

**EFEITO DA ESTAÇÃO DO ANO NO SUCESSO DE
INFECÇÃO POR *Xylella fastidiosa* EM CITROS
[*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]**

ÉRICA FRAZÃO PEREIRA

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura
"Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Doutor em Ciências, Área de
Concentração: Entomologia.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Junho - 2005

**EFEITO DA ESTAÇÃO DO ANO NO SUCESSO DE
INFECÇÃO POR *Xylella fastidiosa* EM CITROS
[*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]**

ÉRICA FRAZÃO PEREIRA
Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. **JOÃO ROBERTO SPOTTI LOPES**

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura
"Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Doutor em Ciências, Área de
Concentração: Entomologia.

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo - Brasil
Junho - 2005

Aos meus Pais,

Jomar da Paes Pereira e Regina Coeli Frazão Pereira,

Por me ensinarem o caminho da honestidade e responsabilidade

E sobretudo pelo constante apoio e amor.

Dedico

Aos meus irmãos **Gláucia, Natali, Jomar Jr. e Raphael** e

À minha querida sobrinha **Júlia Cristina**

Ofereço

"Se eu pudesse deixar algum presente a você, deixaria aceso o sentimento de amor à vida dos seres humanos. A consciência de aprender tudo o que nos foi ensinado pelo tempo afora. Lembraria os erros que foram cometidos para que não mais se repetissem. A capacidade de escolher novos rumos. Deixaria para você, se pudesse, o respeito àquilo que é indispensável: além do pão, o trabalho. Além do trabalho, a ação. E quando tudo mais faltasse, um segredo: o de buscar no interior de si mesmo a resposta e a força para encontrar a saída".

Mahatma Gandhi

AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte infinita de sabedoria, por sua presença e apoio incondicional em todos os momentos de minha vida.

Ao Prof. Dr. João Roberto Spotti Lopes, pela orientação, confiança, amizade e principalmente por seu entusiasmo como pesquisador que foi imprescindível para a concretização deste trabalho e para meu desenvolvimento profissional.

Ao Prof. Dr. Armando Bergamim Filho pela coordenação do projeto e auxílio na elaboração do plano de tese e condução dos experimentos.

Ao Prof. Dr. Gilberto Casadei de Baptista pelo empréstimo de equipamentos e ao Malagueta e ao André Franco pela realização de análises dos componentes químicos da seiva do xilema.

Ao Prof. Dr. José Eduardo Corrente do Departamento de Ciências Exatas e à pesquisadora Ivani Pozar Otsuk do Instituto de Zootecnia de Nova Odessa, pelo auxílio com a execução das curvas de sobrevivência de cigarrinhas e nas interpretações dos resultados.

Aos professores do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da ESALQ/USP, pelos ensinamentos transmitidos;

Ao Prof. Celso Omoto e demais professores responsáveis pela disciplina Entomologia Geral, pela possibilidade de participar do PAE de uma maneira mais ativa e atuante que muito contribuiu para minha formação profissional.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos, ao Fundo de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Fundo Paulista de Citricultura (Fundecitrus), pelo apoio financeiro aos experimentos.

Ao pesquisador Dr. Pedro T. Yamamoto, pelo empréstimo de equipamentos para coleta de seiva.

Ao Prof. Dr. Paulo Yoshio Kageyama, diretor da Diretoria de Conservação da Biodiversidade (MMA) e ao Dr. Bráulio Ferreira de Souza Dias, gerente da Diretoria de Conservação da Biodiversidade (MMA) pela compreensão nos momentos de ausência para elaboração da parte textual da tese e pelo apoio e incentivo.

Ao Dr. Mauro Pichorim pelo auxílio nas análises estatísticas e interpretação dos resultados.

À bibliotecária Eliana M. Garcia da Divisão de Biblioteca e Documentação/ESALQ, pela colaboração na correção das referências bibliográficas e normas da tese.

À equipe de trabalho do Laboratório de Insetos Vetores: Eduardo, Fernanda, Flávio, Helen, Marcelo, Maria Teresa, Miguel, Paulo César, Rodrigo Marques, Simone, Teresinha, Thiago e especialmente, a Carla e a Daniele, pelo auxílio na realização e avaliação dos experimentos e pela convivência harmoniosa que foram imprescindíveis para a concretização deste trabalho.

Aos funcionários do Depto. de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da ESALQ/USP, pelo apoio e momentos de descontração.

Aos colegas de curso que sofreram com nossas dificuldades, nos apoiaram nos momentos difíceis, sorriram e comemoraram todas as conquistas alcançadas.

Aos colegas da Diretoria de Conservação da Biodiversidade (MMA) pelo apoio, incentivo, carinho, momentos de descontração e auxílio durante minhas ausências, principalmente a Marina Landeiro (companheira de projeto), Danielle Blanc, Viviane Souza, Leonardo Luitgars, Francoly Thiago, Ana Lúcia Prates, Maria Goreth, Simone Wolff, Mauro Pichorim, Silvia Godoy e Raquel Resende.

O meu mais profundo obrigado!!!

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	xii
RESUMO.....	xiii
SUMMARY.....	xv
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Clorose Variegada dos Citros.....	4
2.2 O agente causal da CVC	5
2.3 Transmissão de <i>X. fastidiosa</i>	8
2.3.1 Espécies vetoras e mecanismos de transmissão	9
2.4 Dinâmica populacional dos vetores de <i>X. fastidiosa</i> em citros	11
2. 5 Aspectos fisiológicos relacionados a plantas hospedeiras de <i>X. fastidiosa</i>	12
2. 6 Epidemiologia de doenças causadas por <i>X. fastidiosa</i>	16
2. 7 O manejo da CVC.....	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Experimentos de campo	21
3.1.1 Efeito da estação e da condição climática em infecções primárias de <i>X. fastidiosa</i>	21
3.1.2 Avaliação do potencial hídrico e da composição química do xilema de citros em diferentes épocas do ano.....	25
3.2. Experimentos em condições controladas.....	27
3.2.1 Efeito do déficit hídrico do solo e temperatura sobre a infecção por <i>X. fastidiosa</i>	27

3.2.1.1 Ensaio com mudas de <i>C. sinensis</i> em câmara de crescimento.....	27
3.2.1.2 Ensaio com “seedlings” de <i>C. sinensis</i> em câmara de crescimento.....	29
3.2.2 Efeito das condições hídricas do solo e da temperatura sobre a alimentação e sobrevivência do inseto vetor.....	32
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4.1 Experimentos de campo.....	34
4.1.1 Efeito da estação e da condição climática em infecções primárias de <i>X. fastidiosa</i>	34
4.1.2 Avaliação do potencial hídrico e da composição química do xilema de citros em diferentes épocas do ano.....	44
4.1.3 Influência das mudanças climáticas ao longo do ano na bioquímica da seiva do xilema de citros.....	48
4.2 Experimentos sob condições controladas.....	59
4.2.1 Efeito do déficit hídrico do solo e temperatura sobre a infecção por <i>X. fastidiosa</i>	59
4.2.1.1 Ensaio com mudas de <i>C. sinensis</i> em câmara de crescimento e em casa-de-vegetação	59
4.2.1.2 Ensaio em câmara de crescimento inoculando “seedlings” de citros.....	65
4.2.2 Influência das condições hídricas do solo e da temperatura na sobrevivência e alimentação do inseto vetor em “seedlings” de citros.....	67
4.3 Considerações finais.....	75
5 CONCLUSÕES.....	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78

LISTA DE FIGURAS

	Página
1 Detecção de <i>X. fastidiosa</i> em ramos de árvores cítricas por isolamento primário em meio de cultura após 6 meses da inoculação mecânica Gavião Peixoto (SP). Proporções sobre barras representam o número de ramos infectados sobre o número total de ramos avaliados, desconsiderando-se aqueles de plantas que apresentaram ramos-testemunha positivos para <i>X. fastidiosa</i> ou cujos isolamentos resultaram em contaminação	36
2 Detecção de <i>X. fastidiosa</i> em ramos de árvores cítricas por isolamento primário em meio de cultura e/ou PCR após 6 meses da inoculação mecânica Gavião Peixoto (SP). Proporções sobre barras representam o número de ramos infectados sobre o número total de ramos avaliados, desconsiderando-se aqueles de plantas que apresentaram ramos-testemunha positivos para <i>X. fastidiosa</i> ou cujos isolamentos resultaram em contaminação.....	37
3 Detecção parcial de <i>X. fastidiosa</i> em ramos de árvores cítricas por isolamento primário em meio de cultura, após 12 meses da inoculação mecânica em Gavião Peixoto (SP).....	39
4 Detecção parcial de <i>X. fastidiosa</i> em ramos de árvores cítricas por isolamento primário em meio de cultura e/ou PCR, após 12 meses da inoculação mecânica em Gavião Peixoto (SP).....	39
5 Percentual cumulativo de detecção de <i>X. fastidiosa</i> em ramos de árvores cítricas por isolamento primário em meio de cultura e/ou por PCR após 12 meses da inoculação mecânica em Gavião Peixoto (SP).....	40

6 A) Precipitação máxima, média e mínima e B) Balanço hídrico sequencial por Thornthwait & Mather (1995) da região de Gavião Peixoto (SP), plotado através do programa Bhseq V5.0 de 1999, desenvolvido pelo Depto. de Física do solo da ESALQ/USP (Ex: excedente hídrico; DEF: déficit hídrico; RET: retirada de água pelas plantas; REP: reposição de água). Janeiro/2002-Fevereiro/2004. As setas na Fig. 6B indicam as datas de inoculação mecânica de <i>X. fastidiosa</i>	41
7 Volume médio de seiva de xilema extraído de ramos cítricos nas diferentes datas de inoculação em Gavião Peixoto (SP).....	46
8 Potencial hídrico médio ($\pm$ EPM) em ramos de árvores cítricas nas 8 datas de inoculação em Gavião Peixoto (SP).....	46
9 Relação entre o volume médio de seiva do xilema extraída por ramo e o potencial hídrico médio (bar) dos ramos cítricos em um pomar de Gavião Peixoto. A) Quadrante leste; B) Quadrante oeste.....	47
10 Concentração de aminoácidos na seiva do xilema extraída de ramos cítricos sadios em diferentes épocas do ano, no município de Gavião Peixoto (SP). A) outono (abril e maio/2002); B) inverno (julho e agosto/2002); C) primavera (outubro e dezembro/2002); D) verão (janeiro e fevereiro/2003).....	55
11 Concentração relativa média de aminoácidos na seiva do xilema extraída de ramos cítricos sadios em diferentes épocas do ano, no município de Gavião Peixoto (SP). A) outono (abril e maio/2002); B) inverno (julho e agosto/2002); C) primavera (outubro e dezembro/2002); D) verão (janeiro e fevereiro/2003)...	56
12 Concentração média de ácidos orgânicos na seiva de ramos sadios de citros extraída em diferentes épocas do ano, no município de Gavião Peixoto (SP). A) outono (abril e maio/2002); B) inverno (julho e agosto/2002); C) primavera (outubro e dezembro/2002); D) verão (janeiro e fevereiro/2003).....	57
13 Concentração média de carboidratos na seiva do xilema extraída de ramos cítricos em diferentes épocas do ano, no município de Gavião Peixoto (SP), no período de abril/2002 a fevereiro/2003.....	58

14 Detecção de <i>X. fastidiosa</i> por cultura (A) e PCR (B) após 2 meses da inoculação mecânica em mudas cítricas mantidas sob capacidade de campo e estresse hídrico em condições simuladas de verão e inverno em câmara de crescimento. Proporções sobre as barras representam o número de plantas infectadas sobre o total de plantas inoculadas	60
15 Detecção de <i>X. fastidiosa</i> por cultura (A) e PCR (B) após 2 meses da inoculação mecânica em mudas cítricas mantidas sob capacidade de campo e estresse hídrico em condições simuladas de verão e inverno em casa-de-vegetação. Proporções sobre as barras representam o número de plantas infectadas sobre o total de plantas inoculadas.....	62
16 Volume médio de seiva de xilema extraída (A) e potencial hídrico médio (B) de plantas cítricas sadias mantidas sob capacidade de campo e estresse hídrico nas condições simuladas de verão e inverno em câmara de crescimento.....	63
17 Volume médio de seiva de xilema extraída (A) e potencial hídrico médio (B) de plantas cítricas sadias mantidas sob capacidade de campo e estresse hídrico nas condições simuladas de verão e inverno em casa-de-vegetação.....	64
18 Percentual de sobrevivência ao longo do tempo de <i>O. facialis</i> em “seedlings” de citros mantidos sob estresse hídrico e capacidade de campo, nas condições simuladas de inverno (A) e verão (B).....	69
19 Curvas de sobrevida ao longo do tempo (h) de <i>O. facialis</i> em “seedlings” de citros mantidos sob capacidade de campo (estrato=CCT) e estresse hídrico (estrato=EH), nas condições simuladas de inverno (A) e verão (B).....	70
20 Volume médio de “honeydew” excretado por <i>O. facialis</i> durante 96 h de confinamento em mudas cítricas mantidas sob capacidade de campo e estresse hídrico, nas condições simuladas de temperatura de verão e de inverno. Letras diferentes, dentro de uma mesma condição de temperatura, diferem estatisticamente entre si pelo teste <i>t</i> ($P < 0,05$). Barras sobre as colunas representam o erro padrão da média.....	71
21 Percentual cumulativo de indivíduos de <i>O. facialis</i> que excretaram	

“honeydew” no período de 96 h de confinamento em “seedlings” de citros mantidos sob capacidade de campo e estresse hídrico nas condições simuladas de inverno (A) e verão (B).....

LISTA DE TABELAS

	Página
1 Épocas e datas das inoculações mecânicas de <i>X. fastidiosa</i> em ramos de árvores de laranja doce em Gavião Peixoto (SP).....	22
2 Percentual de amostras foliares de “seedlings” de citros inoculados com <i>X. fastidiosa</i> mantidos em diferentes condições de temperatura e umidade, avaliadas por isolamento em meio de cultura PWG e por PCR.....	66
3 Média populacional de <i>X. fastidiosa</i> em amostras foliares de “seedlings” de citros inoculados, mantidos em diferentes condições de temperatura e umidade, por isolamento em meio de cultura.....	66

EFEITO DA ESTAÇÃO DO ANO NO SUCESSO DE INFECÇÃO POR *Xylella fastidiosa* EM CITROS [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]

Autora: ÉRICA FRAZÃO PEREIRA

Orientador: Prof. Dr. JOÃO ROBERTO SPOTTI LOPES

RESUMO

A determinação de épocas de maior risco de disseminação da bactéria *Xylella fastidiosa* representa um aspecto básico para se aprimorar o manejo da Clorose Variegada dos Citros (CVC), que é uma das principais doenças afetando a citricultura. Nesta pesquisa foram realizados estudos em campo e laboratório para investigar o efeito da época do ano e de condições edafo-climáticas sobre: a) estabelecimento de infecções iniciais de *X. fastidiosa* em citros; b) potencial hídrico e composição química da seiva do xilema de citros; e c) alimentação e sobrevivência do inseto vetor. O estudo de campo foi realizado em pomar de laranja doce com 5 anos de idade no município de Gavião Peixoto (SP), inoculando-se mecanicamente *X. fastidiosa* em oito épocas distintas (160 ramos cítricos por época), representativas das estações de outono, inverno, primavera e verão. Verificou-se que o sucesso e a velocidade de estabelecimento de infecções primárias de *Xylella fastidiosa* nos ramos são influenciados pela época em que ocorre a inoculação. Após 12 meses de avaliações, a inoculação realizada no mês mais frio do ano (julho) resultou em um percentual de infecção (0,9%) mais baixo do que o obtido

nas demais épocas de inoculação, que incluíram os meses de agosto (11,4%), outubro (11,1), dezembro (15,7%), janeiro (12%), fevereiro (15%), abril (23,7%) e maio (23,2%). Infecções originadas de inoculações em meses mais quentes e chuvosos (dezembro, janeiro e fevereiro) foram detectadas com maior frequência por isolamento em meio de cultura após 6 meses, evidenciando uma colonização bacteriana mais rápida no período de final de primavera e verão. Em contraste, infecções resultantes de inoculações em abril, maio e agosto, foram detectadas com maior frequência por isolamento somente após 12 meses, evidenciando uma colonização mais lenta por *X. fastidiosa* em épocas mais secas e de temperaturas mais amenas. As árvores cítricas apresentam elevado potencial hídrico nos vasos do xilema durante o período de julho a outubro (inverno e início da primavera), quando há déficit hídrico no solo. O volume de seiva extraída do xilema de ramos cítricos por uma câmara de Scholander é inversamente proporcional ao potencial hídrico, sendo menor na época seca em relação ao período chuvoso. Observou-se variação na composição química da seiva do xilema de citros durante o ano, havendo uma maior concentração de aminoácidos no inverno e outono, em relação à primavera e verão; porém, observou-se um perfil mais balanceado desses compostos na primavera. Entre os ácidos orgânicos, o oxálico foi mais abundante, ocorrendo em maior concentração no verão e menor no inverno. Os teores de glicose, frutose e sacarose no xilema não variaram significativamente entre as estações do ano. Inoculações realizadas em mudas cítricas em câmara de crescimento e casa de vegetação mostraram que o déficit hídrico é um fator desfavorável ao estabelecimento de infecções primárias de *X. fastidiosa*, principalmente na condição de temperatura típica de inverno (19°C). A temperatura ambiente e o balanço hídrico do solo influenciam a sobrevivência e alimentação da cigarrinha vetora, *Oncometopia facialis* (Signoret) (Hemiptera: Cicadellidae), em mudas cítricas. Há maior excreção de “honeydew”, que é uma medida indireta da ingestão de seiva, em temperatura típica de verão (24°C) em relação à de inverno (19°C). O estresse hídrico reduz a sobrevivência e a taxa de ingestão de *O. facialis*. O conjunto de informações obtidas na presente pesquisa reforça a hipótese de que épocas mais quentes e chuvosas são mais favoráveis à transmissão do patógeno e estabelecimento de infecções iniciais em citros.

EFFECT OF SEASON ON INFECTION SUCCESS BY *Xylella fastidiosa* IN CITRUS [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]

Author: ÉRICA FRAZÃO PEREIRA

Adviser: Prof. Dr. JOÃO ROBERTO SPOTTI LOPES

SUMMARY

The identification of seasons of higher risk of spread of the bacterium *Xylella fastidiosa* is a basic step to improve management of Citrus variegated chlorosis (CVC), which is a major disease affecting citriculture. In this research, field and laboratory studies were carried out to investigate the effects of season and environmental conditions on: a) establishment of primary infections of *X. fastidiosa* in citrus; b) water potential and chemical composition of citrus xylem sap; and c) feeding and survival of the insect vector. The field study was carried out in a 5-year old sweet orange grove, in Gavião Peixoto (SP). *X. fastidiosa* was mechanically inoculated in 160 healthy citrus branches at eight times of the year, during autumn, winter, spring and summer. The establishment of primary infections was influenced by the time of inoculation. After 12 months of observation, the inoculation done during the coldest month (July) resulted in a lower rate of infection (0.9%) than in the other times of the year, including August (11.4%), October (11.1%), December (15.7%), January (12%), February (15%), April (23,7%) and May (23,2%). Infections resulting from inoculations in months with higher temperature and rainfall (December, January and February) were detected with higher

frequency by isolation in culture medium after 6 months, indicating that bacterial colonization was faster during late spring and summer. In contrast, infections resulting from inoculations in April, May and August were detected with higher frequency by culturing only after 12 months, suggesting that colonization by *X. fastidiosa* was slower during the drier and colder autumn and winter months. The citrus trees showed a higher water potential in xylem vessels during the period of July through October (winter and early spring), when there is water deficit in the soil. The volume of xylem sap extracted from citrus branches by using a Scholander chamber was negatively correlated with the water potential; thus, lower volumes of xylem sap were extracted in the dry season. The chemical composition of xylem sap varied over the year, with higher concentrations of amino acids in the winter and autumn. However, the amino acid profile was more balanced in the spring. Among the organic acids, oxalic acid was the most abundant, and was more concentrated in the summer. The concentrations of glucose, fructose and sucrose did not vary significantly over the year. Inoculations carried out in citrus seedlings under growth chamber and greenhouse conditions showed that water deficit in the soil is a limiting factor for establishment of primary infections of *X. fastidiosa*, particularly under the typical mean temperature (19°C) of winter in São Paulo State. Temperature and soil water balance also influenced the survival and feeding of the sharpshooter vector, *Oncometopia facialis* (Signoret) (Hemiptera: Cicadellidae) on citrus seedlings. Honeydew excretion, which is an indirect measure of sap ingestion, was higher under simulated summer temperature (24°C) than under winter temperature (19°C). Water deficit in the soil reduced the rates of sap ingestion and survival of *O. facialis*. The information gained in this research supports the hypothesis that periods of higher temperatures and rainfall are more favorable for pathogen transmission and establishment of early infections in citrus.

1 INTRODUÇÃO

A Clorose Variegada dos Citros (CVC), causada pela bactéria *Xylella fastidiosa* (Chang et al., 1993; Lee et al., 1993), é considerada uma das doenças de maior importância nos pomares de citros do Brasil (Lima, 1996), apresentando rápida disseminação nas regiões citrícolas de praticamente todo o território nacional (Rossetti et al., 1990; Tubelis et al., 1993). As perdas anuais de produção no Estado de São Paulo, maior produtor brasileiro, são estimadas em 100 milhões de dólares (Lopes et al., 2004). Todas as cultivares de laranja doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] são afetadas pela doença (Laranjeira et al., 1995), além de algumas tangerinas, tangores, tangelos e uma laranja azeda (Pompeu Jr et al., 1998; Laranjeira et al., 1998). A doença adquiriu uma dimensão tal que a estirpe de *X. fastidiosa* causadora da CVC foi o primeiro patógeno de planta a ter seu DNA sequenciado e recentemente publicado por Simpson et al. (2000).

X. fastidiosa pode ser transmitida em citros através de mudas e borbulhas infectadas (Lima et al., 1996; Sempionato et al., 1997), sendo que em sua disseminação natural e penetração em tecido vegetal suscetível depende obrigatoriamente de insetos vetores (Lopes, 1996). Os vetores são cigarrinhas pertencentes à família Cicadellidae, subfamília Cicadellinae (Roberto et al., 1996; Krüger et al., 1998). Também são conhecidos vetores da família Cercopidae, porém para outras estirpes da bactéria (Turner & Pollard, 1959; Frazier, 1965; Purcell, 1989).

Devido ao importante papel que a citricultura desempenha no país, como fonte geradora de recursos e divisas, torna-se imprescindível o desenvolvimento de tecnologia adequada para o convívio com a doença, visando minimizar perdas. Uma grande evolução nos conhecimentos do patossistema *X. fastidiosa*-citros ocorreu nos últimos

anos, através de estudos em diferentes áreas, porém, ainda existe a necessidade de trabalhos básicos, como a determinação da época crítica de transmissão da bactéria e infecção de plantas cítricas no campo.

No manejo da CVC estão sendo adotadas basicamente três medidas fitossanitárias para reduzir as perdas anuais: a) instalação de pomares com mudas sadias; b) redução do inóculo em pomares infectados através da poda de ramos com sintomas iniciais e/ou eliminação de plantas com infecção sistêmica generalizada; e c) controle químico dos vetores (De Negri & Garcia Júnior, 1993). Inseticidas têm sido usados para o controle das cigarrinhas em viveiros e pomares cítricos, demandando pulverizações freqüentes com produtos pouco seletivos, em áreas extensas, o que pode causar desequilíbrio biológico e pôr em risco o manejo integrado de pragas dos citros.

Até o momento não foi descoberta nenhuma variedade de laranja doce resistente a CVC. Sabe-se que a faixa etária mais suscetível estende-se de 0 a 4 anos de idade (Ayres, 2000), porém, como o citros é uma planta perene, apresenta um amplo período de exposição aos vetores no campo. Onze espécies de cigarrinhas vetoras de *X. fastidiosa* em plantas cítricas já foram relatadas (Redak et al., 2004), sendo encontradas no campo durante praticamente o ano todo (Paiva et al., 1996; Yamamoto, 1998, Pereira, 2000). Estas possuem pouca especificidade hospedeira (Lopes, 1999) e uma vasta gama de espécies vegetais nas quais podem se alimentar e reproduzir (Lopes, 1999; Lopes & Giustolin, 2000). A flutuação populacional das cigarrinhas vetoras em pomares cítricos foi relacionada à precipitação pluviométrica e ao déficit hídrico, constatando-se que em anos com distribuição normal de chuvas, o início da colonização dos pomares ocorre em meados da primavera, com picos populacionais mais freqüentes na primavera e verão (Roberto & Yamamoto, 1998).

Recentemente foram realizados alguns estudos visando identificar épocas de maior sucesso de inoculação e multiplicação da bactéria nas plantas cítricas em condições de campo. Inoculações efetuadas nos meses de fevereiro e dezembro resultaram em um maior número de ramos positivos, com maior recuperação da bactéria por isolamento em meio de cultura do que inoculações nos meses de maio e setembro (Pereira, 2000). Entretanto, o pequeno número de épocas avaliadas e de ramos

inoculados nesse estudo preliminar não permitiu delimitar os períodos de maior sucesso de infecção por *X. fastidiosa*.

Sabendo-se que os vetores apresentam picos populacionais mais freqüentes na primavera e verão (Roberto & Yamamoto, 1998) e que a sobrevivência de *X. fastidiosa* em ramos cítricos foi maior após sua inoculação em dezembro e fevereiro (Pereira, 2000), pode-se sugerir que o período mais quente e chuvoso do ano é mais favorável à transmissão por cigarrinhas e ao estabelecimento de infecções primárias deste patógeno em citros.

Com o objetivo de investigar esta hipótese, nesta pesquisa de doutoramento foram realizados experimentos em campo e laboratório buscando-se avaliar o efeito das estações do ano (seca x chuvosa) sobre aspectos fisiológicos e nutricionais do xilema da planta cítrica, sobre o comportamento alimentar do inseto vetor e o estabelecimento de infecções iniciais de *X. fastidiosa*. Com os resultados desta pesquisa, espera-se definir o(s) período(s) de maior risco de disseminação da CVC, em que as medidas de controle do vetor e de manejo da doença devem ser reforçadas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Clorose variegada dos citros

A CVC, considerada uma das doenças de maior importância nos pomares cítricos do Brasil (Lima et al., 1996), apresentou rápida disseminação nas regiões citrícolas de praticamente todo o território nacional (Rossetti et al., 1990; Tubelis et al., 1993). A incidência da CVC vem aumentando desde 1996, com perdas anuais no Estado de São Paulo estimadas em R\$ 235 milhões, incluindo o custo de manejo (CVC, 2000). A doença vem sendo associada ao estresse hídrico e temperaturas elevadas, sendo que as regiões citrícolas situadas ao norte e noroeste do Estado de São Paulo são as mais afetadas, pois demonstra sintomas severos de CVC acompanhados de altas temperaturas praticamente o ano todo (Salva et al., 1995; Fundecitrus, 2002). Todas as cultivares de laranja doce são suscetíveis à doença (Laranjeira et al., 1995), além de algumas tangerinas, tangores e uma laranja azeda (Pompeu Jr. et al, 1998; Laranjeira et al., 1998).

