

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**DETERMINAÇÃO DA TOLERÂNCIA DA CULTIVAR NAVELINA
ISA 315 À CLOROSE VARIEGADA DOS CITROS**

André Luiz Fadel
Engenheiro Agrônomo

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Fevereiro de 2011

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**DETERMINAÇÃO DA TOLERÂNCIA DA CULTIVAR NAVELINA
ISA 315 À CLOROSE VARIEGADA DOS CITROS**

André Luiz Fadel

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Sanches Stuchi

Co-orientador: Dr. Helvecio Della Coletta Filho

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Fevereiro de 2011

DADOS CURRICULARES

André Luiz Fadel nasceu em Araras estado de São Paulo em 17 de fevereiro de 1984, filho de Irineu Fadel e Clérida de Fátima Bortolucci Fadel. Em 2001 concluiu o curso técnico em Agricultura na Escola Técnica Agrícola “Dr. Carolino da Motta e Silva e a graduação em Engenharia Agrônômica no ano de 2005 na então “Faculdade de Agronomia Manoel Carlos Gonçalves” (UNIPINHAL) em Espírito Santo do Pinhal – SP, foi bolsista de iniciação científica pelo CNPq e desenvolveu trabalhos no Centro de Citricultura Sylvio Moreira – IAC. Trabalhou na Sucocítrico Cutrale Ltda no período de 2006 a 2008, em 2009 ingressou no curso de pós-graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), nível de mestrado na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista – FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal – SP, sob orientação do Prof. Dr. Eduardo Sanches Stuchi, com bolsa concedida pela FAPESP. De 2009 até o momento é colaborador em trabalhos de pesquisa na Estação Experimental de Citricultura de Bebedouro (EECB).

"A ciência se compõe de erros que, por sua vez, são os passos até a verdade."

Júlio Verne

A minha família pelo apoio incondicional, essência de vida e valores.

Irineu, Clérída, Josiane e Giovana

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Eduardo Sanches Stuchi, pelo voto de confiança, convivência, amizade e pelos conhecimentos compartilhados.

Ao meu co-orientador Dr. Helvecio Della Coletta Filho pela atenção, auxílio e sugestões durante o desenvolvimento do trabalho.

A Dr. Juliana Freitas-Astúa pela ajuda durante minha progressão acadêmica.

Aos professores Antonio Baldo Geraldo Martins, José Carlos Barbosa e Dilermando Perecin pela ajuda durante o período de pós-graduação e a Dr^a Simone Rodrigues da Silva pela disponibilidade em participar da banca.

Ao Sr. Otávio Ricardo Sempionato e a todos os funcionários da Estação Experimental de Citricultura de Bebedouro, em especial: Eduardo Toller Reiff, Luiz Gustavo (Guru), Ana, Marlene, Rose, Leandro (Bil), Dimas, Sr. Antônio, Lico e Joãozinho por possibilitarem o desenvolvimento do meu trabalho e pelo apoio em atividades diversas.

Aos colegas Jackson, João Carlos, Maira, Lud do laboratório de tecnologia da UNESP de Jaboticabal e as colegas Carolina Munari, Carolina Rossi e Silvia Oliveira do laboratório de biotecnologia do Centro de Citricultura Sylvio Moreira pelo suporte durante as atividades.

A amiga Maria Tereza Federici pela grande ajuda durante o desenvolvimento do trabalho.

Aos amigos da Republica “Saprófitas” Diego, Rafael e Leandro pela amizade e convivência e a todos os amigos da pós-graduação, em especial Gi, Dri, Fer e Fumiko.

A FAPESP, pelo financiamento do trabalho através da concessão de bolsa de estudo.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	VIII
SUMMARY	IX
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. A doença e agente causal	2
2.2. Sintomas e patogenicidade	3
2.3. Transmissão.....	5
2.4.1. Utilização de mudas sadias	6
2.4.2. Poda e eliminação de plantas sintomáticas	7
2.4.3. Controle químico.....	7
2.5. Suscetibilidade de Citros a <i>X. fastidiosa</i>	8
3. MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1. Plantas em campo	12
3.2. Avaliações	14
3.2.1. Avaliação visual de plantas em campo	14
3.2.2. Presença e quantificação de <i>X. fastidiosa</i> de plantas em campo	15
3.3. Experimentos em casa-de-vegetação	16
3.3.1. Experimento I.....	16
3.3.1.1. Inoculação via suspensão bacteriana	16
3.3.1.2. Determinação da presença de <i>X. fastidiosa</i>	16
3.3.2. Experimento II.....	17
3.3.2.1. Inoculação via encostia de planta infectada	17
3.3.2.2. Avaliações das plantas em casa de vegetação (Experimento II)	19
3.3.2.3. Presença e quantificação de <i>X. fastidiosa</i> das plantas em casa de vegetação (Experimento II)	19
4. RESULTADOS	20
5. DISCUSSÃO	27
6. CONCLUSÃO.....	30
7. REFERÊNCIAS.....	31

DETERMINAÇÃO DA TOLERÂNCIA DA CULTIVAR NAVELINA ISA 315 À CLOROSE VARIEGADA DOS CITROS.

RESUMO - A clorose variegada dos citros causada pela bactéria *Xylella fastidiosa* é uma das doenças bacterianas de maior importância para a citricultura brasileira. Artificialmente o agente causal da CVC pode ser transmitido por enxertia de borbulhas contaminadas, encostia de mudas infectadas e pela própria solução bacteriana através de perfurações do ramo. Já a transmissão natural ocorre por enxertia de raízes entre plantas contaminadas e por cigarrinhas das famílias Cicadellidae e Cercopidae, hoje a forma mais frequente de disseminação da *X. fastidiosa*. Seu manejo está baseado em três medidas: uso de mudas saudáveis, poda e eliminação de plantas sintomáticas, e controle químico do vetor, que muitas vezes podem não ser eficientes. Não há descrito na literatura informações suficientes sobre cultivares de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck.) tolerantes ou promissoras que possam ser utilizadas em estudos relacionados à resistência varietal, porém, estudos prévios tem apontado certa tolerância da cultivar Navelina ISA 315 à CVC. Com bases nestas informações buscou-se neste estudo quantificar o nível de tolerância da Navelina ISA 315 a CVC através da observação visual de sintomas típicos em nível de campo e casa de vegetação, presença e quantificação da *X. fastidiosa* via PCR e PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR). Os resultados obtidos confirmaram as informações preliminares de que a cultivar Navelina ISA 315 apresenta tolerância a CVC, seja pela quase ausência de sintomas e pela baixa população do patógeno observado nesta cultivar. Portanto, até o momento, a cultivar Navelina ISA 315 parece ser uma cultivar de laranja doce com tolerância satisfatória a clorose variegada dos citros.

Palavras chaves: *Citrus sinensis*, sintomas, suscetibilidade, *Xylella fastidiosa*

TOLERANCE DETERMINATION OF NAVELINA ISA 315 CULTIVAR TO CITRUS VARIEGATED CHLOROSIS.

SUMMARY - Citrus variegated chlorosis (CVC) caused by the bacterium *Xylella fastidiosa*, is a bacterial disease of great importance to the Brazilian citrus industry. Causal agents for CVC can be artificially transmitted through contaminated bud grafting, approach grafting with infected nursery trees, and by injecting a bacterial solution into perforations on the branch. Natural transmission of the disease occurs with grafts from roots between infected plants and by leafhoppers of the families, Cicadellidae and Cercopidae, today the most common form of *X. fastidiosa* dissemination. CVC management is based on three measures: the use of healthy nursery trees, pruning and removing symptomatic plants, and chemical control of the vector, which can often be inefficient. There is little information about tolerant, or likewise promising, varieties of sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) that could be used in studies related to host resistance. However, previous studies have indicated some tolerance to CVC in the Navelina ISA 315 cultivar. Based on such information, this study has sought to quantify the tolerance level that Navelina ISA 315 has to CVC through visual observation of typical symptoms in the field, in conjunction with the presence and quantification of *X. fastidiosa* by PCR and quantitative real time PCR (RT-qPCR). The results confirmed preliminary information that Navelina ISA 315 is tolerant to CVC, based on its near absence of symptoms and the low population of pathogen observed in this cultivar.

Key words: *Citrus sinensis*, symptoms, susceptibility, *Xylella fastidiosa*

1. INTRODUÇÃO

As plantas cítricas em geral são originárias do sudeste do continente asiático, sendo que as laranjas doces possivelmente tenham surgido de um híbrido entre toranja e tangerina (DONADIO; MOURÃO FILHO; MOREIRA, 2005).

Atualmente, as frutas cítricas são as mais produzidas em todo o mundo com mais de 122 milhões de toneladas anuais, sendo o Brasil responsável por cerca de 17% dessa produção. Das frutas cítricas no Brasil, as laranjas doces ocupam 88,5% de toda a produção no país (FAO, 2010). Porém essa produção vem sendo altamente prejudicada por problemas fitossanitários, que ocasiona perdas consideráveis para toda a cadeia citrícola.

Dentre esses problemas a clorose variegada dos citros (CVC), é umas das doenças bacterianas de maior importância para a citricultura brasileira, causada pela bactéria *Xylella fastidiosa subesp. pauca* (WELLS et al., 1987; SCHAAD et al., 2004) e transmitida preferencialmente por cigarrinhas das famílias Cicadellidae e Cercopidae (YAMAMOTO et al., 2002a). Foi descrita pela primeira vez em 1987 nas regiões Norte e Noroeste do Estado de São Paulo (ROSSETI; DE NEGRI, 1990), que atualmente vem sendo responsável por prejuízos de mais de 120 milhões de dólares anuais (BOVÉ; AYRES, 2007).

Apesar dos métodos de manejo recomendados até o momento, como o uso de mudas sadias, poda, eliminação de plantas sintomáticas e controle químico do vetor (FUNDECITRUS, 2009) não são suficientes para conter o avanço da doença, a resistência ou tolerância varietal ainda é pouco utilizada. Apesar da pouca informação a respeito de cultivares resistentes ou com níveis satisfatórios de tolerância a CVC, algumas cultivares como a Navelina ISA 315, Navelina SRA 332 e Newhall Navel SRA 343 mostraram-se hospedeiras assintomáticas de *X. fastidiosa* (SOUZA et al., 2006). STUCHI et al. (2007), em continuidade ao estudo anterior, relataram que apenas a Navelina ISA 315 permaneceu assintomática.

Através dessas constatações, buscou-se nesse estudo quantificar a tolerância da cultivar Navelina ISA 315, através de avaliações visuais da presença de sintomas de CVC em plantas de campo e em casa de vegetação, bem como a presença e quantificação da bactéria *X. fastidiosa*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A doença e agente causal

A clorose variegada dos citros (CVC), causada pela bactéria *Xylella fastidiosa* foi observada pela primeira vez em 1987 no triângulo mineiro, Estado de Minas Gerais, e nas regiões Norte e Noroeste do Estado de São Paulo, onde um levantamento na época mostrou que cerca de quarenta e sete cidades do estado tinha a ocorrência da CVC (ROSSETI; DE NEGRI, 1990). Sua presença também foi confirmada nos estados de Rio Grande do Sul, Paraná, Distrito Federal, Goiás, Rio de Janeiro (TUBELIS; BARROS; CAMPOS LEITE, 1993), Sergipe (LARANJEIRA et al., 1996), Santa Catarina (LEITE JÚNIOR; HUANG; BUENO, 1997) e Bahia (SANTOS FILHO et al., 1999).

No ano de 2005 cerca de 43% das laranjeiras doces se encontravam afetadas pela CVC em todas as regiões citrícolas do Brasil, ocasionando um prejuízo de mais de 120 milhões de dólares anuais. Foi também relatada na Argentina, onde é denominada 'Pecosita', no Uruguai e mais recentemente na Costa Rica (BOVÉ; AYRES, 2007).

