inoculadas apenas com solução tampão de fosfato salino (“Phosphate Buffer Saline” – PBS) e permanecendo sob o mesmo regime hídrico daquelas inoculadas.

O experimento de campo foi montado seguindo o delineamento experimental de blocos casualizados, sendo dividido em dois tratamentos, inoculados nas seguintes condições: I) irrigado (sem estresse hídrico); II) não irrigado (com estresse hídrico). Cada tratamento apresentava quatro repetições, sendo cada repetição composta de 16 plantas (Tabela 2.4). Em cada parcela foi montada uma estrutura coberta com um telado, com o objetivo de eliminar a possibilidade de infecção natural por insetos vetores. Essa estrutura telada foi colocada de modo a formar uma pequena estufa, por onde seria possível caminhar durante as inoculações e avaliações (Figura 2.2 A e B). Com base no número de parcelas existentes, foram montadas 10 estruturas; 8 correspondentes às 8 parcelas dos tratamentos, e 2 correspondentes às testemunhas (plantas não inoculadas) de cada tratamento (Anexo A).

Tabela 2.4 – Relação de épocas de plantio e de inoculação mecânica de *Xylella fastidiosa* e os tratamentos correspondentes em plantas cítricas jovens. Matão (SP)

Plantio	Época inoculação	Regime hídrico	Trat.	Nº de repetições	Nº de plantas por repetição	Nº total de plantas
Jan-Fev/05	Jul/05 (Inverno)	Irrigado*	I	4	16	64
		Não irrigado	II	4	16	64
Jan-Fev/05	Testemunha (não inoculadas)	Irrigado*	T3	1	16	16
		Não irrigado	T4	1	16	16
TOTAL						160

*Irrigação com mangueira (2 vezes por semana)

Figura 2.2 – Montagem da estrutura telada após o plantio das mudas de laranja Valência (A) e visualização do interior da estrutura depois de terminada a colocação do telado em uma das parcelas do experimento (B). Fazenda Cambuhy, Matão, SP.

Os tratos culturais foram os mesmos utilizados em todas as mudas de citros da Fazenda, com exceção dos produtos sistêmicos que foram evitados por poderem influenciar a taxa de infecção primária da bactéria *X. fastidiosa*. A adubação de plantio foi realizada com a aplicação de 600 kg de adubo químico Super simples por hectare. Para a adubação de condução foram feitas 4 adubações com Nitrato de amônia de 50, 50, 100 e 100 gramas, respectivamente, uma vez por mês. O inseticida usado foi o Ethion, 2 litros / 200 litros de água, o formicida usado foi o granulado Isca Mirex e o herbicida foi o Glifosato 3 litros / ha.

O isolado de *X. fastidiosa* de citros usado nas inoculações (CCT6570), proveniente de plantas afetadas pela CVC em Bebedouro (ALMEIDA et al., 2001), estava preservado em glicerol a -80°C no Laboratório de Insetos Vetores do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e

Zoologia Agrícola da ESALQ / USP. Suspensões de células bacterianas deste isolado em 3ª passagem em meio de cultura sólido “Periwinkle Wilt Gelrite” – PWG (HILL; PURCELL, 1995b), após cinco dias de crescimento, foram usadas nas inoculações mecânicas.

Colônias resultantes de oito alíquotas de 20 µL provenientes da suspensão da 2ª passagem foram utilizadas para a obtenção de uma suspensão bacteriana padrão (PRADO, 2003). As células bacterianas foram raspadas das placas com o auxílio de um alça de platina e homogeneizadas em 1 mL de PBS até a obtenção de uma concentração de aproximadamente 10⁸ unidades formadoras de colônia (UFC), baseando-se na escala de turbidez de McFarland (LELLIOTT; STEAD, 1987).

Três ramos de cada muda cítrica plantada no interior dos telados foram marcados com fitas coloridas e inoculados no último fluxo de crescimento com a suspensão bacteriana em PBS, obtidas seguindo o procedimento acima descrito, ou apenas com PBS no caso das mudas-testemunhas (controle negativo). As inoculações foram feitas pelo método de agulha (ALMEIDA et al., 2001) depositando-se uma gota de 7 µL da suspensão em um ponto da haste de cada ramo marcado com fita, e perfurando-se o local cinco vezes com um alfinete entomológico para que ocorresse absorção da gota de suspensão. A inoculação foi realizada nas horas mais quentes do dia, quando a absorção do inóculo pela planta é mais rápida (1-3 min). Após 20 min da homogeneização em PBS, tempo suficiente para a inoculação de todas as plantas de um bloco, a suspensão bacteriana foi refeita visando garantir a estabilidade da viabilidade do inóculo. A mesma suspensão bacteriana usada em cada bloco foi inoculada por agulha em 15 mudas de laranja ‘Valência’ sobre ‘Swingle’ como controle positivo da viabilidade do inóculo. Como o experimento era constituído de 4 blocos, foram utilizadas 60 mudas de citros. Tais mudas foram trazidas para o Laboratório de Insetos Vetores da ESALQ/USP e mantidas em casa-de-vegetação para posterior avaliação de sintomas e detecção de *X. fastidiosa*.

Foram conduzidas avaliações semestrais e mensais no decorrer do experimento. As avaliações semestrais, feitas aos 6 e 12 meses após a inoculação, visaram a detecção e quantificação de *X. fastidiosa* por meio de isolamento primário em meio de cultura sólido PWG e confirmação através do teste de “Polymerase Chain Reaction” - PCR. Foram submetidas à avaliação, as primeiras folhas acima do ponto de inoculação de cada ramo. No caso das avaliações realizadas aos 12 meses da inoculação, foram coletadas e submetidas à avaliação as primeiras folhas do penúltimo fluxo de crescimento, localizado cerca de 20 cm acima do ponto de

inoculação. As avaliações mensais, que tiveram início após 3 meses da data de inoculação, buscaram a presença de sintomas de CVC nas plantas inoculadas.

O isolamento primário de *X. fastidiosa* em meio de cultura sólido PWG, a partir das folhas cítricas coletadas no campo, foi realizado seguindo o protocolo modificado por Almeida (1999), que reduz o volume de água destilada para o preparo do meio PWG de 1000 mL para 900 mL. Cada amostra foliar foi primeiramente desinfestada superficialmente por meio de lavagem com água de torneira e submetida a uma limpeza externa com algodão embebido em álcool etílico 96%. Com uso de uma lâmina foram cortados os pecíolos e a porção basal da nervura central das folhas (OLIVEIRA et al., 2002), os quais foram logo em seguida pesados em balança semi-analítica (modelo BG 4000, GEHAKA, Brasil), de modo a manter o peso em uma faixa de 0,10 a 0,20 g. A etapa seguinte do isolamento visou à desinfecção das folhas sendo realizada em câmara de fluxo laminar (modelo VLFS-09, VECO, Campinas, SP) para garantir a assepsia de todo o processo. As amostras foram seqüencialmente imersas por 2 min em recipientes contendo álcool etílico a 96%, hipoclorito de sódio a 2% e em três recipientes contendo água destilada. As amostras já desinfestadas superficialmente foram então cortadas com lâmina sobre papel filtro esterilizado, com ajuda de pinça flambada, em pedaços de 1 a 2 mm e inseridas individualmente em tubos de ensaio de vidro contendo 2 mL de PBS autoclavado.

Um homogeneizador com haste giratória (modelo MA 102, MARCONI Equipamentos para Laboratório S.A., Piracicaba, SP) foi usado para triturar as amostras a uma velocidade aproximada de 17.500 rpm. O processo de trituração seguiu uma série de quatro etapas, desinfecção da haste com álcool a 96% por 15 s, limpeza do excesso de álcool com água destilada esterilizada por 5 s, trituração e homogeneização da amostra por 10 a 15 s e retirada dos resíduos da amostra recém triturada com água destilada por 5 s. Partiu-se então para o processo de trituração da próxima amostra e assim por diante.

Seguidamente, realizou-se a diluição de 10 x de cada amostra transferindo-se, em câmara de fluxo laminar, 200 µL da suspensão resultante da trituração para novos tubos de ensaio contendo 1,8 mL de PBS autoclavado. Tal procedimento foi realizado visando a redução do percentual de contaminação que tende a ser alto em amostras não diluídas (ALMEIDA et al., 2001). Tanto as suspensões diluídas como as não diluídas foram plaqueadas em meio de cultura sólido PWG pipetando-se duas gotas de 20 µL sobre a placa e escorrendo-as por sua superfície. As placas contendo as suspensões bacterianas foram mantidas em incubadora (modelo MA 832,

MARCONI Equipamentos para Laboratório S.A., Piracicaba, SP) a 28 °C por 15 a 20 dias. Após esse período, contaram-se as unidades formadoras de colônias (UFC) das amostras plaqueadas com auxílio de microscópio estereoscópico (modelo LR 66238C, CARLZEISS, Alemanha). Para a estimativa do número de UFC por grama de tecido vegetal, aplicou-se a fórmula (1) para placas contendo suspensões bacterianas não diluídas e a fórmula (2) para placas contendo suspensões diluídas, onde o número de colônias é igual à média no número de colônias presentes nas duas gotas de suspensão bacteriana plaqueadas:

$$\text{UFC / g de tecido} = 100 \times \frac{\text{n}^\circ \text{ Colônias}}{\text{Peso da amostra foliar (g)}} \quad (1)$$

$$\text{UFC / g de tecido} = 100 \times \frac{\text{n}^\circ \text{ Colônias}}{\text{Peso da amostra foliar (g)}} \times 10 \quad (2)$$