As árvores afetadas apresentam sintomas de clorose foliar, similares à deficiência de zinco. Folhas novas não mostram sintomas, porém as velhas, apresentam uma clorose variegada distinta. Na face abaxial das folhas surgem lesões de cor marrom-clara que correspondem às áreas cloróticas amarelas na face adaxial. As áreas cloróticas podem tornar-se marrom-escuras ou necróticas, podendo coalescer (Rossetti et al., 1990; Lee et al., 1993). Plantas severamente afetadas apresentam atrofia e diminuição da copa (Lee et al., 1993; Laranjeira, 1997). Pode ainda ocorrer queda de folhas, morte de ponteiros, encurtamento de entrenós e aumento de brotações nas gemas dos ramos afetados (Laranjeira, 1997). Os frutos de árvores afetadas são pequenos e duros, apresentam alto

conteúdo de açúcar, amadurecem precocemente e a produção é reduzida (Rossetti et al., 1990; Lee et al., 1993; Huang & Chiaradia, 1998).

A baixa produtividade observada em plantas infectadas pode estar relacionada a baixas taxas fotossintéticas, resultantes de lesões foliares necróticas (Machado et al., 1994), de um desbalanço nutricional e de reguladores de crescimento, toxinas (Goodwin et al., 1988; Hopkins, 1989) e baixa condutância estomática (Duniway, 1976; Hopkins, 1989; Machado et al., 1994).

As plantas cítricas podem ser afetadas desde o viveiro até 10 anos de idade (Carvalho, 1996), porém, dentro desse período, as faixas etárias mais suscetíveis são as intermediárias (3 a 5 anos e 6 a 10 anos) (Ayres, 2000). A sobreexortia de borbulhas sadias em plantas contaminadas demonstra sintomas de CVC após 11 meses (Carvalho et al., citados por Rossetti et al., 1997). Sintomas em mudas de citros, utilizando cigarrinhas infectivas, aparecem a partir de 6 meses após a inoculação (Lopes et al., 1996).

2.2 O agente causal da CVC

A *X. fastidiosa* é uma bactéria endofítica, gram-negativa e limitada ao xilema. Possui forma de bastonete, com 0,25 a 0,35 µm de diâmetro por 0,9 a 3,5 µm de comprimento (forma alongada) e parede celular enrugada. Estritamente aeróbica, apresenta crescimento ótimo entre 26 e 28°C e pH entre 6,5 e 6,9, além de conteúdo G + C (guanina + citosina) de 51 a 53 mol % (Wells et al., 1987).

Além da cultura de citros, a *X. fastidiosa* foi detectada em várias espécies de plantas arbóreas, perenes e herbáceas, podendo ou não manifestar sintomas (Hopkins & Adlerz, 1988; Hopkins, 1989). A *X. fastidiosa* causa doenças em várias espécies de valor econômico, como videira, pessegueiro, ameixeira, amendoeira, alfafa, pereira e cafeeiro (Hopkins, 1989; Purcell, 1994; Hill & Purcell, 1995a; Purcell, 1997; Paradela Filho et al., 1995). Quando patogênica, a bactéria pode bloquear o movimento de água e translocação de seiva no interior do xilema (Gravena et al., 1997), porém, apresenta-se distribuída de forma irregular nesses vasos (Hill & Purcell, 1995a).

No Brasil, além da CVC, são relatadas duas outras doenças causadas por *X. fastidiosa*, a escaldadura das folhas da ameixeira (Kitajima et al., 1975) e a requeima do cafeeiro (Paradela Filho et al., 1995).

As bactérias limitadas ao xilema localizam-se em células ou tecidos específicos, entretanto, elas tendem a se acumular em algumas partes da planta. Isso frequentemente varia com o hospedeiro e está relacionado ao tipo de sintoma expresso (Purcell & Hopkins, 1996). A *X. fastidiosa* para se multiplicar e distribuir a partir do ponto de infecção colonizando o xilema, necessita de um transporte de água através de vasos compostos de células mortas e lignificadas. Esses vasos são interconectados por canais ou pontuações que permitem a passagem da seiva do xilema mas bloqueiam a passagem de objetos maiores devido à presença de uma membrana pontuada (Tyree & Zimmerman, 2002, citados por Newman et al., 2003). As células bacterianas se aderem às paredes dos vasos e multiplicam formando colônias como um biofilme, que pode ser tão grande a ponto de bloquear o transporte de água (Tyson et al., 1985). Esse biofilme de adesão é composto por exopolissacarídeos e pode estar associado à virulência das estirpes (Simpson et al., 2000). A descoberta dessa substância de adesão foi enfatizada após o sequenciamento genômico da bactéria (Simpson et al., 2000) e muitos trabalhos foram realizados com o objetivo de determinar seu papel e importância no intuito de desenvolver novas estratégias de controle do patógeno. *X. fastidiosa* pode ser encontrada em duas situações: fora das células e em biofilme (aderidas às células). Segundo Souza (2004), a maioria dos genes expressos na condição de biofilme pode ser associada à produção e detoxificação de toxinas e adaptação para crescimento em condições atípicas. Além disso, a formação de biofilme foi associada ao mecanismo de patogenicidade da bactéria.

Newman et al. (2004) demonstraram em seus trabalhos que uma molécula sinal difusível é requerida para a formação do biofilme tanto no inseto vetor quanto nas plantas após a transmissão do patógeno. Através de estudos com raças mutantes de *X. fastidiosa* descobriram que estes são mais virulentos do que a raça selvagem quando mecanicamente inoculados dentro das plantas, sendo que os biofilmes formados pelos mutantes nas plantas diferem arquitetonicamente dos biofilmes formados em insetos.

Esse trabalho relata que existe a necessidade de uma sinalização de célula para célula para a transmissão por vetores e que a identificação dos genes regulados pelos mutantes pode elucidar os fatores envolvidos na transmissão e na formação do biofilme nos insetos.

Segundo Newman et al. (2003) a extensão do bloqueio dos vasos pela colonização bacteriana está altamente relacionada com a expressão de sintomas. Nesse trabalho os autores observaram que uma alta proporção de vasos colonizados ($\geq 80\%$) por *X. fastidiosa* não causaram bloqueios nas folhas infectadas, e ainda apresentaram colônias pequenas ou células solitárias, sugerindo que o bloqueio dos vasos não é uma estratégia de colonização utilizada pelo patógeno, e mais, é um produto causado por colonização endofítica. Os autores apresentaram evidências de que *X. fastidiosa* movimenta-se através da pontuação dos vasos para os vasos vizinhos e propuseram que o movimento entre os vasos é a estratégia chave de colonização, cuja falha resulta em entupimento do vaso e doença. A anatomia e morfologia dos vasos do xilema podem ser associadas com resistência à *X. fastidiosa* (Queiroz-Voltan et al., 1998; Queiroz-Voltan & Paradela Filho, 1999). Citros, que foi o hospedeiro mais resistente nesse trabalho, possui vasos pontuados, que são mais resistentes ao fluxo de água e movimento lateral (van Leperen et al., 2000). Os vasos pontuados podem impor maior resistência à colonização por *X. fastidiosa*.

Alves et al. (2004) examinaram os pecíolos foliares de ameixeira, cafeeiro e laranja doce infectados com *X. fastidiosa* através de microscopia eletrônica de varredura. Nesse trabalho foi comparado o percentual de vasos colonizados com a severidade de sintomas. O percentual de vasos colonizados variou de 10,9 (M) a 38% (S), 26 (M) a 51,6% (S) e 8 (M) a 11,8% (S) para ameixeira, cafeeiro e citros, respectivamente, e não variaram de acordo com a posição no interior do pecíolo. Os sintomas severos refletiram de forma consistente numa alta proporção de vasos colonizados em cafeeiro e ameixeira, mas não em citros. O fato de que o percentual de vasos colonizados em cafeeiro Ter sido maior do que nas duas outras espécies sugere que o cafeeiro pode ser mais suscetível à colonização por *X. fastidiosa*. Citros pode ser o hospedeiro mais resistente dessas três espécies. Juntamente, os dados apresentados nesse trabalho, sugerem que as

características anatômicas do hospedeiro têm sido negligenciadas no passado e devem ser cuidadosamente avaliadas a partir de agora.

Vários procedimentos são utilizados para a detecção de *X. fastidiosa*, como o “Enzyme Linked Immunosorbent Assay” (ELISA) (Nomé et al., 1980; Sherald & Lei, 1991; Raju et al., 1983; Hopkins & Adlerz, 1988), “Polimerase Chain Reaction” (PCR) (Minsavage et al., 1994; Pooler & Hartung, 1995), isolamento em meio de cultura (Davis et al., 1980; Wells et al., 1981; Lee et al., 1983; Hopkins & Adlerz, 1988; Leite Jr & Leite, 1991; Hill & Purcell, 1995a), microscopia (Rossetti et al., 1990; Hopkins & Adlerz, 1988), DIBA (Lee et al., 1992) e Imunocaptura magnética (Pooler et al., 1997).

2.3 Transmissão de *X. fastidiosa*

A transmissão de *X. fastidiosa* em plantas cítricas de viveiros ou de campo, na vegetação espontânea dos pomares ou áreas adjacentes a esses (Gravena et al., 1997; Paiva et al., 1996; Yamamoto, 1998) pode ocorrer naturalmente por cigarrinhas vetoras pertencentes às famílias Cicadellidae (subfamília Cicadellinae) e Cercopidae (Turner & Pollard, 1959; Frazier, 1965; Purcell, 1989), que se alimentam no xilema de plantas infectadas. Mudanças e borbulhas contaminadas (Lima et al., 1996; Sempionato et al., 1997); enxertia natural de raízes (He et al., 2000); encostia de mudas infectadas (Salibe, 2001); enxertia de pecíolos (Salibe, 2001); garfagem lateral de ramos (Salibe, 2001) e inoculação com agulha (Almeida et al., 2001) também podem transmitir a bactéria de plantas doentes para plantas saudáveis.

2.3.1 Espécies vetoras e mecanismos de transmissão

A transmissão de *X. fastidiosa* por vetores, em citros, foi demonstrada inicialmente para as cigarrinhas *Acrogonia* sp. (Stal), *Dilobopterus costalimai* (Young) e *Oncometopia facialis* (Signoret) (Lopes et al., 1996; Roberto et al., 1996). Posteriormente, outras oito espécies de Cicadélíneos foram relatadas como vetoras: *Bucephalogonia xanthophis* (Berg) e *Plesiommatia corniculata* (Young) por Krügner et al. (1998), *Acrogonia virescens* (Metcalf), *Ferrariana trivittata* (Signoret), *Homalodisca ignorata* (Melichar), *Macugonalia leucomelas* (Walker), *Parathona gratiosa* (Blanchard) e *Sonesimia grossa* (Signoret) (Descobertos, 2000).

A transmissão pelos vetores pode ser dividida nas seguintes fases sequenciais: aquisição, latência e inoculação (Gravena et al., 1997). O período de acesso à aquisição (PAA) é definido como o período que um vetor não infectado tem acesso a uma fonte de inóculo para a aquisição de um agente infeccioso. O período latente é o tempo requerido entre a aquisição de um patógeno pelo vetor e a sua transmissão para a planta. Uma vez adquirida a bactéria, as cigarrinhas adultas podem transmiti-la para as plantas durante praticamente toda a vida (Severin, 1949). Apenas nas fases ninfais ocorre perda da capacidade de transmissão da bactéria, devido às ecdises (Purcell & Finlay, 1979), quando ocorrem as trocas das cutículas do aparelho bucal, e tubo digestivo anterior (estomodéu), que alojam a bactéria (Purcell, 1994). Não foi verificada a passagem transovariana da bactéria (Freitag, 1951).

As cigarrinhas da família Cicadellidae são reconhecidamente as mais importantes vetoras de *X. fastidiosa*, possuindo representantes relativamente grandes e de cabeça proeminente, com uma musculatura desenvolvida para succionar o conteúdo dos vasos xilemáticos, que funcionam sob pressão negativa (Purcell, 1979; 1989). Além disso, as cigarrinhas devem possuir uma câmara filtro bastante evoluída, que lhes permita succionar uma grande quantidade de líquidos, sob forte pressão negativa, e com alta eficiência de assimilação de nutrientes, já que a seiva do xilema apresenta baixa concentração de aminoácidos (Purcell, 1989; Andersen et al., 1992).

Como ocorre transmissão de *X. fastidiosa* por cigarrinhas de famílias distintas, a competência de um vetor está mais relacionada com o hábito alimentar do que com relações filogenéticas com outras espécies de vetores (Purcell, 1989).

De acordo com Day et al. (1952), vários fatores devem ser considerados para que um vetor seja considerado eficiente na aquisição ou inoculação de *X. fastidiosa*: a) frequência com que o inseto atinge o xilema em diferentes espécies de plantas; b) tempo despendido e o modo de alimentação nos tecidos suscetíveis e c) locais de alimentação na planta (galhos, ramos ou folhas).

Hill & Purcell (1995b) determinaram que com o aumento do tempo após a aquisição de *X. fastidiosa* por *Graphocephala atropunctata* (Say), vetora da estirpe que causa “Pierce Disease” (PD) em videiras, houve um aumento na eficiência de transmissão de 56 para 92% entre 1 hora e 7 dias após a aquisição. Verificou-se que a eficiência de transmissão se mantém alta posteriormente, em níveis de 91% e 76% a 21 e 60 dias após a aquisição, respectivamente. A eficiência desse vetor na Califórnia, é superior a 90%, após um período de acesso à inoculação (PAI) de apenas 3 horas (Purcell & Finlay, 1979).

A eficiência de transmissão de *X. fastidiosa* pelas cigarrinhas vetoras em citros é baixa quando comparada em videira por *G. atropunctata* nos Estados Unidos. Uma hipótese levantada para explicar tal fato é de que ocorre uma baixa eficiência de aquisição e/ou inoculação da bactéria pelos vetores, associada a um baixo percentual de sobrevivência do patógeno em infecções iniciais (Hill & Purcell, 1995b; Lopes, 1999).

Hill & Purcell (1997) verificaram uma relação positiva entre população de *X. fastidiosa* em videira e a transmissão por *G. atropunctata*, que é um vetor eficiente. As primeiras aquisições e subseqüentes inoculações ocorreram depois que a bactéria se multiplicou a uma população de 10^4 UFC/g de tecido na planta-fonte. Altas populações de bactéria na planta resultaram em taxas mais elevadas de transmissão. A taxa de transmissão aumentou com o passar do tempo após a infecção da planta-fonte (de 4,5% nos primeiros 10 dias para 55%, depois de 25 dias) e com o aumento na população de células bacterianas viáveis recuperadas por cultura (de 5×10^5 UFC/g, durante os primeiros 10 dias para 5×10^8 , depois de 25 dias).

2.4 Dinâmica populacional dos vetores de *X. fastidiosa* em citros

Sabe-se que o número de indivíduos de qualquer população está na dependência de fatores do meio ambiente, e quando os fatores favoráveis sobrepujam os desfavoráveis, a população aumenta (Silveira Neto et al., 1976).

A observação de plantas cítricas no campo tem demonstrado que as cigarrinhas têm preferência pela face da planta que não recebe os raios solares. Roberto et al. (1996), determinaram através de armadilhas adesivas amarelas, que as cigarrinhas são capturadas em maior número na face norte de plantas mais velhas, não sendo constatada preferência de distribuição em plantas novas. As cigarrinhas também demonstram preferência por se alimentarem em brotações e nos ramos com fluxos novos de crescimento (Gravena et al., 1997). Marucci et al. (2004) comprovaram que a presença de brotações em mudas cítricas aumentava a atratividade das plantas por duas espécies de cigarrinhas vetoras (*D. costalimai* e *O. facialis*). Yamamoto et al. (2001) estudaram a flutuação populacional de cigarrinhas em pomar cítrico em formação através de armadilhas adesivas amarelas. Os resultados obtidos evidenciaram que em pomar em formação predomina a cigarrinha *B. xanthophis*, com probabilidade de transmissão por um único inseto de 11,7% (Lopes, 1999), sendo portanto, uma das mais importantes transmissoras da bactéria para plantas cítricas.

Garcia Júnior et al. (1997) demonstraram em dados preliminares na literatura que o período de maior ocorrência de cigarrinhas vetoras de *X. fastidiosa* nos pomares cítricos do município de São José do Rio Preto (SP) está compreendido entre os meses de janeiro e julho.

A precipitação e o déficit hídrico foram relacionados à flutuação populacional de cigarrinhas, tornando possível relacionar o atraso do período de desenvolvimento vegetativo das plantas com os períodos de estiagem anteriores, e conseqüente, atraso na colonização das cigarrinhas, evidenciando a existência de hospedeiros alternativos (Roberto & Yamamoto, 1998).

Amostragens realizadas com cartões adesivos amarelos em pomares de três regiões produtoras de citros do Estado de São Paulo, capturaram cigarrinhas vetoras de

X. fastidiosa durante todo o ano (Pereira, 2000). Como as cigarrinhas apresentam pouca especificidade hospedeira (Lopes, 1999) e uma vasta gama de espécies vegetais nas quais podem se alimentar e se reproduzir (Leite et al., 1997; Purcell & Saunders, 1999; Lopes, 1999), pode ocorrer uma migração de fora para dentro dos pomares, explicando a presença desses insetos durante praticamente todo o ano.

2.5 Aspectos fisiológicos relacionados a plantas hospedeiras de *X. fastidiosa*

Os processos fotossintéticos de plantas de laranja doce cv. ‘Pêra’ foram investigados por Ribeiro et al. (2003 /No prelo/). As plantas infectadas mostraram uma redução na assimilação de CO₂, transpiração e condutância estomática. Esses resultados sugerem que as baixas taxas fotossintéticas de folhas de laranja doce não sintomáticas infectadas com *X. fastidiosa* foram causadas pela baixa condutância estomática, alterações bioquímicas nos mecanismos fotossintéticos e alterações nos sítios alternativos de elétrons. De acordo com Machado et al. (1994) o potencial hídrico foliar, a assimilação de CO₂ e a condutância estomática sofrem redução em plantas de laranja doce infectadas. A redução na fotossíntese de plantas infectadas está relacionada ao estresse hídrico, causado pela redução nas taxas de fluxo de seiva (Machado et al., 1994). Folhas sem sintomas visíveis também manifestaram reduções na capacidade fotossintética sugerindo que outros mecanismos fisiológicos podem ser afetados (Machado et al., 1994). Dentre esses, pode-se mencionar reações bioquímicas e/ou fotoquímicas da fotossíntese e/ou desbalanço hormonal, possivelmente causado pelas toxinas da própria bactéria.

Em pessegueiros e videiras infectadas com *X. fastidiosa*, a redução na fotossíntese foi associada com toxinas e desbalanço hormonal (Andersen & French, 1987; Goodwin et al., 1988). Mudanças nos hormônios foliares, na concentração de aminoácidos (prolina) e de carboidratos têm sido observadas em videiras infectadas (Goodwin et al., 1988). Entretanto, árvores de laranja doce infectadas não apresentaram um padrão similar àquele observado em videiras.

McElrone et al. (2003) em estudos prévios demonstraram que o estresse hídrico aumenta a severidade de sintomas de escaldadura das folhas e progride ao longo do tronco de *Parthenocissus quinquefolia* infectados por *X. fastidiosa*. A partir desses resultados, investigaram os mecanismos essenciais da interação estresse hídrico e infecção por *X. fastidiosa*, utilizando uma videira florestal decídua do oriente, *P. quinquefolia*. Os autores observaram uma redução significativa no potencial hídrico foliar e condutância estomática dos tratamentos em estresse para todas as posições foliares ao longo do dia no final do verão em dois anos de estudo. Além disso, as infecções reduziram significativamente o potencial hídrico foliar e condutância estomática na maioria das posições na base das folhas no final do verão nos dois anos. De acordo com seus resultados, constataram que um maior efeito da infecção por *X. fastidiosa* ocorra devido à redução na condutância hidráulica causada pela oclusão dos vasos do xilema, porém esta, não aumentou a cavitação ou o embolismo dos elementos de vaso. A redução na condutância hidráulica total das raízes causada pela infecção por *X. fastidiosa* atua adicionalmente com a limitação hídrica imposta pelo estresse hídrico.

Haberman et al. (2003) avaliaram variáveis de trocas gasosas utilizando plantas sadias e com CVC de laranja 'Pêra' sobre limoeiro 'Cravo'. Os valores de resistência estomática sobre fotossíntese foram 30% maiores nas plantas doentes, comparados às sadias. O ponto de compensação de luz também foi maior e o de saturação de luz nas plantas com CVC, foi duas vezes menor. O menor potencial hídrico nas plantas doentes também reforçou a hipótese de oclusão do xilema, que provavelmente causou o menor suprimento de água para o mesófilo, diminuindo as taxas de fotossíntese e transpiração. Todavia, houve também uma redução nas atividades metabólicas da fotossíntese, representadas pela baixa eficiência de carboxilação e distúrbios fotoquímicos detectados nas plantas doentes.

As plantas infectadas mostraram uma redução na assimilação de CO₂, transpiração e condutância estomática. Os resultados obtidos pelos autores sugerem que as baixas taxas fotossintéticas de folhas de laranja doce não sintomáticas infectadas com *X. fastidiosa* foram causadas pela baixa condutância estomática, alterações bioquímicas

nos mecanismos fotossintéticos e aumento no (s) escoamento / sítios alternativos de elétrons.

McElrone et al. (2004) realizaram trabalhos com *P. quinquefolia* a fim de explorar as respostas de trocas gasosas fotossintéticas e elucidar os mecanismos envolvidos na expressão da doença e suas interações como estresse hídrico. Em dois anos de estudo, os baixos níveis de água no solo reduziram o potencial hídrico foliar, a fotossíntese líquida e a condutância estomática de todas as posições foliares, enquanto que a infecção por *X. fastidiosa* reduziu esses parâmetros até apenas nas folhas basais. As concentrações de CO₂ intracelular foram reduzidas nas folhas apicais mas aumentou na maioria das folhas basais, implicando numa redução não estomatal da fotossíntese em folhas que mostravam maior desenvolvimento da doença. Esse resultado foi comprovado através das reduzidas medidas das taxas fotossintéticas das folhas basais e as altas concentrações de CO₂, onde a limitação estomatal foi eliminada. No ano seguinte repetiram-se as medições durante o verão e mostraram que o efeito do estresse hídrico e das infecções foi progressivo no tempo, atingindo sua maior extensão em setembro. Através da redução da condutância estomática em níveis moderados de estresse hídrico, *P. quinquefolia* permaneceu com potencial hídrico foliar relativamente alto e retardou o início dos danos fotossintéticos devido ao patógeno e o estresse hídrico induzido por seca. Além disso, medições de fluorescência de clorofila mostraram que *P. quinquefolia* tem um modo eficiente de dissipar o excesso de energia luminosa o que protege seus mecanismos fotossintéticos foliares de um dano fotoinibitório irreversível que pode ocorrer durante a limitação estomática induzida pelo estresse hídrico. Entretanto, a indução de um estresse severo, pela doença e, eventualmente seca, conduzem a decréscimos não estomáticos da fotossíntese, associados com a senescência foliar.

Ribeiro et al. (2003a) avaliaram os efeitos da alta temperatura nas respostas da fotossíntese à luz em laranja doce infectada por *X. fastidiosa*. O aumento da temperatura afetou a maquinaria fotossintética das plantas sadias e infectadas, mostrando as plantas infectadas maior sensibilidade fotoquímica, porém esse fato não refletiu em menores taxas de fotossíntese. Plantas sadias e infectadas apresentaram diferenças na evolução de oxigênio fotossintético, mas valores similares de eficiência quântica efetiva

do fotossistema II e da taxa aparente de transporte de elétrons a 35°C. Esses resultados sugerem que a limitação da fotossíntese em plantas infectadas pela *X. fastidiosa* pode surgir de injúrias nas reações bioquímicas.

Alves et al. (2004) através de microscopia eletrônica de varredura, avaliaram os pecíolos foliares de ameixeira, cafeeiro e laranja doce quanto a presença de *X. fastidiosa*, confirmada através de PCR e eletroforese. O percentual de vasos colonizados nos pecíolos de cafeeiro foi maior do que nos tecidos de ameixeira e citros quando as plantas exibiam sintomas intermediários e severos da doença. Os sintomas severos refletiram de forma consistente numa alta proporção de vasos colonizados em cafeeiro e ameixeira, mas não em citros. A anatomia e morfologia dos vasos do xilema podem ser associadas com resistência à *X. fastidiosa* (Queiroz-Voltan & Paradela Filho, 1999), mas a partir desse trabalho, verificou-se que podem existir outras explicações para as diferenças encontradas, havendo a possibilidade da composição química do xilema também influenciar a colonização (Andersen & Broadbeck, 1991).

A expressão de sintomas como resposta à infecção por *X. fastidiosa* é influenciada pelo tempo de acúmulo e o limiar populacional bacteriano (Fry & Milholland, 1990). Num estudo recente, vasos completamente bloqueados de *Vitis vinifera* foram o aspecto da colonização mais dramaticamente associado aos sintomas, entretanto, o bloqueio dos vasos foi considerado um resultado da colonização melhor que a tática do patógeno (Newman et al., 2003).

X. fastidiosa pode ser encontrada tanto fora das células quanto em biofilmes (aderidas às células) (Leite et al., 2004). As características químicas gerais da seiva do xilema também podem influenciar a capacidade dessas células de formar um grande número de agregados ou persistirem por um período maior como pequenos agregados em células livres. O biofilme formado tem sido associado à virulência da estirpe (Souza, 2004).

O fato de que o percentual de vasos colonizados em cafeeiro ter sido maior do que nas duas outras espécies nos trabalhos de Alves et al. (2004), sugere que o cafeeiro pode ser mais suscetível à colonização por *X. fastidiosa*. Citros pode ser o hospedeiro

mais resistente dessas três espécies. Dessa forma, as características anatômicas do hospedeiro devem ser cuidadosamente avaliadas.

2.6 Epidemiologia de doenças causadas por *X. fastidiosa*

Laranjeira (1997), estudando a dinâmica espacial e temporal da CVC, verificou que há diferença na taxa de progresso da CVC entre as estações do ano. As taxas médias da primavera e verão foram estatisticamente superiores às do outono e inverno. Em estudos recentes, o progresso da CVC apresentou diversos picos de derivada, que em sua maioria coincidiu com os períodos de primavera e verão (Laranjeira, 2002). Klein et al. (1999), sugerem que a probabilidade de novas infecções aumenta com a distância de árvores previamente infectadas. Martins et al. (2000) determinaram que os vetores infectivos executam vôos longos ao acaso à procura de plantas de citros não estressadas e com brotações.

Durante o período de janeiro a julho os sintomas de CVC nas folhas podem ser vistos facilmente, porém, de agosto a dezembro ficam mascarados pela queda das folhas doentes e pela presença de brotações novas (Carvalho & Laranjeira, 1994; Fundecitrus, 1998). Os sintomas de clorose foliar e senescência precoce de frutos tornam-se mais evidentes na ausência de chuvas, com o estresse hídrico das plantas, o que normalmente ocorre a partir do mês de fevereiro até setembro (De Negri & Garcia Júnior, 1993; Oliveira et al., 1995).