A princípio, considerou-se três hipóteses para o agente causal da doença; desequilíbrios nutricionais, vírus ou viróides, micoplasmas e a ocorrência de bactéria semelhante as do gênero *Xylella* associada à doença (LEE et al., 1993; ROSSETI; DE NEGRI, 1990). CHANG et al. (1993) relataram a conclusão dos postulados de Koch, confirmando a bactéria *Xylella fastidiosa* como agente causal da doença, que mais tarde foi confirmado por LEE et al. (1993). Além da CVC, *X. fastidiosa* causa doenças em outras culturas de importância econômica como videira, ameixeira, pessegueiro, pereira (CARLOS; RODRIGUES NETO; BERETTA, 1997) e também em cafeeiro (PARADELLA FILHO et al., 1995).

A bactéria *X. fastidiosa* é uma bactéria gram negativa, aeróbica, restrita ao xilema de plantas (LARANJEIRA et al., 2005), podendo ser observada em espaços intercelulares do xilema tendendo a se acumular em partes específicas, variando em função do hospedeiro e do tipo de sintoma expresso (PURCELL; HOPKINS, 1996). SCHAAD et al. (2004) propôs a classificação da bactéria dividida em três subespécies: *piercei*, *multiplex* e *pauca*, sendo *X. fastidiosa* subsp. *pauca* a responsável pela CVC.

2.2. Sintomas e patogenicidade

Os sintomas da CVC são descritos como: clorose nas folhas da parte mediana e superior da planta, se estendendo por toda a planta, folhas com sintomas de deficiências nutricionais (zinco e boro) e carência de potássio (frutos pequenos), manchas cloróticas na face ventral da folha que, em folhas mais velhas, correspondem a círculos de goma em tom palha na face dorsal, além de frutos com tendência em frutificação em pencas, pequenos, enrijecidos e impróprios para o comércio, (ROSSETI; DE NEGRI, 1990).

Plantas em estágio avançado da doença apresentam debilidade geral com característica coloração amarelada, associada a enfezamento, desfolha, morte de ramos (LARANJEIRA et al., 2005), com evidente redução na taxa de transpiração e fotossíntese nas folhas decorrente de alterações fisiológicas (MACHADO et al., 1994). Um estudo feito por PALAZZO & CARVALHO, (1992) relata que os sintomas da doença em folhas tendem a aumentar nos meses da primavera atingindo o ponto máximo no mês de março e posterior diminuição gradual, tendo os índices menores em junho e julho.

De acordo com LARANJEIRA et al. (1998), em talhões as plantas infectadas inicialmente aparecem de forma isolada, com o aumento do número dessas plantas ocorre a formação de pequenas reboleiras, que à medida que aumentam tendem a se coalescer formando reboleiras de proporções maiores.

De forma geral o principal fator para disseminação da doença são talhões vizinhos e mudas contaminadas, não havendo influência significativa de vento, plantas daninhas ou tratos culturais (LARANJEIRA et al., 1998). LARANJEIRA et al. (2004) relata que de forma geral não há diferenças no arranjo espacial de plantas afetadas por CVC em três pomares estudados nas regiões Noroeste, Central e Sul do estado de São Paulo, sendo o patossistema semelhante nestas três regiões independente da população de vetores

Segundo MACHADO et al. (2006), plantas de laranjeiras 'Natal' (*Citrus sinensis* L. Osbeck.) com CVC apresentaram queda na assimilação de CO₂, condutância estomática e transpiração, bem como do fluxo de seiva, os sintomas descritos estão diretamente relacionados com estresse hídrico, que é o mecanismo de patogenicidade mais aceito, resultante da obstrução do xilema por agregados bacterianos, gomas e tiloses, segundo discutido por PURCELL & HOPKINS (1996). De acordo com MACHADO et al. (2007), o uso de irrigação pode atenuar o efeito do estresse hídrico, porém não impede o desenvolvimento da doença.

Em laranjeiras doces, no início da infecção é possível encontrar células de *X. fastidiosa* aderidas à parede do xilema, seguido pelo aumento no número das mesmas e obstrução do xilema, podendo ser observado também a presença de estruturas cristalizadas derivadas de cálcio em forma de agulhas que contribuem para a obstrução do vaso (ALVES et al., 2009).

A formação de biofilme em *X. fastidiosa* é definida por agregados de populações matrizes que se aderem uma a outra e no caso na superfície do xilema (COSTERTON et al., 1995), as células que compõe o biofilme apresentam maior resistência, a biocidas, antibióticos, resposta de defesa do hospedeiro (SOUZA et al., 2004), nestas células é possível identificar genes de patogenicidade ligados a adesão, importante na fase de formação do biofilme e outros de adaptação, que são responsáveis pela manutenção da bactéria na planta de acordo com o ambiente (SOUZA et al., 2005).

A composição química do xilema pode influenciar diretamente a formação de biofilme, esse fato explicaria à maior incidência da Doença de Pierce em videiras próximas a pomares de citros na Califórnia, onde as plantas cítricas não manifestam

sintomas, porém são hospedeiras da estirpe de *X. fastidiosa* causadora da Doença de Pierce em videira (BI et al., 2007). Segundo o autor, a diferença na composição química do xilema pode estar relacionada com a maior tolerância das plantas de citros a essa estirpe.

A estirpe da atrofia dos ramos do cafeeiro (ARC), não colonizou plantas de citros em um estudo realizado por PRADO et al. (2008), já a estirpe responsável pela CVC, apresentou menor desenvolvimento em plantas de café. Os resultados deste estudo sugerem que plantas de café não são fontes de inóculo eficientes para citros. De acordo com COLETTA FILHO & MACHADO (2002, 2003), embora exista uma significativa diversidade genética entre estirpes de *X. fastidiosa*, não houve qualquer influencia significativa do hospedeiro (variedades de laranja doce) influenciando esta diversidade, ou seja todas as variedades estariam sujeitas as inoculações (ou infecção ou colonização pelas diferentes estirpes. De acordo com esses autores houveram variabilidades significativas entre regiões de cultivo do hospedeiro, dentro das plantas, podendo ser esta ultima resultante de inoculações naturais múltiplas pela ação de vetores de diferentes fontes de inóculo.

2.3. Transmissão

A CVC pode ser transmitida por enxertia de borbulhas contaminadas, por encostia de mudas infectadas (NUNES et al., 2004), enxertia de raízes entre plantas contaminadas (HE et al., 2000), em condições de laboratório utilizando inoculação via suspensão bacteriana (LOPES et al., 2005) e por cigarrinhas das famílias Cicadellidae e Cercopidae (YAMAMOTO et al., 2002a) cuja forma de multiplicação no vetor é do tipo persistente e não circulativa.

Em citros existem diversas espécies transmissoras de *X. fastidiosa*, doze no total: *Oncometopia facialis*, *Dilobopterus costalimai*, *Acrogonia citrina*, *Bucephalagonia xanthophis*, *Plesiomata corniculata*, *Macugonalia leucomelas*, *Parathona gratiosa*, *Ferrariana trivittata*, *Homalodisca ignorata*, *Sonesimia grossa*, *Acrogonia virescens* e

Fingeriana dubia (FUNDECITRUS, 2009; YAMAMOTO, 2007), porém a eficiência na transmissão pode variar entre essas espécies, não ultrapassando a 20%, sendo que *Macugonalia leucomelas* é a mais eficiente (17,3%) (FUNDECITRUS, 2009), este índice pode variar entre espécies em função de mecanismos fisiológicos e comportamentais (LOPES, 1996).

Um estudo realizado por MIRANDA et al. (2008) mostra que *B. xanthophis* tem preferência em alimentar-se em ramos jovens de mudas cítricas, sendo ambos os sexos ativamente semelhantes em relação a alimentação, que é maior durante o dia. De acordo com LOPES (1996), cigarrinhas das famílias Cicadellidae podem adquirir a bactéria em torno de 1 hora de alimentação sendo imediatamente eficientes na transmissão para plantas saudáveis, porém essa eficiência pode ser melhor em períodos mais longos de aquisição.

É difícil estabelecer um período latente entre a aquisição e a inoculação da bactéria, os adultos podem ser eficientes na transmissão por mais de 60 dias, ou em alguns casos até o final de sua vida porque além dos vasos do xilema a bactéria consegue sobreviver no aparelho bucal das cigarrinhas, porém as ninfas que também podem transmitir a bactéria perdem a eficiência após a ecdise, não sendo observada a transmissão transovariana (GRAVENA et al., 1997; LOPES, 1996).

2.4. Manejo

O manejo da CVC está baseado em três medidas de extrema importância a serem tomadas em conjunto.

2.4.1. Utilização de mudas saudáveis

A muda cítrica infectada é o meio mais rápido e eficiente na disseminação da CVC, portanto é de extrema importância a aquisição de mudas provenientes de viveiros em ambiente protegido no estado de São Paulo (FUNDECITRUS 2009),

regulamentados pelas portarias CDA 5 em 03/02/2005 e CDA 23 em 14/06/2005 (COORDENADORIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2011) e pela Lei federal 10.171 em 05/08/2003 (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2011).

Vale ressaltar que o advento da CVC teve grande importância na revisão das normas para a produção de mudas de citros certificadas em 1998, como principais mudanças: a indexação para CVC e declínio dos citros bem como a obrigatoriedade da manutenção das matrizes sob telado e a introdução do registro da borbulheira (CARVALHO; GRAF; VIOLANTE, 2005).

2.4.2. Poda e eliminação de plantas sintomáticas

Existem diversas recomendações em relação à poda, no geral o que se observa é que parece ser mais apropriada em pomares com baixa incidência da doença, como prática de eliminar tecidos contaminados reduzindo o seu progresso (CARLOS et al., 1997).

A poda deve ser realizada a no mínimo 70 cm abaixo da última folha sintomática, porém somente em plantas acima de quatro anos, para plantas com idade inferior, recomenda-se a erradicação (FUNDECITRUS, 2009).

Segundo COLETTA FILHO et al. (2000), foi confirmada a presença de *X. fastidiosa* mesmo no tronco de plantas de até seis anos de idade com grau de sintoma II (dois ramos apresentando sintomas leves em diversas folhas). E ainda segundo os autores houve incidência de folhas positivas assintomáticas para *X. fastidiosa*, isso mostra que o uso da poda apresenta maior sucesso quando realizada em plantas com poucos sintomas da doença.

2.4.3. Controle químico

O manejo da CVC utilizando produtos químicos se refere quase que exclusivamente ao uso de inseticidas visando o controle das cigarrinhas vetoras. Os inseticidas aplicados via pulverização apresentam melhor efeito inicial de controle quando comparados aos aplicados via solo e via tronco, porém com menor efeito residual e seletividade ecológica (YAMAMOTO et al., 2002b).

Inseticidas sistêmicos, principalmente aqueles aplicados via tronco podem apresentar porcentagem de eficiência superior a 80% mesmo após 100 dias da aplicação, sendo o desempenho desses inseticidas melhor quando utilizados em época de umidade no solo e preferencialmente em plantas jovens (YAMAMOTO; ROBERTO; PRIA JUNIOR, 2000). A aplicação de alguns produtos em plantas ainda em viveiros via “drench” também é uma boa opção, pois possibilita um razoável período de proteção pós plantio (COELHO et al., 2005).

2.5. Suscetibilidade de Citros a *X. fastidiosa*

Em relação à suscetibilidade, com maior ou menor grau, todas as variedades de laranja doce testadas até o momento mostraram-se suscetíveis à CVC. Por outro lado, plantas de outros gêneros relacionados à *Citrus* como *Fortunella* e *Poncirus* não apresentam sintomas e nem foi constatada a presença da bactéria em condições naturais (LARANJEIRA et al., 2005).

LI et al. (2000) relataram que as tangerinas ‘Cravo’ e ‘Oneco’ não apresentaram sintomas de CVC, porém foram positivas para a presença de *X. fastidiosa* em teste Elisa e de PCR. Já as cultivares: ‘Dancy’, ‘Okitsu’ e ‘Ponkan’ permaneceram assintomáticas e foram negativas para a presença da bactéria.