As amostras de colônias bacterianas obtidas por meio de isolamento em meio de cultura foram submetidas ao teste de PCR para confirmação da presença de *X. fastidiosa*. Essa posição foi tomada por se considerar o método de isolamento mais condizente com a realidade do processo infectivo na planta naquele momento, uma vez que esse método detecta somente células vivas (cultiváveis) de bactéria, enquanto que o PCR pode detectar tanto células vivas quanto mortas. Uma ou duas colônias bacterianas de cada amostra positiva por isolamento foram dissolvidas em 30 µL de PBS contidos em tubos de polipropileno de 1,5 mL com tampa, devidamente etiquetados e armazenados a -4 °C. A um volume de 2 µL de cada amostra de isolado foi acrescentado 1,2 µL de tampão MgCl₂ (4mM), 0,36 µL de dNTP, 0,96 µL de cada um dos oligonucleotídeos CVC-1 e 272-2 int., que são específicos para *X. fastidiosa* patogênica a citros (POOLER; HARTING, 1995), 1 unidade de Taq DNA polimerase e água destilada em quantidade suficiente para completar o volume de 25 µL por amostra. Finalmente, foram adicionados 30 µL de óleo mineral para evitar a evaporação das amostras ao serem submetidas ao processo de amplificação. Os reagentes acima citados, com exceção das colônias bacterianas, constituíram o controle negativo deste teste de PCR. Utilizou-se como controle positivo amostras de isolados já amplificadas e confirmadas como positivas para a presença de *X. fastidiosa*. A amplificação foi realizada em termociclador PTC-100 (modelo MA 02172, MJ Research, Inc., USA) seguindo as etapas: 1 ciclo de 94 °C por 4 min, 94 °C por 1 min, 64 °C por 1 min e 72 °C por 1 min e 30 s, repetição das

etapas 2 a 4 por 35 vezes, 72 °C por 10 min e estabilização a 4 °C por tempo indeterminado. Um volume de 1 µL de corante azul de bromofenol 0,25% foi adicionado às amostras recém amplificadas. As amostras foram então aplicadas em um gel de agarose a 1% [1 g de agarose para 100 mL de TBE 10 x (121,1 g de Tris HCl PM 121,14; 51,3 g de ácido bórico; 20 mL de EDTA 0,5 mM pH 8,0 e acréscimo de água destilada até completar o volume de um litro)] contendo brometo de etídio para a separação de bandas e visualização daquelas correspondentes aos fragmentos amplificados de DNA bacteriano (amostras positivas). A imagem das bandas foi capturada sob luz ultravioleta e documentada em equipamento computadorizado “Eagle Eye II” (modelo CA 92037, STRATAGENE, La Jolla, EUA.). No caso das amostras positivas foi possível identificar as bandas correspondentes aos fragmentos de DNA de *X. fastidiosa*, comparando-se com marcadores moleculares (DNA ladder) também aplicados no gel de agarose.

Plantas que apresentaram um ou mais ramos positivos para *X. fastidiosa* foram consideradas infectadas.

As médias dos dados de porcentagem de plantas infectadas por *X. fastidiosa* dos tratamentos foram comparadas estatisticamente pelo teste de hipótese sobre duas proporções. Já as médias de população bacteriana (nº UFC / g de tecido vegetal) dos tratamentos foram submetidas ao teste estatístico de média.

2.2.2 Experimentos em casa-de-vegetação

Com o objetivo de testar a hipótese de que o regime hídrico influi na taxa de infecção primária de *X. fastidiosa* foram realizadas inoculações mecânicas e com insetos em mudas de *C. sinensis* de 12 meses de idade. Os resultados de ambos os métodos de inoculação foram averiguados após 5 e 10 meses respectivamente.

Adquirir informações quanto ao sucesso da infecção primária de *X. fastidiosa* em mudas nessa idade é importante na medida em que é nessa etapa de seu crescimento que as mesmas são replantadas no campo para a formação de novos pomares.

2.2.2.1 Efeito do déficit hídrico do solo sobre a infecção primária por *X. fastidiosa* após inoculação mecânica em mudas de laranja doce

Duzentas e quarenta mudas de *C.sinensis* com 60 cm de altura e 12 meses de idade foram transplantadas de sacos de polietileno para vasos de plástico rígido 30x10 cm (comercialmente denominados citrovasos ou citropotes) contendo substrato constituído de uma mistura de solo peneirado, areia e esterco de curral curtido peneirado na proporção 3:1:1. A adubação foi realizada adicionando-se 50 g de adubo superfosfato simples (20% P_2O_5) para cada 25 kg de substrato e 3 g / vaso de Osmocolt (fertilizante granulado contendo microelementos e durabilidade de 6 meses) na superfície dos citrovasos logo após o transplântio das mudas. O controle de pragas foi realizado com pulverizações quinzenais de Vertimec 18 CE (0,2 mL / L de água) e Perfekthion 400 CE (1,0 mL / L de água). Também foram realizadas adubações foliares semanais com Chelard (2,5 g / L).

Três amostras do substrato a ser utilizado no experimento foram coletadas e enviadas para o Laboratório de Hidráulica localizado no Departamento de Engenharia Rural da ESALQ/USP para que se realizasse a análise da curva de retenção de água no mesmo. A partir dos valores obtidos em umidade com base em volume ($cm^3 H_2O / cm^3$ solo) dos pontos de capacidade de campo e ponto de murcha permanente, foi possível estimar o peso de cada vaso que correspondia a esses valores e, assim, estabelecer o peso em déficit hídrico, determinado a partir de um ponto fixo na curva de retenção de água no solo próximo ao valor correspondente ao ponto de murcha permanente.

Cento e vinte mudas de *C. sinensis* foram mantidas sob regime de capacidade de campo e outras 120 foram mantidas sob regime de déficit hídrico, com o objetivo de testar a hipótese de que o regime hídrico é capaz de influenciar o estabelecimento de infecções primárias dessa bactéria em mudas cítricas de 12 meses de idade. Os pesos estipulados para cada vaso nos dois regimes hídricos foram mantidos constantes através da pesagem diária dos mesmos em balança digital (modelo MF 601, FILIZOLA, São Paulo, Brasil) e do acréscimo de água até o valor estipulado.

As plantas a serem submetidas ao regime de capacidade de campo foram irrigadas até que houvesse acúmulo de água na superfície dos vasos e, em seguida, aguardou-se a absorção completa da água pelo solo contido nos vasos para que os mesmos fossem então pesados e o peso

nesse regime hídrico estipulado. Já as plantas a serem submetidas ao regime de déficit hídrico levaram, em média, 40 dias para alcançarem o peso limite após o qual as mesmas começariam a apresentar sintomas de murcha foliar. Após esse tempo, outros 30 dias foram necessários para a aclimação das mudas a esse regime hídrico. Passado o período de aclimação, realizou-se a inoculação mecânica de uma suspensão de *X. fastidiosa* em 50 plantas mantidas em déficit hídrico e em 46 plantas mantidas em capacidade de campo; 10 plantas mantidas em déficit hídrico e outras 13 mantidas em capacidade de campo serviram como testemunha, sendo inoculadas apenas com PBS.

A inoculação mecânica foi feita em maio de 2005 pelo método de agulha (ALMEIDA et al., 2001) depositando-se uma gota de 7 µl da suspensão em um ponto da haste do ultimo fluxo de crescimento e perfurando-se com um alfinete entomológico, conforme descrito no item 2.2.1.1. O isolado de *X. fastidiosa* usado nas inoculações foi o CCT6570. Suspensões de células bacterianas de CCT6570, preservado em glicerol a -80°C no Laboratório de Insetos Vetores da ESALQ/USP. Após três passagens deste isolado em meio de cultura sólido PWG a 28°C, colônias com 7 dias foram raspadas das placas com auxílio de um alça de platina e homogeneizadas em 1 mL de PBS até a obtenção de uma concentração de 10⁸ unidades formadoras de colônia (UFC), baseando-se na escala de turbidez de McFarland (LELLIOTT; STEAD, 1987). A viabilidade do inóculo foi confirmada através de diluição e plaqueamento em meio de cultura sólido PWG.

O isolamento primário em meio de cultura sólido PWG para detecção e quantificação de *X. fastidiosa* nas plantas (HILL; PURCELL, 1995b) foi realizado 5 meses após a data de inoculação mecânica, conforme descrito anteriormente (item 2.2.1.1). De cada planta inoculada foram submetidas ao isolamento amostras dos seguintes pontos: secções de 1 cm de comprimento acima da haste tomadas a 2 cm e 7 cm acima do ponto de inoculação, 1ª folha e 3ª folha acima do ponto de inoculação. No caso das folhas, as amostras foram constituídas apenas de tecidos do pecíolo e parte basal da nervura central. O peso das amostras foi padronizado entre 0,10 a 0,20 g.

Colônias bacterianas isoladas de amostras de hastes e folhas foram submetidas ao teste de PCR para confirmação da presença de *X. fastidiosa*, conforme descrito no item 2.2.1.1.

2.2.2.2 Efeito do déficit hídrico do solo sobre a infecção primária por *X. fastidiosa* após inoculação por insetos vetores em mudas de laranja doce

Para inoculação das mudas dos tratamentos de déficit hídrico e de capacidade de campo foram usados adultos das cigarrinhas vetoras *Bucephalogonia xanthophis* e *Dilobopterus costalimai*. O Laboratório de Insetos Vetores da ESALQ/USP mantém colônias da cigarrinha *B. xanthophis*, da qual foram retirados os indivíduos para a realização das inoculações (Figura 2.3). Indivíduos da espécie *D. costalimai* foram coletados em pomares cítricos da região de José Bonifácio (SP), com auxílio de funcionários do Fundo de Defesa da Citricultura – FUNDECITRUS e mantidos em plantas de boldo [*Vernonia condensata* Beker] até o início do teste de transmissão.

Figura 2.3 – Colônias da cigarrinha *Bucephalogonia xanthophis* mantidas em casa de vegetação, de onde foram retirados indivíduos usados na inoculação com insetos no experimento em condições controladas

Adultos de ambas espécies foram submetidos a um período de acesso à aquisição (PAA) de 48 h em plantas-fonte do isolado CCT6576 de *X. fastidiosa* e em seguida levados à casa-de-vegetação para a inoculação das plantas dos tratamentos (Figura 2.4 A). Um ponto de inoculação foi marcado com caneta preta na haste do último fluxo de crescimento de cada muda cítrica, onde foram fixadas gaiolas retangulares de plástico transparente de 5x3x2 cm (D'ARCY; NAULT, 1982) visando o confinamento de duas cigarrinhas naquele ponto. Os insetos foram introduzidos nas gaiolas por meio de um aspirador bucal (Figura 2.4 B), sendo mantidos por um período de acesso à inoculação (PAI) de 48 horas, após o qual foram retirados e avaliados quanto à sobrevivência.

A inoculação de *X. fastidiosa* pelos vetores foi realizada em 58 plantas mantidas em déficit hídrico e em 57 plantas mantidas em capacidade de campo. Dentre as 58 plantas mantidas em déficit hídrico, 29 foram inoculadas por *B. xanthophis* no dia 23 de março de 2005, 20 por *D. costalimai* no dia 30 de março de 2005 e outras 9 por *B. xanthophis* no dia 06 de junho de 2005. Dez plantas mantidas em déficit hídrico e 12 em capacidade de campo serviram como testemunhas (controle negativo), sendo inoculadas apenas com PBS.

Figura 2.4 – Plantas-fonte às quais adultos de cigarrinhas foram confinadas durante o período de acesso à aquisição de *X. fastidiosa* (A) e aspirador bucal utilizado para introduzir as cigarrinhas nas gaiolas (B)

A inoculação de *X. fastidiosa* pelos vetores foi realizada em 58 plantas mantidas em déficit hídrico e em 57 plantas mantidas em capacidade de campo. Dentre as 58 plantas mantidas em déficit hídrico, 29 foram inoculadas por *B. xanthophis* no dia 23 de março de 2005, 20 por *D. costalimai* no dia 30 de março de 2005 e outras 9 por *B. xanthophis* no dia 06 de junho de 2005. Dez plantas mantidas em déficit hídrico e 12 em capacidade de campo serviram como testemunhas (controle negativo), sendo inoculadas apenas com PBS.