Considera-se que o inóculo primário de PD seja proveniente de fontes externas, ocorrendo quase sempre disseminação secundária dentro dos vinhedos (Adlerz & Hopkins, 1979). Estudos realizados por Purcell (1975), utilizando cartões adesivos para o monitoramento de uma espécie de cigarrinha vetora de PD, determinaram que essa espécie tende a se concentrar em áreas de mata ciliar durante a primavera, e a migrar para o vinhedo durante o verão, ocorrendo um aumento de infectividade natural na população nessa época (Purcell, 1975).

Os sintomas em plantas parecem depender da taxa de colonização das plantas hospedeiras (Purcell & Hopkins, 1996). Alguns estudos consideram que ocorram mudanças químicas no fluido do xilema em função da temperatura (Andersen & Brodbeck, 1989). Purcell (1977), levantou a hipótese de que o clima de inverno pode limitar a distribuição de PD no norte dos Estados Unidos, assim como para “Phony Peach Disease” (PPD), pois pode ocorrer morte do patógeno.

No momento em que as folhas de videira desenvolvem necrose marginal, a infestação e o entupimento dos vasos pela *X. fastidiosa* aproximam-se de seu máximo (Hopkins & Thompson, 1984). Mudanças fisiológicas aparentemente promovem um aumento da população bacteriana em videiras, como o estresse resultante da manutenção dos frutos e o balanço hormonal nas videiras, que podem exercer papel no desenvolvimento de sintomas de PD (Hopkins & Thompson, 1984).

A falta de virulência de estirpes de PD está relacionada à habilidade da bactéria se multiplicar e mover sistematicamente no interior de videiras suscetíveis (Hopkins, 1985). Estirpes virulentas chegam a alcançar populações de 10^6 - 10^7 UFC nos pecíolos inoculados de videiras, estirpes avirulentas alcançam somente 10^4 - 10^5 UFC por centímetro e as fracamente virulentas, multiplicaram-se e moveram-se vagarosamente, eventualmente alcançando 10^6 UFC por centímetro (Hopkins, 1985).

Cultivares de videira com folhagens mais velhas mostraram-se mais resistentes à exposição de cigarrinhas do que quando apresentavam folhagens mais jovens, produzindo infecções que se disseminaram de maneira mais vagarosa a partir do ponto de inoculação. Em alguns cultivares de videira, poucas infecções persistem durante o inverno (estação de dormência nos Estados Unidos), sendo as inoculações efetuadas com cigarrinhas no período de abril a junho, mais persistentes em todas as cultivares que as inoculações feitas em julho ou início de agosto (Purcell, 1981).

O clima de inverno pode ser um fator limitante importante para a distribuição de PPD e PD, pois ambas as doenças requerem insetos vetores para sua disseminação e células bacterianas viáveis no xilema de árvores afetadas (Purcell, 1977).

O tempo de incubação requerido para a detecção da bactéria difere em cada espécie de planta hospedeira, bem como a concentração bacteriana e percentagem de infecção (Hill & Purcell, 1995a).

A importância das plantas hospedeiras como fonte de inóculo de *X. fastidiosa*, depende da sistemicidade da bactéria. Desse modo, plantas que suportam o movimento sistêmico podem preservar e expandir o inóculo durante períodos de baixa abundância de vetores (Purcell & Hopkins, 1996).

Substâncias que aceleram a maturidade e senescência das plantas são suspeitas de favorecerem a multiplicação bacteriana, considerando que substâncias que retardam podem prevenir ou reduzir a população de *X. fastidiosa* (Hopkins, 1985). Chang & Yonce (1987) e Hopkins (1989) verificaram que a *X. fastidiosa* pode não se multiplicar ativamente em tecidos jovens.

Gravena et al. (1997) demonstraram que plantas com CVC mesmo em solos com boa fertilidade e ricos em potássio apresentam teores nutricionais menores quando comparados com plantas sadias.

Martins et al. (1999) detectaram alterações no metabolismo de laranjeiras ‘Natal’ adultas, infectadas com *X. fastidiosa*. Em comparação com árvores sadias, as árvores com CVC apresentaram maior concentração de compostos fenólicos, e alta atividade de β -1,3-glucanase, quitinase e peroxidase. Além disso, as paredes celulares das nervuras centrais de folhas com sintomas, apresentaram maior conteúdo de lignina.

Com o início do período das chuvas nos pomares cítricos do Estado de São Paulo, os sintomas de CVC diminuem, devido à disponibilidade de água no solo. Quando se associa irrigação e poda de ramos sintomáticos em pomares adultos sem sintomas graves, nota-se uma redução nos sintomas da doença e melhorias na vegetação e produção de frutos (Gravena et al., 1997).

2.7 O manejo da CVC

Para determinar em qual época do ano o controle de vetores é mais eficiente, primeiro deve-se conhecer as principais espécies de cigarrinhas vetoras que ocorrem no pomar, e em qual período ocorre maior chance de transmissão e infecção das plantas. Normalmente esse período coincide com a presença dos vetores na área, alta quantidade de inóculo e de tecidos suscetíveis. Portanto, o conhecimento da fenologia da planta e do hábito e necessidades dos vetores é fundamental para se obter sucesso nesses estudos.

Várias medidas preventivas e de convivência com a doença vem sendo recomendadas aos citricultores, como a instalação de pomares com mudas sadias, o controle de plantas daninhas, a poda de ramos sintomáticos em pomares adultos e erradicação de plantas sintomáticas com menos de dois anos de idade, a aplicação de inseticidas (preferencialmente sistêmicos) no tronco ou granulados de solo para controle de vetores e a pulverização sistemática de plantas em viveiros (De Negri & Garcia Júnior, 1993; Carvalho, 1996; Gravena, 1998).

Em anos com distribuição normal de chuvas, o início da colonização das cigarrinhas normalmente ocorre em meados da primavera. Desse período em diante, recomenda-se o controle com inseticidas se a população atingir níveis superiores a 10% de plantas com cigarrinhas, sem distinção das espécies e independente do número, devendo-se iniciar o controle (Roberto & Yamamoto, 1999). Entretanto, recomenda-se a utilização dos inseticidas sistêmicos dirigidos ao tronco das plantas cítricas ou os granulados de solo, pelo seu maior período residual e maior seletividade aos inimigos naturais (Roberto & Yamamoto, 1998; Gravena, 1998).

Como foi constatado que as cigarrinhas vetoras preferem se alimentar de plantas com brotações, e que esse fato pode aumentar as chances de aquisição ou inoculação de *X. fastidiosa*, sugeriu-se adotar medidas de controle desses insetos em períodos de maior vegetação dos pomares cítricos (Marucci et al., 2004).

Até o momento, não se conhece nenhuma variedade de laranja doce resistente à *X. fastidiosa* sobre qualquer tipo de porta-enxerto (Carvalho et al., 1996). Apenas as laranjas Westin e Lue Gim Gong, apresentaram características favoráveis a sua

utilização em programas de convivência com a doença (Laranjeira & Pompeu Júnior, 1998, citados por Laranjeira, 2002).

Alves et al. (2003) avaliaram o número de unidades formadoras de colônias (UFC) dentro dos vasos do xilema de pecíolos foliares de diferentes cultivares de *Nicotiana tabacum* por microscopia eletrônica seguida de análise de imagens. Não houve diferença estatística entre as cultivares, porém observando-se os sintomas foliares verificou-se que a aplicação de sulfato de amônio durante a poda pode reverter os sintomas. Dessa forma, a fertilização pode afetar a manifestação de sintomas de *X. fastidiosa* e a poda pode ser utilizada como medida auxiliar na redução do avanço de *X. fastidiosa* no interior da planta.

Araújo (2000) demonstrou pela primeira vez, em trabalhos experimentais, evidências da indução de resistência em *C. sinensis* por bactérias endofíticas. Esse trabalho indicou uma estratégia importante para o entendimento da CVC e a possibilidade do controle biológico da doença por microrganismos endofíticos.

Esta pesquisa teve por objetivo principal definir o período (época do ano) de maior risco de disseminação da CVC visando um manejo mais racional e eficiente da doença nos pomares cítricos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Experimentos de campo

3.1.1 Efeito da estação e da condição climática em infecções primárias de *X. fastidiosa*

Instalou-se um experimento de campo em um pomar de laranja ‘Pêra’ [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] sobre porta-enxerto limoeiro Cravo (*C. limonia* Osbeck) localizado no município de Gavião Peixoto, região citrícola Central do Estado de São Paulo. Nesse pomar foi definido um talhão experimental com aproximadamente 2000 árvores, com 5 anos de idade e incidência de CVC inferior a 10%. Com o objetivo de investigar o estabelecimento de infecções primárias de *Xylella fastidiosa* em árvores cítricas em diferentes épocas do ano, realizaram-se oito inoculações mecânicas intercaladas por aproximadamente 45 dias (abril/02-fevereiro/03), sendo duas por estação do ano, uma no início e outra no final de cada estação (Tabela 1).

Inicialmente, a área experimental foi avaliada quanto à presença de sintomas visuais de CVC, realizando-se o mapeamento das plantas sintomáticas por uma equipe treinada do FUNDECITRUS. De acordo com o mapeamento foi produzido um croqui do talhão e demarcadas as áreas com menor incidência da doença para a seleção de árvores assintomáticas, visando à coleta de material e marcação de ramos para inoculações posteriores.

Tabela 1. Épocas e datas das inoculações mecânicas de *X. fastidiosa* em ramos de árvores de laranja doce em Gavião Peixoto (SP)

Época	Mês	Data	No. Ramos inoculados*	No. Árvores inoculadas*
Início do outono	Abril	18/abril/2002	160	40
Final do outono	Maio	27/maio/2002	160	40
Início do inverno	Julho	18/julho/2002	160	40
Final do inverno	Agosto	28/agosto/2002	160	40
Início da primavera	Outubro	18/outubro/2002	160	40
Final da primavera	Dezembro	03/dezembro/2002	160	40
Início do verão	Janeiro	21/janeiro/2003	160	40
Final do verão	Fevereiro	24/fevereiro/2003	160	40

* 4 ramos/planta; 1 ramo/quadrante (N; S; L; O)

Duas semanas antes de cada data de inoculação, foram coletadas 5 folhas de cada quadrante (N, S, L e O) de 50 árvores cítricas sem sintomas visíveis de CVC, de acordo com o croqui da área. Os pecíolos e parte da nervura central dessas folhas foram separados, cortados em pedaços de aproximadamente 2mm e homogeneizados em cadinho contendo 1mL de tampão SPS [0,1M de ácido ascórbico e 5% polivinilpirrolidona insolúvel - Sigma P-6755 tratada com ácido clorídrico (Hoben et al., 1988)] utilizando-se uma amostra de 1g de tecido para extração de DNA e detecção de possíveis infecções prévias por *X. fastidiosa* através de testes de PCR (“Polymerase Chain Reaction”). Foi utilizado o protocolo de extração de Minsavage et al. (1994), no qual 100uL do macerado é transferido para tubos de polipropileno de 1,5 mL com tampa e lavado duas vezes em água destilada por centrifugação (11700 rpm) por 2 min. O sobrenadante é descartado ao precipitado são acrescidos 567uL de TE (10mM Tris HCL; 1mM EDTA – ácido etileno diamono tetracético), 30uL de SDS 10% (dodecil sulfato de sódio, Gibco BRL 15525-017) e 3uL de Proteinase K (20mg/mL, Gibco BRL 25530-015), agitado em “vortex” e incubado por 1-1,5h a 37°C. Após esse período são acrescidos 100uL de NaCl 5M e 80uL de CTAB/NaCl, em cada amostra que é agitada

novamente e incubada a 65°C por 10 min. Em câmara de exaustão, coloca-se 550mL de CIA (clorofórmio e álcool isoamílico na proporção de 24:1). As amostras são agitadas manualmente por 10 min e centrifugadas a 11700 rpm por 5 min. Nessa etapa o sobrenadante fica bem distinto da porção contendo material orgânico vegetal, sendo retirado aproximadamente 700uL do sobrenadante e transferido para tubos novos contendo 420uL de álcool isopropílico gelado, para auxiliar na precipitação do DNA. As amostras são encubadas durante 10 min a -80°C e posteriormente centrifugadas por 20min. Descarta-se o sobrenadante cuidadosamente, acrescenta-se 500uL de isopropanol a 70% e centrifuga-se novamente por 10 min. O sobrenadante é descartado com cuidado para não descolar o pelet formado no fundo dos tubos, contendo o DNA. Esses tubos são invetidos e colocados ara secar durante 1,5h em tempertura ambiente. Depois de secos, coloca-se 50uL de TE para ressuspender o pelet e deixa-se mais 1h em temperatura ambiente para que ocorra esse processo, antes da estocagem das amostras a 4°C.

Foram utilizados os “primers” (oligonucleotídeos) CVC1 e 272-2 int (Pooler & Hartung, 1995), para a amplificação do fragmento de DNA bacteriano de 500pb. Esses “primers” são específicos para *X. fastidiosa* que ocorre em citros e cafeeiro, segundo Coletta Filho & Machado (2001). Em termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc., Watertown, MA 02172, EUA.) um volume final de 12 uL, sendo 3uL de amostra e 9uL de reagentes (tampão, MgCl₂, (NH₄)₂SO₄, KCl, DNTPs e Taq DNA polimerase) foi amplificado de acordo com o protocolo de Pooler & Hartung (1995) (1 ciclo a 94°C por 4 min; 30 ciclos a 94°C por 1 min para desnaturação, 60°C por 1,5min para anelamento e, 72°C por 1,5 min para extensão; 10 min a 72°C para completa extensão e estabilização a 4°C por tempo indeterminado).

Às amostras amplificadas foi acrescentado o corante azul de bromofenol 0,25%, contendo brometo de etídio. Num gel de agarose, em equipamento de eletroforese, as amostras foram aplicadas para a separação de bandas, correspondentes aos fragmentos de DNA bacteriano (amostras positivas), sendo visualizadas sob luz UV e a imagem capturada e documentada em equipamento “Eagle Eye II” (Stratagene, La Jolla, CA

92037, EUA.). Nos casos onde foram detectadas amostras positivas para *X. fastidiosa*, descartou-se a planta correspondente para inoculação.

Em cada data de inoculação, dois ramos de uma mesma pernada e quadrante, com fluxos de brotação, foram marcados com fitas coloridas. Um deles foi inoculado no último fluxo de crescimento, com uma suspensão bacteriana de aproximadamente 10^8 unidades formadoras de colônia (UFC) de *X. fastidiosa* em tampão fosfato salino (“phosphate buffer saline” - PBS) e o outro, apenas com PBS (testemunha). Os ramos-testemunhas foram usados para identificar infecções naturais provenientes de outras partes da planta. Procurou-se selecionar os ramos no terço superior da copa das árvores, onde as cigarrinhas vetoras são mais freqüentemente observadas (Leite & Nakano, 2000). Esse procedimento foi repetido em 40 plantas sadias, totalizando 160 ramos inoculados com suspensão bacteriana e 160 testemunhas por data de inoculação (Tabela 1).

Um isolado de *X. fastidiosa* de citros (CCT6570), proveniente de plantas afetadas pela CVC em Bebedouro (Almeida et al., 2001), foi usado nas inoculações. Este isolado foi triplamente clonado e preservado a -80°C no Laboratório de Insetos Vetores do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da ESALQ/USP. Para cada data de inoculação, foram utilizadas colônias de terceiro repique do isolado em meio sólido “Periwinkle Wilt Gelrite” (PWG) (Hill & Purcell, 1995), após 5 dias de crescimento a 28°C . Para a obtenção de uma suspensão bacteriana padrão, foram utilizadas colônias resultantes de oito alíquotas (20 μL cada) de uma suspensão do repique anterior (Prado, 2003). As colônias foram raspadas das placas com alça de platina e homogeneizadas em 1 mL de tampão PBS até a obtenção de uma suspensão turbida e esbranquiçada ($\cong 10^8$ UFC/mL). Este procedimento foi adotado para o preparo de suspensões de células bacterianas usadas na inoculação dos ramos cítricos no campo. As suspensões foram refeitas após 20 min da homogeneização em PBS, para evitar queda de viabilidade do inóculo. Como controle positivo, 10 mudas de laranja ‘Caipira’ (*C. sinensis*) foram inoculadas com uma das suspensões no campo, em cada data de inoculação. Essas mudas foram trazidas para o Laboratório de Insetos Vetores e

mantidas em viveiro telado para observação de sintomas. Após 4-6 meses, foram realizados testes de isolamento em meio de cultura e de PCR para a detecção de *X. fastidiosa* nas mesmas.

Os ramos marcados do experimento foram inoculados com alfinete entomológico em um único ponto do terço apical do último fluxo de crescimento, com uma gota de 5 µL da suspensão bacteriana, como descrito por Almeida et al. (2001). Em seguida, os ramos inoculados foram cobertos com sacos de tule para protegê-los de inoculações naturais por vetores. O controle de vetores também foi executado periodicamente, através da aplicação de inseticidas sistêmicos nas árvores do pomar de citros. Após 6 e 12 meses da inoculação, a primeira folha e a segunda, abaixo do ponto de inoculação de cada ramo, respectivamente, foram submetidas aos testes de isolamento em meio de cultura PWG (Almeida et al., 2001) e de PCR (Pooler & Hartung 1995) para avaliar o estabelecimento das infecções de *X. fastidiosa*.

Os ramos de árvores cítricas que se apresentaram positivos por isolamento em meio de cultura e/ou PCR através das amostras foliares, foram podados em sua base (na inserção com o tronco) e uma folha aproximadamente 50 cm abaixo do ponto de inoculação foi amostrada a fim de se detectar o deslocamento da bactéria na planta cítrica, por isolamento em meio de cultura PWG e PCR.

3.1.2 Avaliação do potencial hídrico e da composição química do xilema de citros em diferentes épocas do ano

Com o objetivo de identificar fatores que poderiam estar influenciando no sucesso de estabelecimento de infecções primárias de *X. fastidiosa*, foram monitoradas as condições ambientais e da planta (xilema) em cada uma das diferentes épocas de inoculação no pomar. A temperatura média, quantidade de chuvas e dados de balanço hídrico do solo foram obtidos para cada época de inoculação (janeiro/02 a fevereiro/03).

Em cada data de inoculação, realizou-se a aferição do potencial hídrico e coleta de seiva do xilema de brotações dos quadrantes leste e oeste de pelo menos três árvores comprovadamente sadias, sempre entre 8-10 h da manhã. Nessas avaliações, foi utilizada uma câmara de pressão de Scholander (Soilmoisture, modelo 3005, *Plant water status console*) (Scholander et al., 1965), de acordo como o seguinte procedimento: a) cobertura do ramo a ser destacado da planta com saco plástico (a fim de minimizar a evapotranspiração e erros de leitura); b) corte em bisel de uma brotação de aproximadamente 30 cm de comprimento com tesoura de poda; c) retirada da camada epidérmica mais externa na região de corte com lâmina; d) inserção do ramo na câmara fixando a parte “descascada” para fora dela através de uma rolha de borracha, presente na tampa da câmara ; e) introdução de um gás inerte (nitrogênio); f) aferição do potencial hídrico do ramo (observando-se com lupa a região de corte), no momento da mudança de coloração dos feixes de vasos na área seccionada do ramo (nesse ponto cessa-se a introdução de gás para a tomada de medida); g) introdução de até 3 atm de pressão adicional na câmara para extravasamento da seiva do xilema; h) coleta da seiva em tubos de polipropileno estéreis durante 1’30’’; i) identificação da amostra e estocagem em caixas térmicas contendo gelo.

As amostras de seiva do xilema foram transportadas em caixas térmicas ao Laboratório de Insetos Vetores da ESALQ/USP, onde passaram por um processo de filtração em tubos de polipropileno contendo filtros de membrana de acetato de 0,22 µm. Após a filtração, as amostras foram divididas em até três alíquotas de pelo menos 50 µL e armazenadas a -80°C, até serem encaminhadas para análise de seu teor de aminoácidos, ácidos orgânicos e açúcares.

Uma das alíquotas foi usada para as análises de aminoácidos através da técnica de cromatografia líquida de alta performance (High performance liquid chromatography -HPLC) (AKTA-Amershan/Pharmacia Biotech). Utilizou-se um cromatógrafo equipado com detector espectrofotométrico de comprimento de onda variável, computador CROMATOPAC-CR4A e coluna cromatográfica de fase reversa (C₁₈) (Modelo Pico Tag®, Waters). Foram analisados os seguintes aminoácidos: ácido aspártico, ácido

glutâmico, asparagina, serina, histidina, glutamina, histidina, glicina, treonina, arginina, alanina, GABA, tirosina, metionina, valina, fenilalanina, isoleucina, leucina e lisina.

Outra alíquota foi submetida à análise de ácidos orgânicos através do HPLC. Os ácidos orgânicos foram monitorados em comprimento de onda UV ($\lambda = 214 \text{ nm}$) (Andersen et al., 1989), para detecção dos seguintes compostos: ácido oxálico, ácido tartárico, ácido fórmico, ácido málico, ácido láctico, ácido acético, ácido maleico, ácido cítrico, ácido succínico e ácido fumárico.

A terceira alíquota de seiva foi submetida à análise cromatográfica em HPLC (Andersen et al., 1989) para a quantificação da concentração de carboidratos. Os carboidratos analisados foram: sacarose, glicose e frutose.

3.2 Experimentos em condições controladas

3.2.1 Efeito do déficit hídrico do solo e temperatura sobre a infecção por *X. fastidiosa*

3.2.1.1 Ensaios com mudas de *C. sinensis* em câmara de crescimento

Para testar a hipótese de que temperatura e ou condições hídricas influenciam o estabelecimento de infecções primárias de *X. fastidiosa*, esta bactéria foi inoculada mecanicamente em mudas cítricas envasadas, mantidas em câmara de crescimento (E-15, Conviron, Winnipeg, Canadá) sob condições edafoclimáticas similares às de inverno e de verão da região onde foram realizados os experimentos de campo. Utilizaram-se temperaturas médias de 19 e 24°C e comprimentos do dia de 11 e 13h, respectivamente, para simular as condições típicas dos meses de inverno (junho-agosto) e verão (dezembro-fevereiro) da região de Araraquara (SP) (469m acima do nível do mar, 21°51'S e 48°31'W).

Cinquenta mudas de laranja doce sadias (pé-franco de *C. sinensis* “Caipira”) de, aproximadamente, 70 cm de altura foram utilizadas em cada condição de temperatura

(“inverno” e “verão”). Através da análise de pontos (capacidade de campo e murcha permanente) do substrato utilizado no plantio das mudas, de modo a determinar a capacidade de retenção de água desse solo, estipulo-se o valor de estresse hídrico a ser fornecido para os tratamentos. Em cada temperatura estudada, metade das plantas foi mantida sob regime de déficit hídrico (entre o ponto de murcha permanente e o de capacidade de campo) e a outra metade, sob capacidade de campo (sem déficit hídrico). Foi possível induzir esses regimes através de irrigação controlada e pesagem diária dos vasos em balança digital. O substrato utilizado nos vasos foi uma mistura de solo peneirado, areia e esterco de curral curtido (2:1:1) adubado com fertilizante fosfatado.

Após um período de aclimação de 30 dias, 15 plantas de cada regime hídrico foram inoculadas com uma suspensão bacteriana de *X. fastidiosa* de, aproximadamente, 10^8 UFC/mL (isolado CCT 6570) em tampão PBS. A suspensão foi preparada conforme descrito no experimento de campo (item 3.1.1), excetuando-se que a viabilidade do inoculo foi confirmada através de diluição e plaqueamento em meio de cultura PWG. Dez plantas de cada regime hídrico foram inoculadas apenas com PBS e mantidas como controle negativo. A primeira folha localizada abaixo do ponto de inoculação foi removida após 60 dias da inoculação e submetida a testes de isolamento em meio de cultura e PCR para detecção de *X. fastidiosa*. Em seguida as plantas foram cortadas para aferição de seu potencial hídrico, utilizando-se a câmara de pressão de Scholander, conforme descrito no item 3.1.2.

Um estudo semelhante de câmara de crescimento foi conduzido em casa-de-vegetação localizada no Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da ESALQ / USP, no município de Piracicaba (SP), durante os meses de inverno e verão. A temperatura e a umidade relativa do ar da casa-de-vegetação foram monitoradas através de “data logger” (Marca Texto, Mod 175-H2, Lenzkirch, Germany). Em cada estação, utilizaram-se 50 mudas de laranja doce sadias (pé-franco de *C. sinensis*) de, aproximadamente, 70 cm. Metade das plantas foram mantidas sob regime de déficit hídrico (entre o ponto de murcha permanente e o de capacidade de campo) e a outra metade sob condições de capacidade de campo (sem déficit hídrico). Esses regimes

hídricos foram induzidos nos vasos de plantas com irrigação controlada, baseados no volume de solo contido em cada um e no resultado das análises de pontos para determinação da capacidade de retenção de água do solo utilizado. Neste ensaio foi utilizado um substrato semelhante ao do ensaio em câmara de crescimento.

As plantas foram aclimatadas por 30 dias no ambiente e, após o valor percentual de déficit hídrico ser atingido, foram mantidas nessas condições por mais 10 dias antes de serem inoculadas com a suspensão de *X. fastidiosa*. Após 60 dias da inoculação, coletou-se a primeira folha localizada abaixo do ponto de inoculação (aproximadamente 3 cm) para detectar a presença da bactéria por isolamento em meio de cultura e PCR. Em seguida realizou-se a aferição do potencial hídrico com a câmara de Scholander.

3.2.1.2 Ensaio com “seedlings” de *C. sinensis* em câmara de crescimento

Este ensaio também foi elaborado com o objetivo de avaliar o sucesso de infecção por *X. fastidiosa* em diferentes condições edafoclimáticas, porém, inoculando-se um maior número de plantas cítricas em cada condição, para obter uma maior robustez nos resultados. Neste experimento foram utilizados “seedlings” de laranja doce, mais jovens, plantadas em bandejas plásticas com 42 x 28 cm de lado e 10 cm de altura. O estudo foi realizado em câmara de crescimento (Modelo MA 535/7, Marconi Equipamentos para Laboratório S.A., Piracicaba, SP) simulando em um primeiro ensaio, condições de temperatura média e de fotoperíodo de inverno (19°C e 11h) e, num segundo ensaio, as de verão (24°C e 13h). Em cada ensaio, comparou-se a sobrevivência e a alimentação das cigarrinhas em plantas submetidas a dois regimes hídricos: capacidade de campo e estresse hídrico.

Na instalação dos ensaios foi preparado um substrato composto de 1 parte de areia, 1 parte de solo peneirado e 1 parte de esterco de curral curtido. Este substrato foi previamente adubado com farelado Heringer® (NPK + Ca, S, Mg e Zn), na proporção de 50 g de adubo para cada 25 Kg de solo. O substrato foi colocado em 5 bandejas plásticas com furos na base, forrados com filtro, para o escoamento da água de irrigação.