A maioria das cultivares de outras espécies que não seja *Citrus sinensis*, como as cultivares de tangerinas: Ponkan, Cravo, Mexerica do Rio, África do Sul, Batangas, Clementina Caçula, Creola, Ellendale, Empress, Kara, Ladu x Szinkon, Oneco, Satsuma, Shekawasha Tizon, Solid Scarlet, Sul da África, Surino, Szibar, Szinkon x Batangas, Szuwinkon e Warnuco; Tangores: Murcott e Fallglo; Tangelos: Fairchild,

Fremont, Robinson, Sampson, Sunburst, Osceola e 2560; Limas doces e ácidas: Dourada e Tahiti; Limões: Eureka Km 47, Feminelo de Siracusa, Lisboa tetraplóide e Monachelo; Pomelos e Toranjas: Marsh Seedless, Star Ruby e Vermelha, não apresentam sintomas e nem foi constatada a presença da bactéria em condições naturais de transmissão (LARANJEIRA et al., 2005; LARANJEIRA; POMPEU JUNIOR, 2002; LARANJEIRA et al., 1998).

Entre as cultivares de laranja doce foram relatadas diferenças em relação ao grau de expressão de sintomas, sendo as cultivares Valência, Pera, Barão as mais suscetíveis (MACHADO et al., 1992), já Rubi, Westin e Ovale apresentam menos sintomas foliares (LARANJEIRA et al., 2005), podendo haver diferenças na expressão de sintomas dentre clones de laranjeira Natal (LI et al., 1998).

Um trabalho envolvendo 15 cultivares de laranja doce em relação à CVC, relacionando as variáveis citadas acima propôs a seguinte classificação de cultivares: altamente suscetíveis: Barão, Pera, Lima, Rubi, Canederas 17 e 51, Berna e Valência; suscetíveis: Gardner, Pineapple, Sunstar, Folha Murcha e Baianinha; moderadamente suscetíveis: Lue Gim Gong e Westin (LARANJEIRA; POMPEU JUNIOR, 2002).

SOUZA; DONADIO & GONZÁLES JAIMEZ (2000) em um estudo envolvendo 34 cultivares de laranja doce, verificaram que de três avaliações as cultivares Maçã, Belladonna, Prata de Ponte, Biondo di Caccia, Berna IVIA, Castellana IVIA e Torregrossa IVIA, apresentaram sintomas apenas em uma delas, e que foram negativas para a presença da bactéria em testes de PCR e ELISA.

De todas as cultivares de laranja doce presentes no banco ativo de germoplasma do Centro APTA Citros Sylvio Moreira, 20 permaneceram assintomáticas para CVC durante quatro anos de avaliações, após receberem inoculações artificiais e em condições naturais de infecção (YAMAMOTO et al., 2004).

NUNES et al. (2006) mostraram que a laranjeira doce 'Folha Murcha' apresentou resultado positivo para PCR mas não expressou sintomas na mesma velocidade que o padrão 'Pera'. FRANCO et al. (2008) também relataram um menor índice de sintomas foliares naquela cultivar quando comparada a outras cinco. Uma possível explicação para estas observações, segundo os autores, seria o maior tempo requerido pela

bactéria para colonizar os vasos de xilema da Folha Murcha. De acordo com PAVAN et al. (2007), um híbrido somático de laranjeira Hamlin + tangerineira 'Montenegrina' apresentou menor taxa de infecção em relação a cultivar Hamlin.

SILVA et al. (2004) relatam que cultivares como Clementina de Nules VCR, Clementina Caffin SRA e o Tangelo Mapo SRA 450, não apresentaram sintomas visuais e foram negativas em testes moleculares em relação a presença de *X. fastidiosa*, dentre outros cultivares positivos porém assintomáticos.

Em relação à influência de porta enxerto a suscetibilidade da copa a CVC, há certa controvérsia entre trabalhos disponíveis. STUCHI et al. (2004) afirmam que plantas de laranjeira Pera enxertadas em um Citrangor [citrange (*Poncirus trifoliata* Raf. x *C. sinensis*) x *C. sinensis*], e 'Sunki' apresentaram as menores incidências de sintomas de CVC dentre 16 porta enxertos, um Citrandarim [*C. sunki* hort. Ex Tanaka) x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. cv. English] também se destacou por não apresentar em duas avaliações plantas com grau máximo de severidade da doença.

A laranjeira Valência apresentou menor incidência de CVC quando enxertada em tangerineira Cleópatra, citrumeleiro Swingle e laranjeira Valência Americana comparados com outros quatro porta enxertos (STUCHI; DONADIO; SEMPIONATO, 2002).

Já para LARANJEIRA et al. (2001), não houve influência de quatro porta enxertos avaliados (tangerineira Cleópatra e Sunki, limoeiro Cravo e citrumeleiro Swingle) em diversas copas de laranja doce, para incidência de CVC em plantas, nem na concentração da bactéria.

Para SOUZA et al. (2006), Navelina ISA 315, Navelina SRA 332 e Newhall Navel SRA 343 apresentaram-se como hospedeiras assintomáticas de *X fastidiosa*. STUCHI et al. (2007), em continuidade ao estudo anterior, relataram que apenas a Navelina ISA 315 permaneceu sem sintomas após sete anos no campo mesmo em condições de alta pressão de inoculo ou após receber inoculações artificiais via subenxertia com plantas sintomáticas.

A Navelina ISA 315 (*Citrus sinensis* L. Osbeck.) teve origem na Itália em 1976 de um clone recuperado *in vitro* por cultivo de óvulos não desenvolvidos, sendo introduzida

no Brasil e estabelecida em campo no ano de 2000 para início de estudos de resistência a CVC. Foi constatada nesta variedade por indexação biológica a presença do viróide HSVd (*Hop stunt viroid*), causador de cachexia-xiloporose (STUCHI et al., 2007). Posteriormente, provou-se, por meios bioquímicos, que a variedade, além de HSVd, portava também CDVd (*Citrus dwarfing viroid*) (¹Eiras) . Ambas as Infecções que podem ser atribuída à coleta de borbulhas da variedade em experimento de anançamento por inoculação de viróides em andamento na Itália à época da introdução, uma vez que DAVINO et al. (2005) relataram resultados de experimento com a cultivar em que havia a combinação de viroides encontradas nos tratamentos.

Uma das possibilidades, seria a interação entre os viróides e *X. fastidiosa*, já que SOLEL et al. (1995) relataram que a presença de viróides em plantas cítricas reduz a infecção de *Phoma tracheiphila*. Árvores inoculadas com estirpes fracas e severas de exocorte mostraram-se mais tolerantes a *Phytophthora spp.* (ROSSETI et al., 1984) e recentemente o mesmo efeito foi demonstrado em plantas inoculadas com viróides (SEMANCIK et al., 2005).

Com base nestas constatações buscou-se neste estudo quantificar o nível de tolerância da cultivar Navelina ISA 315 em relação à CVC, por observação visual de sintomas típicos, presença e quantificação da bactéria.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado na Estação Experimental de Citricultura de Bebedouro, (EECB) em Bebedouro – SP. As condições edafo climáticas deste local (latitude 20°53'16" S, longitude 48°28'11" W) podem assim ser definidas: precipitação média anual é de 1550 mm e as temperaturas médias variam de 16,8°C a 30,6°C, o solo predominante é o Latossolo Vermelho Distrófico típico, textura média, A moderado hipoférrico (ANDRIOLI; CENTURION; MARQUES JUNIOR, 1994), clima Cwa: subtropical-inverno moderado e seco, verão quente e chuvoso), SP, Brasil.

¹ EIRAS, M. (Instituto Biológico - São Paulo, SP). Comunicação pessoal, 2010.

3.1. Plantas em campo

Em novembro de 2006, oito plantas de laranja doce da cultivar Pera (*Citrus sinensis* Osbeck) enxertadas em limoeiro Cravo (*Citrus limonia* Osbeck) com sintomas típicos de CVC em grau 3 (plantas com mais de 50% da copa com sintomas) de acordo com o proposto por COLLETA FILHO; CARLOS & MACHADO (1997); SALVA; ROBERTO & CARLOS, (1995) existentes em um talhão experimental com espaçamento de 7 m x 3 m, sem uso de irrigação, foram submetidas à poda drástica. Os ramos remanescentes receberam tratamento com caulim para prevenir danos pelo sol.

Em março de 2007, quando as brotações das larenjeiras Pera encontravam-se com diâmetro ideal, realizou-se a enxertia em “T” invertido utilizando borbulhas de plantas assintomáticas da cultivar Navelina ISA 315 (Figura 1), oriundas das três plantas originais estabelecidas em campo no ano de 2000. Essas plantas, apesar de expostas a condições naturais de infecção há sete anos, não apresentaram sintomas de CVC, porém foram positivas para presença de *X. fastidiosa* via PCR (STUCHI et al., 2007).

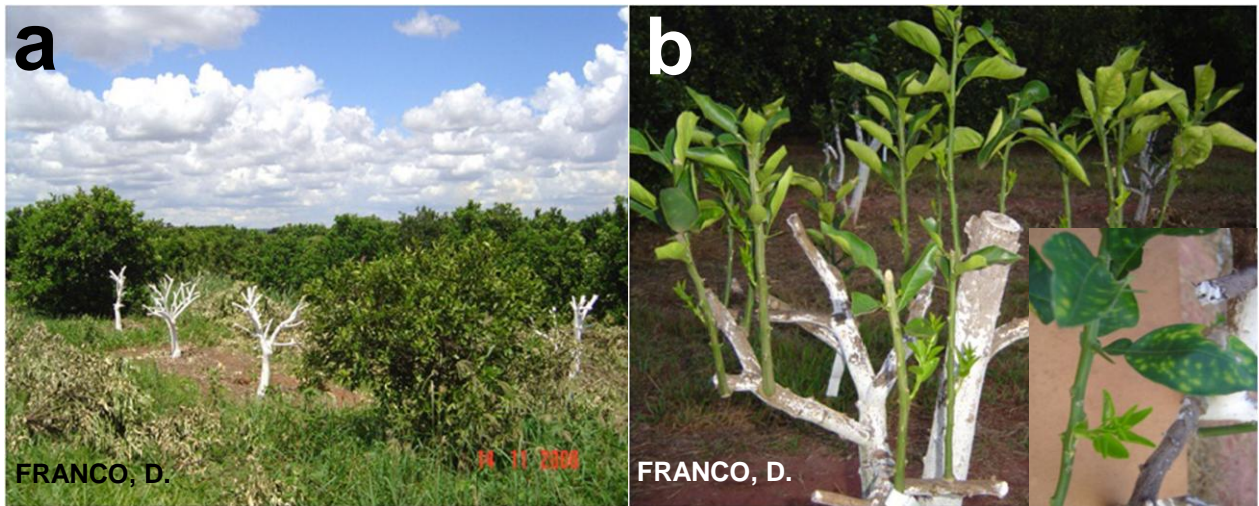


Figura 1 – Vista parcial das plantas após a poda de topo (a), ramos após a enxertia da cultivar Navelina ISA 315 sobre a antiga copa da cultivar Pera (b) e detalhe da borbulha em ramo da cultivar Pera com sintomas de CVC (b)

Em dezembro de 2008, 21 meses após a enxertia, já se havia formado uma nova copa da variedade Navelina ISA 315. Portanto essas plantas ficaram com a seguinte composição: limoeiro Cravo como porta enxerto, laranjeira Pera como interenxerto e laranjeira Navelina ISA 315 como copa. Cada ramo remanescente (antiga copa da laranjeira Pera) foi identificado com etiquetas, com respectivo número de planta e ramo sobrenxertado. Os números de ramos sobreenxertados por planta variou: planta nº 1, 9 ramos, planta nº 2, 15 ramos, planta nº 3, 7 ramos, planta nº 4, 13 ramos, planta nº 5, 10 ramos, planta nº 6, 12 ramos, planta nº 7, 20 ramos e planta nº 8, 11 ramos.