Aos 10 meses após a data de inoculação, realizou-se o isolamento primário e quantificação de *X. fastidiosa* em amostras de todas as plantas inoculadas, conforme descrito no item 2.2.1.1.

Os procedimentos para confirmação de *X. fastidiosa* em colônias bacterianas isoladas das amostras foram os mesmos descritos em 2.2.1.1.

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Experimento em condições naturais

2.3.1.1 Efeito da irrigação sobre infecções primárias por *X. fastidiosa* em plantas jovens de laranja doce

As avaliações dos ramos inoculados no inverno foram realizadas aos 6 e 12 meses após a data de inoculação (julho/2005). Todas as plantas-testemunha apresentaram resultados negativos para a presença da bactéria pelo método de isolamento primário em meio sólido. As mudas cítricas mantidas como controle positivo do inoculo em casa-de-vegetação, apresentaram resultados positivos por isolamento, comprovando a viabilidade das suspensões bacterianas utilizadas.

Do total de 128 plantas avaliadas após 6 meses da inoculação, 11 apresentaram resultados positivos, sendo 9 pertencentes ao tratamento irrigado (correspondentes a 14% do total de plantas avaliadas) e 2 pertencentes ao tratamento não irrigado (correspondentes a 3,1% do total de plantas avaliadas). Realizou-se um teste de hipótese sobre as proporções de plantas infectadas no tratamento irrigado e não irrigado. Com base no resultado obtido, pode-se dizer que há evidência suficiente para garantir que a proporção de plantas infectadas por *X. fastidiosa* correspondente ao tratamento irrigado é maior do que a proporção correspondente ao tratamento não irrigado (Tabela 2.5).

Do total de 128 plantas avaliadas após 12 meses da inoculação, 27 apresentaram resultados positivos, sendo 15 pertencentes ao tratamento irrigado (correspondentes a 23,4% do total de plantas avaliadas) e 12 pertencentes ao tratamento não irrigado (correspondentes a 18,7% do total de plantas avaliadas). Não houve diferença estatística entre os percentuais de plantas infectadas dos tratamentos irrigado e não irrigado, aos 12 meses após a inoculação (Tabela 2.6).

Tabela 2.5 – Porcentagem de infecção e população de *Xylella fastidiosa* em plantas de laranja doce, detectadas pelo método de isolamento primário aos 6 meses após a inoculação mecânica realizada em julho/2005, na Fazenda Cambuhy, Matão, SP

Tratamentos	Blocos	Nº plantas inoculadas	Nº plantas infectadas*	População média bacteriana**
Irigado	1	16	2 (12,5 %)	$1,7 \times 10^4$
	2	16	4 (25 %)	$6,2 \times 10^4$
	3	16	3 (18,7 %)	$5,5 \times 10^4$
	4	16	0 (0 %)	-
Média (blocos)			14 % ^a	$3,4 \times 10^4$
Não irrigado	1	16	0 (0 %)	-
	2	16	0 (0 %)	-
	3	16	1 (6,2 %)	$6,7 \times 10^4$
	4	16	1 (6,2 %)	$2,5 \times 10^5$
Média (blocos)			3,1 % ^b	$7,9 \times 10^4$

* A proporção (p) seguida pela letra 'a' é maior do que a proporção (p) seguida pela letra 'b', segundo o teste de hipótese unilateral à direita sobre duas proporções, ou seja, teste da afirmativa de que $p^a > p^b$, a 5% de probabilidade.

** Número médio de unidades formadoras de colônia por grama de tecido vegetal obtido por meio de isolamento da primeira folha acima do ponto de inoculação dos ramos.

Tabela 2.6 – Porcentagem de infecção e população de *Xylella fastidiosa* em plantas de laranja doce, detectadas pelo método de isolamento primário aos 6 meses após a inoculação mecânica realizada em julho/2005, na Fazenda Cambuhy, Matão, SP

Tratamentos	Blocos	Nº plantas inoculadas	Nº plantas infectadas*	População média bacteriana**
Irigado	1	16	3 (18,7 %)	$1,2 \times 10^6$
	2	16	5 (31,2 %)	$7,3 \times 10^5$
	3	16	2 (12,5 %)	$5,1 \times 10^5$
	4	16	5 (31,2 %)	$1,4 \times 10^5$
Média (blocos)			23,4 % ^a	$6,4 \times 10^5$ ^a
Não irrigado	1	16	4 (25 %)	$9,5 \times 10^5$
	2	16	4 (25 %)	$4,5 \times 10^5$
	3	16	3 (18,7 %)	$2,9 \times 10^5$
	4	16	1 (6,2 %)	$5,6 \times 10^5$
Média (blocos)			18,7 % ^a	$5,6 \times 10^5$ ^a

* As proporções seguidas de mesma letra, dentro da mesma coluna, são estatisticamente iguais segundo o teste de hipótese unilateral à direita sobre duas proporções, a 5 % de probabilidade.

** Número médio de unidades formadoras de colônia por grama de tecido vegetal obtido por meio de isolamento da primeira folha acima do ponto de inoculação dos ramos. Médias seguidas pela mesma letra, dentro da mesma coluna, são estatisticamente iguais segundo o Teste de Média, no qual se aceitou H_0 , o que significa que as variações são devido a variação natural do processo.

Nas avaliações mensais de sintomas foram visualizados sintomas discretos de CVC em 4 ramos somente aos 12 meses após a data de inoculação, sendo 3 deles pertencentes ao tratamento irrigado e 1 pertencente ao não irrigado. No caso dos 3 ramos pertencentes ao tratamento irrigado, a média da população bacteriana foi de $1,1 \times 10^6$ UFC / g de tecido vegetal, enquanto que no caso do ramo pertencente ao tratamento não irrigado, a população bacteriana foi de $2,7 \times 10^6$ UFC / g de tecido vegetal. Pode-se observar que a concentração bacteriana presente nos ramos sintomáticos é mais alta do que a média geral das plantas infectadas ($\cong 10^5$ UFC / g).

Todas as amostras positivas para o isolamento de *X. fastidiosa* apresentaram também resultados positivos para o teste de PCR, confirmando tratar-se verdadeiramente de colônias dessa bactéria. Nenhuma das plantas testemunhas (inoculadas apenas com PBS) mostraram resultados positivos para isolamento de *X. fastidiosa* ou sintomas de CVC, indicando que as mudas usadas no estudo eram sadias e que não houve inoculação natural por insetos vetores.

Ao se comparar os resultados obtidos com 6 e 12 meses após a inoculação, observou-se que a porcentagem de plantas infectadas por *X. fastidiosa* passou de 14% para 23,4% nos tratamentos irrigados e de 3,1% para 18,7% nos tratamentos não irrigados indicando, possivelmente, o início da colonização sistêmica do hospedeiro pela bactéria. Apesar de se observar um aumento do número total de plantas infectadas em ambos os tratamentos, nota-se que a bactéria foi detectada com mais frequência nas plantas pertencentes ao tratamento irrigado com apenas 6 meses após a inoculação (Tabela 2.5). A semelhança estatística na porcentagem de plantas infectadas aos 12 meses mostra que não há diferença no sucesso da infecção entre os tratamentos irrigado e não irrigado. Entretanto, o fato de ter havido diferença estatística aos 6 meses mostra que o estabelecimento de infecções foi mais rápido no tratamento irrigado.

Com relação à análise dos dados de concentração bacteriana, os valores obtidos 6 meses após a data de inoculação indicaram uma diferença na média populacional bacteriana, sendo discretamente maior nas amostras do tratamento não irrigado do que nas amostras do tratamento irrigado (Tabela 2.5). No entanto, não é possível considerar representativos os valores do tratamento não irrigado, uma vez que correspondem a apenas duas plantas infectadas. Já com relação à avaliação de 12 meses da data de inoculação, os valores das médias populacionais bacterianas de ambos os tratamentos não diferiram estatisticamente entre si ($6,4 \times 10^5$ e $5,6 \times 10^5$ para as amostras do tratamento irrigado e não irrigado, respectivamente), o que indica que, uma vez retirado o estresse hídrico (após o início da época chuvosa), sua influência negativa deixa de

existir e a bactéria readquire sua capacidade de infecção e colonização do hospedeiro. Ao comparar os valores das médias populacionais bacterianas aos 6 e 12 meses da data de inoculação, observou-se que ambas aumentaram significativamente, de $3,4 \times 10^4$ para $6,4 \times 10^5$ no caso das amostras dos tratamentos irrigados, e de $7,9 \times 10^4$ para $5,6 \times 10^5$ no caso das amostras dos tratamentos não irrigados (Figura 2.5).

Figura 2.5 – População média bacteriana baseada no número de unidades formadoras de colônia (UFC) por grama de tecido vegetal, em ramos de plantas cítricas dos tratamentos irrigados e não irrigados que apresentaram resultados positivos para a detecção de *X. fastidiosa* aos 6 e 12 meses após a data de inoculação mecânica realizada em julho/2005, na Fazenda Cambuhy, em Matão, SP

Os resultados das avaliações 6 e 12 meses após a data de inoculação reforçam a tendência observada por Pereira (2000, 2005) em pomares adultos de que o déficit hídrico é prejudicial ao desenvolvimento inicial de infecções de *Xylella fastidiosa*. A bactéria foi detectada em apenas 3,1% das mudas do tratamento não irrigado aos 6 meses da inoculação realizada em julho/2005 (período de estiagem), enquanto que no tratamento irrigado observou-se 14% de infecção, no mesmo período (Tabela 2.5). Transcorridos 12 meses da inoculação e após as mudas terem sido expostas a uma estação chuvosa, a porcentagem de plantas infectadas no tratamento não irrigado aumentou significativamente para 18,7% (Tabela 2.6). Esse valor é próximo aos 23,4% de plantas

infectadas aos 12 meses no tratamento irrigado, indicando que a estação chuvosa possibilitou o desenvolvimento de infecção bacteriana mesmo no tratamento não irrigado, cujas plantas haviam sido expostas a um déficit hídrico. Estes resultados sugerem que o déficit hídrico não impede, porem retarda o estabelecimento de infecção por *X. fastidiosa* em citros.

Outra evidência de que o déficit hídrico retarda a infecção por *X. fastidiosa* foi o menor índice de plantas sintomáticas no tratamento sem irrigação (1,6%) em relação ao irrigado (4,7%), aos 12 meses após a inoculação. Acredita-se que a expressão de sintomas seja uma resposta à infecção por *X. fastidiosa*, influenciada pelo tempo em que essa bactéria leva para acumular-se nos vasos pelo ponto no qual a multiplicação bacteriana teve início (FRY; MILHOLLAND, 1990).