Durante 30 dias, essas caixas foram irrigadas para que o substrato se acomodasse, permitindo a retirada de um anel de amostra de solo de uma das bandejas para análise no Laboratório de Física do Solo, do Departamento de Engenharia Rural da ESALQ / USP. Nessas análises foram determinados os pontos de murcha permanente e de capacidade de campo do substrato. Nas quatro bandejas restantes (1 a 4) foram transplantados 40 “seedlings” sadios de laranja doce (*C. sinensis* “Caipira”), com aproximadamente 5-7 cm de altura, produzidos em tubetes a partir de sementes, no interior de viveiros telados. Os “seedlings” foram protegidos com aplicação de inseticidas químicos para o controle de larva minadora, ácaros e afídeos.

Determinados os valores de capacidade de campo e de ponto de murcha permanente do substrato, as 4 bandejas foram irrigadas até a saturação, deixando com que o excesso de água escorresse. Quando a água parou de escorrer, as bandejas com as mudas foram pesadas, determinando-se o peso de cada caixa em capacidade de campo. Os tratamentos de estresse foram determinados pela seguinte regra:

Peso inicial da bandeja em capacidade de campo = valor obtido na análise do substrato para o ponto capacidade de campo;

Ponto de murcha permanente = valor obtido na análise do substrato (por regra de três simples determinou-se o peso da bandeja caso esta atingisse esse ponto).

Como a intenção era submeter os “seedlings” a um estresse hídrico, porém, com condições de sobrevivência para as plantas, procurou-se determinar um percentual de estresse correspondente a um valor intermediário entre os pesos da bandeja em capacidade de campo e em ponto de murcha permanente.

As bandejas em capacidade de campo foram irrigadas diariamente por pesagem de modo que voltasse a ter o mesmo peso inicial. Após ter sido estabelecido um percentual de estresse de 40% para as condições de inverno e de 15% para as de verão, o peso das bandejas submetidas a esse tratamento também foi mantido através de pesagens diárias completando as perdas com água. Foi aplicado um valor de estresse na simulação de verão inferior ao da condição de inverno devido à temperatura e fotoperíodo mais elevados induzirem uma maior evapotranspiração das mudas, com sua conseqüente

murcha. Foi necessário um estresse menor a fim de garantir a integridade das mudas para a realização do ensaio. Para monitorar melhor as condições simuladas, colocou-se um “data logger” no interior da câmara, para aferir a temperatura e umidade relativa a cada 5 min.

Nas duas condições de temperatura e fotoperíodo, as bandejas 1 e 2 foram irrigadas diariamente até atingir o peso da caixa com mudas irrigada (valor do solo em capacidade de campo). Na simulação das condições de inverno, durante os 12 primeiros dias na câmara de crescimento, as caixas 3 e 4 permaneceram sem irrigação, até que atingissem o valor de déficit hídrico desejado. Tendo atingido os valores de déficit hídrico e mantido os tratamentos em capacidade de campo, as mudas foram submetidas a aproximadamente 15 dias de aclimatando às condições de verão e 20 dias às condições de inverno, antes de ser realizada sua inoculação.

Para a inoculação das mudas das caixas 1 e 3 com *X. fastidiosa* utilizou-se o segundo repique do isolado CCT 6570. Em ambos os ensaios (“verão” e “inverno”), prepararam-se suspensões bacterianas com concentrações de aproximadamente 10^8 UFC/mL de tampão PBS, conforme descrito no item 3.1.1. A viabilidade e concentração do inoculo foram confirmadas através de diluições e plaqueamento em meio de cultura PWG.

A inoculação foi realizada após o período de aclimação em apenas um ponto no caule da planta, colocando-se uma gota de 3 μ L da suspensão e perfurando-se o caule através da gota com alfinete entomológico. As bandejas 1 e 3 foram inoculadas com a suspensão bacteriana e as bandejas 2 e 4 apenas com tampão PBS (testemunhas).

Realizada a inoculação, as plantas foram mantidas durante 60 dias nas condições já descritas. Após esse período, foram coletadas duas folhas de cada planta (uma abaixo e outra acima do ponto de inoculação) para proceder ao isolamento em meio de cultura. Nesse teste de detecção, foram utilizados os pecíolos foliares, sendo o restante das folhas guardado para a extração de DNA e teste de PCR. No teste de isolamento, após a esterilização superficial e maceração em tampão PBS, as amostras foram plaqueadas em 2 concentrações: sem diluição e com diluições de 10 vezes. O macerado sem diluição foi

guardado para ser acrescentado ao macerado para extração de DNA e PCR. O teste de PCR foi realizado conforme descrito anteriormente (item 3.1.1).

3.2.2 Efeito das condições hídricas do solo e da temperatura sobre a alimentação e sobrevivência do inseto vetor

Avaliou-se a sobrevivência e a taxa de alimentação de seiva da cigarrinha *O. facialis* em plantas cítricas dos dois tratamentos testemunhas do experimento descrito no item 3.2.1.2 nos quais foram plantados “seedlings” sadios em capacidade de campo (bandeja 2) e em estresse hídrico (bandeja 4). Após a coleta de folhas para os testes de cultura e PCR para detecção de *X. fastidiosa* nos ensaios do item 3.2.1.2, as bandejas foram mantidas na câmara de crescimento, com temperatura média de 19°C e fotoperíodo de 12h, para o ensaio conduzido simulando as condições de inverno e de 24°C e fotoperíodo de 13h, para o ensaio nas condições de verão.

A ingestão de seiva pelas cigarrinhas nas diferentes condições foi medida de maneira indireta através da coleta do líquido (*honeydew*) excretado pelos insetos por unidade de tempo. Em cada bandeja (regime hídrico), 25 adultos de *O. facialis* foram confinados individualmente sobre 25 “seedlings” de laranja, no interior de gaiolas plásticas adaptadas para a coleta do “honeydew”, semelhantes às descritas por Andersen et al. (1992). Cada gaiola foi constituída de um tubo de centrífuga transparente de 50-mL (Cat. No. 430291, Corning Inc., Acton, Massachusetts 01720, USA), dentro do qual era colocado o inseto, acoplado a um tubo de centrífuga graduado de 15 mL (Cat. No. 430791, Corning Inc.). As gaiolas foram posicionadas sobre a haste principal do “seedling” de modo a favorecer o escoamento do líquido para o recipiente graduado, objetivando-se a avaliação do volume de *honeydew* excretado. A cada 12 h, avaliou-se a sobrevivência e o volume de excreção das cigarrinhas por um período de até 10 dias, ou até que restasse apenas 10-20% das cigarrinhas no tratamento com menor número de sobreviventes.

Através do método de análise atuarial considerando a censura intervalar foram construídas as curvas de sobrevida das cigarrinhas, utilizando os testes estatísticos de comparação de estratos Log-Rank e Wilcoxon. O volume médio de “honeydew” excretado por cigarrinha e a frequência cumulativa de indivíduos que excretaram durante as primeiras 96 h de cada experimento foram comparados pelo Teste t e Qui-Quadrado, respectivamente.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Experimentos de campo

4.1.1 Efeito da estação e da condição climática em infecções primárias de *X. fastidiosa*

Todas os ramos inoculados foram avaliados após 6 e 12 meses da inoculação. Das 10 mudas cítricas utilizadas como controle do inóculo em cada data de inoculação, pelo menos uma apresentou resultados positivos por isolamento e/ou PCR, confirmando a viabilidade das suspensões bacterianas utilizadas. Do total de 160 ramos inoculados em cada época de inoculação, um número menor e variável foi aproveitado após os testes de isolamento e PCR, devido à ocorrência de contaminações no procedimento de isolamento em meio de cultura e/ou constatação de ramos testemunhas positivos após 6 e 12 meses da inoculação. Aquelas plantas que apresentaram pelo menos um ramo-testemunha positivo por PCR foram desconsideradas no cálculo da infecção, pois este era um indicativo da ocorrência de infecção natural, provavelmente sistêmica e de origem desconhecida na planta.

A taxa total de infecção baseada no isolamento primário em meio de cultura e/ou PCR, após 6 meses da inoculação, foi baixa ($\leq 5\%$) para todas as inoculações de outono e inverno (Figuras 1 e 2). Os resultados de PCR indicaram taxas de infecção maiores do que aquelas obtidas por cultura para as inoculações de abril (início do outono) e agosto

(final do inverno). Segundo Minsavage et al. (1994), o teste de PCR permite a detecção de 10^2 UFC/mL, sendo portanto mais sensível que o isolamento em meio de cultura, cujo limiar de detecção para a diluição utilizada (10x) é de 10^4 UFC/mL. Deve-se ainda considerar que o isolamento em meio de cultura detecta somente células viáveis (cultiváveis) de bactéria, enquanto que o PCR pode detectar tanto células vivas quanto mortas (Figuras 1 e 2). Na avaliação realizada após 6 meses, as baixas taxas de infecção obtidas a partir das inoculações de outono e inverno por isolamento podem ser atribuídas à baixa sensibilidade do método e possivelmente a uma sobrevivência limitada de infecções de *X. fastidiosa* nessa época. As menores taxas de infecção foram observadas para as datas de inoculação que foram seguidas de déficit hídrico do solo (Figura 6), como o final do outono (maio) e inverno (julho e agosto), após 6 meses da inoculação.

Resultados de campo semelhantes foram obtidos por Pereira (2000), que realizou inoculações da bactéria em plantas cítricas em diferentes épocas do ano no campo e obteve baixa recuperação de colônias de *X. fastidiosa* por isolamento após inoculações realizadas no final de outono (maio) e no final do inverno (setembro).

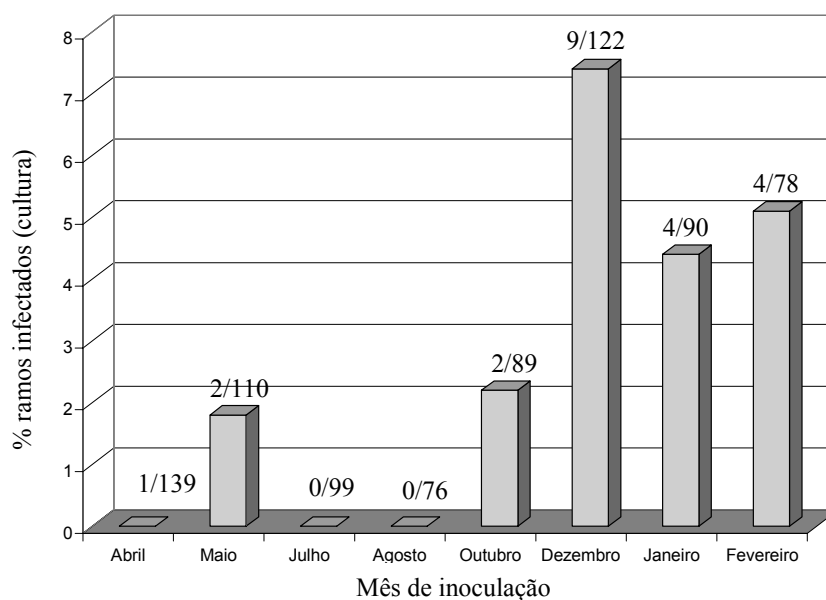


Figura 1 - Detecção de *X. fastidiosa* em ramos de árvores cítricas por isolamento primário em meio de cultura após 6 meses da inoculação mecânica em Gavião Peixoto (SP). Proporções sobre as barras representam o número de ramos infectados sobre o número total de ramos avaliados, desconsiderando-se aqueles de plantas que apresentaram ramos-testemunha positivos para *X. fastidiosa*, ou cujos isolamentos resultaram em contaminações

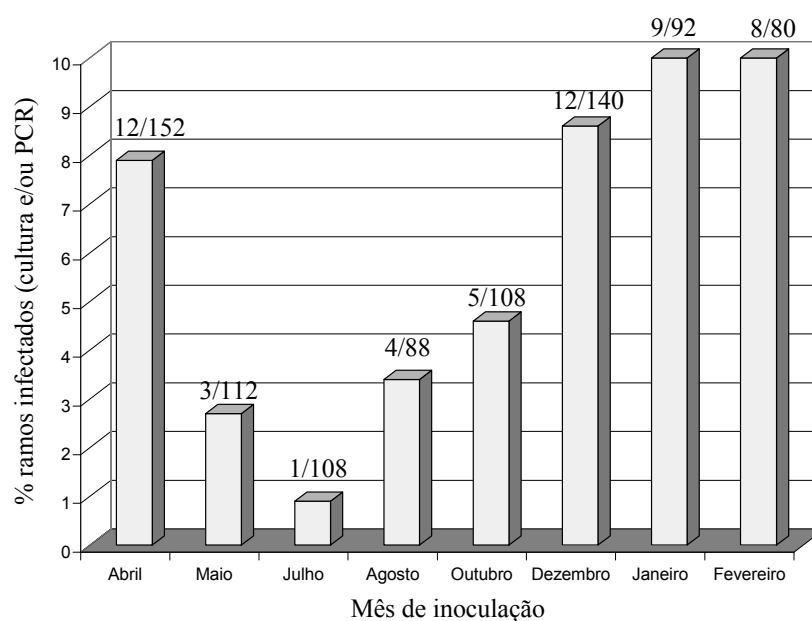


Figura 2 - Detecção de *X. fastidiosa* em ramos de árvores cítricas por isolamento primário em meio de cultura e/ou PCR após 6 meses da inoculação mecânica em Gavião Peixoto (SP). Proporções sobre as barras representam o número de ramos infectados sobre o número total de ramos avaliados, desconsiderando-se aqueles de plantas que apresentaram ramos-testemunha positivos para *X. fastidiosa*, ou cujos isolamentos resultaram em contaminações

Após 12 meses da inoculação a taxa total de infecção no mês de maio passou de 2,7% (aos 6 meses) para 21,4% por isolamento em meio de cultura e/ou PCR (Figuras 2 e 4). Na época mais quente e chuvosa (Figura 6), correspondente aos meses de dezembro e janeiro, a detecção da bactéria por isolamento em meio de cultura após 6 meses, passou de 7,4% e 4,4%, respectivamente (Figura 1), para zero (Figura 3). A tendência geral de aumento na recuperação de *X. fastidiosa* (ramos infectados primariamente) a partir do final do inverno (agosto), observada também por Pereira (2000), não foi mantida após 12 meses da inoculação (Figura 4). Ramos positivos na avaliação após 6 meses não se mostraram positivos após as avaliações com 12 meses. Para explicar este fato deve-se considerar os valores de precipitação, temperatura, balanço hídrico do solo (Figura 6) e a tendência cumulativa de recuperação da bactéria por isolamento em meio de cultura e/ou PCR das avaliações de 6 e 12 meses (Figura 5), onde maiores taxas de infecção ocorreram nos meses de abril e maio e um pouco mais baixa e constante no período de agosto a fevereiro. Especula-se que a bactéria possa não ter sobrevivido a um período maior de tempo no interior dos vasos dos ramos inoculados em folhas próximas ao local da inoculação (onde as amostras após 6 e 12 meses foram coletadas), ou ainda, ter se mantido latente ou em níveis não detectáveis pelos testes de detecção utilizados.

Comparando-se todas as avaliações realizadas após 6 e 12 meses da inoculação (Figuras 1, 2, 3 e 4) pode-se observar um único período desfavorável ao estabelecimento da bactéria no campo, que correspondeu ao mês de julho (inverno), quando as temperaturas foram bem mais baixas e havia déficit hídrico acentuado (Figura 6).

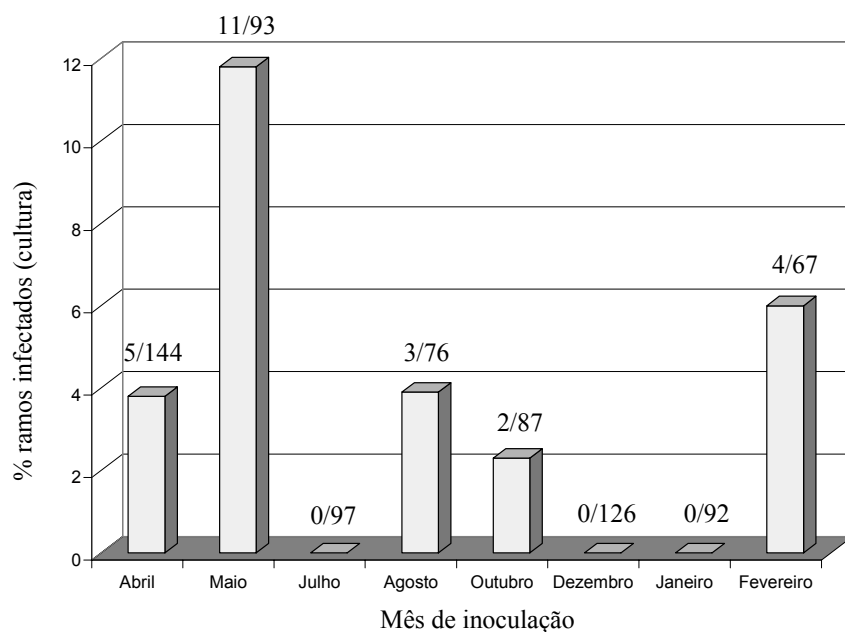


Figura 3 Detecção parcial de *X. fastidiosa* em ramos de árvores cítricas por isolamento primário em meio de cultura, após 12 meses da inoculação mecânica em Gavião Peixoto (SP)

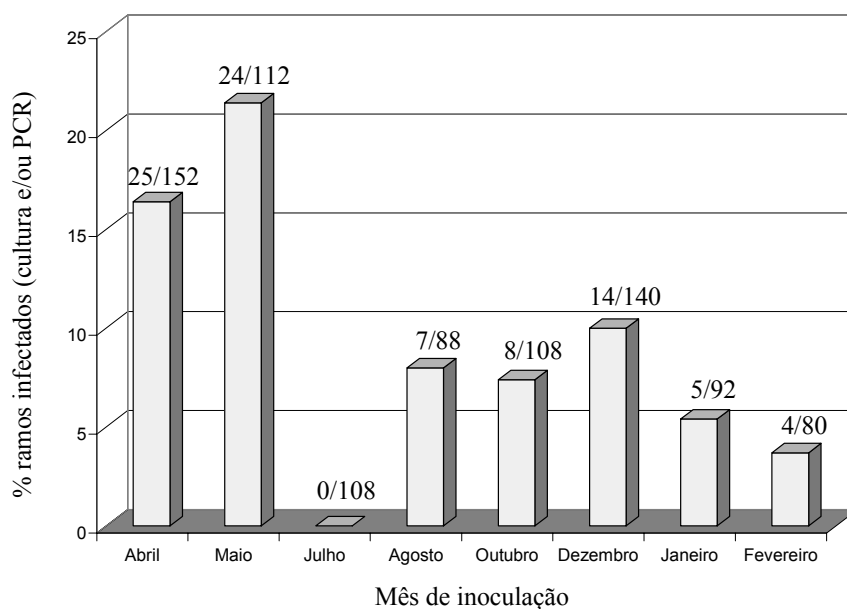


Figura 4 Detecção parcial de *X. fastidiosa* em ramos de árvores cítricas por isolamento primário em meio de cultura e/ou PCR após 12 meses da inoculação mecânica em Gavião Peixoto (SP)

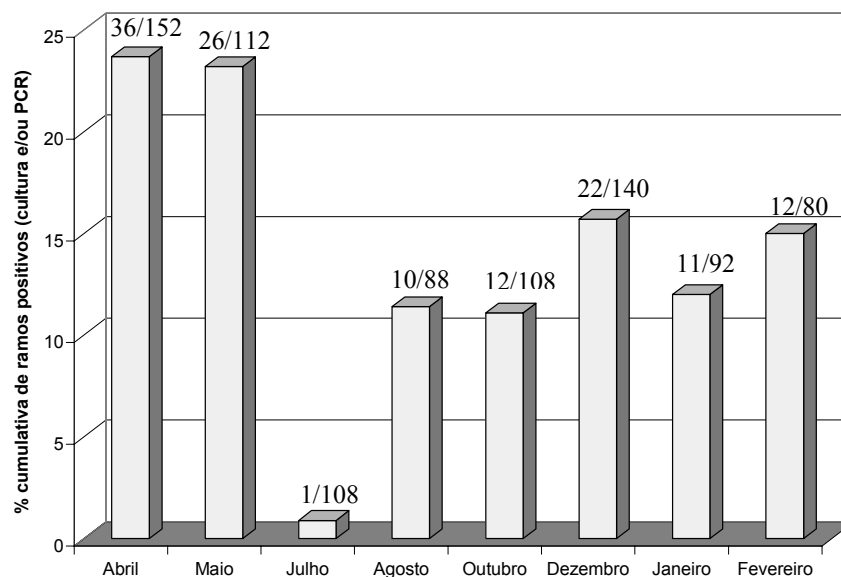


Figura 5 Percentual cumulativo de detecção de *X. fastidiosa* em ramos de árvores cítricas por isolamento primário em meio de cultura e/ou PCR após 12 meses da inoculação mecânica em Gavião Peixoto (SP)

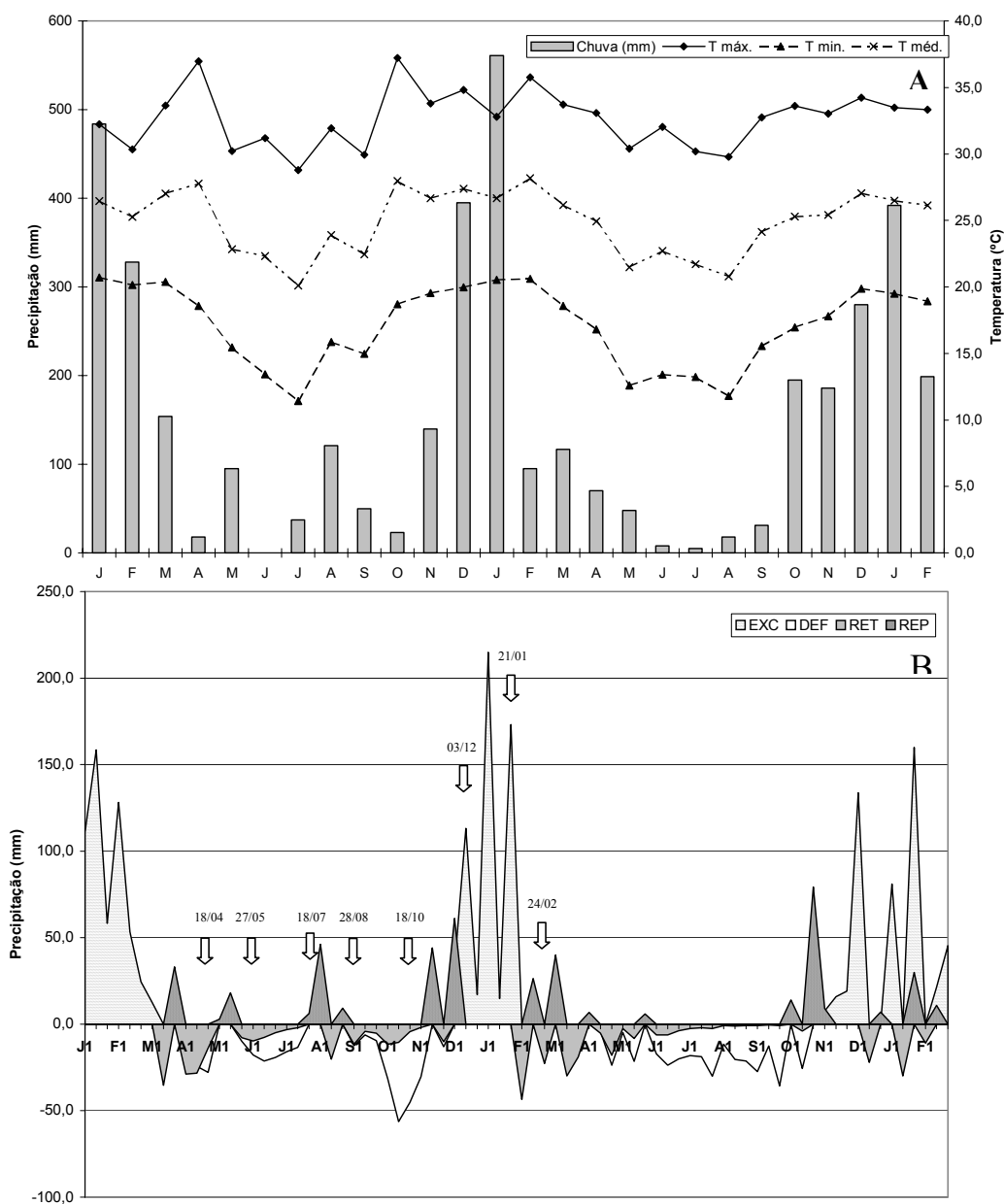


Figura 6 - A) Precipitação máxima, média e mínima e B) Balanço hídrico sequencial por Thornthwait & Mather (1995) da região de Gavião Peixoto (SP), plotado através do programa Bhseq V5.0 de 1999, desenvolvido pelo Depto. de Física do solo da ESALQ/USP (Ex: excedente hídrico; DEF: déficit hídrico; RET: retirada de água pelas plantas; REP: reposição de água). Janeiro/2002-Fevereiro/2004. As setas na Fig. 6B indicam as datas de inoculação mecânica de *X. fastidiosa*

As inoculações realizadas na época referente ao outono (abril/maio), correspondem a um período prévio às condições de baixa temperatura, ausência de chuvas e déficit hídrico no solo (inverno), que pode ser desfavorável à multiplicação da bactéria em plantas cítricas. Assim, 6 meses parece ter sido um tempo muito curto para avaliar o sucesso de inoculações realizadas no outono. Após o outono, a ocorrência de estresse hídrico, baixas temperaturas, mudanças fisiológicas, redução na velocidade de fluxo de seiva e conseqüentemente de nutrientes, podem afetar o estabelecimento da bactéria. Alguns autores relataram que determinados microorganismos que habitam o sistema vascular de plantas ao passarem por períodos desfavoráveis, como condições de estresse para as plantas, baixam seu metabolismo, entrando em latência, voltando a se desenvolver e multiplicar somente após um determinado período de tempo sob condições favoráveis. Portanto, a bactéria inoculada no outono pode ter se mantido de forma latente na planta e, após a ocorrência de condições favoráveis (abundância de chuvas e temperaturas elevadas no verão), sua população tenha encontrado melhores condições para se desenvolver, resultando em maior taxa média de recuperação por isolamento após 12 meses da inoculação.

Esses resultados vêm reforçar a idéia de que o período de estresse pelo qual passa a planta cítrica durante o inverno pode influenciar o desenvolvimento da bactéria. Entretanto, para as infecções que se estabeleceram antes do inverno, parece haver desenvolvimento normal da infecção após o retorno das condições de maior temperatura e pluviosidade na primavera e verão (Figura 3). Isto explicaria a maior taxa de infecção da bactéria detectada somente após 1 ano, no caso das inoculações de outono (Figura 3).