O manejo e tratos culturais foram usuais, de acordo com o recomendado por MATTOS JUNIOR; POMPEU JUNIOR & FIGUEIREDO, (1998), somente sem aplicação de inseticidas, visando à manutenção da população de cigarrinhas e consequente inoculação natural de *X. fastidiosa*.

3.2. Avaliações

As avaliações foram realizadas no Verão (janeiro) e Inverno (agosto) de 2009 e no Outono (abril) e primavera (novembro) de 2010.

3.2.1. Avaliação visual de plantas em campo

Todas as folhas de cada ramo da cultivar Navelina ISA 315 que se originou dos ramos sobrenxertados foram avaliadas visualmente para presença de sintomas da CVC, assim como sua severidade com base na escala diagramática desenvolvida por AMORIM et al. (1993).

Folhas com a mesma porcentagem de área lesionada, independente da planta, foram coletadas e compuseram um grupo (amostra) para fins de padronização e quantificação da bactéria. Nos ramos que apresentaram folhas com diferentes graus de severidade, coletaram-se apenas as folhas com maior severidade e foi considerada sua nota como representativa para o grupo. As folhas sem sintomas também foram avaliadas e compuseram um grupo, então classificado como grau zero, na escala diagramática proposta por AMORIM et al. (1993).

Quando constatada a ausência de sintomas nas folhas de toda a planta (nota zero na escala diagramática), optou-se por agrupar cada planta em uma amostra composta, neste caso cada amostra foi composta de acordo com o número de ramos sobrenxertados, coletando-se uma folha para cada ramo.

Em novembro de 2010, também foi realizada uma avaliação visual nas três plantas originais introduzidas no ano de 2000 com base no mesmo critério adotado para as demais plantas experimentais. Uma amostra composta de 20 folhas por planta foi coletada, independente de haver sintomas ou não nas folhas das plantas, a detecção e quantificação de *X. fastidiosa* nestas plantas foi de acordo com a metodologia descrita no item 3.2.2.

3.2.2. Presença e quantificação de *X. fastidiosa* de plantas em campo

A quantificação da *X. fastidiosa* nas amostras foi realizada por meio da reação em cadeia da DNA polimerase (PCR) em tempo real (QPCR) utilizando-se do sistema ABI PRISM 7500 Sequence Detector System (Applied Biosystems). A reação foi realizada em um volume total de 20 μ l contendo 10,0 μ l de TaqMan PCR Master Mix (Applied Biosystems), primers (CVC-1 e do CCSM-1) e sonda, nas mesmas concentrações utilizadas por OLIVEIRA et al. (2002). Para isto, o DNA total foi purificado a partir do pecíolos e nervuras centrais de folhas das respectivas amostras utilizando-se da metodologia conhecida como CTAB adaptada de MURRAY & THOMPSON (1980). Após a extração o DNA total obtido das amostras foi padronizado na concentração final de 50 ng, por meio de espectrofotometria (NanoDrop, Thermo Scientific) e então utilizado 3 μ L nas amplificações. Para a amplificação seguiu-se uma pré-incubação a 50°C por 2 minutos e desnaturação a 95°C durante 10 minutos foram seguidos por 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15s e anelamento e extensão junto a 60°C por 1 min em cada ciclo.

Para estimativa da população de *X. fastidiosa*, nas amostras foi estabelecida uma curva padrão a partir da concentração conhecida de DNA genômico de *X. fastidiosa* obtida por diluições em série iniciando-se de 10^7 Unidade Formadora de Colônia (UFC) até 10 UFC/mL. Valores médios de Ct (ciclo limiar onde a fluorescência emitida pela probe passou a ser captada pelo sistema) para cada diluição do DNA (eixo Y) foram plotados contra o log₁₀ da UFC (eixo X). A equação de regressão mostrando uma significativa linearidade entre as duas variáveis foi obtida ($y = -5.09565x + 52.230705$, $r = 0.999$). O limiar de detecção foi observado na diluição 10^3 UFC (Ct = 36.81), sendo que todas amostras cujos valores de Ct foram superiores a este foram consideradas negativas. Todos os resultados relatados de QPCR são baseados no número de células de *X. fastidiosa* em cada amostra, uma vez que o gene alvo amplificado pelo primers tem uma única cópia do genoma desta bactéria, que foram estimados a partir da curva padrão. Em todas as extrações de DNA e PCR foram

incluídos controles de plantas saudáveis e sabidamente infectadas com *X. fastidiosa* sendo que cada amostra foi testada em duplicata.

3.3. Experimentos em casa-de-vegetação

3.3.1. Experimento I

3.3.1.1. Inoculação via suspensão bacteriana

Entre dezembro de 2006 e fevereiro de 2007, 18 plantas jovens de Navelina ISA 315 (portadoras de viróides) com aproximadamente 10 cm de altura, enxertadas em limoeiro Cravo foram inoculadas com 20 µL de suspensão de *X. fastidiosa* linhagem 9a5c na concentração de 10^9 células/mL. Para isto, uma gota com o volume desejado da suspensão bacteriana foi depositada no ramo principal da muda, através da qual foram feitas sucessivas perfurações com agulha entomológica, duas plantas como controle negativo foram inoculadas utilizando-se tampão fosfato (PBS), totalizando 20 plantas.

3.3.1.2. Determinação da presença de *X. fastidiosa*

As 20 plantas foram analisadas quanto à presença de *X. fastidiosa* cerca de seis e 45 meses após a inoculação. Para isso, uma fração do pecíolo de todas as folhas que compunham a amostra foi finamente fatiada e homogeneizada obtendo-se aproximadamente 200 mg de tecido fresco, o qual foi triturado para obtenção do DNA total através da metodologia CTAB (MURRAY; THOMPSON, 1980). O diagnóstico para a bactéria foi realizado através da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se dos primers RST31/RST33 (MINSAVAGE et al., 1993). A reação foi conduzida em 25 µL contendo no volume final 1 U da taq DNA polymerase recombinante (Invitrogen), 2,5

μL do tampão 10X desta enzima, 0,08 mM de cada dNTP (Invitrogen), 2,5 mM de Mg^+ , 2,20 ng de cada iniciador e 2 μL do DNA total, contendo aproximadamente 100 ng. As amplificações foram conduzidas em termociclador programado inicialmente a 95°C por 5 minutos, seguindo-se de 36 ciclos a 95°C por 45 segundos, 55°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto, com extensão final de 72°C por 10 minutos. As amplificações foram reveladas em eletroforese horizontal utilizando-se agarose a 1%.

3.3.2. Experimento II

3.3.2.1. Inoculação via encostia de planta infectada

Em abril de 2009, iniciou-se a produção de mudas de Navelina ISA 315, com borbulhas obtidas de plantas da introdução original portadora de HSVd e CDVd e de plantas que passaram pela limpeza clonal por microenxertia e foram pré-imunizadas contra o vírus da tristeza com o isolado PIAC, no Centro APTA Citros “Sylvio Moreira” – IAC. Dez mudas de cada um dos clones (com e sem viroides) foram estabelecidas em casa de vegetação, onde foram inoculadas com *X. fastidiosa*.

A inoculação de *X. fastidiosa* foi feita em julho de 2009 através da encostia de plantas contaminadas, essas plantas foram previamente preparadas por enxertia de plantas jovens de limoeiro Cravo em ramos de plantas adultas de laranja Pera com sintomas avançados de CVC. Estas permaneceram ligadas as plantas até a perfeita soldagem dos câmbios. Posteriormente essa planta, denominada planta inoculo, foi enxertada nas plantas em casa de vegetação (Figura 2). Como testemunhas da eficiência da inoculação foram utilizadas 10 mudas de laranjeira Pera IAC. Para todas as plantas teste (mudas de clones de Navelina ISA 315 e Pera) foi utilizado o limoeiro Cravo como porta-enxerto.



Figura 2. Vista parcial das plantas de casa de vegetação após a inoculação por encostia de plantas infectadas.

Em dezembro de 2009 todas as plantas foram transplantadas para vasos de 14 lts, as plantas inóculo também foram transplantadas e permaneceram ligadas as plantas teste até o fim do experimento (Figura 3).

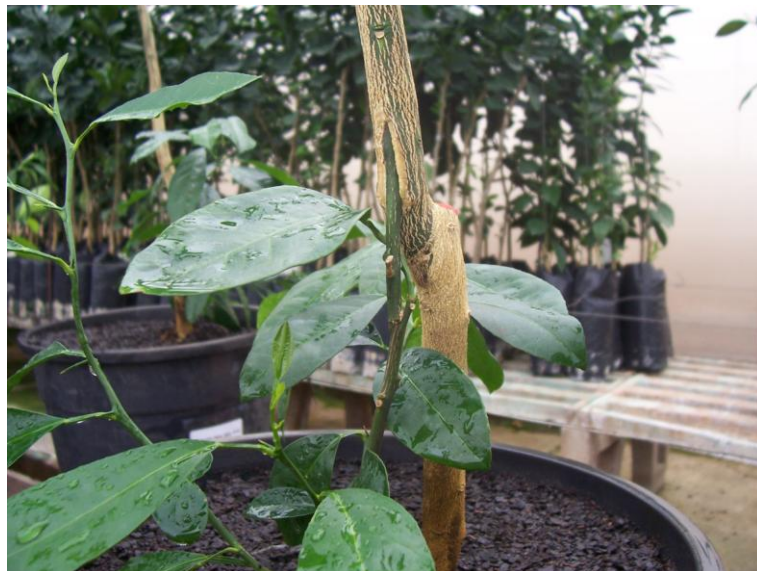


Figura 3. Detalhe planta inóculo após transplante para vasos de 14 litros.

Mensalmente foi efetuada a desbrota dos brotos de limoeiro Cravo das plantas teste e das plantas inóculo. Em fevereiro de 2010 foi realizada uma poda de rebaixamento de todas as plantas a 1 m de altura com intuito de reduzir o tamanho das plantas e proporcionar um novo fluxo de vegetação na tentativa de antecipar a expressão de sintomas. Em todos os precedimentos as ferramentas foram desinfectadas com hipoclorito de sódio (2%).

3.3.2.2. Avaliações das plantas em casa de vegetação (Experimento II)

As avaliações foram visuais, realizadas em abril de 2010 e janeiro de 2011, seguindo-se do mesmo critério adotado para as plantas de campo. Na avaliação de abril de 2010 foram coletadas de cada planta as cinco primeiras folhas acima do ponto de encostia da inoculação, sendo que cada planta foi representada como uma amostra. Foram coletadas em junho de 2010 folhas de cada planta inóculo para verificar se a bactéria ainda estava presente nas plantas.

Em agosto de 2010 as plantas experimentais foram novamente rebaixadas através de poda, remanescendo as três pernadas principais, após a nova vegetação foi reduzida a oferta de água visando indução de estresse às plantas conforme SOUZA; DONADIO & GONZÁLEZ JAIMES, (2000) e possível indução de sintomas. Na avaliação de janeiro de 2011 foram coletadas dez folhas representativas da copa de cada planta que compuseram amostras individuais.

3.3.2.3. Presença e quantificação de *X. fastidiosa* das plantas em casa de vegetação (Experimento II)

A metodologia da extração de DNA e o QPCR utilizadas nas plantas de casa de vegetação foi a mesma utilizada para as plantas de campo (item 3.2.2.). Para

comprovar a presença de *X. fastidiosa* nas plantas inoculo, utilizou-se a metodologia empregada nas plantas de casa de vegetação (item 3.3.1.2).

4. RESULTADOS

Os resultados das plantas de campo e de casa de vegetação (experimentos I e II) foram analisados com base na presença de sintomas foliares, presença, quantificação de *X. fastidiosa*.