Um outro aspecto que pode ter favorecido os maiores índices de detecção de *Xylella fastidiosa* por isolamento é a época do ano em que as plantas foram avaliadas 12 meses após a data de inoculação – a época de inverno. Pereira (2000) observou uma tendência de maiores populações bacterianas por isolamento nos meses mais frios e secos do ano, justificada pelo fato de que nessa época existe uma maior concentração de substâncias responsáveis pela maturidade da planta e senescência foliar e uma menor concentração de substâncias que promovem o desenvolvimento de tecidos jovens, fatores que, respectivamente, estimulam e inibem a multiplicação de *Xylella fastidiosa* (HOPKINS, 1985).

A fase de progresso lento da CVC entre as estações de Outono e Inverno descrita por Laranjeira (1997) não foi observada nesse experimento, uma vez que a bactéria intensificou sua multiplicação e movimentação para outros vasos do xilema nesse período. Os resultados obtidos nas avaliações realizadas 6 e 12 meses após a data da inoculação tendem a seguir o comportamento observado por Laranjeira et al. (1997) e Oliveira et al. (2003), nos quais foi observado um progresso muito mais rápido do que o previsto para doenças que seguem o modelo de Gompertz, sugerido como sendo aquele que melhor descrevia o progresso da CVC (GOTTWALD et al., 1993).

O fato de que a maioria das plantas infectadas não apresentaram sintomas condiz com a concepção de que os sintomas de doenças bacterianas não são sempre confiáveis para diagnosticar plantas possivelmente infectadas, uma vez que podem variar de acordo com as condições ambientais (RASMUSSEN; REEVES, 1992). Acredita-se que a expressão de sintomas seja uma resposta à infecção por *X. fastidiosa*, influenciada pelo tempo em que essa bactéria leva para

acumular-se nos vasos e pelo ponto no qual a multiplicação bacteriana teve início (FRY; MILHOLLAND, 1990). Então, é possível deduzir que a infecção por *X. fastidiosa* teve início no inverno, sua população aumentou no decorrer da primavera e verão e atingiu uma densidade populacional ainda mais alta no inverno, culminando com a expressão de sintomas nas folhas de alguns ramos inoculados. Observações similares foram feitas por Oliveira et al. (2002) ao deduzirem que, após o início da infecção bacteriana (que em condições normais, começa na primavera com a alimentação das cigarrinhas em novas brotações) é seguida do crescimento populacional no decorrer do tempo culminando com o surgimento de sintomas.

2.3.2 Experimentos em casa-de-vegetação

No total, foram avaliadas 147 mudas no experimento em casa-de-vegetação, sendo 77 referentes ao ensaio utilizando inoculação mecânica e 70 referentes ao ensaio utilizando inoculação por insetos, ambas realizadas na época do outono (final de maio e início de junho de 2005).

2.3.2.1 Efeito do déficit hídrico do solo sobre a infecção primária por *X. fastidiosa* após inoculação mecânica em mudas de laranja doce

Foram avaliadas 35 mudas mantidas em déficit hídrico e 42 mudas mantidas em capacidade de campo quanto à infecção de *X. fastidiosa*, do total de 77 mudas inoculadas mecanicamente nesse experimento. A bactéria foi detectada em 2 mudas sob estresse hídrico e em 8 mudas sob capacidade de campo em diferentes partes amostradas (Tabela 2.7). Realizou-se um teste de hipótese sobre as proporções de plantas infectadas submetidas ao regime de déficit hídrico e capacidade de campo. Com base no resultado obtido, pode-se dizer que há evidência suficiente para garantir que a proporção de plantas infectadas por *X. fastidiosa* submetidas ao regime de capacidade de campo é maior do que a proporção correspondente ao regime de déficit hídrico (Tabela 2.7).

Todas as plantas testemunhas apresentaram resultados negativos para a presença da bactéria pelo método de isolamento primário em meio sólido.

Tabela 2.7 – Porcentagem de detecção de *Xylella fastidiosa* pelo método de cultura em diferentes partes de mudas de laranja doce mantidas sob regimes hídricos distintos em casa-de-vegetação, aos 5 meses após a inoculação mecânica

Regime Hídrico	Proporção de plantas infectadas ⁽¹⁾	Partes amostradas ⁽²⁾			
		H - 2 cm	H - 7 cm	1ª Folha	3ª Folha
Capacidade de Campo	8 / 42 (19 % ^a)	6 (60 %)	2 (20 %)	1 (10 %)	1 (10 %)
Déficit Hídrico	2 / 35 (5,7 % ^b)	1 (10 %)	1 (10 %)	0 (0 %)	0 (0 %)

⁽¹⁾ Número de plantas positivas para a presença de *X. fastidiosa* sobre o número total de plantas avaliadas e o valor percentual correspondente. A proporção seguida pela letra 'a' é maior do que a proporção seguida pela letra 'b', segundo o teste de hipótese unilateral à direita sobre duas proporções, ou seja, pode-se afirmar que $p^a > p^b$ a 5% de probabilidade.

⁽²⁾ Hastes de 1 cm de comprimento retiradas a 2 e 7 cm acima do ponto de inoculação e 1ª e 3ª folhas acima do ponto de inoculação. Os dados representam o número de amostras infectadas e a porcentagem de detecção naquela parte da planta em relação ao total de amostras positivas para *X. fastidiosa*

No caso das mudas mantidas em regime de déficit hídrico, as partes amostradas que apresentaram resultado positivo para a presença da bactéria foram aquelas correspondentes às secções da haste localizadas a 2 e 7 cm acima do ponto de inoculação. Estas partes apresentaram populações bacterianas de $1,2 \times 10^5$ e $5,5 \times 10^5$ UFC / g de tecido, respectivamente, com média de $3,3 \times 10^5$. Um total de 8 mudas em capacidade de campo apresentaram resultado positivo para a presença da bactéria, sendo detectada nas partes amostradas correspondentes à haste (2 e 7 cm), e 1ª e 3ª folha acima do ponto de inoculação. As populações bacterianas na haste, a 2 e 7 cm acima do ponto de inoculação foram, respectivamente, $9,2 \times 10^4$ e $6,5 \times 10^5$. Nas folhas acima do ponto de inoculação as populações bacterianas foram de apenas $2,5 \times 10^4$ (1ª folha) e 1×10^4 (3ª folha) UFC / g de tecido vegetal. A menor população na 3ª folha era esperada, já que foi a parte amostrada mais distante do ponto de inoculação.

Estes resultados, obtidos 5 meses após a inoculação mecânica de *X. fastidiosa* realizada em maio de 2005, indicam taxas de infecção primária mais altas nas plantas mantidas em capacidade de campo do que naquelas mantidas em estresse hídrico. Esses resultados foram consistentes com os obtidos no experimento de campo, em que a infecção pela bactéria foi desfavorecida enquanto a planta esteve sujeita a condições hídricas limitantes (sem irrigação) no

período subsequente à inoculação (Tabela 2.5). A não detecção da bactéria no ponto mais distante da inoculação (3ª folha), no tratamento de déficit hídrico (Tabela 2.7), sugere uma movimentação sistêmica mais lenta de *X. fastidiosa* na planta nestas condições.

Dados semelhantes aos dessa pesquisa foram obtidos por Pereira (2005) após inoculações mecânicas de seedlings de *C. sinensis* sob condições simuladas de verão e inverno em câmara de crescimento. Esta autora observou maior porcentagem de infecção por *X. fastidiosa* em plantas mantidas em capacidade de campo com relação àquelas mantidas em déficit hídrico, após 5 meses da inoculação.

2.3.2.2 Efeito do déficit hídrico do solo sobre a infecção primária por *X. fastidiosa* após inoculação por insetos vetores em mudas de laranja doce

Dez meses após a data de inoculação com os insetos vetores *B. xanthophis* e *D. costalimai*, realizou-se o isolamento de amostras de tecidos da 1ª folha acima do ponto de inoculação, visando à detecção de *X. fastidiosa*. Com relação ao regime de déficit hídrico foram avaliadas 8 mudas submetidas à primeira inoculação por *B. xanthophis*, 8 mudas submetidas à inoculação por *D. costalimai* e 2 mudas submetidas à inoculação novamente por *B. xanthophis*. Com relação ao regime de capacidade de campo foram avaliadas 24 mudas submetidas à primeira inoculação por *B. xanthophis*, 17 mudas submetidas à inoculação por *D. costalimai* e 11 mudas submetidas à inoculação novamente por *B. xanthophis*. O menor número de plantas avaliadas no tratamento de déficit hídrico se deve ao fato de que houve uma mortalidade significativa das plantas nesta condição.

Não foi detectada a presença de *X. fastidiosa* em nenhuma das 18 plantas mantidas em regime de déficit hídrico (Tabela 2.8). Com relação àquelas mantidas em regime de capacidade de campo, foi possível detectar a presença da bactéria em dois pontos de amostragem de 1 planta submetida à 1ª inoculação com *B. xanthophis* (1ª folha acima do ponto de inoculação e haste, 7 cm acima do ponto de inoculação) e em 1 planta inoculada por *D. costalimai* (haste, 2 cm acima do ponto de inoculação), em um total de 52 plantas avaliadas. Esses resultados correspondem a uma taxa média de infecção primária de *X. fastidiosa* de 3,9% em plantas mantidas em capacidade de campo através de inoculação com insetos (Tabela 2.8).

Tabela 2.8 – Detecção de *Xylella fastidiosa* pelo método de cultura após 10 meses de inoculação por vetores em mudas de laranja doce mantidas em regimes hídricos distintos, em casa-de-vegetação

Regime Hídrico	Data da inoculação	Espécie vetora	Nº de plantas inoculadas ⁽¹⁾	Porcentagem de Plantas infectadas
Déficit hídrico	23/05/05	<i>Bucephalogonia xanthophis</i>	8	0 %
	30/05/05	<i>Dilobopterus costalimai</i>	8	0 %
	06/06/05	<i>Bucephalogonia xanthophis</i>	2	0 %
Total			18	0 %
Capacidade de campo	23/05/05	<i>Bucephalogonia xanthophis</i>	24	4,2 %
	30/05/05	<i>Dilobopterus costalimai</i>	17	5,9 %
	06/06/05	<i>Bucephalogonia xanthophis</i>	11	0 %
Total			52	3,9 %

⁽¹⁾ Cada planta foi exposta a 2 adultos de cigarrinhas por um período de acesso à inoculação de 48 horas. Os insetos foram previamente submetidos a um período de acesso à aquisição de 48 h em plantas cítricas infectadas com o isolado CCT6570 de *X. fastidiosa*

A análise de sobrevivência das cigarrinhas durante o período de acesso à inoculação (PAI) de 48 h mostrou que o regime hídrico influenciou distintamente as duas espécies vetoras. No caso de *B. xanthophis*, ocorreu menor mortalidade no tratamento com déficit hídrico (Figura 2.6). Para *D. costalimai*, o tratamento de déficit hídrico acelerou a mortalidade dos insetos. Um estudo realizado por Pereira et al. (2005) mostrou que o déficit hídrico afeta não apenas a sobrevivência, mas também a taxa de alimentação de uma outra espécie de cigarrinha vetora, *Oncometopia facialis* (Signoret). Uma menor sobrevivência e alimentação dos vetores em plantas cítricas sob estresse hídrico podem reduzir a probabilidade de transmissão da bactéria durante ao período mais seco do ano, em condições naturais (PEREIRA et al., 2005).