Enquanto isso, as inoculações realizadas nos meses mais quentes e chuvosos (final da primavera e verão) foram acompanhadas por um período de disponibilidade hídrica e temperaturas médias mais elevadas e, provavelmente, mais adequadas ao desenvolvimento da bactéria [de 26 a 28°C, segundo Wells et al. (1987)], maior velocidade de fluxo de seiva e, possivelmente, melhor disponibilidade ou balanço nutricional. Nessas inoculações foram detectadas maiores taxas de recuperação da bactéria após 6 meses e menores após 12 meses (Figuras 2 e 4). Supõe-se que devido à

pronta ocorrência de condições favoráveis ao seu estabelecimento, a bactéria tenha colonizado mais rapidamente os tecidos da planta (maior recuperação após 6 meses) (Figura 1) e translocado em seus vasos condutores para outras partes da planta.

A oclusão de vasos e possível morte das células bacterianas no ponto de inoculação poderiam explicar a baixa recuperação de colônias por isolamento no ponto de inoculação de folhas deste local, após 12 meses da inoculação.

A capacidade da bactéria se mover e multiplicar em plantas hospedeiras está relacionada a diferentes fatores, como: virulência da estirpe (Hopkins, 1985), clima (Purcell, 1977, Hopkins & Thompson, 1984), tempo de acúmulo (Fry & Milholand, 1990; Hill & Purcell, 1995), espécie hospedeira (Hill & Purcell, 1995) e mudanças fisiológicas na planta hospedeira após a infecção (Hopkins & Thompson, 1984; Queiroz-Voltan & Paradela Filho, 1999).

McElrone et al. (2003), estudando o efeito das interações do estresse hídrico e as infecções causadas por *X. fastidiosa*, numa espécie de videira silvestre, *Parthenocissus quinquefolia*, verificaram que o estresse hídrico aumenta a severidade de sintomas de escaldadura das folhas e progride ao longo do tronco de plantas infectadas. A condutância hidráulica total das raízes foi reduzida tanto pela falta de água quanto pelas infecções. Entretanto, a porcentagem de vasos embolizados e o diâmetro médio destes foram afetados apenas com a seca. Esses resultados indicaram que um maior efeito da infecção por *X. fastidiosa* ocorra devido à redução na condutância hidráulica causada pela oclusão dos vasos (que não aumenta a cavitação ou o embolismo dos elementos de vaso); essa redução atua adicionalmente à limitação hídrica imposta pelo estresse.

Comparando-se mudas cítricas e plantas adultas no campo, a eficiência da inoculação a inoculação varia em função de seu tamanho e vigor das plantas, sendo a relação inóculo e quantidade de tecido bem maior em plantas mais novas. Alves et al. (2004) a infecção de *X. fastidiosa* em citros, ameixeira e cafeeiro através de sua inoculação mecânica com um mesmo nível de inóculo, e avaliação por microscopia eletrônica de varredura. Verificou-se que os sintomas severos corresponderam a uma alta proporção de vasos colonizados em cafeeiro e ameixeira, mas não em citros. Os

autores constataram que citros foi o hospedeiro mais resistente à colonização pela bactéria, provavelmente devido à presença de vasos do xilema pontuados, que são mais resistentes ao fluxo de água e movimento lateral (Van Leperen et al., 2000, citados por Alves et al., 2004). Tanto a anatomia dos vasos do xilema quanto sua morfologia podem ser associadas com a resistência à *X. fastidiosa* (Queiroz-Voltan et al., 1998; Queiroz-Voltan & Paradela Filho, 1999). Além disso, existe ainda a possibilidade da composição química do xilema influenciar na colonização da bactéria (Andersen & Broadbeck, 1991).

4.1.2 Avaliação do potencial hídrico e da composição química do xilema de citros em diferentes épocas do ano

Comparando-se os resultados obtidos na extração de seiva, verificou-se que o volume médio extraído por ramo sadio foi menor durante o período de julho (início do inverno) até o início de dezembro (final da primavera) e maior em março (final do verão) para ambos os quadrantes da planta (Figura 7), enquanto que o potencial hídrico médio mostrou uma tendência inversa (Figura 8). Na realidade, o volume de seiva extraída do xilema foi inversamente proporcional ao potencial hídrico da seiva nos ramos (Figura 9). Os potenciais hídricos entre 8 e 12 bar (1 bar = 1,01325 atm) resultaram em um decréscimo exponencial no volume de seiva extraída do xilema de ramos cítricos através da câmara de pressão de Scholander (Figura 9). Essas variações na extração estão aparentemente relacionadas com o déficit hídrico do solo (Figura 6). Os maiores potenciais hídricos (Figura 8) e os menores volumes de seiva extraídos (Figura 7) foram relacionados com as extrações de julho, agosto e outubro, quando houve déficit hídrico no solo. Com a abundância de chuvas e a reposição de água no solo em dezembro/02 e janeiro/03, o potencial hídrico médio da seiva do xilema caiu à níveis ≤ 10 bar em janeiro/03 e março/03 (Figura 8).

As informações geradas através da avaliação do potencial hídrico e da composição química da seiva do xilema em diferentes épocas caracterizaram as

condições fisiológicas e nutricionais dos vasos do xilema em cada data de inoculação podendo-se relacionar essas variáveis com o sucesso de infecção por *X. fastidiosa* após a inoculação mecânica.

Análises fisiológicas da interação entre o estresse hídrico e *X. fastidiosa* mostram que esses fatores atuam aditivamente. Quando a disponibilidade de água no solo diminui, o desenvolvimento de infecções por *X. fastidiosa* em plantas ocorre mais cedo, ocorrendo reduções pronunciadas na condução estomática, no potencial hídrico foliar e na condutância hidráulica das raízes da videira *Parthenocissus quinquefolia* (McElrone et al., 2003). A redução na fotossíntese de plantas infectadas está relacionada ao estresse hídrico, causado pela redução nas taxas de fluxo de seiva (Machado et al., 1994). Em videiras ocorre uma redução significativa no potencial hídrico foliar e na condutância estomática de plantas em estresse no final do verão (McElrone et al., 2004). Existem fortes evidências de que a oclusão do xilema causada por *X. fastidiosa* pode fazer com que o suprimento de água até o mesófilo foliar seja dificultado (Machado et al., 1994), explicando os baixos valores de taxa transpiratória, com a redução na assimilação de CO₂ e condutância estomática observados em plantas afetadas pela bactéria (Machado et al., 1994; Ribeiro et al., 2003; McElrone et al., 2004). Essa redução causada por *X. fastidiosa* atua adicionalmente com a limitação hídrica imposta pelo estresse hídrico (McElrone et al., 2004). De acordo com Haberman et al. (2003), o menor potencial hídrico encontrado em plantas doentes também reforça a hipótese de que ocorra oclusão do xilema.

Como folhas assintomáticas também manifestam reduções na capacidade fotossintética, isso sugere que outros mecanismos fisiológicos podem ser afetados pela infecção causada por *X. fastidiosa* (Machado et al., 1994). Como exemplo, pode-se citar as reações bioquímicas e/ou fotoquímicas da fotossíntese e/ou desbalanço hormonal, possivelmente causado por toxinas da própria bactéria. Em pessegueiros e videiras infectadas com *X. fastidiosa*, a redução na fotossíntese foi associada com toxinas e desbalanço hormonal (Andersen & French, 1987; Goodwin et al., 1988). Mudanças nos hormônios foliares, na concentração dos aminoácidos (prolina) e dos carboidratos têm

sido observadas em videiras infectadas (Goodwin et al., 1988). Entretanto, árvores de laranja doce infectadas não apresentam um padrão similar àquele observado em videiras.

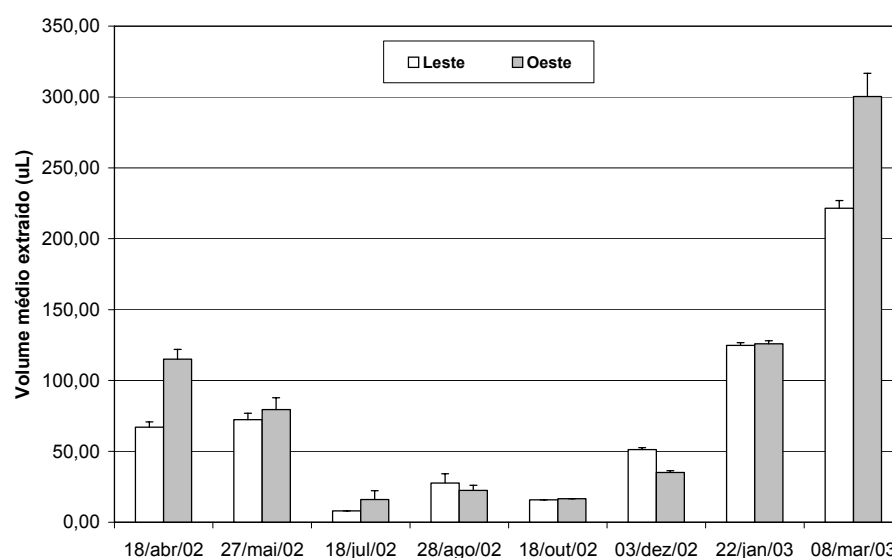


Figura 7 - Volume médio de seiva de xilema extraído de ramos cítricos nas diferentes datas de inoculação em Gavião Peixoto (SP)

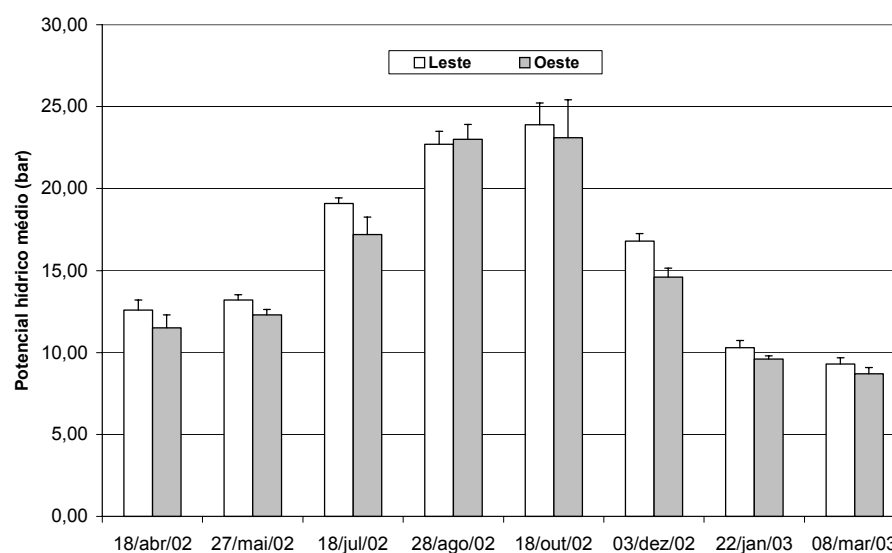


Figura 8 - Potencial hídrico médio ($\pm$ EPM) em ramos de árvores cítricas nas oito datas de inoculação em Gavião Peixoto (SP)

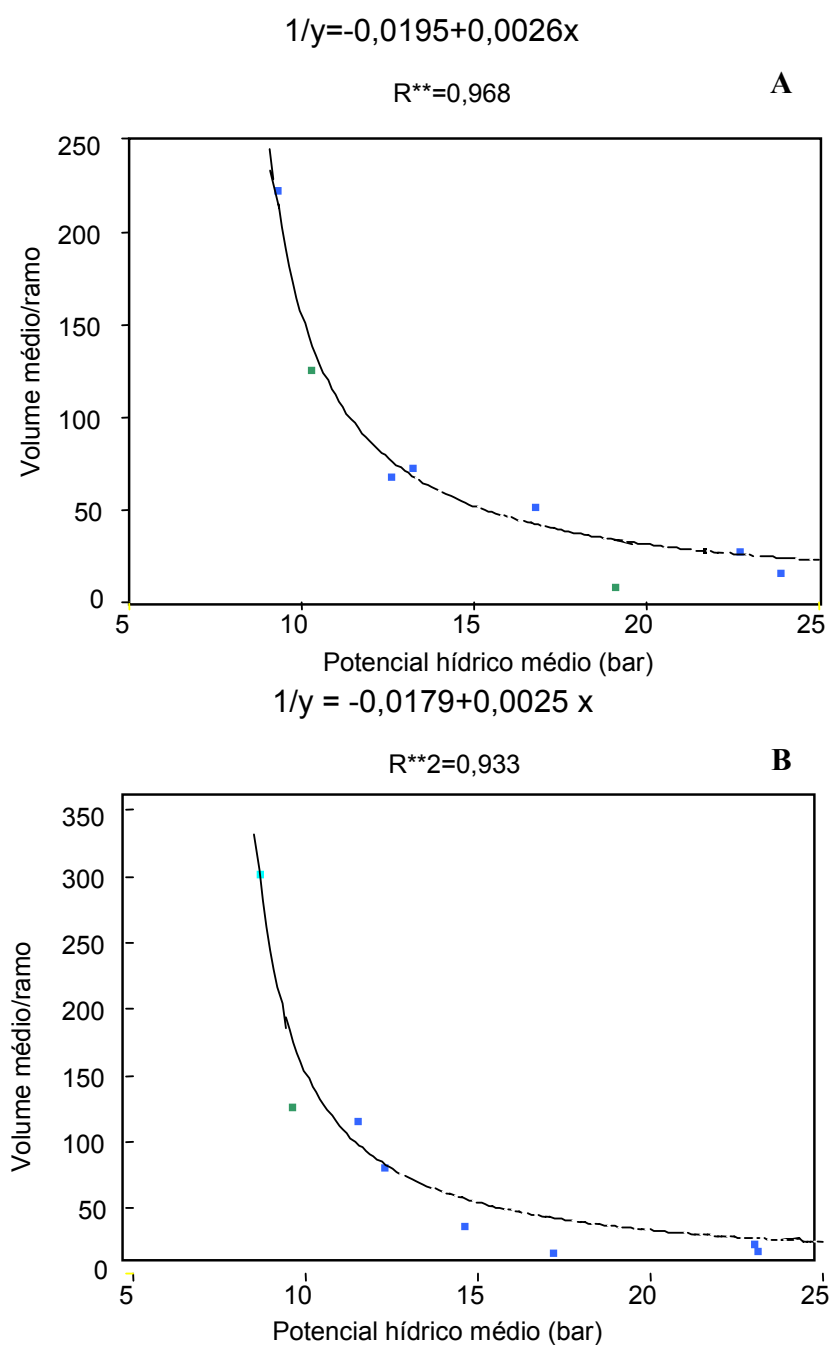


Figura 9 - Relação entre o volume médio de seiva do xilema extraído por ramo e o potencial hídrico médio (bar) dos ramos cítricos em um pomar de Gavião Peixoto (SP). A) Quadrante leste; B) Quadrante oeste

4.1.3 Influência das mudanças climáticas ao longo do ano na bioquímica da seiva do xilema de citros

Para investigar o efeito da época do ano na bioquímica do xilema (primavera, verão, outono e inverno) foram comparados as concentrações e o percentual de aminoácidos (Figuras 10 e 11), a concentração de ácidos orgânicos (Figura 12) e de carboidratos (Figura 13) presentes na seiva de ramos cítricos sadios. Foi considerada ainda a influência do clima (temperatura e umidade) na fisiologia da planta e composição da seiva (Figura 6).

O perfil de aminoácidos ao longo do ano variou entre as estações em número e em concentração (Figura 10). Comparando-se as épocas avaliadas, observou-se que o inverno apresentou os maiores índices de concentração para alguns aminoácidos, sendo estes, asparagina, glutamina e GABA (ácido γ -aminobutírico). Os demais aminoácidos estiveram presentes na seiva, porém em quantidades pouco representativas em relação aos anteriormente citados (Figuras 10B e 11). Observando-se o outro extremo, a época de verão, constatou-se os menores índices de concentração de aminoácidos, observaram-se maiores concentrações de asparagina, seguida pelo GABA e glutamina, os mesmos mais abundantes no inverno. Porém, a discrepância em concentração destes três compostos em relação aos demais aminoácidos presentes na seiva foi menor. Portanto, pode-se considerar que no verão ocorreu um maior equilíbrio na concentração de aminoácidos presentes na seiva do xilema (Figuras 10D e 11D).

Durante a primavera, época sucessora do inverno e antecessora do verão, o GABA tornou-se menos concentrado, porém, foi o aminoácido mais representativo e discrepante em relação aos demais (Figuras 10C e 11C). Surpreendentemente a asparagina e a glutamina tiveram sua concentração reduzida de 12.000 e 9000 nM para aproximadamente 2100 e 1900nM, respectivamente (Figura 10C). Percebe-se que a maioria dos aminoácidos sofreu redução na sua concentração no verão, principalmente o GABA, que passou de pouco mais de 5000nM para menos de 2000nM, ficando em nível semelhante ao da asparagina (Figura 10B).

Após essa fase de maior balanceamento entre os aminoácidos (verão), observou-se que a concentração dos aminoácidos mais abundantes em todas as épocas, asparagina, glutamina e GABA voltou a crescer no outono (Figura 10A e 11A), verificando-se, inclusive, um aumento na concentração de arginina. A seiva voltou a se tornar menos balanceada, antecedendo sua fase mais crítica, correspondente ao inverno (Figura 10B).

Estudando o comportamento alimentar da cigarrinha *Homalodisca coagulata* (Say) em plantas hospedeiras e a composição da seiva do xilema, Brodbeck et al. (1990) observaram que esse inseto preferiu alimentar-se daquelas plantas com maior concentração de aminoácidos, principalmente as do grupo das amidas, como a glutamina e a asparagina. A glutamina e a asparagina, abundantes na maioria das espécies vegetais (Andersen & Brodbeck, 1989), estão relacionadas à preferência hospedeira, sendo dois aminoácidos livres, não essenciais, que apresentam um papel vital no metabolismo de proteínas. Nesse ensaio a época onde os aminoácidos apresentavam-se mais concentrados, ou pelo menos, mais balanceados correspondeu ao final da primavera e ao verão. Possivelmente devido a esse balanceamento, essa época é mais atrativa e propícia à alimentação das cigarrinhas vetoras.

A elevada transformação de amônia orgânica em inorgânica ($\text{NH}_3^+ - \text{NH}_4^+$) durante estresse abiótico, acompanhada de um incremento da via biossintética da arginina, é considerado um mecanismo de desintoxicação do íon amônio. A quantidade de glutamina livre e sua proporção em relação ao glutamato disponível, assim como os de nitrato (NO_3^-) são, provavelmente, os metabólitos chaves que governam a capacidade de redução do nitrato nas plantas (Solomonson & Barber, 1990). A capacidade de incorporar amônio em condições de estresse (salino, osmótico ou nutricional), pode representar um mecanismo homeostático importante quando se trata de vegetais. A menor atividade da redutase do nitrato em plantas sob estresse hídrico se deve ao decréscimo no fluxo do substrato por falta de umidade, principal regulador dessa enzima (Crócomo, 1985). Como observado no presente ensaio, o inverno apresentou uma alta concentração de glutamina, além de GABA e asparagina, podendo-se inferir que o estresse hídrico pelo qual passaram as plantas nesse período (Figura 6), pode ter influenciado no estabelecimento de infecções primárias de *X. fastidiosa* no campo.

Vários tipos de estresse induzem a redução no crescimento da planta da qual resulta na acumulação de aminoácidos livres, amidas ou ureídeos, tanto na parte aérea como nas raízes e nódulos vegetais (Burity et al., 1999).

Plantas de *Canavalia ensiformes* (L.), no início da fase reprodutiva, apresentaram a concentração de aminoácidos e o metabolismo de nitrogênio profundamente alterados em relação ao estágio vegetativo. A atividade da enzima nitrato redutase, mostrou-se regulada pela glutamina, sendo mais ativa quando os níveis de glutamina eram menores (Crócomo, 1985; Camargos, 2003).

Em hospedeiros submetidos a estresse hídrico, a alimentação de cigarrinhas vetoras está associada à quantidade de aminoácidos totais, amidas e glutamina, sendo que as amidas servem como fagoestimulantes (Andersen et al., 1992). As taxas alimentares resultantes da concentração das amidas foram dadas pela razão entre aminoácidos essenciais (não sintetizados pelo inseto) sobre não-essenciais, observando-se maiores taxas de alimentação quando havia maior proporção de aminoácidos essenciais. Quando as plantas foram submetidas a níveis de estresse hídrico muito elevado, a alimentação decresceu exponencialmente em função da tensão do xilema.

A glutamina é ainda precursora de outros aminoácidos e um dos maiores transportadores de nitrogênio na seiva do xilema (Andersen et al., 1989). A fecundidade, o ganho de peso e a sobrevivência são mais relacionadas ao acúmulo de aminoácidos essenciais, assim, altas concentrações de amidas condicionam fatores de atratividade aos insetos, enquanto que o acúmulo de aminoácidos essenciais se relaciona ao desenvolvimento do inseto. De acordo com T.A. Giustolin (dados não publicados), a maior proporção de aminoácidos essenciais pode explicar a ocorrência de posturas de cigarrinhas vetoras em citros durante a primavera e verão.

Purcino et al. (2003) avaliaram alterações na composição da seiva do xilema e no metabolismo do nitrogênio em citros infectados com *X. fastidiosa*. Foram realizadas análises das seivas e folhas de plantas sadias e infectadas. Não se detectou amônia inorgânica nas folhas e, as plantas sadias apresentaram menos nitrato e mais aminoácidos e proteínas solúveis em relação às doentes, refletindo em maior atividade da enzima redutase do nitrato em plantas sadias. A arginina aumentou

consideravelmente em plantas doentes o que indica uma maior reciclagem de nitrogênio nessas plantas, hipótese confirmada também pela maior atividade da enzima glutamina sintetase. A atividade dessa enzima é associada a condições desfavoráveis de desenvolvimento. A maior atividade proteolítica e o maior teor de aminoácidos encontrados em folhas doentes também suportam essa hipótese. Desse modo, os autores verificaram que a infecção causada pela bactéria altera drasticamente o metabolismo do nitrogênio em citros. Considerando essas informações e correlacionando com as análises de seiva do xilema observa-se que essa época correspondeu nas condições desse ensaio ao outono, com uma maior concentração de arginina no xilema das plantas.

Brodbeck et al. (1990) analisaram o fluido do xilema coletado em dois momentos diferentes de espécies de plantas hospedeiras, quando o número de cigarrinhas que se alimentavam nas plantas era baixo, e em seguida, alto. A concentração de aminoácidos foi maior quando esse número era alto, sendo positivamente correlacionada com a seleção hospedeira, sendo que a concentração de aminoácidos e a preferência das cigarrinhas também foram afetadas pelo porta-enxerto. As amidas (glutamina e asparagina) em porta-enxertos preferenciais e não preferenciais foram os aminoácidos mais correlacionados com a seleção hospedeira. Esses compostos são predominantes no fluido do xilema, que tem altas taxas de nitrogênio e carbono, contribuindo para a alta percentagem de valores calóricos nesse fluido. A maioria dos aminoácidos menos abundantes também foi correlacionada positivamente com a preferência hospedeira (Brodbeck et al., 1990). Durante o verão na presente pesquisa, verificou-se um perfil de aminoácidos mais balanceado, em termos de concentração, indicando que a planta cítrica apresenta-se mais favorável ao desenvolvimento e atrativa às cigarrinhas.

Andersen et al. (1995) verificaram que a concentração da maioria dos compostos orgânicos varia pouco em função das variações nutricionais ou da quantidade de água no solo. Com isso, concluíram que esses compostos foram responsáveis pelas mudanças nas relações de água nas plantas, as quais foram maiores até que as alterações químicas do fluido do xilema.

Analizando a seiva de videira, Andersen & Brodbeck (1989a) determinaram que a solução do xilema compreende 80% de componentes orgânicos e 20%

de inorgânicos, mas que a taxa de componentes orgânicos para inorgânicos varia com o passar do tempo.

Andersen & Broadbeck (1989b) encontraram, na seiva do xilema de videira, 19 aminoácidos, 7 ácidos orgânicos, 3 açúcares, NH_4^+ , NO_3^- , além de macro e micro elementos. A osmolaridade total coincidiu com a soma de todos os componentes orgânicos e inorgânicos, indicando que a maioria dos componentes químicos no exudato do xilema foi identificada. Glutamina foi o composto nitrogenado predominante no exudato do xilema das plantas estudadas. A concentração de aminoácidos aumentou e a de ácidos orgânicos caiu nos exudatos no final do inverno, mas a de íons inorgânicos e a concentração de açúcares variou assincronicamente com o tempo. O aumento da concentração de aminoácidos totais foi um resultado do aumento da concentração de glutamina, enquanto que o declínio na concentração de ácidos orgânicos foi principalmente em função da redução na concentração dos ácidos málico e succínico. Então, além da osmolaridade do fluido do xilema ter permanecido relativamente no decorrer do tempo, diferenças substanciais no perfil químico ocorreram, em função da data de poda. No presente estudo, também se observou um aumento considerável na concentração de aminoácidos durante o inverno e redução na de ácidos orgânicos. A glutamina sofreu um aumento em sua concentração durante o inverno, porém o aminoácido mais abundante em todas as estações foi o GABA, com exceção do inverno quando predominou a asparagina.

Andersen et al. (1995) verificaram que asparagina, ácido aspártico, glutamina e ácido glutâmico foram os principais responsáveis pelas trocas diurnas na concentração de aminoácidos totais e de nitrogênio orgânico (N) em *Prunus persica* (L.), sendo que a variação diurna de N orgânico no fluido do xilema de *Vitis* foi devido a glutamina. Arginina, tanto quanto as amidas, foram fontes primárias de N orgânico no fluido do xilema de *Pyrus communis* (L.), sendo que não houve uma variação diurna consistente na concentração de aminoácidos e N orgânico. A predominância de ácidos orgânicos em todas as espécies examinadas foi de ácido cítrico e málico. Não houve variação diurna ocorreu na concentração de ácidos orgânicos ou açúcares do fluido do xilema de *P. communis* (Andersen et al., 1995).

Gzik (1996), trabalhando com beterrabas (*Beta vulgaris* L.) e estudando o modelo de aminoácidos livres sob diferentes condições de estresse, observou que a indução dos estresses osmótico, salino e hídrico resultou num rápido aumento no conteúdo de prolina, enquanto que a taxa de crescimento das plantas intactas caiu. A composição de aminoácidos livres variou para as diferentes condições de estresse. Ao contrário do ácido aspártico e glutâmico, que foram pouco influenciados pelos fatores de estresse, os conteúdos de ácidos orgânicos, amidas e aminoácidos básicos, aumentou repentinamente. A maioria dos níveis de outros aminoácidos livres, exceto serina, foram incrementados.

O ácido orgânico presente na seiva do xilema em maior concentração para todas as épocas avaliadas foi o ácido oxálico, sendo que no verão apresentou sua mais alta concentração e mais baixa durante o inverno (Figura 12). Esse ácido varia sua concentração ao longo do ano sendo esta baixa no inverno, crescendo na primavera e atingindo pico no verão e voltando a decrescer no outono. Os outros ácidos que foram detectados, porém em concentrações bem inferiores ao oxálico foram o ácido fumárico para todas as estações com exceção do inverno, o ácido málico no verão e o láctico na primavera (Figura 12).

Com relação ao conteúdo de carboidratos na seiva do xilema observou-se que glicose, frutose e sacarose estiveram presentes em todas as épocas do ano sem grandes variações em sua concentração (Figura 13). Frutose foi o açúcar mais abundante, seguido da glicose e sacarose.