Para as plantas de campo observou-se redução no título da bactéria *X. fastidiosa* na cultivar Navelina ao longo do período de estudo, com tendência a uma diminuição no número de plantas infectadas e da concentração da bactéria a partir da segunda avaliação (agosto/2009). Com exceção de um único ramo, em uma planta na avaliação de agosto de 2009 (Figura 4-b), todas as demais plantas da cultivar Navelina ISA 315 não apresentaram sintomas típicos de CVC desde março de 2007 até novembro de 2010, ou seja, de forma geral ao longo de 45 meses as plantas permaneceram hospedeiras assintomáticas de *X. fastidiosa*.

As análises de ramos da cultivar Pera só foram possíveis a partir da segunda avaliação, quando alguns ramos da copa original começaram a brotar, na base do tronco principal, logo acima da enxertia original ou seja, próximo ao porta-enxerto. Neste caso as folhas da cultivar Pera que compuseram as amostras foram classificadas nos níveis de severidade: 6% e 35% (AMORIM et al., 1993) nas avaliações de agosto de 2009 e novembro de 2010, respectivamente, seguindo o critério de folhas com maior incidência de sintomas entre todas as plantas como amostra representativa (Figura 4-b,d).

Na avaliação de abril de 2010 (Figura 4-c), apesar das folhas de Pera que representaram a amostra composta terem apresentado sintomas, a amostra foi considerada negativa, pois o Ct desta amostra foi superior ao Ct limiar de detecção (36,81), uma possível explicação seria o comprometimento da qualidade do DNA.

As três plantas originais, avaliadas em novembro de 2010, não apresentaram sintomas de CVC e apenas uma das três plantas foi positiva para presença de *X. fastidiosa*, na concentração de $1,20E+03$ células de *X. fastidiosa* por DNA total, apesar do baixo título da bactéria, essa foi a única planta que recebeu inoculação artificial via encostia de muda infectada dentre as três avaliadas.

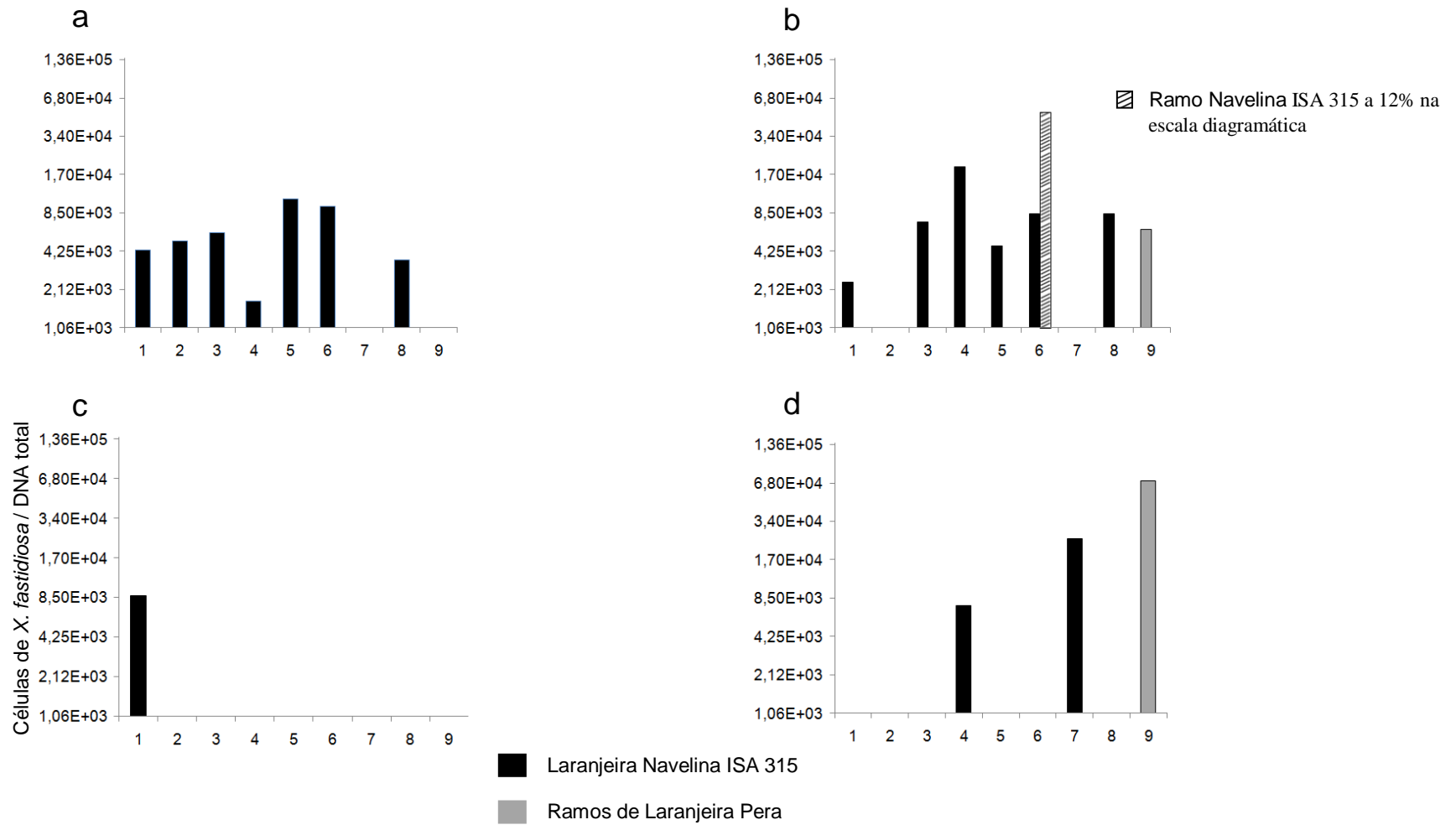


Figura 4. Resultado de RT-qPCR em quatro avaliações: (a) janeiro/2009; (b) agosto/2009; (c) abril/2010; (d) novembro/2010, em plantas da cultivar Navelina ISA 315 (1-8) e ramos remanescentes da cultivar Pera (9).

Nas plantas de casa de vegetação (Experimento I), os resultados comprovaram que a bactéria esteve presente nos sete primeiros meses após a inoculação em 15 das 18 plantas. Porém, após 38 meses da primeira avaliação, a bactéria não pode ser mais detectada nas plantas através da PCR, mostrando que houve uma redução no título do patógeno a ponto de não ser constatada sua presença e nem mesmo foi possível seu isolamento em meio de cultura (Tabela 1).

Tabela 1. Amostras foliares de mudas de Navelina ISA 315 inoculadas com 20 uL de suspensão de *Xylella fastidiosa* na concentração de 10^9 células/ml.

Amostra	Descrição	PCR	PCR	Isolamento
		07/2007	09/2010	Bactéria
1	Mudas inoculadas em 19/12/2006	+(¹)	-(²)	-
2	Mudas inoculadas em 19/12/2006	+	-	-
3	Mudas inoculadas em 19/12/2006	+	-	-
4	Mudas inoculadas em 19/12/2006	-	-	-
5	Mudas inoculadas em 19/12/2006	+	-	-
6	Mudas inoculadas em 19/12/2006	-	-	-
7	Mudas inoculadas em 19/12/2006	+	-	-
8	Mudas inoculadas em 19/12/2006	+	-	-
9	Mudas inoculadas em 19/12/2006	+	-	-
10	Mudas inoculadas em 19/12/2006	-	-	-
11	Mudas inoculadas em 19/12/2006	+	-	-
12	Mudas inoculadas em 19/12/2006	+	-	-
13	Controle (-) não inoculado	-	-	-
14	Controle (-) não inoculado	-	-	-
15	Mudas inoculadas em 19/12/2006	+	-	-
16	Mudas inoculadas em 19/12/2006	+	-	-
17	Mudas inoculadas em 06/02/2007	+	-	-
18	Mudas inoculadas em 06/02/2007	+	-	-
19	Mudas inoculadas em 06/02/2007	+	-	-
20	Mudas inoculadas em 06/02/2007	+	-	-

(¹) Presença de *X. fastidiosa*

(²) Ausência de *X. fastidiosa*

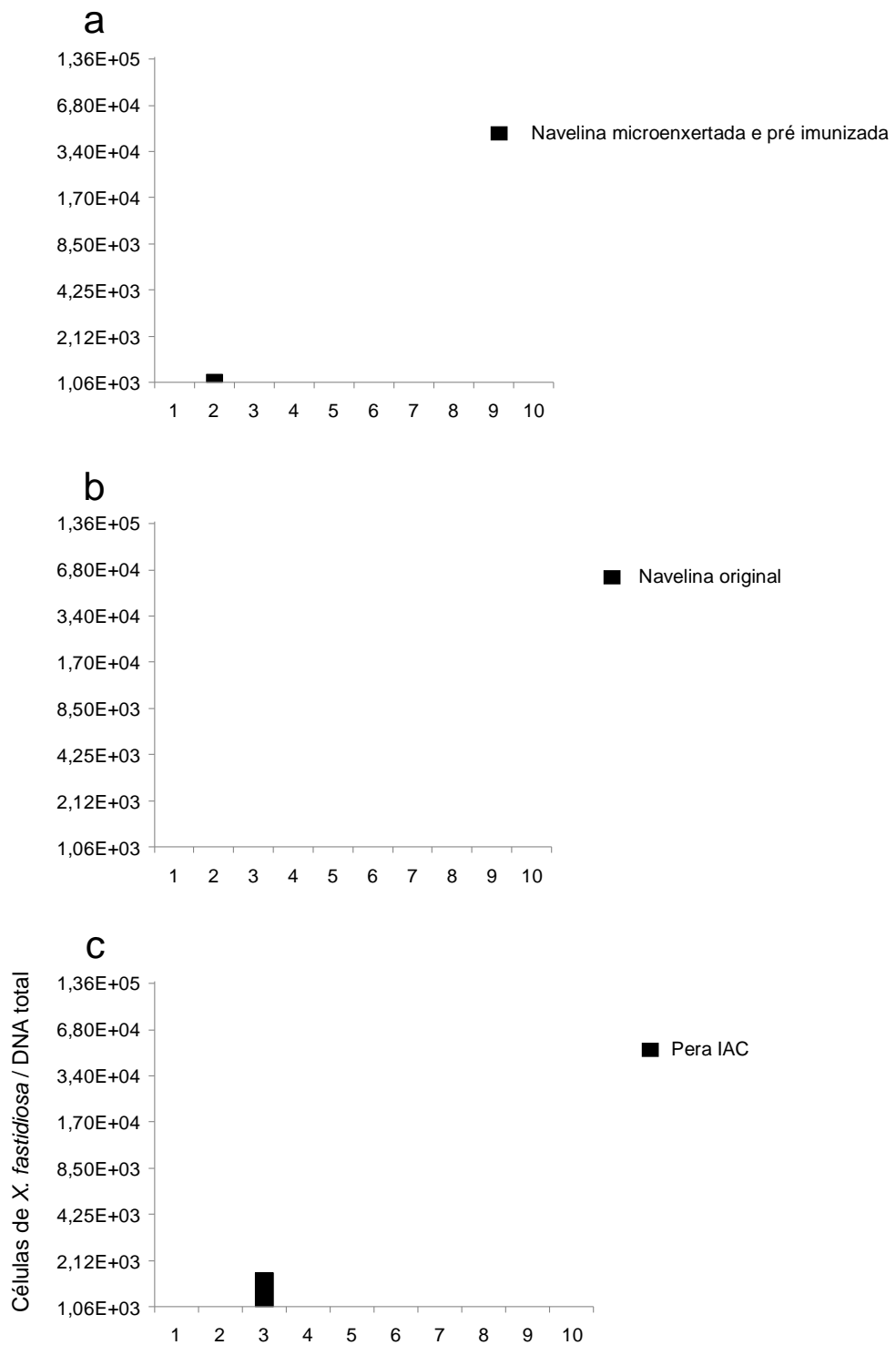


Figura 5. Resultado de QPCR nas plantas de casa de vegetação (Experimento II) em abril de 2010, nove meses após a inoculação: (a) Navelina microenxertada e pré-imunizada; (b) Navelina original (portadoras de viróides) e (c) Pera IAC (testemunha).