Figura 2.6 – Porcentagem da sobrevivência das cigarrinhas vetoras *Bucephalogonia xanthophis* e *Dilobopterus costalimai* durante o período de acesso à inoculação (PAI) de 48 h em mudas de laranja doce mantidas sob déficit hídrico ou capacidade de campo, em casa-de-vegetação

Em geral, os resultados desta pesquisa indicam um efeito negativo do déficit hídrico sobre o estabelecimento de infecções de *X. fastidiosa* em plantas cítricas, sendo essa influência ainda mais marcante quando se analisa a transmissão com insetos vetores, que é o que de fato ocorre no campo.

A baixa taxa de transmissão de *X. fastidiosa* por insetos vetores obtida nesse experimento também foi relatada em outros estudos referentes à análise da eficiência de aquisição e transmissão da bactéria por cigarrinhas vetoras em mudas de citros em condições controladas (ALMEIDA, 1999; KRÜGNER et al., 1998; LOPES, 1999; YAMAMOTO et al., 2002). Segundo Almeida et al. (2001), parece provável que a baixa densidade populacional da bactéria em citros restrinja a eficiência de transmissão dos insetos vetores, pelo menos parcialmente, uma vez que diminui a probabilidade da aquisição da bactéria pelas cigarrinhas. Almeida (1999) relata que cigarrinhas vetoras *D. costalimai* comprovadamente infectadas com *X. fastidiosa* não transmitiram a bactéria para nenhuma planta-teste, indicando que a eficiência de inoculação por essa espécie também é baixa. Outro fator possivelmente relacionado à baixa eficiência de aquisição e inoculação da bactéria por cigarrinhas vetoras é o local de alimentação na planta hospedeira (LOPES, 1996).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesse trabalho, tanto em condições naturais quanto em condições controladas, verificou-se uma menor taxa de infecções detectáveis por cultura em plantas mantidas em regime de déficit hídrico, quando as avaliações foram feitas após 6 meses da inoculação. No entanto, pôde-se observar que não houve redução da habilidade de multiplicação de *X. fastidiosa* quando se comparou as médias populacionais bacterianas em plantas submetidas ao regime de déficit hídrico e capacidade de campo, 12 meses após a data de inoculação. Uma possível explicação para este comportamento bacteriano seria a exposição das plantas a condições favoráveis de umidade do solo durante as chuvas de verão no tratamento não irrigado. Além disso, com apenas 6 meses da inoculação, as plantas do tratamento não irrigado talvez ainda não estivessem expostas a períodos suficientemente longos de umidade de solo que permitissem o crescimento de *X. fastidiosa* a níveis detectáveis por cultura. Neste contexto, o estresse hídrico teria reduzido o estabelecimento e a detecção de infecções por *X. fastidiosa* no tratamento não irrigado. Constatou-se que o déficit hídrico, além de retardar o estabelecimento de infecções iniciais de *X. fastidiosa*, também reduziu a probabilidade de transmissão das cigarrinhas vetoras.

4 CONCLUSÕES

- solos em condição de estresse hídrico retardam o estabelecimento de infecções iniciais de *X. fastidiosa* em plantas jovens de laranja doce em condições naturais;
- o regime de déficit hídrico do solo retarda o estabelecimento de infecções iniciais de *X. fastidiosa* em mudas jovens de laranja doce em casa-de-vegetação.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, R.P.P. **Multiplicação e movimentação de *Xylella fastidiosa* em mudas de *Citrus sinensis* e sua eficiência de aquisição e inoculação por vetores**. 1999. 57 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1999.
- 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**, Saint Paul, v. 85, n. 4, p. 382-386, 2001.
- ALVES, E.; KITAJIMA, E.W.; LEITE, B. Interaction of *Xylella fastidiosa* with different cultivars of *Nicotiana tabacum*: a comparison of colonization patterns. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 151, n. 9, p. 500-506, 2003.
- ALVES, E.; MARUCCI, R.C.; LOPES, J.R.S.; LEITE, B. Leaf symptoms on Plum, coffee and citrus and the relationship with the extent of xylem vessels colonized by *Xylella fastidiosa*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 152, n. 5, p. 191-197, 2004.
- AMORIM, L.; BERGAMIN, F.A.; PALAZZO, D.A.; BASSANEZI, R.B.; GODOY, C.V.; TORRES, G.A.M. Clorose variegada dos citros: uma escala diagramática para avaliação da severidade da doença. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 18, n. 2, p. 174-180, 1993.
- ANDERSEN, P.A.; BRODBECK, B.V. Diurnal and temporal changes in the chemical profile of xylem exudates from *Vitis rotundifolia*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 75, n. 1, p. 63-70, 1989.
- ANDERSEN, P.A.; BRODBECK, B.V. Influence of fertilization on xylem fluid chemistry of *Vitis rotundifolia* Noble and *Vitis* Hybrid Suwannee. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 42, n. 3, p. 245-251, 1991.
- ANDERSEN, P.A.; BRODBECK, B.V. MIZELL III, R.F. Metabolism of amino acids and organic acids and sugars extracted from the xylem fluid of 4 host plants by *Homalodisca coagulata*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 50, n. 2, p. 149-159, 1989.
- ANDERSEN, P.A.; BRODBECK, B.V. MIZELL III, R.F. Feeding by the leafhopper, *Homalodisca coagulata*, in relation to xylem fluid chemistry and tension. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 38, n. 8, p. 611-622, 1992.
- ANDERSEN, P.A.; BRODBECK, B.V. MIZELL III, R.F. Diurnal variations in tension, osmolarity, and the composition of nitrogen and carbon assimilates in xylem fluid of *Prunus persica*, *Vitis* Hybrid, and *Pyrus communis*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 120, n. 4, p. 600-606, 1995a.

ANDERSEN, P.A.; BRODBECK, B.V. MIZELL III, R.F. Water stress – and nutrient solution – mediated changes in water relations and amino acids, organic acids, and sugars in xylem fluid of *Prunus salicina* and *Lagerstroemia indica*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 120, n. 1, p. 36-42, 1995b.

ARAUJO, W.L.; MARCON, J.; MACCHERONI, W.JR.; ELSAS, J.D.V.; FUURDE, J.L.V.; AZEVEDO, J.L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 10, p. 4906-4914, 2002.

AYRES, A.J. **Intensidade da clorose variegada dos citros em pomares comerciais de laranja do Estado de São Paulo e sul do triângulo mineiro**. 2000. 59 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2000.

BARBOSA, F.F.L. **Epidemiologia da clorose variegada dos citros no Estado de São Paulo**. 2002. 158 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

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

BERETTA, M.J.G.; HAKAWA, R.; CHAGAS, C.M.; DERRICK, K.S.; BARTHE, G.A.; CECCARDI, T.L.; LEE, R.F.; PARADELA, O.; SUGIMORI, M.; RIBEIRO, I.A. First report of *Xylella fastidiosa* in coffee. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 80, n. 7, p. 821, 1996.

BOYER, J.S. Biochemical and biophysical aspects of water deficits and the predisposition to disease. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 33, p. 251-274, 1995.

BRLANSKY, R.H.; DAVIS, C.L.; TIMMER, L.W.; HOWD, D.S.; CONTRERAS, J. Xylem-limited bacteria in citrus from Argentina with symptoms of citrus variegated chlorosis. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 81, n. 10, p. 1210, 1991. Apresentado no THE AMERICAN PHYTOPATHOLOGICAL SOCIETY ANNUAL MEETING, Albuquerque, 1994.

BRLANSKY, R.H.; DAMSTEEGT, V.D.; HOWD, D.S.; HARTUNG, J.S. Transmission of the causal agent of citrus variegated chlorosis, *Xylella fastidiosa*, with a sharpshooter leafhopper vector from Florida. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 86, n. 11, p. S74, 1996. Suplemento. Apresentado no THE AMERICAN PHYTOPATHOLOGICAL SOCIETY ANNUAL MEETING, Indianapolis, 1996.

BRODBECK, B.V.; MIZELL, R.F.; FRENCH, W.J.; ANDERSEN, P.C.; ALDRICH, J.H. Amino acids as determinates of host preference for the xylem feeding leafhopper, *Homalodisca coagulata* (Homoptera: Cicadelidae). **Oecologia**, Berlin, v. 83, n. 3, p. 338-345, 1990.

CARVALHO, M.A. de; SILVA, V. da; DE MELLO, N.T.C.; AMARO, A.A. Prognóstico agrícola 2005/06: culturas perenes e semi-perenes. **Análises e Indicadores do Agronegócio**, Brasília, v. 1, n.1, 2006. Disponível em:

<<http://www.iaea.sp.gov.br/out/verTexto.php?codTexto=4450>>. Acesso em: 13 set. 2006.

CHAGAS, C.M.; ROSSETTI, V.; BERETTA, M.J.G. Electron microscopy studies of a xylem-limited bacterium in sweet orange affected with citrus variegated chlorosis disease in Brazil.

Journal of Phytopathology, Berlin, v. 134, n. 4, p. 306-312, 1992.

CHANDOK, M.R.; YTTERBERG, A.J.; WIJK, K.J.; KLESSIG, D.F. The pathogen-inducible nitric oxide synthase (iNOS) in plants is a variant of the P protein of the glycine decarboxylase complex. **Cell**, Cambridge, v. 113, n. 4, p. 469-482, 2003.

CHANG, C.J.; GARNIER, M.; ZREIK, L.; ROSSETTI, V.; BOVE, J.M. Culture and serological detection of the xylem-limited bacterium causing citrus variegated chlorosis and its identification as a strain of *Xylella fastidiosa*. **Current Microbiology**, New York, v. 27, n. 3, p. 137-142, 1993.