Muitos trabalhos associam a glicose a mecanismos de patogenicidade das bactérias, principalmente àquelas capazes de produzirem exopolissacarídeos, tais como, goma xantana ou alguma fastidiana. Simpson et al. (2000), ao seqüenciarem o DNA da *X. fastidiosa*, determinaram vários genes operon *gum* para esta bactéria, semelhante aos genes patogênicos encontrados em *Xanthomonas campestris*. Entretanto, Souza (2002), estudando a produção e caracterização de mutantes do operon *gum* de *X. fastidiosa*, não observou qualquer influência da glicose sobre genes da bactéria que pudessem ser associados a patogenicidade. Acredita-se porém, que este açúcar exerça um papel importante no estabelecimento de *X. fastidiosa* no xilema de citros, de modo a torná-la

patogênica, mas ainda se faz necessário maior evidência experimental sobre essa relação. Caso essa associação seja realmente verdadeira, tomando como base os resultados obtidos da seiva do xilema nas diferentes épocas do ano (Figura 12), esse não seria um fator limitante ao estabelecimento de infecções da bactéria em qualquer estação do ano em plantas saudáveis de citros.

Talvez, a menor taxa de infecção por *X. fastidiosa* observada durante o inverno, (Figuras 2 e 4) esteja associada ao desbalanço de aminoácidos nessa época. Fatores abióticos como temperatura e umidade também devem ser considerados, visto que o déficit hídrico e baixas temperaturas durante o inverno nos pomares (Figura 6) podem ter afetado o estabelecimento inicial da bactéria.

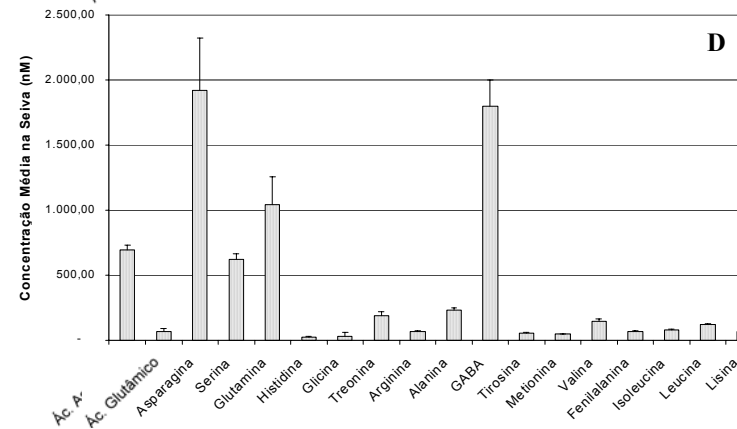
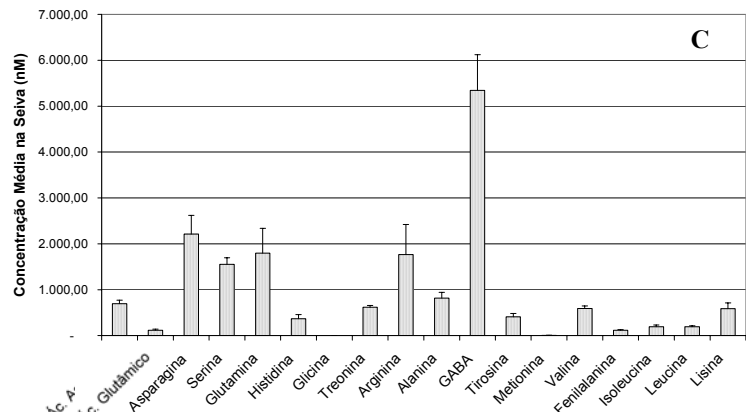
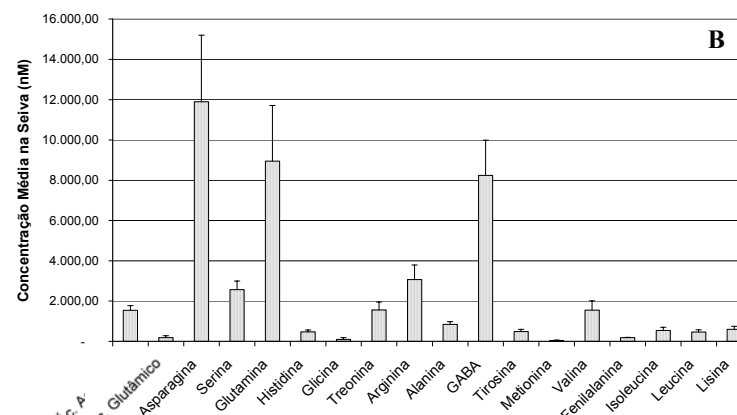
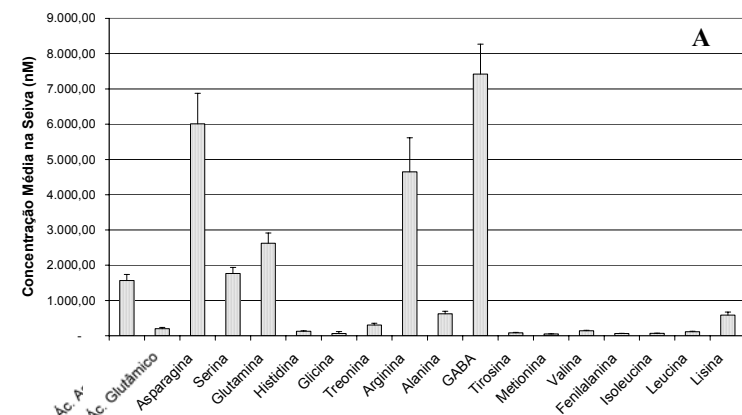


Figura 10 - Concentração de aminoácidos na seiva do xilema extraída de ramos cítricos saudáveis em diferentes épocas do ano, no município de Gavião Peixoto (SP). A) outono (abril e maio/2002); B) inverno (julho e agosto/2002); C) primavera (outubro e dezembro/2002); D) verão (janeiro e fevereiro/2003)

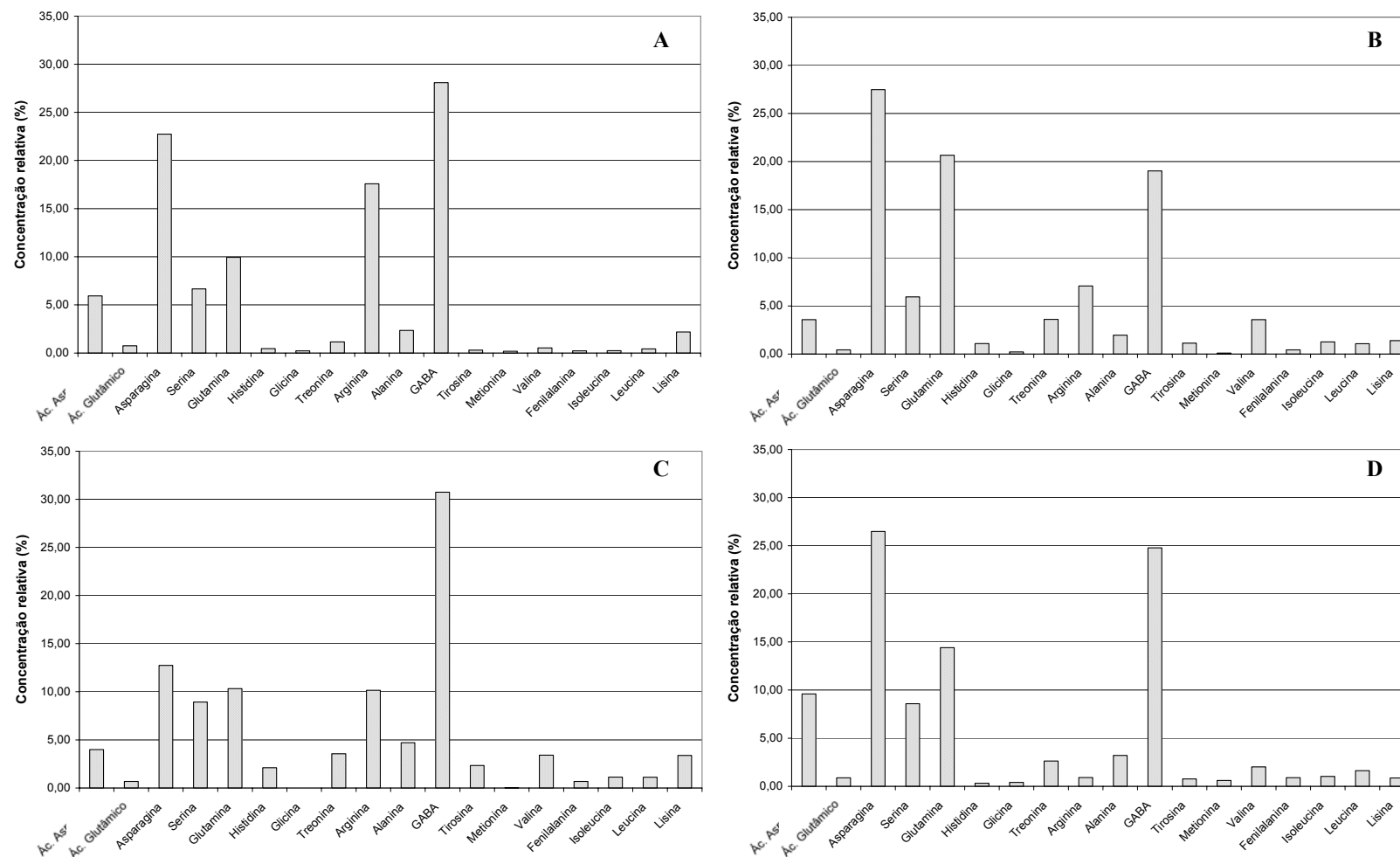


Figura 11 - Concentração relativa média de aminoácidos na seiva do xilema extraída de ramos cítricos sadios em diferentes épocas do ano, no município de Gavião Peixoto (SP). A) outono (abril e maio/2002); inverno (julho e agosto/2002); C) primavera (outubro e dezembro/2002); D) verão (janeiro e fevereiro/2003)

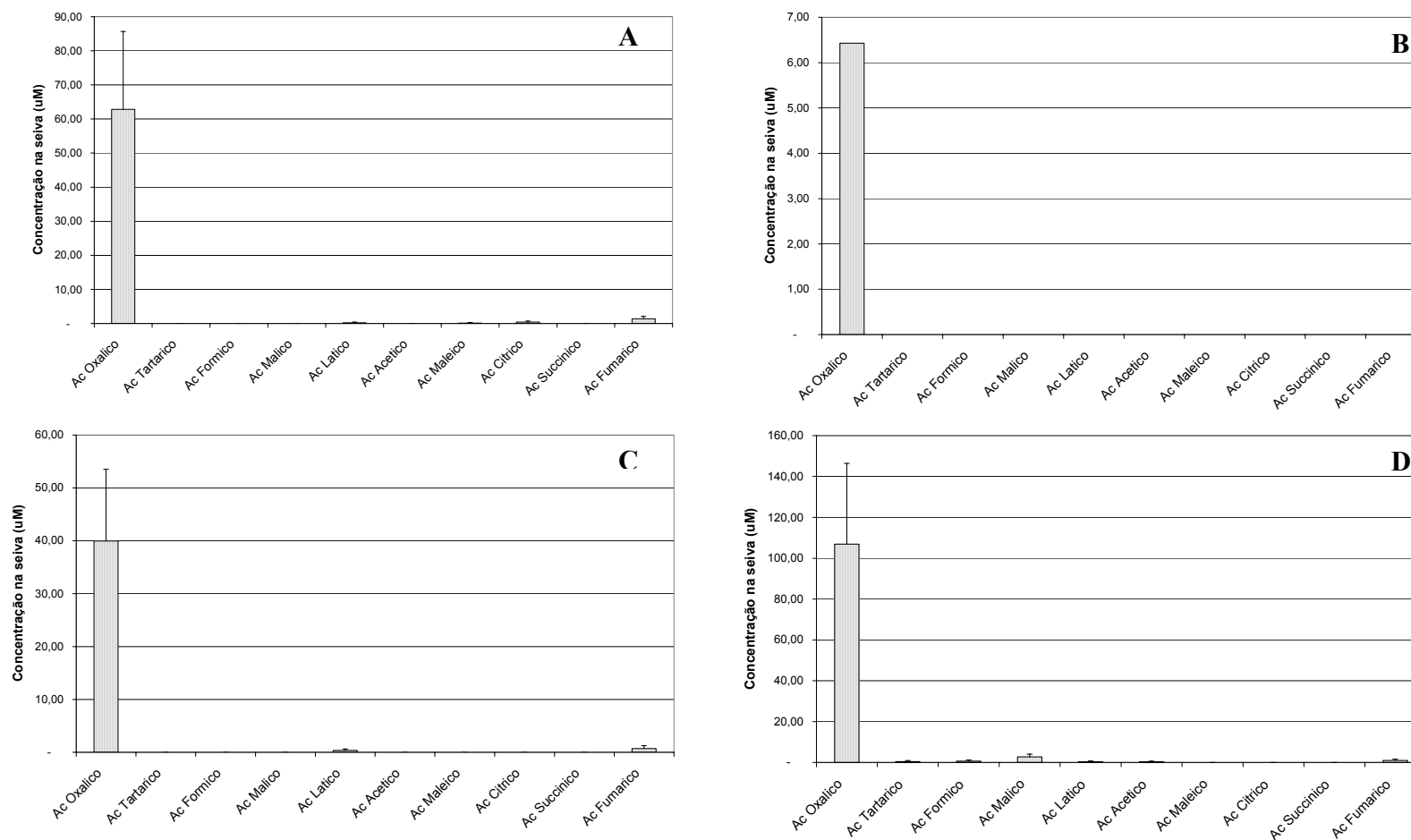


Figura 12 - Concentração média de ácidos orgânicos na seiva de ramos saudáveis de citros extraída em diferentes épocas do ano, no município de Gavião Peixoto (SP). A) outono (abril e maio/2002); B) inverno (julho e agosto/2002); C) primavera (outubro e dezembro/2002); D) verão (janeiro e fevereiro/2003).

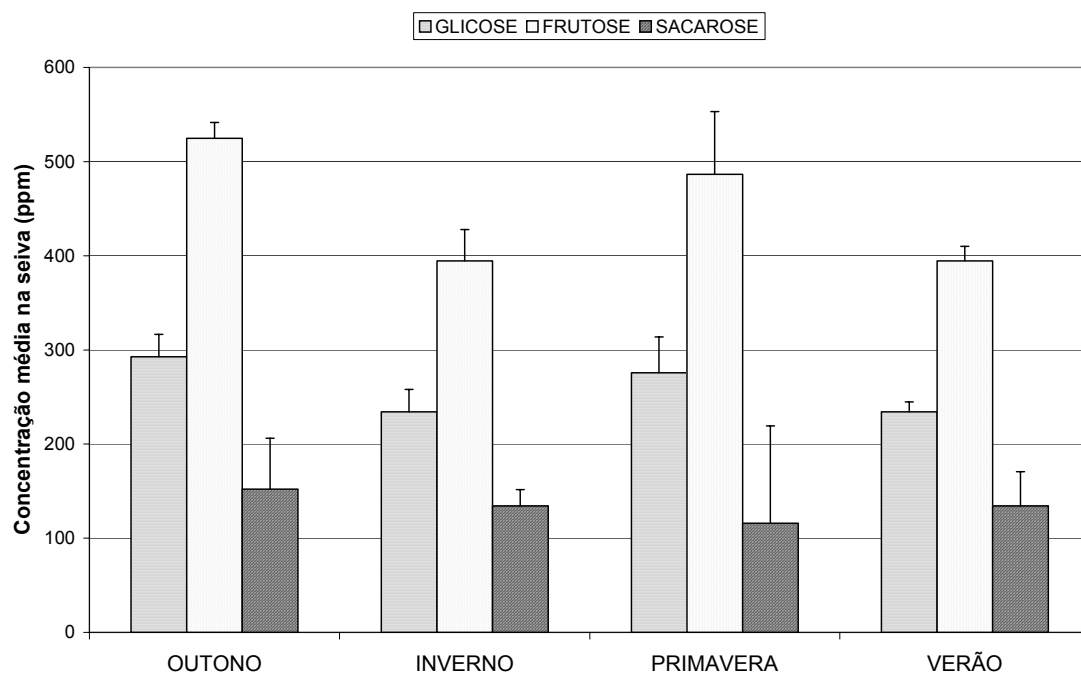


Figura 13 - Concentração média de carboidratos na seiva do xilema extraída de ramos cítricos em diferentes épocas do ano, no município de Gavião Peixoto (SP), no período de abril/2002 a fevereiro/2003

4.2. Experimentos sob condições controladas

4.2.1 Efeito do déficit hídrico do solo e temperatura sobre a infecção por *X. fastidiosa*

4.2.1.1 Ensaios com mudas de *C. sinensis* em câmara de crescimento e em casa-de-vegetação

Os resultados desse experimento mostraram um efeito negativo do déficit hídrico no sucesso de infecções primárias por *X. fastidiosa* nas condições de inverno, já que nenhuma planta apresentou-se positiva para a presença da bactéria por cultura e PCR após 2 meses da inoculação (Figura 14), enquanto que as plantas mantidas em capacidade de campo apresentaram 60% de infecção (resultados de cultura + PCR). Nas condições de verão, tanto plantas mantidas em capacidade de campo quanto em estresse hídrico apresentaram-se infectadas pela bactéria (Figura 14), embora tenha havido uma menor porcentagem de infecção no segundo caso. Nenhuma das plantas mantidas como testemunhas foram positivas para *X. fastidiosa* nos testes de detecção.

O potencial hídrico médio das plantas cítricas sadias (controles negativos) mantidas sob déficit hídrico em câmara de crescimento foi bem maior do que o das plantas irrigadas nas condições de inverno. Isso talvez explique, em parte, o não estabelecimento de infecções primárias de *X. fastidiosa* no regime de estresse hídrico (Figura 14A). Entretanto, o mesmo efeito de regime hídrico no potencial hídrico não foi observado nas condições de verão em câmara de crescimento (Figura 14A) e nas condições de verão e inverno na casa-de-vegetação (Figura 14B).

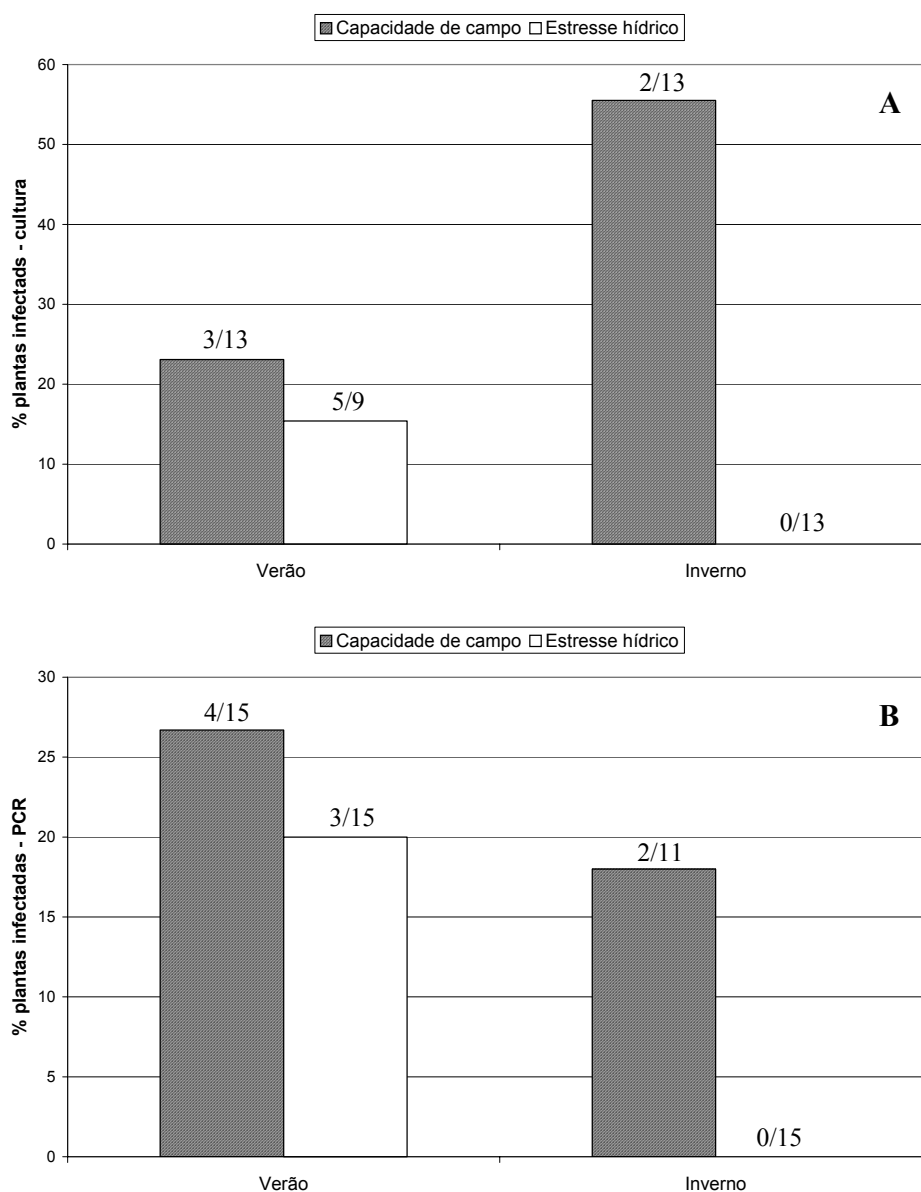


Figura 14 - Detecção de *X. fastidiosa* por cultura (A) e PCR (B) após 2 meses da inoculação mecânica em mudas cítricas mantidas sob capacidade de campo e estresse hídrico em condições simuladas de verão e inverno em câmara de crescimento. Proporções sobre as barras representam o número de plantas infectadas sobre o total de plantas inoculadas

Em casa-de-vegetação observou-se que as plantas mantidas em capacidade de campo, tanto nas condições de inverno quanto nas de verão, apresentaram taxas de infecção por *X. fastidiosa* superiores a 30% por cultura e/ou PCR (Figura 14). O déficit hídrico, nesse ambiente mostrou-se um fator limitante ao desenvolvimento da bactéria nos vasos das plantas, independente da condição de temperatura (Figura 14). Nenhuma testemunha apresentou-se positiva a presença da bactéria.

Nos ensaios em casa-de-vegetação, a temperatura média registrada para as condições de verão foi de $26,8 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, enquanto que nas de inverno, a média de temperatura foi de $21,7 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. A umidade relativa do ar, também registrada por “data logger” foi de 74,6% no verão e de 69,4% no inverno ($\pm 3\%$).

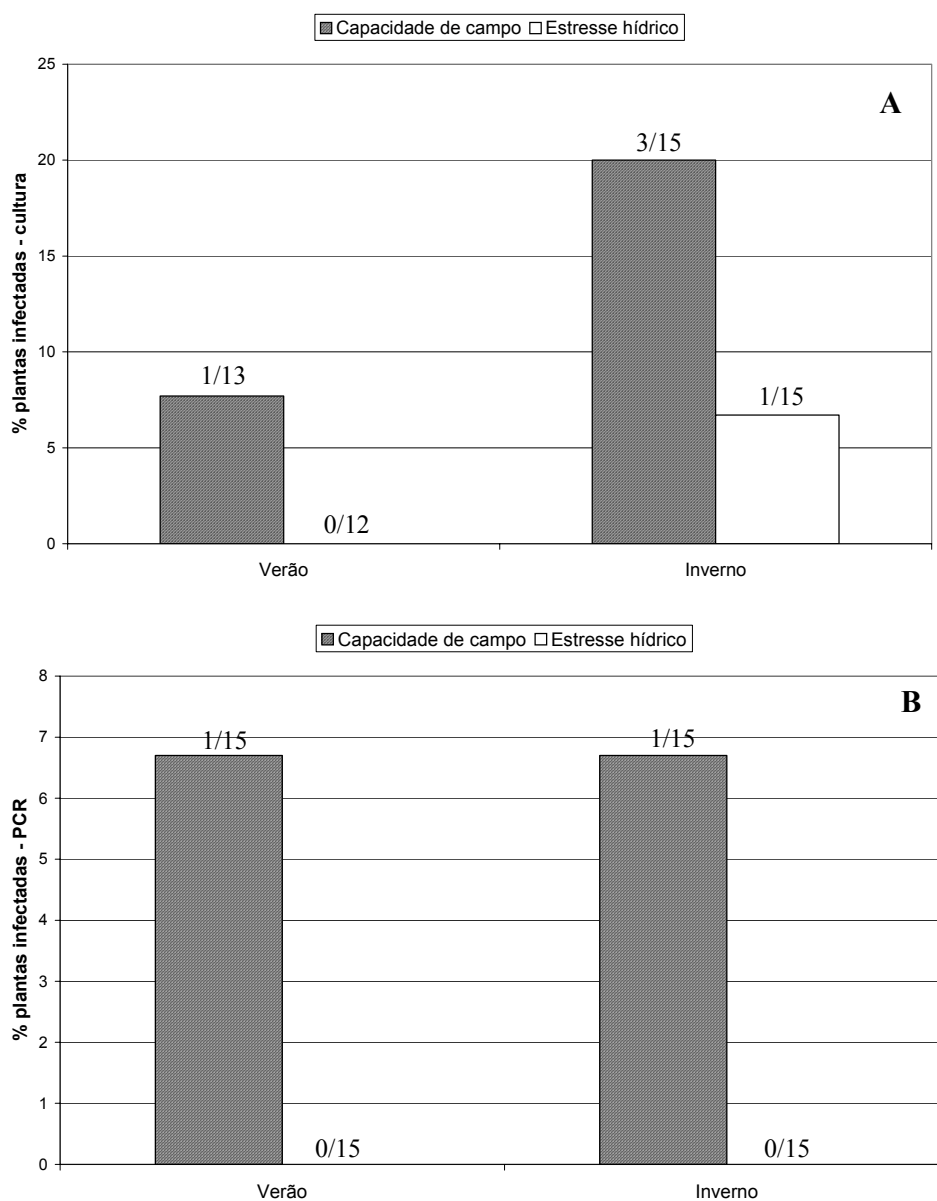


Figura 15 - Detecção de *X. fastidiosa* por cultura (A) e PCR (B) após 2 meses da inoculação mecânica em mudas cítricas mantidas sob capacidade de campo e estresse hídrico em condições simuladas de verão e inverno em casa-de-vegetação. Proporções sobre as barras representam o número de plantas infectadas sobre o total de plantas inoculadas