No Experimento II nenhuma das plantas apresentaram sintomas na avaliação de abril de 2010, mesmo após cerca de nove meses após a enxertia das plantas inóculo. Em relação à quantificação da bactéria, a maioria das plantas avaliadas foram negativas para presença de *X. fastidiosa* (Figura 5).

Apenas a planta 2 da Navelina microenxertada e pré-imunizada e a planta 3 da testemunha Pera IAC foram positivas, sendo que a Pera IAC apresentou a maior concentração (Figura 5). Com base nos resultados dessa primeira avaliação, optou-se por fazer uma avaliação das folhas das plantas inóculos, via PCR, para comprovar se a bactéria ainda se encontrava presente. De acordo com os resultados, 73,3 % das plantas inóculo foram positivas para presença de *X. fastidiosa*, mesmo após nove meses da enxertia. Com base nestes dados, na segunda avaliação de janeiro de 2011, foram consideradas somente as plantas cuja planta inóculo foi positiva para a presença da bactéria (Tabela 2).

Tabela 2. Resultado de PCR em amostras foliares das plantas inóculo, nove meses após a enxertia.

Plantas inóculo	Navelina Original (portadoras de viróides)	Navelina microenxertada e pré-imunizada	Pera IAC (testemunha)
1	-	+(¹)	-(²)
2	-	+	-
3	+	+	+
4	-	+	+
5	+	+	+
6	+	+	-
7	+	+	+
8	+	+	-
9	+	+	+
10	-	+	+

(¹) Presença de *X. fastidiosa*

(²) Ausência de *X. fastidiosa*

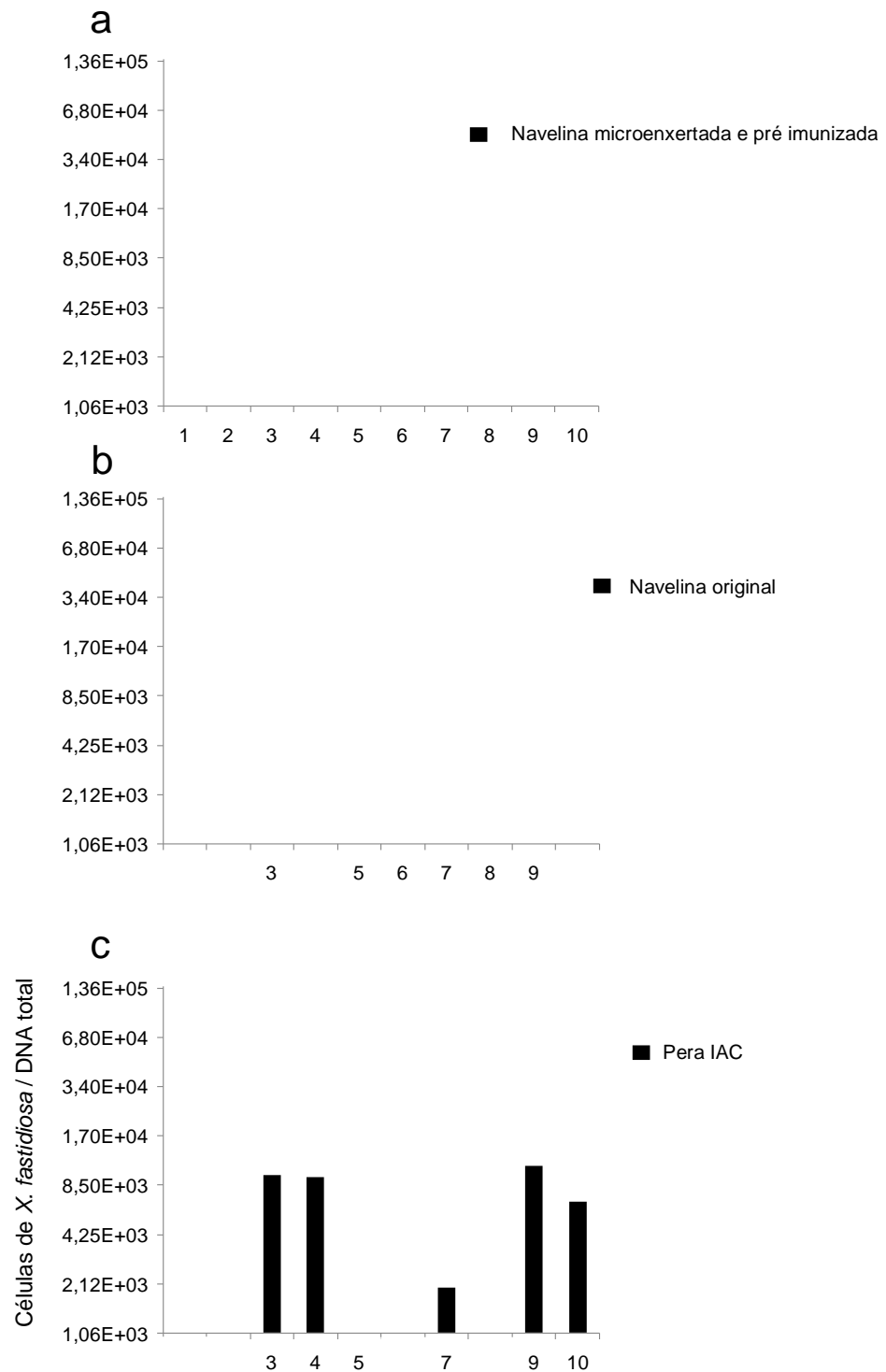


Figura 6. Resultado de QPCR nas plantas de casa de vegetação (Experimento II) em janeiro de 2011, 18 meses após a inoculação: (a) Navelina microenxertada e pré-imunizada; (b) Navelina original (portadora de viróides) e (c) Pera IAC (testemunha).

Na avaliação de janeiro de 2011, todas as plantas também não apresentaram sintomas (Figura 6), porém as plantas de Pera IAC (Figura 6-c), que tiveram a presença da bactéria confirmada na planta inóculo, apresentaram um aumento no número de plantas em que a bactéria esteve presente. Já a planta 3 apresentou aumento na concentração em relação a primeira avaliação. Somente na planta 5 não foi constatada a presença da bactéria apesar de sua respectiva planta inóculo infectada com *X. fastidiosa* (Tabela 2).

A planta 2 da Navelina microenxertada e pré-imunizada apresentou redução total no título da bactéria cerca de nove meses após a primeira avaliação.

5. DISCUSSÃO

Em relação aos ramos da cultivar Pera nas plantas de campo, é possível que ramos brotados na base do tronco principal, ou seja, próximo ao porta-enxerto requeiram maior tempo para a colonização da bactéria (COLETTA FILHO; CARLOS; MACHADO, 1997). Embora também tenha sido observada uma alternância temporal na concentração da bactéria nesta cultivar, houve um expressivo aumento na última avaliação o que pode estar relacionado com a maturidade dos ramos (Figura 2).

Os resultados das plantas inóculo na casa de vegetação (Experimento II), em relação à presença de *X. fastidiosa*, mostra que parte das plantas foram negativas mesmo sendo utilizados ramos sintomáticos para CVC da cultivar Pera, esse fato pode ser atribuído a mortalidade de células bacterianas nos ramos sintomáticos ou pelo fato de que *X. fastidiosa* coloniza uma proporção menor de vasos xilemáticos em citros quando por exemplo comparado a videiras (ALMEIDA et al., 2001).

A ausência de sintomas na cultivar Pera IAC, mesmo após 18 meses da inoculação, pode ter relação com a idade da planta que recebeu as inoculações. LOPES et al. (2005) relatam que plantas mais jovens podem apresentar maior multiplicação da bactéria quando inoculadas e que ainda plantas da cultivar Pera

inoculadas com suspensão bacteriana, apesar de infectadas, também permaneceram assintomáticas após 18 meses da inoculação.

No geral, a temperatura em casa de vegetação pode ter prejudicado a multiplicação de *X. fastidiosa*. FEIL & PURCELL (2001) observaram em videiras com a doença de Pierce, que plantas expostas, após três dias às temperaturas de 5°C e 37°C, apresentaram redução no título da bactéria, sendo que a 37°C não foi possível sua recuperação *in vitro*.

Em um estudo realizado por COLETTA FILHO et al. (2007), envolvendo híbridos de Laranja Pera x Tangor Murcott, também foi observado que a partir de 60 dias após a inoculação houve uma diminuição no título de *X. fastidiosa* na progênie resistente a CVC, o que corrobora com os resultados obtidos no presente trabalho para cultivar Navelina ISA 315 em condições de campo e em casa de vegetação (Experimentos I e II), cuja maior tolerância a CVC já foi veiculada em trabalhos anteriores (SOUZA et al., 2006; STUCHI et al., 2007).

Resultado semelhante também foi observado por PAVAN et al. (2007), que relataram uma redução na presença de *X. fastidiosa* de 63 % para 10,5 % em um híbrido somático de laranjeira Hamlin + tangerineira Montenegrina na segunda avaliação em relação a primeira, sendo que na cultivar Hamlin essa redução foi de 63% para 47,4 %.

Diversos fatores podem estar relacionados com a tolerância da Navelina ISA 315 à *X. fastidiosa*, como a composição química do xilema desta cultivar, BI et al. (2007), relataram que a estirpe da bactéria que causa doença em videiras, apresentou o desenvolvimento do biofilme afetado quando avaliada *in vitro* em fluido de xilemas de plantas cítricas. Também é possível que algumas bactérias endofíticas possam estar inibindo o desenvolvimento de *X. fastidiosa* na Navelina, já que ARAÚJO et al. (2002) associaram a presença de *Curtobacterium flaccumfaciens* com maior freqüência em plantas assintomáticas. Por outro lado, outras como *Methylobacterium spp.* podem em alguns casos estimular o crescimento de *X. fastidiosa*; sendo possível relacionar a presença de sintomas de CVC com o equilíbrio populacional entre *C. flaccumfaciens*, *Methylobacterium spp.* e *X. fastidiosa* (LACAVA et al. 2004).

Estudos relatam a menor expressão sintomática de doenças em plantas cítricas quando as mesmas estão infectadas com viróides. Resultados obtidos por ROSSETI et al. (1984) demonstram que plantas cítricas, inoculadas com estirpes fracas e severas do viroide causador da exocorte, mostraram-se mais tolerantes a *Phytophthora spp*, resultados semelhantes, com viróides, foram obtidos por SEMANCIK et al. (2005). Podem ocorrer interações sinérgicas e antagonísticas entre viróides em plantas cítricas que influem na resposta do hospedeiro (VERNIERE et al., 2004, 2006). Especula-se sobre a possibilidade de existir interações semelhantes entre viróides e outros microorganismos, como *X. fastidiosa*, já que a cultivar em sua forma original está infectada com os viróides HSVd e CDVd. Mas, no presente estudo isso parece não ter ocorrido, uma vez que tanto as plantas da introdução original como as que passaram por limpeza clonal (microenxertadas) e pré-imunização apresentaram respostas semelhantes quando inoculadas com *X. fastidiosa*.

LARANJEIRA et al. (1998) relatam que a cultivar Baianinha, em condições de campo na região de Mirasol e Barretos, apresentaram sintomas cerca de nove meses após o plantio, o que também ocorreu com clones de Bahia em Mirasol e em Cordeirópolis.

Para MACHADO et al. (1997), as cultivares Bahia e Baianinha não apresentaram sintomas de CVC mesmo após três anos de sobrenxertia em plantas sintomáticas, nem foi detectada a presença da bactéria nessas cultivares e que ainda a cultivar Hamlin desenvolveu sintomas mais lentamente quando comparada as cultivares Barão e Pera. Há relato de baixa incidência de CVC em diversas seleções californianas de Bahia e Baianinha (²STUCHI), tais informações sugerem que as cultivares que pertencem ao grupo das laranjas de 'umbigo' apresentam resultados contraditórios em relação à suscetibilidade a CVC.