CHEN, J.; HARTUNG, J.S.; CHANG, C.J.; VIDAVER, A.K. An evolutionary perspective of Pierce's disease of grapevine, citrus Variegated Chlorosis, and Mulberry Leaf Scorch diseases. **Current Microbiology**, New York, v. 45, p. 423-428, 2002.

COLLETA FILHO, H.D.; MACHADO, M. A. Hospedeiros, transmissão e técnicas de diagnóstico da bactéria *Xylella fastidiosa*. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 22, n. 1, p. 121-132, 2001.

COLLETA FILHA, H.D.; MACHADO, M.A. Geographical genetic structure of *Xylella fastidiosa* from citrus in São Paulo State, Brazil. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 93, n. 1, p. 28-34, 2003.

COLLETA FILHO, H.D.; MACHADO, M.A.; TARGON, M.L.P.N. Detecção de *Xylella fastidiosa* da clorose variegada dos citros através de PCR. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 21, p. 343, 1996. Suplemento. Apresentado no CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 29., 1996, Campo Grande.

CVC diminui nas plantas novas. São Paulo: Revista do Fundecitrus, 2002. 15 p.

D'ARCY, C.J.; NAULT, L.R. Insect transmission of plant viruses and mycoplasma-like and rickettsia-like organisms. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 66, n. 2, p. 99-171, 1982.

DAVIS, M.J.; PURCELL, A.H.; THOMPSON, V. Pierce's disease of grapevines: Isolation of the causal bacterium. **Science**, Washington, v. 199, n. 4324, p. 75-77, 1978.

DAVIS, M.J.; FRENCH, W.J.; SCHAAD, N.W. Axenic culture of the bacteria associated with phony disease of peach and plum leaf scald. **Current Microbiology**, New York, v. 6, n. 5, p. 309-314, 1981.

DOW, J.M.; DANIELS, M.J. *Xylella* genomics and bacterial pathogenicity to plants. **Yeast**, Davis, v. 17, n. 4, p. 263-271, 2000.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. Citrus. In: NAKAMAE, I.J. **Agrianual 2005**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2005. p. 257-270.

FREITAG, J.H. Host range of Pierce's disease virus of grapes as determined by insect transmission. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 41, n. 10, p. 920-934, 1951.

FRENCH, W.J.; STASSI, D.L. Response of phony-infected peach trees to gibberellic acid. **HortScience**, Alexandria, v. 13, n. 2, p. 158-159, 1978.

FRY, S.M.; MILHOLLAND, R.D. Multiplication and translocation of *Xylella fastidiosa* in petioles and stems of grapevine resistant, tolerant and susceptible to Pierce's disease. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 80, n. 1, p. 61-65, 1990.

FUNDECITRUS. Descobertos mais seis vetores de CVC. **Revista do Fundecitrus**, Araraquara, v. 14, n. 9, p. 8-9, 1999.

FUNDECITRUS. **Manual de convivência com a CVC**. Araraquara: Fundo de Defesa da Citricultura, 2000, 15 p.

FUNDECITRUS. **Estatísticas da CVC**. Disponível em:
<<http://www.fundecitrus.com.br/escvcbr.htm>>. Acesso em: 21 set. 2006.

GARNIER, M.; CHANG, C.J.; ZREIK, L.; ROSSETI, V.; BOVÉ, J.M. Citrus variegated chlorosis: serological detection of *Xylella fastidiosa*, the bacterium associated with the disease. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 12., 1993, New Delhi. **Programme and abstracts...** Riverside: International Organization of Citrus Virologists, 1993. p. 301-305.

GOMES, M.M.A.; LAGOA, A.M.M.A.; MACHADO, E.C.; MEDINA, C.L. Absciscic acid and indole-3-acetic acid contents in orange trees infected by *Xylella fastidiosa* and submitted to cycles of water stress. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 39, n. 3, p. 263-270, 2003.

GOODWIN, P.H.; DE VAY, J.E.; MEREDITH, C.P. Physiological responses of *Vitis vinifera* cv. Chardonnay to infection by the Pierce's disease bacterium. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 32, p. 17-32, 1988.

GOTTWALD, T.R.; GIDTTI, F.B.; SANTOS, J.M.; CARVALHO, A.C. Preliminary spatial and temporal analysis of citrus variegated chlorosis (CVC) in São Paulo, Brazil. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 12., 1993, New Delhi. **Programme and abstracts...** Riverside: International Organization of Citrus Virologists, 1993, p. 327-335.

GRAVENA, S.; DE NEGRI, J.D.; QUAGGIO, J.A.; GONZALES, M.A.; PINTO, W.B.S.; BASILE, G.B. Sharpshooters and CVC management in citrus orchard. In: DONADIO, L.C.; MOREIRA, C.S. **Citrus Variegated Chlorosis**. Bebedouro: Fundecitrus;Fapesp, 1998. p. 91-113.

HABERMANN, G.; MACHADO, E.C.; RODRIGUES, J.D.; MEDINA, C.L. Gas exchange rates at different vapor pressure deficits and water relations of 'Pêra' sweet orange plants with citrus variegated chlorosis (CVC). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 98, n. 3, p. 233-245, 2003a.

HABERMANN, G.; MACHADO, E.C.; RODRIGUES, J.D.; MEDINA, C.L. CO₂ assimilation, photosynthetic light response curves, and water relations of 'Pêra' sweet orange plants infected with *Xylella fastidiosa*. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v. 15, n. 2, p. 79-87, 2003b.

HANCOCK, J.F. **Plant evolution and the origin of crop species**. Englewood cliffs: Prentice-Hall, 1992. 307 p.

HARTUNG, J.S.; BERETTA, M.J.G.; BRLANSKY, R.H.; SPISSO, J.; LEE, R.F. Citrus variegated chlorosis: Axenic culture, pathogenicity, and serological relationships with other strains of *Xylella fastidiosa*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 84, n. 6, p. 591-597, 1994.

HE, C.X.; LI, W.B.; AYRES, A.J. HARTUNG, J.S.; MIRANDA, V.S.; TEIXEIRA, D.C. Distribution of *Xylella fastidiosa* in citrus rootstocks and transmission of citrus variegated chlorosis between sweet orange plants through natural root grafts. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 84, n. 6, p. 622-626, 2000.

HEWITT, W.B.; FRAZIER, N.W.; FREITAG, J.H. Pierce's disease investigations. **Hilgardia**, Berkeley, v. 19, p. 207-264, 1949.

HILL, B.L.; PURCELL, A.H. Acquisition and retention of *Xylella fastidiosa* by an efficient vector, *Graphocephala atropunctata*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 85, n. 2, p. 209-212, 1995a.

HILL, B.L.; PURCELL, A.H. Multiplication and movement of *Xylella fastidiosa* within grapevine and four other plants. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 85, n. 11, p. 1368-1372, 1995b.

HOPKINS, D.L. Physiological and pathological characteristics of virulent and avirulent strains of the bacterium that causes Pierce's disease of grapevine. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 75, n. 6, p. 713-717, 1985.

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

HOPKINS, D.L. *Xylella fastidiosa*. In: SINGH, U.S.; SINGH, R.P.; KOHMOTO, K. **Pathogenesis and host specificity in plant diseases**: histopathological, biochemical, genetic, and molecular bases. London: Oxford, 1995. v. 1, p. 185-198.

HOPKINS, D.L.; ADLERZ, W.C. Natural hosts of *Xylella fastidiosa* in Florida. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 72, n. 5, p. 429-431, 1988.

HOPKINS, D.L.; PURCELL, A.H. *Xylella fastidiosa*: cause of Pierce's disease of grapevine and other emergent diseases. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 86, n. 10, p. 1056-1066, 2002.

HOPKINS, D.L.; THOMPSON, C.M. Seasonal concentration of the Pierce's disease bacterium in 'Carlos' and 'Welder' muscadine grapes compared with 'Schuyler' bunch grape. **HortScience**, Alexandria, v. 19, n. 3, p. 419-420, 1984.

HOYLE, B.D.; COSTERTON, J.W. Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms. **Progress in Drug Research**, Basel, v. 37, p. 91-105, 1991.

HUANG, G.F.; CHIARADIA, L.A. Clorose variegada dos citros: caracterização e alternativas no manejo da doença. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 11, n. 4, p. 52-55, 1998.

KRÜGNER, R.; LOPES, M.T.V.C.; SANTOS, J.S.; BERETTA, M.J.G.; LOPES, J.R.S. Transmission efficiency of *Xylella fastidiosa* by sharpshooters and identification of two new vector species. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 14., 1998, Campinas. **Programme and abstracts...** Cordeirópolis: IAC, 1998. p. 81.

LACAVA, P.T.; ARAUJO, W.L.; MARCON, J.; MECCHERONI, W.Jr.; AZEVEDO, J.L. Interaction between endophytic bacteria from citrus plants and the phytopathogenic bacteria *Xylella fastidiosa*, causal agent of citrus variegated chlorosis. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 39, n. 1, p. 55-59, 2004.

LARANJEIRA, F.F. **Dinâmica espacial e temporal da Clorose Variegada dos Citros**. 1997. 144 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura "Luis de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1997.

LARANJEIRA, F.F. Dez anos de clorose variegada dos citros: O que sabemos? **Laranja**, Cordeirópolis, v. 18, n. 1, p. 123-141, 1997.

LARANJEIRA, F.F.; POMPEU JUNIOR, J.; HARAKAVA, R. Seleção de variedades de citros tolerantes e/ou resistentes à clorose variegada dos citros. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, p. 304, 1995. Suplemento. Apresentado no CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 28. 1995, Ilhéus.

LARANJEIRA, F.F.; BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. Dinâmica e estrutura de focos da clorose variegada dos citros (CVC). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 1, p. 36-41, 1998.

LARANJEIRA, F.F.; BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L.; BERGER, R. Dinâmica temporal da clorose variegada dos citros em três regiões do Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 5, p. 481-488, 2003a.

LARANJEIRA, F.F.; BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L.; LOPES, J.R.S. Comportamento sazonal da clorose variegada dos citros em três regiões do Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 6, p. 633-641, 2003b.