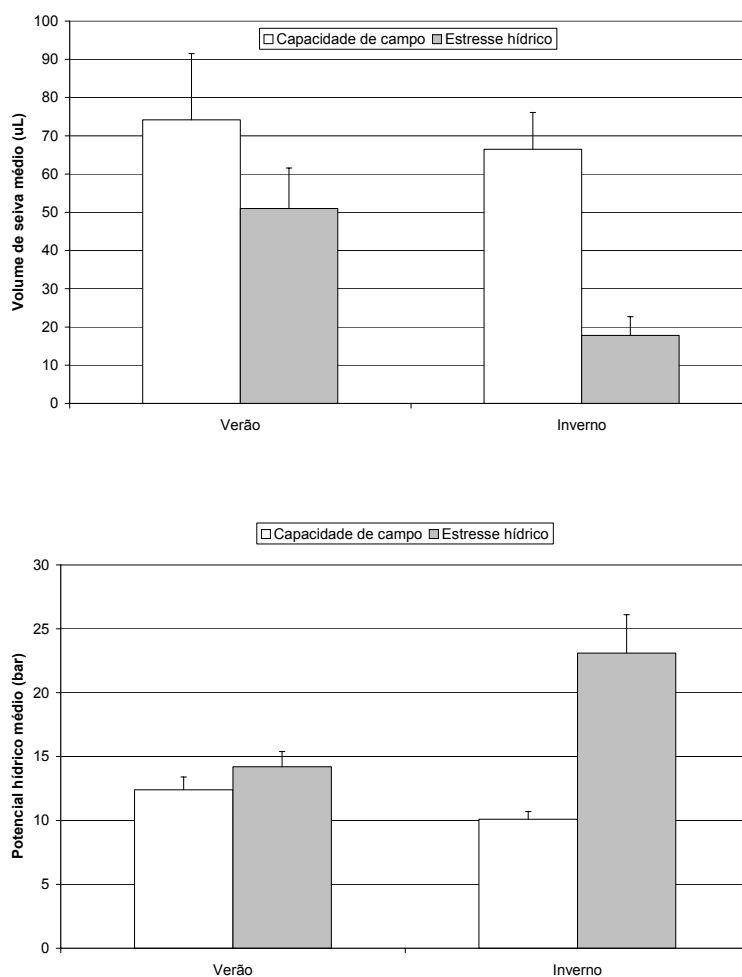


Figura 16 - Volume médio de seiva de xilema extraída (A) e potencial hídrico médio (B) de plantas cítricas sadias mantidas sob capacidade de campo e estresse hídrico nas condições simuladas de verão e inverno em câmara de crescimento

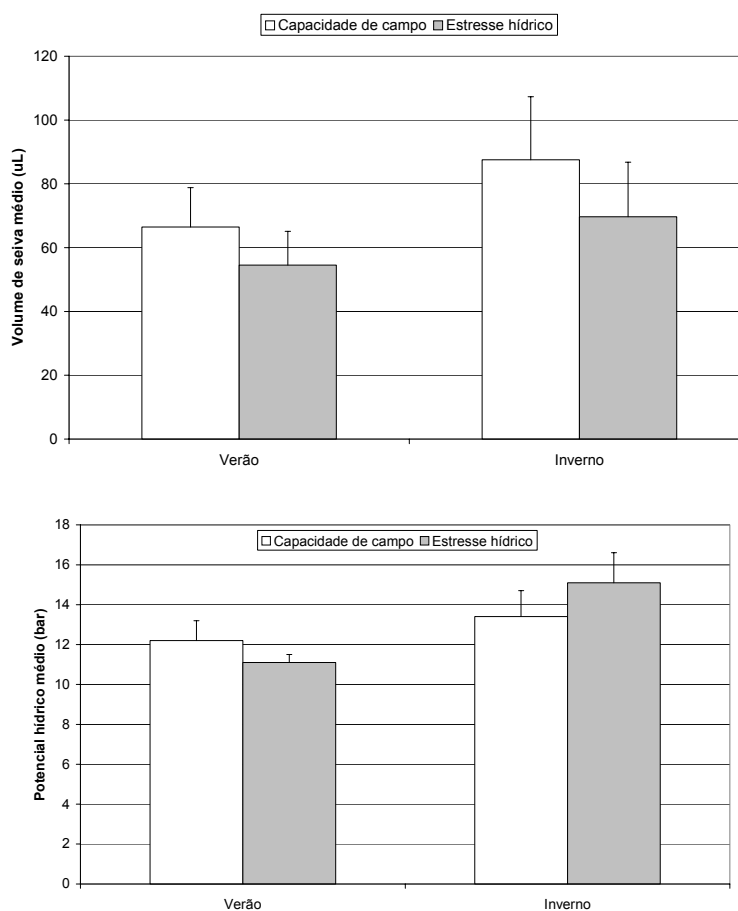


Figura 17 - Volume médio de seiva de xilema extraída (A) e potencial hídrico médio (B) de plantas cítricas sadias mantidas sob capacidade de campo e estresse hídrico nas condições simuladas de verão e inverno em casa-de-vegetação

4.2.1.2 Ensaios em câmara de crescimento inoculando “seedlings” de citros

Após 60 dias da inoculação dos “seedlings” de laranja doce, os testes de PCR e isolamento em meio de cultura para detecção de *X. fastidiosa* mostraram que nas condições de inverno, as plantas mantidas em capacidade de campo (bandeja 1), ou seja, com água disponível no solo, apresentou maior sucesso de infecção em relação às plantas mantidas em déficit hídrico do solo (bandeja 3). Comparando-se os resultados positivos dos dois testes, verificou-se que ambos funcionaram, sendo que a recuperação por isolamento em meio de cultura das plantas inoculadas da caixa 1 foi bem maior no teste sem diluição em relação ao PCR. Amostras diluídas 10x apresentaram resultados semelhantes àqueles obtidos por PCR e as diluídas 50x, não detectaram a bactéria.

Pelo teste de isolamento em meio de cultura foi observado que as plantas da caixa 3 apresentaram menor sucesso de infecção em relação àquelas mantidas na caixa 1. Quando as mesmas plantas foram avaliadas por PCR, o jogo de primers CVC1 + 272-2int não detectou a presença de *X. fastidiosa*. Nesse caso, vale ressaltar que o isolamento em meio de cultura detecta apenas células viáveis da bactéria, com um limite de detecção de 10^4 , enquanto os testes de PCR podem detectar tanto células vivas quanto mortas, com limiar de 10^2 .

As plantas dos tratamentos testemunhas, caixas 2 e 4, em capacidade de campo e em déficit hídrico, respectivamente, foram avaliadas por PCR com o jogo de primers CVC1 + 272-2int. Esses primers são mais sensíveis na detecção da estirpe da bactéria de citros e não detectaram nenhuma testemunha positiva quanto à presença de *X. fastidiosa*.

Tabela 2. Percentual de amostras foliares de “seedlings” de citros inoculados com *X. fastidiosa* mantidos em diferentes condições de temperatura e umidade, avaliadas por isolamento em meio de cultura PWG e por PCR

Condição de Temperatura	Condição de umidade	Isolamento em PWG sem diluição	Isolamento em PWG 10x diluído	PCR (CVC1+272-2int)
Verão¹	Capacidade de campo	7,5	2,5	0
	Estresse hídrico	2,5	2,5	0
Inverno²	Capacidade de campo	67,5	31,6	20
	Estresse hídrico	15	2,6	0

¹Temperatura média de 24°C e fotofase de 13h.

²Temperatura média de 19°C e fotofase de 11h.

Tabela 3. Média populacional de *X. fastidiosa* em amostras foliares de “seedlings” de citros inoculados, mantidos em diferentes condições de temperatura e umidade, por isolamento em meio de cultura

Condição de temperatura	Tratamentos de umidade	Câmara de Crescimento
Verão¹	Capacidade de campo	5,4 ± 0,4 ³
	Estresse hídrico	4,7 ± 0,2
Inverno²	Capacidade de campo	5,56 ± 0,8
	Estresse hídrico	0

¹Temperatura média de 24°C e fotofase de 13h.

²Temperatura média de 19°C e fotofase de 11h.

³População bacteriana média em Log UFC/mL de tampão/g de tecido ± EPM.

4.2.2 Influência das condições hídricas do solo e da temperatura na sobrevivência e alimentação do inseto vetor em “seedlings” de citros

Este ensaio avaliou a influência das condições hídricas do solo e de temperatura ambiente nas taxas de sobrevivência e de alimentação da cigarrinha vetora *O. facialis* em plantas cítricas, visando-se investigar o efeito de época do ano na adequação de citros para os vetores e discutir possíveis implicações sobre a probabilidade de transmissão da bactéria em pomares de laranja.

Nas condições simuladas de inverno, os adultos de *O. facialis* mantidos em “seedlings” cítricos sob regime de estresse hídrico tiveram um percentual de sobrevivência inferior àqueles mantidos em plantas bem irrigadas, no regime de capacidade de campo. Após 96h do início do ensaio, a sobrevivência sob estresse hídrico caiu drasticamente, atingindo o nível de apenas 20% com 156h (6,5 dias) (Figura 18A). No regime de capacidade de campo, a sobrevivência manteve-se acima dos 80%, no mesmo período. O ensaio foi encerrado após 10 dias, quando a sobrevivência sob estresse hídrico caiu abaixo de 20%. Naquele momento, mais de 70% das cigarrinhas em plantas sob capacidade de campo permaneciam vivas (Figura 18A).

Na simulação de verão, as taxas de sobrevivência das cigarrinhas nos dois regimes hídricos foram inferiores às obtidas nas condições de inverno. As curvas de sobrevivência observadas sob capacidade de campo e estresse hídrico foram semelhantes nas condições de verão, porém, no primeiro tratamento as cigarrinhas apresentaram taxas de sobrevivência cerca de duas vezes mais elevadas durante quase todo o experimento (Figura 18B). Para ambos os tratamentos, houve uma queda brusca na sobrevivência durante as primeiras 48h. Posteriormente, as taxas decresceram gradativamente, atingindo níveis inferiores a 10%, no tratamento com estresse e pouco mais de 20% no tratamento de capacidade de campo (Figura 18B). Através das análises de curvas de sobrevida de *O. facialis*, encontrou-se diferença estatística significativa entre os tratamentos capacidade de campo e estresse hídrico tanto nas condições

simuladas de inverno (P Log-Rank < 0,001; P Wilcoxon < 0,001) (Figura 19A), quanto nas de verão (P Log-Rank = 0,0002; P Wilcoxon = 0,0003) (Figura 19B).

Tanto nas condições de inverno como nas de verão, as cigarrinhas mantidas em “seedlings” de citros no regime de capacidade de campo tiveram volumes médios de excreção de “honeydew” superiores aos obtidos em plantas sob estresse hídrico (Figura 20). O volume médio excretado pelos indivíduos mantidos nas condições de verão, para ambos os regimes hídricos, foi cerca de duas vezes maior do que aquele excretado por cigarrinhas em condições de inverno.

Na simulação de inverno, após 24 e 48 h de confinamento nas mudas cítricas, o percentual de cigarrinhas que excretaram “honeydew” foi baixo, não diferindo entre os regimes de capacidade de campo e de estresse hídrico (Figura 21A). Após 72 h, entretanto, este percentual dobrou para as cigarrinhas mantidas em “seedlings” em capacidade de campo em relação ao tratamento com estresse hídrico. Somente após 96 h de confinamento, houve um pequeno aumento no número de cigarrinhas que excretaram sob estresse hídrico, porém, o percentual manteve-se cerca de duas vezes inferior ao observado no regime de capacidade de campo (Figura 21A).

Quando a situação simulada foi a de verão, observou-se que até 48 h de confinamento, houve maior percentual de excreção no regime de capacidade de campo (Figura 21B). Entretanto, passado este período inicial, os poucos sobreviventes (cerca de 20%) (Figura 19B) no regime de estresse hídrico aumentaram drasticamente a taxa de excreção, atingindo um percentual cumulativo superior a 80% com 72 e 96 h de confinamento, igualando-se ao observado sob capacidade de campo (Figura 21B).

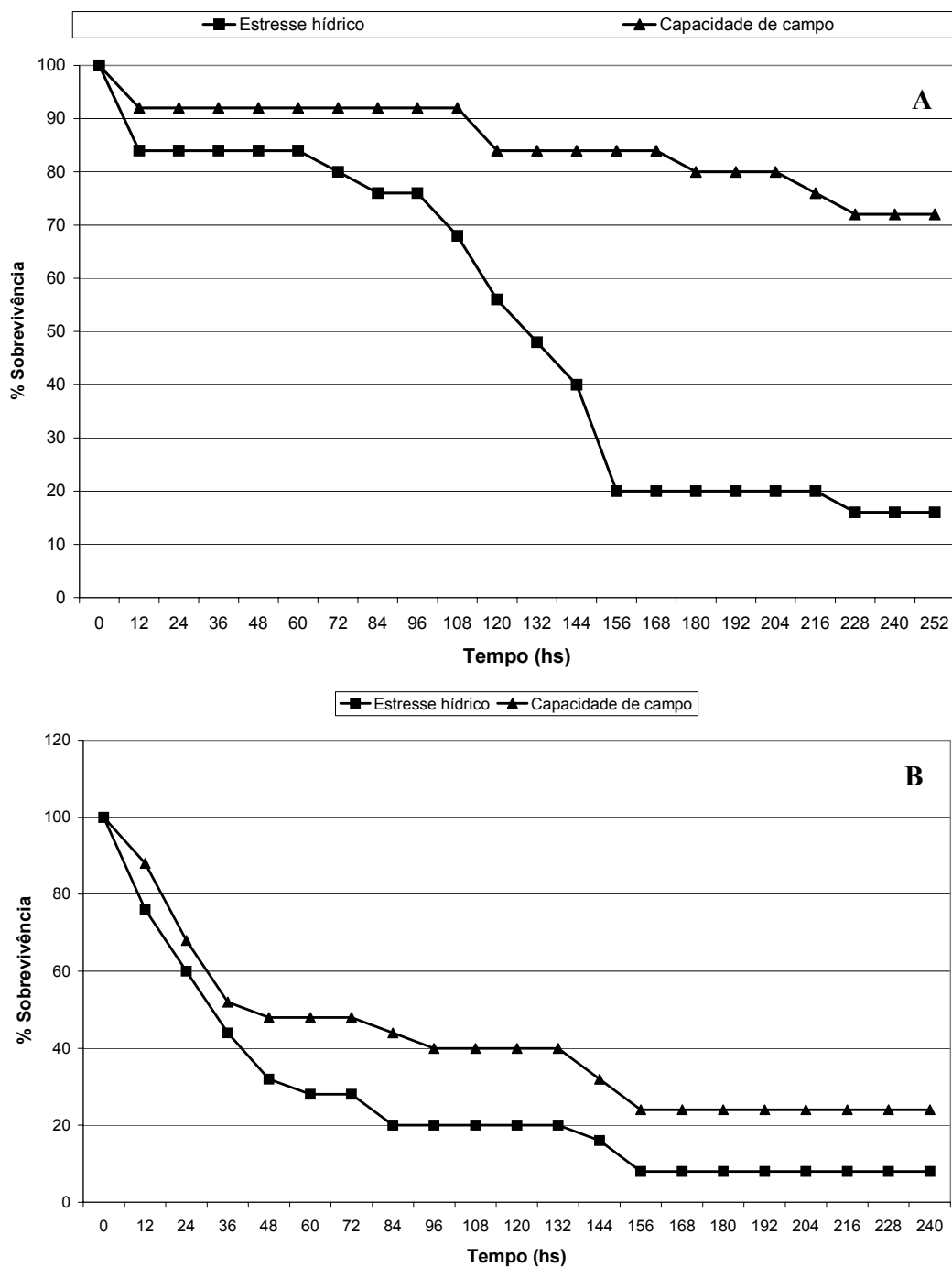


Figura 18 - Percentual de sobrevivência ao longo do tempo de *O. facialis* em “seedlings” de citros mantidos sob estresse hídrico e capacidade de campo, nas condições simuladas de inverno (A) e verão (B)

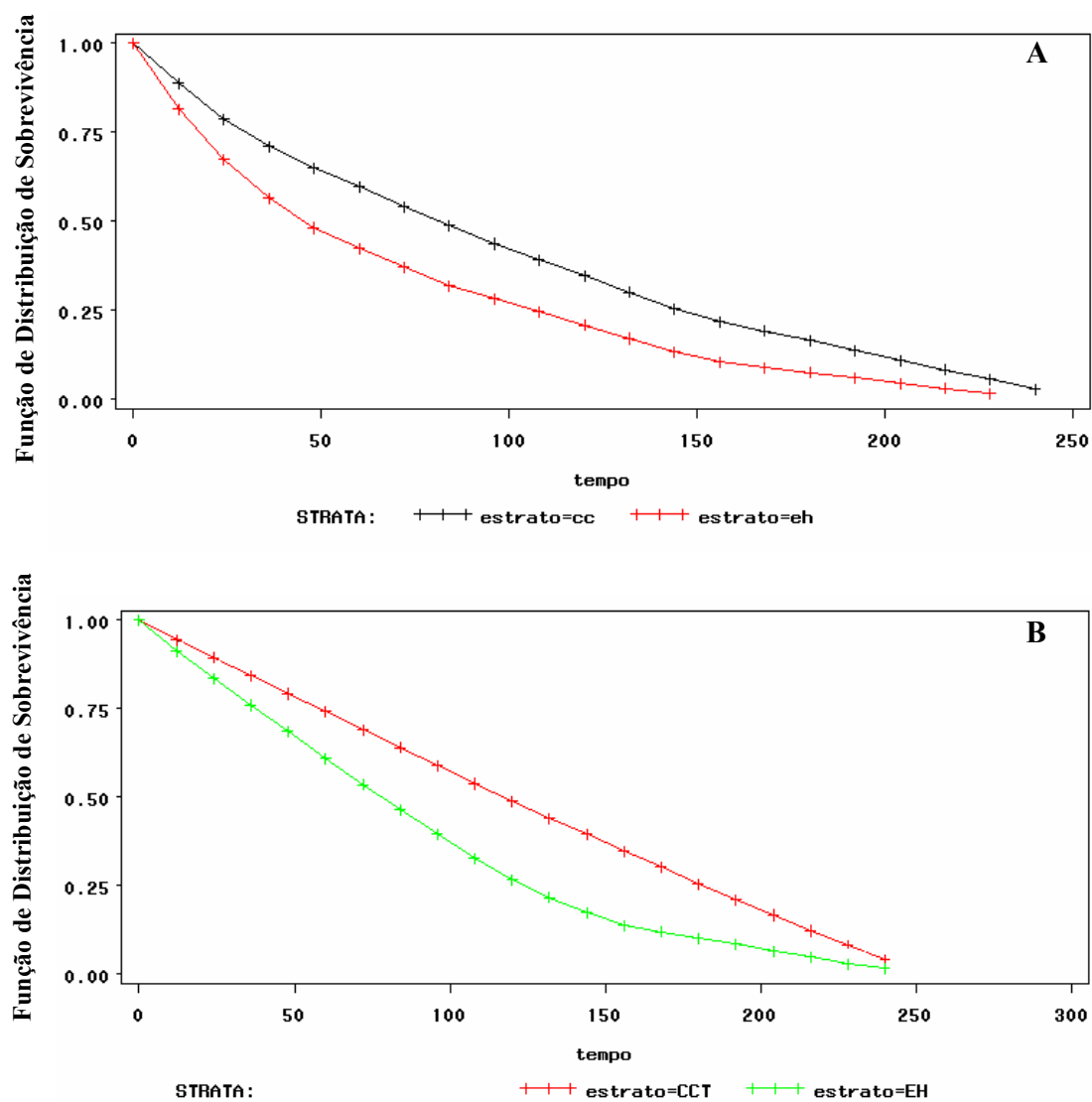


Figura 19 - Curvas de sobrevida ao longo do tempo (h) de *O. facialis* em "seedlings" de citros mantidos sob capacidade de campo (estrato=CCT) e estresse hídrico (estrato=EH), nas condições simuladas de inverno (A) e verão (B)

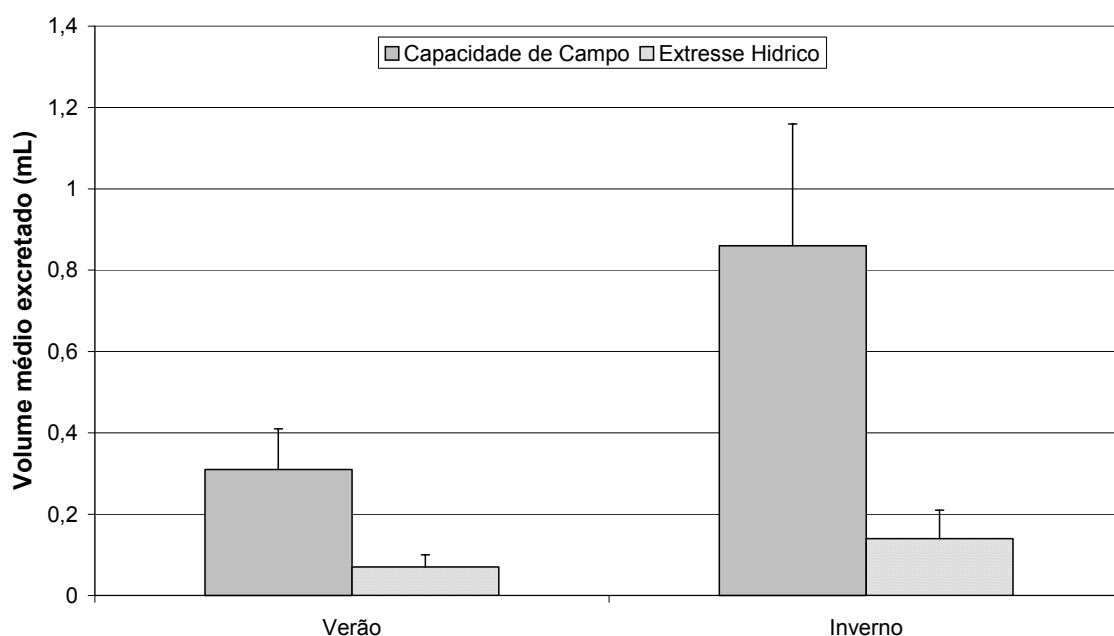


Figura 20 - Volume médio de “honeydew” excretado por *O. facialis* durante 96 h de confinamento em mudas cítricas mantidas sob capacidade de campo e estresse hídrico, nas condições simuladas de temperatura de verão e de inverno. Letras diferentes, dentro de uma mesma condição de temperatura, diferem estatisticamente entre si pelo teste *t* ($P < 0,05$). Barras sobre as colunas representam o erro padrão da média

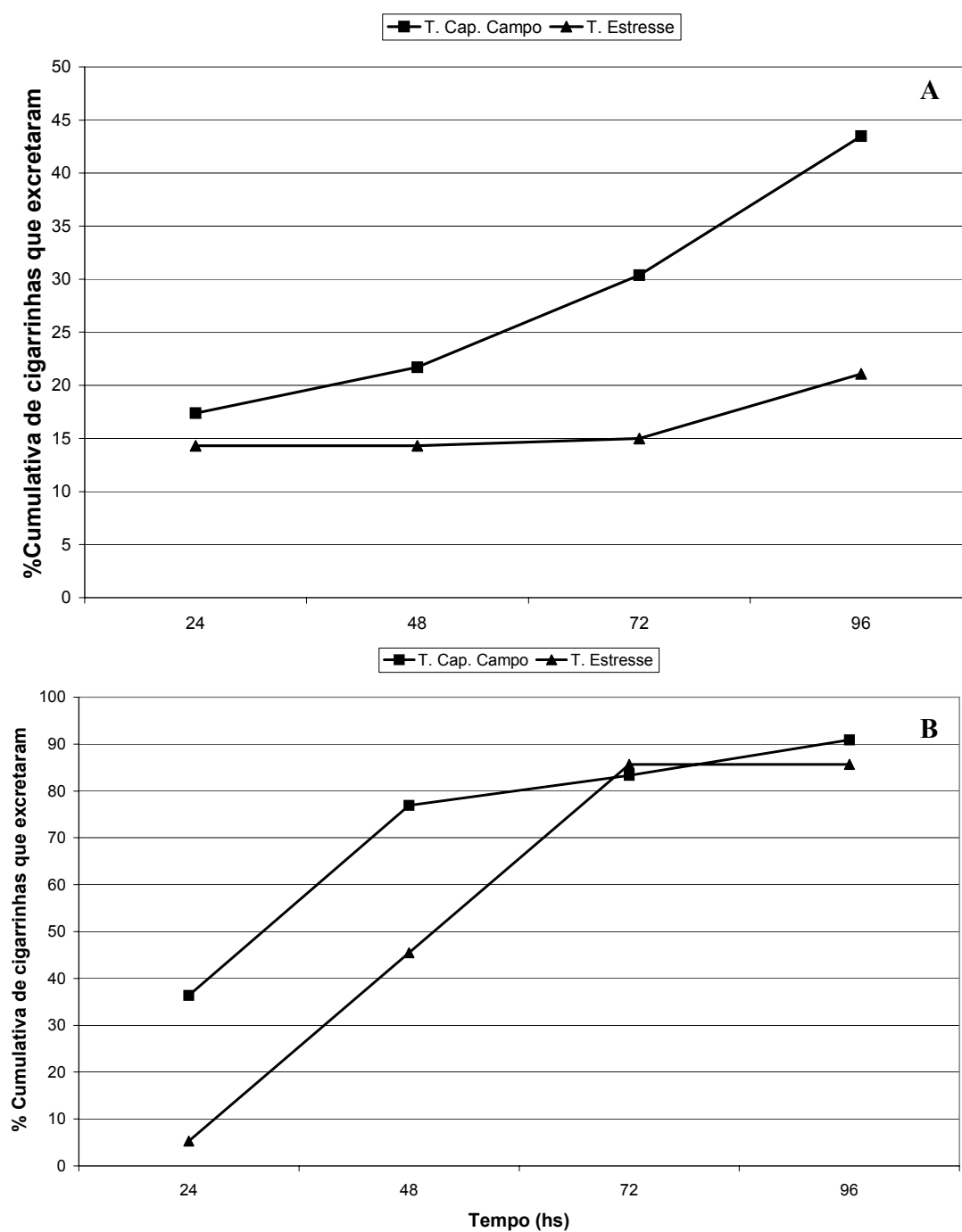


Figura 21 - Percentual cumulativo de indivíduos de *O. facialis* que excretaram “honeydew” no período de 96 h de confinamento em “seedlings” de citros mantidos sob capacidade de campo e estresse hídrico nas condições simuladas de inverno (A) e verão (B)

Este estudo mostra que as condições hídricas do solo e a temperatura ambiente influenciam a sobrevivência e alimentação da cigarrinha *O. facialis* em mudas de citros. Verificaram-se menores taxas de excreção de “honeydew” e de sobrevivência deste inseto vetor em plantas mantidas sob estresse hídrico em relação a plantas em regime de capacidade de campo, independentemente das condições de temperatura (verão ou inverno). Embora as condições de temperatura (e fotoperíodo) de verão e de inverno tenham sido testadas em ensaios independentes, com lotes distintos de insetos, houve uma clara tendência de maior excreção de “honeydew” nas condições de temperatura mais elevada (verão), para ambos os regimes hídricos. Pode-se dizer que na presença de temperaturas mais elevadas e tendo as plantas cítricas disponibilidade hídrica, o estímulo para iniciar a alimentação é maior. Após 48h nas condições de verão, a maioria dos sobreviventes (>80%) iniciou a alimentação, excretando quantidades mensuráveis de “honeydew”. Verificou-se, entretanto, uma taxa mais rápida de mortalidade das cigarrinhas nas condições de verão, possivelmente pela maior transpiração e perda de água pelas plantas e insetos, principalmente no regime de estresse hídrico.