A cultivar Navelina ISA 315 pode ser considerada tolerante, em função dos seguintes resultados: a) as três plantas originais da cultivar Navelina ISA 315, permanecem assintomáticas até novembro de 2010, após quase 10 anos de plantio no

² STUCHI, E. S. (Estação Experimental de Citricultura de Bebedouro, EECB – Bebedouro, SP). Comunicação pessoal, 2010.

campo e que apenas uma mostrou-se positiva para *X. fastidiosa*; b) mudas inoculadas com suspensão bacteriana, não apresentaram sintomas e após 45 e 43 meses não apresentavam mais *X. fastidiosa* em seus tecidos; c) quase todas as copas da cultivar decorrentes da sua sobrenxertia em plantas severamente atacadas não apresentaram sintomas após 42 meses; d) mudas inoculadas com plantas infectadas não apresentaram sintomas nem *X. fastidiosa* em seus tecidos, 18 meses após a inoculação, tanto para aquelas obtidas de plantas portadoras de viróides como para as sanitizadas e pré-imunizadas.

Esses resultados corroboram e complementam trabalhos anteriores (SOUZA et al., 2006; STUCHI et al., 2007) onde a cultivar Navelina ISA 315 destaca-se como promissora pela não observação de sintomas típicos de CVC em estudos envolvendo uma série de cultivares de laranjas doces, inclusive algumas do grupo das laranjas-de-umbigo ou “navels”.

A cultivar Navelina, pertencente a esse grupo parece ser uma exceção por sua provável tolerância de origem genética à CVC. Estudos em andamento relacionados à expressão gênica relatam que a bactéria quando na cultivar Navelina ISA 315, apresenta maior expressão de alguns genes que codificam toxinas e proteínas de detoxificação, chaperonas, assim como distintos reguladores e genes relacionados com a sobrevivência, sugerindo que o sistema de defesa da cultivar seja melhor em relação à laranjeira Pera (FEDERICI et al., 2009).

6. CONCLUSÃO

Pode-se afirmar que a laranjeira Navelina ISA 315 parece ser a primeira cultivar de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck.) a apresentar tolerância satisfatória a clorose variegada dos citros.

7. REFERÊNCIAS

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, p. 382-386, 2001.

ALVES, E.; LEITE, B.; PASCHOLATI, S. F.; ISHILDA, M. L.; ANDERSEN, P. C. Citrus sinensis leaf petiole and blade colonization by *Xylella fastidiosa*: details of xylem vessel occlusion. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 66, n. 2, p. 218-224, 2009.

AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, 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. 17, n. 1, p. 42-48, 1993.

ANDRIOLI, I.; CENTURION, J. F.; MARQUES JUNIOR, J. **Levantamento detalhado dos solos da Estação Experimental de Citricultura de Bebedouro**. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Departamento de Solos e adubos, 1994. 19 p. (Relatório).

ARAÚJO, W. L.; MARCON, J.; MACCHERONI JUNIOR, W.; ELSAS, J. D. V.; VUURDE, J. W. 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, p. 4906-4914, 2002.

BI, J. L.; DUMENYO, C. K.; HERNANDEZ-MATINEZ, R.; COOKSEY, D. A.; TOSCANO, N. C. Effect of Host Plant Xylem Fluid on Growth, Aggregation, and Attachment of *Xylella fastidiosa*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 33, n. 3, p. 493-500, 2007.

BOVÉ, J. M.; AYRES, A. J. Etiology of three recent diseases of citrus in São Paulo State: Sudden Death, Variegated Chlorosis and Huanglongbing. **IUBMB Life**, Oxford, v.59, n. 4/5, p. 346-354, apr./may 2007.

CARLOS, E. F.; CABRITA, J. R. M.; RODAS, V. Z.; GARCIA JUNIOR, A.; AYRES, A. J. Uso da poda em pomares com CVC. In: DONADIO, L. C.; MOREIRA, C. S. **Clorose variegada dos citros**. Bebedouro: Estação Experimental de Citricultura, 1997. p. 113-122.

CARLOS, E. F.; RODRIGUES NETO, J.; BERETTA. A bactéria *Xylella fastidiosa*. In: DONADIO, L.C.; MOREIRA, C.S. **Clorose variegada dos citros**. Bebedouro: Estação Experimental de Citricultura, 1997. p. 22-27.

CARVALHO, S. A.; GRAF, C. C. D.; VIOLANTE, A. R. Produção de material básico e propagação. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JUNIOR, P. **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico de Campinas e Fundag, 2005. p. 279-316.

CHANG, C. J.; GARNIER, M. ZREIK, L.; ROSSETTI, V.; BOVÉ, J. M. Culture and serological detection of 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.

COELHO, J. H. C.; XIMENES, N. L.; FELIPPE, M. R.; RESTAINO, E. C.; MONTESINO, L. H.; GARBIM, L. F.; SANCHES, A. L.; YAMAMOTO, P. T. Eficiência de inseticidas sistêmicos para controle de pragas em mudas cítricas em pré e em pós-plantio. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 26, n. 2, p. 237-249, 2005.

COLETTA FILHO, H. D.; CARLOS, E. F.; MACHADO, M. A. Distribution of *Xylella fastidiosa* in sweet orange plantas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, p. 234, 1997. numero especial.

COLETTA FILHO, H. D.; CARLOS, E. F.; TARGON, M. L. P. N.; CRISTOFANI, M.; SOUZA, A. A.; MACHADO, M. A. Distribution of *Xylella fastidiosa* within sweet orange trees: influence of age and level of symptom expression of citrus variegated chlorosis. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 14., 1998, Campinas. **Proceedings...** Riverside: International Organization of Citrus Virologists, 2000. p. 243-248.

COLETTA FILHO, H. D.; MACHADO, M. A. Evaluation of the genetic structure of *Xylella fastidiosa* populations from different citrus sinensis varieties. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 8, p. 3731-3736, 2002.

COLETTA FILHO, H. D.; MACHADO, M. A. Geographical genetics structure of *Xylella fastidiosa* from citrus in São Paulo state, Brazil. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 93, p. 28-34, 2003.

COLETTA FILHO, H. D.; PEREIRA, O. O.; SOUZA, A. A.; TAKITA, M. A.; CRISTOFANI YALE, M.; MACHADO, M. A. Analysis of resistance to *Xylella fastidiosa* within a hybrid population of Pera sweet orange x Murcott tangor. **Plant Pathology**, Oxford, v. 56, p. 661-668, 2007.

CONSTERTON, J. M.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D. E.; KORBER, D. R.; LAPPIN-SCOTT, H. M. Microbial Biofilms. In: ORNSTON, L. N.; BALOWS, A.; GREENBERG, E. P. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, 1995. v. 49, p. 711-722.

Coordenadoria de Defesa Agropecuária do Estado de São Paulo. Disponível em. <<http://www.cda.sp.gov.br/www/legislacoes/index.php?row=1&keyword=23&var=6&ntupas=8#>>. Acesso em: 09 fev. 2011.

DAVINO, S.; DAVINO, M.; CARUSO, A.; SORRENTINO, G.; GUARDO, M.; DURAN-VILA, N. Performance of Navelina sweet orange on five rootstocks inoculated with citrus viroids. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 16., 2004, Monterrey. **Proceedings...** Riverside: International Organization of Citrus Virologists, 2005. p. 312-319.

DONADIO, L. C.; MOURÃO FILHO, F. A. A.; MOREIRA, C. S. Centros de origem, distribuição geográfica das plantas cítricas e histórico da citricultura no Brasil. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, P. **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico de Campinas; Fundag, 2005. p. 1-18.

FEDERICI, M. T.; PICCHI, S.; FADEL, A. L.; MARCONDES, J. M.; STUCHI, E. S.; LEMOS, E. G. M. Análise da Expressão de Genes de Patogenicidade da Bactéria *Xylella fastidiosa* em Variedades Susceptíveis e Tolerantes à Clorose Variegada dos Citros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 25., 2009, Porto de Galinhas. **Anais...** Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2009. CD-ROM

FEIL, H.; PURCELL, A. H. Temperature-dependent growth and survival of *Xylella fastidiosa in vitro* in potted grapevines. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 85, n. 12, p. 1230-1234, 2001.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nation. Disponível em. <<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>>. Acesso em: 17 mar. 2010.

FRANCO, D.; STUCHI, E. S.; SILVA, S. R.; MARTINS, A. B. G.; LARANJEIRA, F. F. Citrus variegated chlorosis damage assessment in six sweet orange cultivars in São Paulo, Brasil. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON HUANGLONGBING, 2008, Orlando. **Proceedings...** Fort Pierce: USDA, 2008. p. 340.

GRAVENA, S.; LOPES, J. R. S.; PAIVA, P. E. B.; YAMAMOTO, P. T.; ROBERTO, S. R. Os vetores da *Xylella fastidiosa*. In: DONADIO, L. C.; MOREIRA, C. S. **Clorose variegada dos citros**. Bebedouro: Estação Experimental de Citricultura, 1997. p. 37-52.

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 (*C. sinensis* (L.) Osbeck) plants through natural root-grafts. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 84, p. 622-626, 2000.

LACAVALA, P. T.; ARAÚJO, W. L.; MARCON, J.; MACCHERONI JUNIOR. W.; 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, p. 55-59, 2004.

LARANJEIRA, F. F. Screening for tolerance of citrus to *Xylella fastidiosa*, the causal agent of citrus variegated chlorosis CVC. **Fruits**, Paris, v. 53, n. 5, p. 345-349, 1998.

LARANJEIRA, F. F.; AMORIM, L.; BERGAMIM-FILHO, A.; AGUILAR-VILDOSO.; COLETTA-FILHO, H. D. Fungos, procariotos e doenças abióticas. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico de Campinas e Fundag, 2005. p. 532-538.

LARANJEIRA, F. F.; BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L.; BERGUER, R. Aspectos práticos da epidemiologia da clorose variegada dos citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 19, n. 1, p. 79-90, 1998.

LARANJEIRA, F. F.; BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L.; GOTTWALD, T. R. Dinâmica espacial da clorose variegada dos citros em três regiões do estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 1, p. 56-65, 2004.

LARANJEIRA, F. F.; MÜLLER, G. W.; TRINDADE, J.; SILVA, L. M. S. Constatação da clorose variegada dos citros (CVC) no Estado de Sergipe. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 4, p. 521, 1996.

LARANJEIRA, F. F.; MÜLLER, G. W.; VAZ FILHO, D.; POMPEU JÚNIOR, J. Porta-enxertos não influenciam na expressão da clorose variegada dos citros (CVC) em laranjas-doces. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 1, p. 212-214, 2001.

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

LEE, R. F.; BERETTA, M. J. G.; HARTUNG, J. H.; HOOKER, M. E.; DERRICK, K. S. Citrus variegated chlorosis: confirmation of a *Xylella fastidiosa* as the causal agent. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 19, n. 2, p. 123-125, 1993.

LEITE JÚNIOR, R. P.; HUANG, G. F.; BUENO, B. Ocorrência da clorose variegada dos citros no Estado de Santa Catarina. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 2, p. 214, 1997.

LI, W. B.; DONADIO, L. C.; SEMPIONATO, O. R. Citrus variegated chlorosis: resistance evaluation of Natal orange clones. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 14., 1998, Campinas. **Programs and Abstracts...** Riverside: International Organization of Citrus Virologists, 2000. p. 83.

LI, W. B.; HE, C. X.; AYRES, A. J.; DONADIO, L. C. Susceptibility of tangerines to citrus variegated chlorosis. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 535, p. 253-257, 2000.

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

LOPES, S. A.; TEIXEIRA, D. C.; FERNANDES, N. G.; AYRES, A. J.; TORRES, S. C. Z.; BARBOSA, J. C.; LI, W. B. An experimental inoculation system to study citrus-*xylella fastidiosa* interactions. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 89, p. 250-254, 2005.