- LARANJEIRA, F.F.; POMPEU JUNIOR, 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. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 2, p. 147-154, 1998.
- LEE, R.F.; RAJU, B.C.; NYLAND, G.; GOHEEN, A.C. Phytotoxin(s) produced in culture by the Pierce's disease bacterium. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 72, n. 7, p. 886-888, 1982.
- LEE, R.F.; BERETTA, M.J.G.; HARTUNG, J.H.; HOOKER, M.E.; DERRICK, K.S. Citrus variegated chlorosis: confirmation of *Xylella fastidiosa* as the casual agent. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 19, n. 2, p. 123-125, 1993.
- LEITE, B.; ANDERSEN, P.C.; ISHIDA, M.I. Colony aggregation and biofilm formation in xylem chemistry-based media for *Xylella fastidiosa*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 230, n. 2, p. 283-290, 2004.
- LEITE, B.; ISHIDA, M.I.; ANDERSEN, P.C. Effect of hydrophobicity and divalent ions on biofilm formation of *Xylella fastidiosa*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 93, n. 6, p. S50, 2003. Suplemento. Apresentado no THE AMERICAN PHYTOPATHOLOGICAL SOCIETY ANNUAL MEETING, 2003, Charlotte.
- LEITE, B.; ISHIDA, M.I.; ALVES, E.; CARRIER, H.; PASCHOLATI, S.F.; KITAJIMA, E.W. Genomic and X-ray microanalysis indicate that Ca^{2+} and thiols mediate the aggregation and adhesion of *Xylella fastidiosa*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 35, n. 6, p. 645-650, 2002.
- LELLIOTT, R.A.; STEAD, D.E. **Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants**. Boston: Blackwell Scientific, 1987. v. 2, 216 p.
- LEPEREN, W.VAN.; MEETEREN, U.VAN; GELDER, H.VAN. Fluid ionic composition influences hydraulic conductance of xylem conduits. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, n. 345, p. 769-776, 2000.
- LEU, L.S.; SU, C.C. Isolation, cultivation, and pathogenicity of *Xylella fastidiosa*, the casual bacterium of pear leaf scorch disease in Taiwan. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 77, n. 6, p. 642-646, 1993.
- LI, W.B.; PRIA, W.D.; TEIXEIRA, D.C.; MIRANDA, V.S.; AYRES, A.J.; FRANCO, C.F.; COSTA, M.G.; HARTUNG, J.S. Coffee leaf scorch caused by a strain of *Xylella fastidiosa* from citrus. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 85, n. 5, p. 501-505, 2001.
- LI, W.B.; ZHOU, C.H.; PRIA, W.D.; TEIXEIRA, D.C.Jr.; MIRANDA, V.S.; PEREIRA, E.O.; AYRES, A.J. Citrus and coffee strains of *Xylella fastidiosa* induce Pierce's disease in grapevine. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 86, n. 11, p. 1206-12010, 2002.
- LIMA, J.E.O. Como conviver com o amarelinho. **Revista do Fundecitrus**, Araraquara, n. 77, p. 1-12, jul./ago. 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**, Saint Paul, v. 82, n. 1, p. 94-97, 1998.

LOPES, J.R.S. Mecanismos de transmissão de *Xylella fastidiosa* por cigarrinhas. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 17, n. 1, p. 79-92, 1996.

LOPES, J.R.S. Estudos com vetores de *Xylella fastidiosa* e implicações no manejo da clorose variegada dos citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 20, n. 2, p. 329-344, 1999.

MACHADO, E.C.; QUAGGIO, J.A.; LAGO, A.M.M.A.; TICELLI, M.; FURLANI, P.R. Trocas gasosas e relações hídricas em laranjeiras com clorose variegada dos citros. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 6, n. 1, p. 53-57, 1994.

MACHADO, M.A. Citrus variegated chlorosis: research and development. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 18, p. 143-154, 1997.

MACHADO, M.A.; TARGON, M.L.P.N.; BERETTA, M.J.G.; LARANJEIRA, F.F.; CARVALHO, S.A. Detecção de *Xylella fastidiosa* em espécies e variedades de citros sobre-enxertadas em laranja 'pêra' com clorose variegada de citros (CVC). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 1, p. 30-33, 1997.

MARTINS, M.L.; CEOTTO, G.; ALVES, S.G.; BUFON, C.C.B.; SILVA, J.M.; LARANJEIRA, F.F. A cellular automata model for citrus variegated chlorosis. **Physical review**, New York, v. 62, n. 5, p. 7024-7030, 2000.

MCELTRONE, A.J.; SHERALD, J.L.; FORSETH, I.N. Effects of water stress on symptomatology and growth of *Parthenocissus quinquefolia* infected by *Xylella fastidiosa*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 85, n.11, p. 1160-1164, 2001.

MCELTRONE, A.J.; SHERALD, J.L.; FORSETH, I.N. Interactive effects of water stress and xylem-limited bacterial infection on the water relations of a host vine. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 54, n. 381, p. 419-430, 2003.

MCELTRONE, A.J.; FORSETH, I.N. Photosynthetic responses of a temperate Liana do *Xylella fastidiosa* infection and water stress. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 152, n. 1, p. 9-20, 2004.

MINSAVGE, G.V.; THOMPSON, C.M.; HOPKINS, D.L.; LEITE, R.M.V.B.C.; STALL, R.E. Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 84, n. 5, p. 456-461, 1994.

MIZELL, R.F.; FRENCH, W.J. Leafhopper vectors of phony peach disease: feeding site preference and survival on infected and uninfected peach, and seasonal response to selected host plants. **Journal of Entomological Science**, Trifton, v. 22, p. 11-22, 1987.

MOLLENHAUER, H.H.; HOPKINS, D.L. Xylem morphology of Pierce's disease infected grapevines with different levels of tolerance. **Physiology of Plant Pathology**, London, v. 95, p. 95-100, 1976.

MONTEIRO, P.B.; TEIXEIRA, D.C.; PALMA, R.R.; GARNIER, M.; BOVE, J.M.; RENAUDIN, J. Stable transformation of the *Xylella fastidiosa* citrus variegated chlorosis strain with oriC plasmids. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 5, p. 2263-2269, 2001.

NEWMAN, K.L.; ALMEIDA, R.P.; PURCELL, A.H.; LINDOW, S.E. Use of a green fluorescent strain for analysis of *Xylella fastidiosa* colonization of *Vitis vinifera*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 12, p. 7319-7327, 2003.

NUNES, W.M.C. **Epidemiologia da clorose variegada dos citros (CVC) avaliada por sintomas e diagnóstico serológico e molecular de *X. fastidiosa***. 1999. 144 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu. 1999.

OLIVEIRA, A.C.; VALLIM, M.A.; SEMIGHINI, C.P.; ARAUJO, W.L.; GOLDMAN, G.H.; MACHADO, M.A. Quantification of *Xylella fastidiosa* from citrus trees by real-time polymerase chain reaction assay. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 92, n. 10, 2002.

OSIRO, D.; COLNAGO, L.A.; OTOBONI, A.M.M.B.; LEMOS, E.G.M.; SOUZA, A.A.; COLETTA-FILHO, H.D.; MACHADO, M.A. A kinetic model for *Xylella fastidiosa* adhesion, biofilm formation, and virulence. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 236, n. 2, p. 313-318, 2004.

PAIVA, P.E.B.; SILVA, J.L. da; GRAVENA, S.; YAMAMOTO, P.T. Cigarrinhas de xilema em pomares de laranja do Estado de São Paulo. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 17, n. 1, p. 45-54, 1996.

PALAZZO, D.A.; CARVALHO, M.L.V. Desenvolvimento e progresso da clorose variegada dos citros (CVC) em pomares de Colina, SP. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 13, n. 2, p. 489-502, 1992.

PEREIRA, F.E. **Estudo de fatores sazonais relacionados à transmissão de *Xylella fastidiosa* em pomares de citros**. 2000. 82 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

PEREIRA, F.E. **Efeito da estação do ano no sucesso de infecção por *X. fastidiosa* em citros [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]**. 2005. 91 p. Tese (Doutorado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

POMPEU JÚNIOR, J.; LARANJEIRA, F.F.; HARAKAVA, R.; FIGUEREIDO, J.O.; CARVALHO, S.A.; COLETTA FILHO, H.D. Detecção de sintomas de clorose variegada dos citros e *Xylella fastidiosa* em plantas cítricas infectadas em condição de campo. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 19, n. 12, p. 321-330, 1998.

POOLER, M.R.; HARTUNG, J.S. Specific PCR detection and identification of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chlorosis. **Current Microbiology**, New York, v. 31, n. 6, p. 377-381, 1995.

PRADO, S.S. **Eficiência de infecção e multiplicação de estirpes de *Xylella fastidiosa* de citros [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] e de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) em inoculações cruzadas.** 2003. 87 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

PURCELL, A.H. Cold therapy of Pierce's disease of grapevines. **Plant Disease Reporter**, Washington, v. 61, n. 6, p. 514-518, 1977.

PURCELL, A.H. Control of the blue-green sharpshooter *Graphocephala atropunctata* and effects on the spread of Pierce's disease of grapevines. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 72, p. 887-892, 1979.

PURCELL, A.H. Role of weed management in Pierce's disease and almond leaf scorch disease. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 69, n. 9, p. 1043, 1979.

PURCELL, A.H. Environmental therapy for Pierce's disease of grapevines. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 64, n. 4, p. 388-390, 1980.

PURCELL, A.H. Homoptera transmission of xylem-inhabiting bacteria. In: HARRIS, K.F. **Advances in disease vector research**. New York: Springer-Verlag, 1989, p. 243-266.

PURCELL, A.H. *Xylella fastidiosa*, a regional problem or global threat? **Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 79, p. 99-105, 1997.

PURCELL, A.H.; FINLAY, A.H.; McLEAN, D.L. Pierce's disease bacterium: mechanism of transmission by leafhopper vectors. **Science**, Washington, v. 206, n. 4420, p. 839-841, 1979.

PURCELL, A.H.; HOPKINS D.L. Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 34, p. 131-151, 1996.

QIN, X.T.; MIRANDA, V.S.; MACHADO, M.A.; LEMOS, E.G.M.; HARTUNG, J.S. An evaluation of the genetic diversity of *Xylella fastidiosa* isolated from diseased citrus and coffee in São Paulo, Brazil. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 91, n. 6, p. 599-605, 2001.

QUEIROZ-VOLTAN, R.B.; PARADELA FILHO, O. Caracterização de estruturas anatômicas de citros infectados com *X. fastidiosa*. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 20, n. 1, p. 55-76, 1999.

QUEIROZ-VOLTAN, R.B.; PARADELA FILHO, O.; CARELLI, M.L.C.; FAHL, J.I. Aspectos estruturais do cafeeiro infectado com *Xylella fastidiosa*. **Bragantia**, Campinas, v. 57, n. 1, p. 23-33, 1998.

RAJU, B.C.; WELLS, J.M. Diseases caused by fastidious xylem-limited bacteria and strategies for management. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 70, n. 33, p. 182-186, 1986.

RAJU, B.C.; WELLS, J.M.; NYLAND, G.; BRIANSKY, R.H.; LOWE, S.K. Plum leaf scald: isolation, culture, and pathogenicity of the casual agent. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 72, n. 11, p. 1460-1466, 1982.

RAJU, B.C.; GOHEEN, A.C.; FRAZIER, N.W. Occurrence of Pierce's disease bacteria in plants and vectors in California. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 73, n. 24, p. 1309-1313, 1983.