MACHADO, E. C.; OLIVEIRA, R. F.; RIBEIRO, R. V.; MEDINA, C. L.; STUCHI, E. S.; MARIN, F. R.; SILVA, J. A. B.; SILVA, S. R. Fluxo de seiva e fotossíntese em laranjeira 'Natal' com clorose variegada dos citros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 6, p. 911-918, 2006.

MACHADO, E. C.; OLIVEIRA, R.F; RIBEIRO, R. V.; MEDINA, C. L.; STUCHI, E. S.; PAVANI, L. C. Deficiência hídrica agrava os sintomas fisiológicos da Clorose Variegada dos Citros em laranjeira 'Natal'. **Bragantia**, Campinas, v. 66, n. 3 p. 373-379, 2007.

MACHADO, E. C.; QUAGGIO, J. A.; LAGOA, 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**, Campinas, v. 6, p. 53-57, 1994.

MACHADO, M. A.; SILVÉRIO, J. L.; BAPTISTA, C. R.; CRISTOFANI, M. TEÓFILO SOBRINHO, J. Avaliação de transmissão e seleção de variedades à Clorose Variegada dos Citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 13, n. 2, p. 515-531, 1992.

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 Pera com clorose variegada dos citros (CVC). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, p. 30-33, 1997.

FUNDECITRUS - Manual Técnico: clorose variegada dos citros 2009. Disponível em <<http://www.fundecitrus.com.br/ImageBank/PageFlip/pageflip.aspx?idPage=137>>.

Acesso em: 11 dez. 2011.

MATTOS JUNIOR, D.; POMPEU JUNIOR, J.; FIGUEIREDO, J. O. Citros. In: FAHL, J. I.; CAMARGO, M. B. P.; PIZZINATO, M. A.; BETTI, J. A.; MELO, A. M. T, DEMARIA, I. C.; FURLANI, A. M. C. **Boletim 200**: Instruções agrícolas para as principais culturas econômicas. Campinas: Instituto Agronômico, 1998. p. 111-114.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em. <<http://www.agricultura.gov.br/portal/page/portal/Internet-MAPA/pagina-inicial/vegetal/legislacao>>. Acesso em: 09 fev. 2011.

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

MIRANDA, M. P.; VIOLA, D. N.; MARQUES, R. N.; BONANI, J. P.; LOPES, J. R. S. Locais e período de alimentação da cigarrinha vetora de *Xylella fastidiosa*, *Bucephalogonia xanthopis* (Berg) (Hemiptera: Cicadellidae), em mudas cítricas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 4, p. 913-918, 2008.

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

NUNES, W. M. C.; MEDINA, C. L.; MACHADO, M. A.; MACHADO, E. C.; CORAZZA-NUNES, M. J.; MÜLLER, G. W. Transmissão de *Xylella fastidiosa* para mudas de citros através da encostia de plantas-inóculo. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 25, n. 2, p. 349-356, 2004.

NUNES, W. M. C.; ZANUTTO, C. A.; CORAZZA-NUNES, M. J.; MOLINA, R. O. Análise espaço-temporal da clorose variegada dos citros no Noroeste de Paraná, com uso de PCR para detecção de *Xylella fastidiosa*. **Acta Scientia Agronomica**, Maringá, v. 28, n. 3, p. 421-425, 2006.

OLIVEIRA, A. C.; VALLIM, M. A.; SEMIGHINI, C. P.; ARAÚJO, W. L.; GOLDMAN, G. H.; MACHADO, M. A. Quantification of *Xylella fastidiosa* from Citrus Trees by Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 92, p. 1048-1053, 2002.

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. 489-495, 1992.

PARADELLA FILHO, O.; SUGIMORI, M. H.; RIBEIRO, I. J. A.; MACHADO, M. A.; LARANJEIRA, F. F.; GARCIA JUNIOR, A.; BERETTA, M. J. G.; HARAKAWA, R.; RODRIGUES NETO, J.; BERIAM, L. O. S. Primeira constatação em cafeeiro no Brasil da *Xylella fastidiosa* causadora da clorose variegada dos citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 16, n. 2, p. 135-136, 1995.

PAVAN, A.; CALIXTO, M. C.; CARDOSO, S. C.; MENDES, B. M. J.; BERGAMIN FILHO, A.; LOPES, J. R. S.; CARVALHO, C. R.; MOURÃO FILHO, F. A. A. Evaluation of 'Hamlin' sweet orange + 'Montenegrina' mandarin somatic hybrid for tolerance to *Xanthomonas axonopodis* pv. *Citri* and *Xylella fastidiosa*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 113, n. 3, p. 278-285, 2007.

PRADO, S. S.; LOPES, J. R. S.; DEMÉTRIO, C. G. B.; BORGATO, A. F.; ALMEIDA, R. P. P. Host colonization differences between citrus and coffee isolates of *Xylella fastidiosa* in reciprocal inoculation. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 65, n. 3, p. 251-258, 2008.

PURCELL, A. H.; HOPKINS, D. L. Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. In: WEBSTER, R. K.; ZENTMYER, G. A.; SHANER, G. **Annual Review of Phytopathology**. Palo Alto, p. 131-151, 1996.

ROSSETI, V.; DE NEGRI, J.D. Clorose variegada dos citros – revisão. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 11, n. 1, p. 1-14, 1990.

ROSSETTI, V.; FEICHTENBERGER, E.; SALIBE, A. A.; OLIVEIRA, D. A. Reaction of exocortis and rumple diseased lemon trees to *Phytophthora citrophthora* inoculations. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 9., 1984, Riverside. **Proceedings...** Riverside: International Organization of Citrus Virologists, 1984. p.180-183.

SALVA, R. A.; ROBERTO, S. R.; CARLOS, E. F. Situação da Clorose Variegada dos Citros no Estado de São Paulo. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 16, n. 2, p. 155-164, 1995.

SANTOS FILHO, H. P.; BARBOSA, C. J.; MATRANGOLO, W. J. R.; RIBEIRO, J. S.; MEISSNER FILHO, P. E.; MIRANDA, M. Ocorrência da clorose variegada dos citros (CVC) no Estado da Bahia. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 2, p. 190, 1999.

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

SEMANCIK, J. S.; VIDALAKIS, G.; SZYCHOWSKY, J. A; POND, E.; MENGE, J. A. Interactions among citrus viroids and *Phytophthora citrophthora*. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 16., 2004, Monterrey. **Proceedings...** Riverside: International Organization of Citrus Virologists, 2005. p.447-451.

SILVA, S. R.; OLIVEIRA, J. C.; STUCHI, E. S.; DONADIO, L. C.; SOUZA, P. S.; GONZÁLES-JAIMES, E. P. Avaliação de tangerinas, tangores e tangelos em relação à Clorose Variegada dos Citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, n.1, p. 57-60, 2004.

SOLEL, Z.; MOGILNER, N.; GAFNY, R.; BAR-JOSEPH, M. Induced Tolerance o Mal secco Disease in Etrog Citron and Rangpur Lime by Infection with the Citrus Exocortis Viroid. **Plant Disease**, Saint Paul, v.79, n.1, p.60-61.

SOUZA, A. A.; TAKITA, M. A.; COLETTA FILHO, H. D.; CALDANA, C.; GOLDMAN, G. H.; 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 fortation in vitro. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, 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 e in planta. **Current Microbiology**, New York, v. 50, n. 4, p. 223-228, 2005.

SOUZA, P. S.; DONADIO, L. C.; GONZÁLES-JAIMES, E. P. Avaliação de alguns genótipos de citros em relação à Clorose Variegada dos Citros (CVC). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 22, n. 2. p. 148-152, 2000.

SOUZA, P. S.; GOES, A.; STUCHI, E. S.; JAIMES, E. P. G.; WICKERT, E.; SILVA, S. R.; DONADIO, L. C. Reação de variedades e clones de laranjas a *Xylella fastidiosa*. **Revista Brasileira de fruticultura**, Jaboticabal, v.28, n.1, p.145-147, 2006.

STUCHI, E. S.; SILVA, S. R.; COLETTA FILHO, H. D.; FRANCO, D.; CARVALHO, S. A.; SEMPIONATO, O. R.; DONADIO, L. C.; ALVES, K. C. S. Navelina ISA 315 sweet orange: a citrus variegated chlorosis (CVC) resistant cultivar. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 17., 2007,

Riverside. **Program & Abstracts...** Adana, Riverside: International Organization of Citrus Virologists, 2007. p.89.

STUCHI, E. S.; DONADIO, L. C.; SEMPIONATO, L. C. PERECIN, D. Produtividade e qualidade dos frutos da laranjeira 'Pera' clone iac em 16 porta-enxertos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, n. 2, p. 359-362, 2004.

STUCHI, E. S.; DONADIO, L. C.; SEMPIONATO, O.R. Qualidade industrial e produção de frutos de laranjeira "Valência" enxertada em sete porta enxertos. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 23, n. 2, p. 453-471, 2002.

TUBELIS, A.; BARROS, J. C. S. M.; CAMPOS 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. 239-254, 1993.

VERNIERE, C.; PERRIER, X.; DUBOIS, C.; DUBOIS, A.; BOTELLA, A.; CHABRIER, C.; BOVÉ, J. M.; DURAN-VILA, N. Citrus viroids: symptom expression and effect on vegetative growth and yield of Clementine grafted on trifoliolate orange. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 88, p. 1189-1197, 2004.

VERNIERE, C.; PERRIER, X.; DUBOIS, C.; DUBOIS, A.; BOTELLA, L.; CHABRIER, C.; BOVÉ, J. M.; DURAN-VILA, N. Interactions between citrus viroids affect symptom expression and field performance of Clementine trees grafted on trifoliolate orange. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 96, p. 356-368, 2006.

WELLS, J. M.; RAJU, B. C.; HUNG, H. Y.; WEISBURG, W. G.; MANDELCO-PAUL, L.; BRENNER, D. J. *Xylella fastidiosa* new-genus, new-species, gram-negative xylem-limited fastidious plant bacteria related to *Xantomonas* spp. **International Journal Systematic Bacteriology**, Praga v. 37, n. 2, p. 136-143, 1987.

YAMAMOTO, P. T.; AYRES, A. J.; MENDES, M. A.; DONADIO L. C.; STUCHI, E. S.;

SEMPIONATO, O. R.; LI, W. B.; LARANJEIRA, F. F.; POMPEU JUNIOR, J. Assessment of the resistance of sweet orange varieties from the citrus germoplasm resources to the citrus variegated chlorosis. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 16., 2004, Monterrey. **Programs and Abstracts...** Riverside: International Organization of Citrus Virologists, 2004. p. 171.

YAMAMOTO, P. T.; FELIPPE, M. R.; CAETANO, A. C.; SANCHES, A. L.; LOPES, J. R. S. First report of *Fingeriana dúbia Cavichioli* transmitting *Xylella fastidiosa* to citrus. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, p. 266, 2007.

YAMAMOTO, P. T.; PRIA JUNIOR, W. D.; FELIPPE, M. R.; ALMEIDA, E. J.; FREITAS, E. P. Controle químico da cigarrinha em citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 23, n. 1, p. 141-154, 2002b.

YAMAMOTO, P. T.; ROBERTO, S. R.; PRIA JUNIOR, W. D. Inseticidas sistêmicos via tronco para controle de *Oncometopia facialis*, *Phyllocnistis citrella* e *Toxoptera citrida* em citros. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, n. 3, p. 415-420, 2000.

YAMAMOTO, P. T.; ROBERTO, S. R.; PRIA JUNIOR, W. D.; FELIPPE, M. R.; MIRANDA, V. S.; TEIXEIRA, D. C.; LOPES, J. R. S. Transmissão de *Xylella fastidiosa* por cigarrinhas *Acrogonia virescens* e *Homalodisca ignorata* (Hemiptera: Cicadellidae) em plantas cítricas. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 28, p. 178-181, 2002a.