RAMEY, B.E.; KOUTSOUDIS, M.; VON BODMAN, S.B.; FUQUA, C. Biofilm formation in plant-microbe associations. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 7, n. 6, p. 602-609, 2004.

RAVEN, J.A. Phytophages of xylem and phloem: a comparison of animal and plant sap-feeders. **Advances in Ecological Research**, London, v. 13, p. 135-234, 1984.

RASMUSSEN, O.F.; REEVES, J.C. DNA probes for detection of plant pathogenic bacteria. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 52, n. 3, p. 203-220, 1992.

REDAK, R.A.; PURCELL, A.H.; LOPES, J.R.S.; BLUA, M.J.; MIZEL III, R.F.; ANDERSEN, P.C. The biology of xylem fluid-feeding insect vectors of *Xylella fastidiosa* and their relation to disease epidemiology. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 49, p. 243-270, 2004.

RIBEIRO, R.V.; MACHADO, E.C.; OLIVEIRA, R.F. Early photosynthetic responses of sweet orange plants infected with *Xylella fastidiosa*. **Physiological and Molecular Plant pathology**, London, v. 62, n. 3, p. 167-173, 2003.

RIBEIRO, R.V.; MACHADO, E.C.; OLIVEIRA, R.F.; PIMENTEL, C. High temperature effects on the response of photosynthetic to light in sweet orange plants infected with *Xylella fastidiosa*. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v. 15, n. 2, p. 89-97, 2003.

RIBEIRO, R.V.; MACHADO, E.C.; OLIVEIRA, R.F. Growth- and leaf-temperature effects on photosynthesis of sweet orange seedlings infected with *Xylella fastidiosa*. **Plant Pathology**, London, v. 53, n. 3, p. 334-340, 2004.

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. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 4, p. 517-518, 1996.

RODAS, V.Z. Convivência com a clorose variegada dos citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 15, n. 1, p. 129-133, 1994.

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

ROSSETTI, V.; GARNIER, M.; BOVÉ, M.J.; BERETTA, J.M.G.; TEIXEIRA, A.R.R.; QUAGGIO, J.A.; DE NEGRI, J.D. Présence de bactéries dans le xylème d'orangers atteints de chlorose variégée, une nouvelle maladie de agrumes au Brésil. **Comptes Rendus de l'Académie de Sciences**, Paris, v. 310 (Serie III), p. 345-349, 1990.

ROSSETI, V.; GONZALES, M.A.; DONALDO, L.C. Histórico. In: DONADIO, L.C.; MOREIRA, C.S. (Ed.). **Clorose Variegada dos citros**. Bebedouro: FUDECITROS, 1997. cap.1, p.1-21.

SAEED, I.A.M.; MACGUIDWIN, A.E.; ROUSE, D.I.; SHARKEY, T.D. Limitation to photosynthesis in *Pratylenchus penetrans* and *Verticillium dahliae* infected potato. **Crop Science**, Madison, v. 39, n. 5, p. 1340-1346, 1999.

SEMPIONATO, O.R.; GIROTTI, L.F.; STUCHI, E.S. Produção de mudas sadias. In: DONADIO, L.C.; MOREIRA, C.S. **Clorose Variegada dos Citros**. Bebedouro: Fundecitrus, 1997, p. 75-92.

SALVA, R.A.; ROBERTO, R.S.; CARLOS, E.F. Situação da clorose variegada dos citros no Estado de São Paulo. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 16, p. 155-164, 1995.

SHERALD, J.L.; HEARON, S.S.; KOSTKA, S.J.; MORGAN, D.L. Sycamore leaf scorch: culture and pathogenicity of fastidious xylem-limited bacteria from scorch-affected trees. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 67, n. 8, p. 849-852, 1983.

SHERALD, J.L.; KOSTKA, S.J. Bacterial leaf scorch of landscape trees caused by *Xylella fastidiosa*. **Journal of Arboriculture**, Savoy, v. 18, n. 1, p. 57-63, 1992.

SILVA, F.R.; VETTORE, A.L.; KEMPER, E.L.; LEITE, A.; ARRUDA, P. Fastidian gum: the *Xylella fastidiosa* exopolysaccharide possibly involved in bacterial pathogenicity. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 203, n. 2, p. 165-171, 2001.

SIMPSON A.J.G.; REINACH, F.C.; ARRUDA, P.; ABREU, F.A.; ACENCIO, M.; ALVARENGA, R.; ALVES, L.M.C.; ARAYA, J.E.; BAIA, G.S.; BAPTISTA, C.S.; BARROS, M.H.; BONACCORSI, E.D.; BORDIN, S.; BOVÉ, J.M.; BRIONES, M.R.S.; BUENO, M.R.P.; CAMARGO, A.A.; CAMARGO, L.E.A.; CARRARO, D.M.; CARRER, H.; COLAUTO, N.B.; COLOMBO, C.; COSTA, M.; DIAS-NETO, E.; DOCENA, C.; EL-DORRY, H.; FACINCANI, A.P.; FERREIRA, A.J.S.; FERREIRA, V.C.A.; FERRO, J.A.; FRAGA, J.S.; FRANÇA, F.C.; FRANCO, M.C.; FROHME, M.; FURLAN, L.R.; GARNIER, M.; GOLDMAN, G.H.; GOLDMAN, M.H.S.; GOMES, S.L.; GRUBER, A.; HO, P.L.; HOHEISEL, J.D.; JUNQUEIRA, M.L.; KEMPER, E.L.; KITAJIMA, J.P.; KRIEGER, J.E.; KURAMAE, E.E.; LAIGRET, F.; LAMBAIS, M.R.; LEITE, L.C.C.; LEMOS, E.G.M.; LEMOS, M.V.F.; LOPES, S.A.; LOPES, C.R.; MACHADO, J.A.; MACHADO, M.A.; MADEIRA, A.M.B.N.; MADEIRA, H.M.F.; MARINO, C.L.; MARQUES, M.V.; MARTINS, E.A.L.; MARTINS, E.M.F.; MATSUKUMA, A.Y.; MENCK, C.F.M.; MIRACCA, E.C.; MIYAKI, C.Y.; MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; MOON, D.H.; NAGAI, M.A.; NASCIMENTO, A.L.T.O.; NETTO, L.E.S.; NHANI Jr, A.; NOBREGA, F.G.; NUNES, L.R.; OLIVEIRA, M.A.; de OLIVEIRA, M.C.; de OLIVEIRA, R.C.; PALMIERI, D.A.; PARIS, A.; PEIXOTO, B.R.; PEREIRA, G.A.G.; PEREIRA Jr, H.A.; PESQUERO, J.B.; QUAGGIO, R.B.; ROBERTO, P.G.; RODRIGUES, V.; ROSA, A.J. de M.; ROSA Jr, V.E.; de SÁ, R.G.; SANTELLI, R.V.; SAWASAKI, H.E.; da SILVA, A.C.R.; da SILVA, A.M.; da SILVA, F.R.; SILVA Jr, W.A.; da SIQUEIRA, J.F.; SILVESTRI, M.L.Z.; SIQUEIRA, W.J.; de SOUZA, A.A.; de SOUZA, A.P.; TERENCE, M.F.; TRUFFI, D.; TSAI, S.M.; TSUHAKO, M.H.; VALLADA, H.; VAN SLUYS, M.A.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; VETTORE, A.L.; ZAGO, M.A.; ZATS, M.; MEIDANIS, J.; SETUBAL, J.C. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Nature**, London, v. 406, p. 151-157, 2000.

SOUZA, A.A.; TAKITA, M.A.; COLETTA-FILHO, C.C.; YANAI, G.M.; MUTO, N.H.; OLIVEIRA, R.C.; NUNES, L.R.; MACHADO, M.A. Gene expression profile of the plant pathogen *Xylella fastidiosa* during biofilm formation in vitro. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 237, n. 2, p. 341-353, 2004.

SOUZA, A.A.; TAKITA, M.A.; PEREIRA, E.O.; COLETTA-FILHO, H.D.; MACHADO, M.A. Expression of pathogenicity-related genes of *Xylella fastidiosa* in vitro and in planta. **Current Microbiology**, New York, v. 50, n. 4, p. 223-228, 2005.

TUBELIS, A. Clima: fator que afeta a produção e qualidade da Laranja. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 16, n. 2, p. 179-211, 1995.

TUBELIS, A.; BARROS, J.C.; LEITE, R.M.V.B. Difusão da clorose variegada dos citros em pomares comerciais de laranja no Brasil. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 14, n. 1, p. 2 39-254, 1993.

TYREE, M.T.; SPERRY, J.S. Vulnerability of xylem cavitation and embolism. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 40, p. 19-36, 1989.

WELLS, J.M.; RAJU, B.C.; JUNG, H.Y.; WEISBURG, W.G.; MANDELCO-PAUL, L.; BRENNER, D.J. *Xylella fastidiosa*: gram-negative, xylem-limited, fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas*. **Journal of Systematic Bacteriology**, London, v. 37, n. 2, p. 136-143, 1987.

WENDLAND, A. **Diversidade genética de *Xylella fastidiosa* em três regiões produtoras de citros (*Citrus sinensis*) do Estado de São Paulo**. 2000. 74 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”, Piracicaba. 2000.

WICHMAN, R.L.; HOPKINS, D.L. Differentiation of Pathogenic Groups of *Xylella fastidiosa* strains with whole-cell protein profiles. **The American Phytopathological Society**, Saint Paul, v. 86, n. 8, p. 875-879, 2002.

YAMAMOTO, P.T. **Espécies e flutuação populacional de cigarrinhas e psílídeos (Hemiptera) em pomares cítricos**. 1998. 112p. Tese (Doutorado em Entomologia) – Faculdade de Ciência Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 1998.

YAMAMOTO, P.T.; ROBERTO, S.R.; PRIA, W.D.; FELIPPE, M.R.; MIRANDA, V.S. et al. Transmissão de *Xylella fastidiosa* por cigarrinhas *Acrogonia virescens* e *Homalodisca ignorata* (Hemiptera: Cicadellidae) em plantas cítricas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 28, n. 2, 2002.

YOUNCE, C.E.; CHANG, C.J. Detection of xylem-limited bacteria from sharpshooter leafhoppers and their feeding hosts in peach environs monitored by culture isolation and ELISA techniques. **Environmental Entomology**, College Park, v.16, n. 1, p. 68-71, 1987.

ANEXO

ANEXO A – Estruturas localizadas na Fazenda Cambuhy, Município de Matão, Estado de São Paulo, referentes ao experimento em condições naturais. Cada bloco era formado pelos tratamentos irrigados e não irrigados inoculados nas épocas de verão e inverno. O bloco ‘T’ é formado pelas testemunhas dos quatro tratamentos.