Os resultados obtidos em laboratório são consistentes com estudos prévios de dinâmica populacional de cigarrinhas em pomares e viveiros cítricos. De acordo com Garcia Jr. et al. (1997), o número de cigarrinhas em viveiros que eram produzidos a céu aberto, começava a aumentar no início do verão, atingindo picos no final dessa estação e no outono com queda populacional no inverno e primavera. A população de vetores foi relacionada a características dos viveiros, tais como a localização em baixadas úmidas e irrigação, constatando-se que a disponibilidade de água é fundamental na perpetuação da população de cigarrinhas durante o inverno (estação seca) e a primavera, em viveiros de citros.

A flutuação populacional de cigarrinhas é influenciada direta e indiretamente pelo clima, sendo que em anos com estiagem prolongada (após o inverno), as infestações são mais tardias nos pomares (Roberto & Yamamoto, 1998). Como as cigarrinhas preferem alimentar-se de partes novas e tenras das plantas (Marucci et al., 2004), o atraso na emissão de brotações resulta num atraso em sua infestação. Em anos com

distribuição normal de chuvas, a colonização pelas cigarrinhas tem início em meados da primavera e, caso esta aumente em 10%, aconselha-se entrar com o controle químico, de preferência com produtos sistêmicos de tronco ou granulados de solo, por maior seletividade e período residual (Roberto & Yamamoto, 1998).

O déficit hídrico vegetal pode ser definido como todo o conteúdo de água de um tecido que se encontra abaixo do conteúdo de água mais alto exibido durante seu estado de maior hidratação. Quando o esse déficit é suficientemente lento para permitir mudança nos processos fisiológicos e de desenvolvimento, ele tem vários efeitos sobre o crescimento da planta, como redução na expansão foliar e, conseqüentemente, na fotossíntese (Taiz & Zeiger, 2004). O déficit hídrico em plantas hospedeiras pode resultar na menor produção de brotações (Garcia Jr. et al., 1997), redução nos níveis nutricionais e aumento na tensão do xilema (Andersen et al., 1992), podendo influenciar na alimentação e preferência das cigarrinhas (Garcia Jr. et al., 1997, Milanez et al., 2003), e promover mudanças em seu ciclo de vida (Hoffman & Hogg, 1991, Hoffman et al., 1991). Poucos estudos têm descrito mudanças no perfil químico em função da temperatura, sendo essas de significância prática nas observações dos pesquisadores, já que a composição do fluido do xilema pode servir como um indicador do status de nutrição das plantas (Bollard, 1953 citado por Andersen & Brodbeck, 1989).

A excreção de “honeydew” pelas cigarrinhas representa uma medida indireta da quantidade de seiva ingerida durante a alimentação e, juntamente com dados de sobrevivência, indicam a adequação da planta hospedeira ao inseto (Milanez et al., 2003). Embora o presente estudo tenha sido realizado com mudas pequenas de laranja e em condições artificiais de laboratório, os resultados obtidos sugerem que pode ocorrer uma variação sazonal na adequação da planta cítrica ao inseto em condições de campo. Assim, durante períodos mais quentes e chuvosos, havendo excedente hídrico no solo, correspondente ao final da primavera, verão e início do outono na região Centro-Sul do Brasil, as árvores cítricas podem oferecer condições mais favoráveis para a alimentação deste inseto vetor e, conseqüentemente, para a disseminação da bactéria *X. fastidiosa*. Analogamente, a prática de irrigação em pomares de laranja também pode tornar as plantas mais adequadas ao vetor, particularmente em épocas secas e veranicos. Estas

hipóteses, que foram geradas a partir de observações em laboratório, devem ser testadas em condições de campo, em pomares novos e adultos, com e sem irrigação

4.3 Considerações finais

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho verificou-se que a primavera e principalmente o verão oferecem as condições mais favoráveis para a transmissão da bactéria no campo e seu estabelecimento mais rápido nas plantas cítricas, em termos de fatores abióticos, composição química do xilema das plantas e maior frequência de vetores relatados em diversos trabalhos de monitoramento durante essa época. O inverno por sua vez, foi marcadamente uma época desfavorável à disseminação e estabelecimento da bactéria no campo, visto que o déficit hídrico e as baixas temperaturas parecem afetar tanto a sobrevivência dos vetores que se alimentam dessas plantas quanto o estabelecimento de infecções primárias (condições de campo). Além disso, essa época é caracterizada ainda por altos potenciais hídricos nas plantas, traduzido numa forte tensão no xilema e baixo volume de seiva coletado, um maior desbalanço de aminoácidos e baixa concentração de ácidos orgânicos.

5 CONCLUSÕES

- O sucesso e a rapidez de estabelecimento de infecções primárias de *Xylella fastidiosa* em ramos de árvores cítricas no campo, são influenciados pela época em que ocorre a inoculação;
- A inoculação realizada no mês mais frio do ano (julho) resultou em um percentual cumulativo de infecção (0,9%) mais baixo do que o obtido nas demais épocas de inoculação (11,1-23,7%), que incluíram os meses de agosto, outubro, dezembro, janeiro, fevereiro, abril e maio;
- Infecções originadas de inoculações em meses mais quentes e chuvosos (dezembro, janeiro e fevereiro) são detectadas com maior frequência por isolamento em meio de cultura após 6 meses;
- Infecções resultantes de inoculações nos meses de abril, maio e agosto, foram detectadas com maior frequência por isolamento somente após 12 meses;
- As plantas cítricas apresentam elevado potencial hídrico nos vasos do xilema durante o período de julho a outubro (inverno e início da primavera), quando há déficit hídrico no solo.
- O volume de seiva extraída do xilema de ramos cítricos é inversamente proporcional ao potencial hídrico, sendo menor na época seca em relação ao período chuvoso.
- Ocorre variação na composição química da seiva do xilema de citros durante o ano, havendo uma maior concentração de aminoácidos no inverno, em relação às outras épocas. Porém, há um perfil mais balanceado de aminoácidos na primavera;
- Entre os ácidos orgânicos, o oxálico foi mais abundante, ocorrendo em maior concentração no verão e menor no inverno;

- Os teores de glicose, frutose e sacarose no xilema não variam significativamente entre as estações do ano;
- Inoculações realizadas em mudas cítricas em câmara de crescimento e casa de vegetação mostraram que o déficit hídrico é um fator desfavorável ao estabelecimento de infecções primárias de *X. fastidiosa*, principalmente na condição de temperatura típica de inverno (19 °C);
- O estresse hídrico reduz também a sobrevivência e a taxa de alimentação da cigarrinha vetora, *Oncometopia facialis* (Signoret), em “seedlings” de citros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLERZ, W.C.; HOPKINS, D.L. Natural infectivity of two sharpshooters vectors of Pierce's disease of grape in Florida. **Journal of Economic Entomology**, v.72, n.6, p.916-919, 1979.
- 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**, v.85, n.4, p.382-386, 2001.
- ALVES, E.; KITAJIMA, E.W.; LEITE, B. Interactions of *Xylella fastidiosa* with different cultivars of *Nicotiana tabacum*: a comparison of colonization patterns. **Journal of Phytopathology**, v.151, 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**, v.152, p.291-297, 2004.
- ANDERSEN, P.C.; BOADBECK, B.V. Chemical composition of xylem exudates from bleeding spurs of *Vitis rotundifolia* Noble and *Vitis* Hybrid Suwannee in relation to pruning date. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.40, n.3, p.155-160, 1989a.
- ANDERSEN, P.C.; BROADBECK, B.V. Diurnal and temporal changes in the chemical profile of xylem exudates from *Vitis rotundifolia*. **Physiologia Plantarum**, v.75, p.63-70, 1989b.
- ANDERSEN, P.C.; RODBECK, B.V. Influence of fertilization on xylem fluid chemistry of *Vitis rotundifolia* Noble and *Vitis* Hybrid Suwannee. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.42, n.3, p.245-251, 1991.

- ANDERSEN, P.C.; FRENCH, W.J. Biophysical characteristics of peach disease. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. v.31, n.1, p.25-40, 1987.
- ANDERSEN, P.C.; BROADBECK, B.V.; MIZELL III, R.F. Metabolism of amino acids, organic acids and sugar extracted from the xylem fluid of four host plants by adult *Homalodisca coagulata*. **Entomologia Experimentallis et Applicata**, v.50, p.149-159, 1989.
- ANDERSEN, P.C.; BROADBECK, B.V.; MIZELL III, R.F. Feeding by the leafhopper, *Homalodisca coagulata*, in relation to xylem fluid chemistry and tension. **Journal of Insect Physiology**, v.38, n.8, p.611-622, 1992.
- ANDERSEN, P.C.; BROADBECK, 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**, v.120, n.4, p.600-606, 1995a.
- ANDERSEN, P.C.; BROADBECK, 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**, v.120, n.1, p.36-42, 1995b.
- ARAÚJO, W.L. de. A comunidade bacteriana endofítica de citros e sua interação com *Xylella fastidiosa*, agente causal da clorose variegada dos citros (CVC). Piracicaba, 2000. 131p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- AYRES, A.J. Intensidade da clorose variegada dos citros em pomares comerciais de laranja do Estado de São Paulo e sul do triângulo mineiro. Jaboticabal, 2000. 59p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista.
- BERETTA, M.J.G.; DERRICK, K.S.; LEE, R.F.; HARAKAVA, R.; RICCI, A.P. Testes de diagnósticos para a detecção da bactéria *Xylella fastidiosa* em citros. **Laranja**, v.18, n.1, p.113-122, 1997.

- BRODBECK, B.V.; MIZELL, R.F. III, FRENCH, W.J. Amino acids as determinants of host preference for the xylem feeding leafhopper, *Homalodisca coagulata* (Homoptera: Cicadellidae). **Oecologia**, v.83, p.338-345, 1990.
- BRODBECK, B.V.; MIZELL III, R.F.; FRENCH, W.J.; ANDERSEN, P.C.; ALDRICH, J.H. Amino acids as determinant of host preference for the xylem feeding leafhopper, *Homalodisca coagulata* (Homoptera: Cicadellidae). **Oecologia**, v.83, p.338-345, 1990.
- CAMARA, T.R.; WILLADINO, L.; TORNÉ, J.M.; MANICK, A.; SANTOS, M.A. Efeito do estresse salino e da prolina exógena em calos de milho. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. v.12, n.2, p.146-155, 2000.
- CARVALHO, M.L.V. Situação da clorose variegada dos citros e estratégias de controle. **Fitopatologia Brasileira**, v.21, p.328, 1996. Suplemento./Apresentado ao 29. Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Campo Grande, 1996 - Resumo/.
- CARVALHO, M.L.V.; BERETA, M.J.G.; CHAGAS, C.M.; HARAKAWA, R.; PALAZZO, D.A.; ROSSETTI, V. **Clorose variegada dos citruss**: etiologia e manejo. São Paulo: Instituto Biológico, 1996. 13p. (Boletim Técnico, 3).
- CARVALHO, S.A.; LARANJEIRA, F.F. Protótipo de viveiro de mudas certificadas e borbulheiras sob telado à prova de afídeos de Centro de Citricultura – IAC. **Laranja**, v.15, n.2, p.213-220, 1994.
- CVC: sintomas estão mais graves. **Revista do Fundecitrus**, v.14, n.99, p.8-9, jul./ago. 2000.
- DAVIS, M.J.; PURCELL, A.H.; THOMPSON, S.V. Isolation media for the Pierce's disease bacterium. **Phytopathology**, v.70, p.425-429, 1980.
- DAY, M.F.; IRZYKIEWICZ, H.; Mc KINNON, A. Observations of the feeding of the virus vector *Orosius argentatus* (Evans) and comparisons with certain other Jassids. **Australian Journal Science Research**, v.5, p.128-142, 1952.
- DE NEGRI, J.D.; GARCIA JUNIOR, A. Sugestões para o manejo de pomares com clorose variegada dos citros. **Laranja**, v.14, n.1, p.255-267, 1993.
- DESCOBERTOS mais seis vetores de CVC. **Revista do Fundecitrus**, v.14, n.94, p.8-9, ago./set. 1999.

- DUNIWAY, J.M. Water status and imbalance. In: HEITEFUSS, R.; WILLIAMS, P.H. (Ed.). **Physiology plant pathology**. Berlin: Springer-Verlag, 1976. v.4, p.430-449. (Encyclopedia of Plant Physiology).
- FRAZIER, N.W. Xylem viruses and their insect vectors. In: PROCEEDINGS INTERNATIONAL CONFERENCE ON VIRUS AND VECTOR ON PERENIAL HOSTS, WITH SPECIAL REFERENCE TO *VITIS*, Davis, 1965. **Proceedings**. Davis: University of California, 1965. p.91-99.
- FREITAG, J.H. Host range of the Pierce's disease virus of grapes as determined by insect transmission. **Phytopathology**, v.41, p.920-934, 1951.
- 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**, v.80, p.61-65, 1990.
- FUNDECITRUS. **Estatísticas da CVC**. <http://www.fundecitrus.com.br/escvcb.htm> (12 jan. 2002).
- GARCIA JUNIOR, A.; LOPES, J.R.S.; BERETTA, M.J.G. Population survey of leafhopper vectors of *Xylella fastidiosa* in citrus nurseries, in Brazil. **Fruits**, v.52, n.6, p.371-374, 1997.
- 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**, v.32, p.17-32, 1988.
- GRAVENA, S. Manejo ecológico de pragas dos citros – aspectos práticos. **Laranja**, v.19, n.1, p.61-77, 1998.
- GRAVENA, S.; DE NEGRI, J.D.; QUAGGIO, J.A.; GONZALEZ, M.A.; PINTO, W.B.S.; BASILE, G.B. Manejo de cigarrinhas e CVC no pomar. In: DONADIO, L.C.; MOREIRA, C.S. (Ed.). **Clorose variegada dos citros**. Bebedouro: FUNDECITRUS, 1997. cap.6, p.93-112.
- GZIK, A. Accumulation of proline and pattern of α -amino acids in sugar beet plants in response to osmotic, water and salt stress. **Environmental and Experimental Botany**, v.36, n.1, p.29-38, 1996.

- 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**, v.15, n.2, p.79-87, 2003.
- HILL, B.L.; PURCELL, A.H. Acquisition and retention of *Xylella fastidiosa* by an efficient vector, *Graphocephala atropunctata*. **Phytopathology**, 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**, v.85, n.11, p.1368-1372, 1995b.
- HILL, B.L.; PURCELL, A.H. Populations of *Xylella fastidiosa* in plants required for transmission by an efficient vector. **Phytopathology**, v.87, n.12, p.1197-1201, 1997.
- HOFFMAN, G.D.; HOGG, D.B. Potato leafhopper (Homoptera: Cicadellidae) in water-stressed alfalfa: population consequences and field tests. **Environmental Entomology**, v.20, n.4, p.1067-1073, 1991.
- HOFFMAN, G.D.; HOGG, D.B.; BOUSH, G.M. Potato leafhopper (Homoptera: Cicadellidae) life history trails on water-stressed alfalfa in the early regrowth and bud stage. **Entomological Society of America**, v.20, n.4, p.1058-1066, 1991.
- HOPKINS, D.L. Seasonal concentration of the Pierce's disease bacterium in grapevine stems, petioles and leaf veins. **Phytopathology**, v.71, p.415-418, 1981.
- HOPKINS, D.L. Physiological and pathological characteristics of virulent and avirulent strains of the bacterium that causes Pierce's disease of grapevine. **Phytopathology**, v.75, p.713-717, 1985.
- HOPKINS, D.L. *Xylella fastidiosa*: xylem-limited bacterial pathogen of plants. **Annual Review of Phytopathology**, v.27, p.2711-3290, 1989.
- HOPKINS, D.L.; ADLERZ, W.C. Natural hosts of *Xylella fastidiosa* in Florida. **Plant Disease**, v.72, p.429-431, 1988.
- 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**, v.19, n.3, p.419-420, 1984.

- HUANG, G.F.; CHIARADIA, L.A. Clorose variegada dos citros: caracterização e alternativas no manejo da doença. **Agropecuária Catarinense**, v.11, n.4, p.52-55, 1998.
- KITAJIMA, E.W.; BAKARCIC, M.; FERNANDEZ-VALIEGA, M.V. Association of rickettsia like bacteria with plum leaf scald disease. **Phytopathology**, v.65, p.476-479, 1975.
- KLEINN, C.; JOVEL, J.; HILJE, L. A model for assessing the effect of distance on disease spread in crop fields. **Crop Protection**, v.18, p.609-617, 1999.
- 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., Campinas, 1998. **Programme and abstracts**. Cordeirópolis: IAC, 1998. p.81.
- LARANJEIRA, F.F. Dinâmica espacial e temporal da clorose variegada dos citros. Piracicaba, 1997. 144p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- LARANJEIRA, F.F. Epidemiologia da clorose variegada dos citros no estado de São Paulo. Piracicaba, 2002. 158p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- LARANJEIRA, F.F.; POMPEU JUNIOR, J.; HARAKAVA, R. Seleção de variedades de citros tolerantes e/ou resistentes à clorose variegada dos citros. **Fitopatologia Brasileira**, v.20, p.304, 1995. Suplemento.
- LARANJEIRA, F.F.; BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L.; LOPES, J.R.S. Comportamento sazonal da Clorose Variegada dos Citros em três regiões do Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, n.6, p.633-641, 2003.
- LARANJEIRA, F.F.; POMPEU JÚNIOR, 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**, v.23, n.2, p.147-154, 1998.

- LEE, R.F.; BERETTA, M.J.G.; DERRICK, K.S.; HOOKER, M.E. Development of a serological assay for citrus variegated chlorosis – a new disease of citrus in Brazil. **Proceedings of the Florida State for Horticultural Society**, v.105, p.32-35, 1992.
- LEE, R.F.; BERETTA, M.J.G.; HARTUNG, J.H.; HOOKER, M.E.; DERRICK, K.S. Citrus variegated chlorosis: confirmation of *Xylella fastidiosa* as the causal agent. **Summa Phytopathologica**, v.19, n.2, p.123-125, 1993.
- LEITE, R.M.V.B.C.; LEITE JUNIOR, R.P.; CERESINI, P.C. Flutuação populacional de *Xylella fastidiosa* em ameixeiras suscetíveis e resistentes à escaldadura da folha. **Fitopatologia Brasileira**, v.22, n.1, p.58-63, 1997.
- LEITE JÚNIOR, R.P.; LEITE, R.M.V.B.C. Associação de *Xylella fastidiosa* com clorose variegada dos citros. **Summa Phytopathologica**, v.17, p.7, 1991. /Resumo/
- LIMA, J.E.O. de. Como conviver com o amarelinho. **Revista do Fundecitrus**, n.77, p.1-12, jul./ago. 1996.
- LIMA, J.E.O. de; MIRANDA, V.S.; HARTUNG, J.S.; BRLANSKY, R.H.; COUTINHO, A.; ROBERTO, S.R.; CARLOS, E.F. Coffee leaf scorch bacterium: axenic culture, pathogenicity, and comparison with *Xylella fastidiosa* of citrus. **Plant Disease**, v.82, p.94-97, 1998.
- LOPES, J.R.S. Mecanismos de transmissão de *Xylella fastidiosa* por cigarrinhas. **Laranja**, 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**, v.20, n.2, p.329-344, 1999.
- LOPES, J.R.S.; GIUSTOLIN, T.A. Outros hospedeiros das cigarrinhas. **Revista do Fundecitrus**, n.97, p.1-15, mar./abr. 2000.
- MACHADO, E.C.; QUAGGIO, J.A.; LAGÔA, 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**, v.6, p.53-57, 1994.
- MARTINS, E.M.F.; GUZZO, S.D.; PALAZZO, D.A.; HARAKAVA, R. Metabolic alterations detected in Natal orange trees infected by *Xylella fastidiosa*. **Summa Phytopathologica**, v.25, p.288-293, 1999.

- MARTINS, M.L.; CEOTTO, G.; ALVES, S.G.; BUFON, C.C.B.; SILVA, J.M.; LARANJEIRA, F.F. Cellular automata model for citrus variegated chlorosis. **Physical Review**, v.62, n.5, p.7030-7037, 2000.
- MARUCCI, R.C.; LOPES, J.R.S.; VENDRAMIM, J.D.; CORRENTE, J.E. Feeding site preference of *Dilobopterus costalimai* Young and *Oncometopia facialis* (Signoret) (Hemiptera: Cicadellidae) on citrus plants. **Neotropical Entomology**, v.33, n.6, p.759-768, 2004.
- McELRONE, A.J.; FORSETH, I.N. Photosynthetic responses of a temperate Liana to *Xylella fastidiosa* infection and water stress. **Journal of Phytopathology**, v.152, p.9-20, 2004.
- McELRONE, A.; 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**, v.54, n.381, p.419-430, 2003.
- MILANEZ, J.M.; PARRA, J.R.P.; CUSTÓDIO, I.A.; MAGRI, D.C.; CERA, C.; LOPES, J.R.S. Feeding and survival of citrus sharpshooters (Hemiptera: Cicadellidae) on host plants. **Florida Entomologist**, v.86, n.2, p.154-157, 2003.
- MINSAVAGE, 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**, v.84, n.5, p.456-461, 1994.
- NEWMAN, K.L.; ALMEIDA, R.P.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**, v.69, n.12, p.7319-7327, 2003.
- NEWMAN, K.L.; ALMEIDA, R.P.P.; PURCELL, A.H.; LINDOW, S.E. Cell-cell signaling controls *Xylella fastidiosa* interactions with both insects and plants. **Microbiology**, v.101, n.6, p.1737-1742, 2004.
- NOMÉ, S.F.; RAJU, B.C.; GOHEEN, A.C.; NYLAND, G.; DOCAMPO, D. Enzyme-linked immunosorbent assay for Pierce's disease bacteria in plant tissues. **Phytopathology**, v.70, p.746-749, 1980.
- OLIVEIRA, P.S.R. de; SILVA, S.M.; ANGELOTTI FILHO, E. Clorose variegada dos citros. **Unimar Ciências**, v.4, n.1, p.123-133, 1995.

- 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**, v.17, n.1, p.41-54, 1996.
- PARADELA FILHO, O.; SUGIMORI, M.H.; RIBEIRO, I.J.A.; MACHADO, M.A.; LARANJEIRA, F.F.; GARCIA JUNIOR, A.; BERETTA, M.J.G. Primeira constatação em cafeeiro no Brasil, da *Xylella fastidiosa* causadora da clorose variegada dos citros. **Laranja**, v.16, n.2, p.135-136, 1995.
- PEREIRA, E.F. Estudo de fatores sazonais relacionados à transmissão de *Xylella fastidiosa* em pomares de citros. Piracicaba, 2000. 82p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- POMPEU JÚNIOR, J.; LARANJEIRA, F.F.; HARAKAVA, R.; FIGUEIREDO, J.O. de; 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**, v.19, n.2, 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**, v.31, p.377-381, 1995.
- POOLER, M.R.; MYUNG, I.S.; BENTZ, J.; SHERALD, J.; HARTUNG, J.S. Detection of *Xylella fastidiosa* in potential insect vectors by immunomagnetic separation and nested polymerase chain reaction. **Letters in Applied Microbiology**, v.25, p.123-126, 1997.
- 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. Piracicaba, 2003. 87p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.
- PURCELL, A.H. Role of the blue-green sharpshooter, *Hordnia circellata*, in the epidemiology of Pierce’s disease of grapevines. **Environmental Entomology**, v.4, p.745-752, 1975.
- PURCELL, A.H. Cold therapy of Pierce’s disease of grapevines. **Plant Disease Reporter**, v.61, p.514-518, 1977.

- PURCELL, A.H. Vector preference and inoculation efficiency as components of resistance to Pierce's disease in European grape cultivars. **Phytopathology**, v.71, p.429-435, 1981.
- PURCELL, A.H. Homopteran transmission of xylem-limited bacteria. In: HARRIS, K.F. (Ed.). **Advances in vector research**. New York: Springer-Verlag, 1989. cap.9, p.243-266.
- PURCELL, A.H. Cigarrinhas na cultura de citros. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE CITROS, 3., Bebedouro, 1994. **Anais**. Campinas: Fundação Cargill, 1994. p.195-209.
- PURCELL, A.H. *Xylella fastidiosa*, a regional problem or global threat? **Journal of Plant Pathology**, v.79, n.2, p.99-105, 1997.
- PURCELL, A.H.; FINLAY, A. Evidence for noncirculative transmission of Pierce's disease bacterium by sharpshooter leafhoppers. **Phytopathology**, v.69, n.4, p.393-395, 1979.
- PURCELL, A.H.; HOPKINS, D.L. Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v.34, p.131-151, 1996.
- PURCELL, A.H.; SAUNDERS, S.R. Fate of Pierce's disease strains of *Xylella fastidiosa* in common riparian plants in California. **Plant Disease**, v.83, n.9, p.825-830, 1999.
- PURCINO, R. P. ; MAZZAFERA, P. ; MEDINA, C. L. . Alterações no metabolismo de compostos nitrogenados em seiva e folhas de plantas de citros infectadas por *Xylella fastidiosa*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 2003, 9º, Atibaia, 2003. **Resumos** , 2003. v. 1, p. 45.
- QUEIROZ-VOLTAN, R.B.; PARADELA FILHO, O. Caracterização de estruturas anatômicas de citros infectados com *Xylella fastidiosa*. **Laranja**, v.20, n.1, p.55-76, 1999.
- QUEIROZ-VOLTAN, R.B.; PARADELA FILHO, O.; CARELLI, M.L.C.; FAHL, J.I. Aspectos estruturais de cafeeiro infectado com *Xylella fastidiosa*. **Bragantia**, v.57, n.1, p.23-33, 1998.

- RAJU, B.C.; GOHEEN, A.C.; FRAZIER, N.W. Occurrence of Pierce's disease bacteria in plants and vector in California. **Phytopathology**, v.73, n.9, p.1309-1313, 1983.
- RAJU, B.C.; WELLS, J.M.; NYLAND, G.; BRLANSKY, R.H.; LOWE, S.K. Plum leaf scald: isolation, culture, and pathogenicity of the causal agent. **Phytopathology**, v.72, n.11, p.1460-1466, 1982.
- 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**, v.62, n.3, p.167-173, 2003a.
- RIBEIRO, R.V.; MACHADO, E.C.; OLIVEIRA, R.F.; PIMENTEL, C. High temperature effects on the response of photosynthesis to light in sweet orange plants infected with *Xylella fastidiosa*. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.15, n.2, p.89-97, 2003b.
- ROBERTO, S.R.; YAMAMOTO, P.T. Flutuação populacional e controle químico de cigarrinhas em citros. **Laranja**, v.19, n.2, p.269-284, 1998.
- ROBERTO, S.R.; COUTINHO, A.; LIMA, J.E.O.; MIRANDA, V.S.; CARLOS, E.F. Transmissão de *Xylella fastidiosa* pelas cigarrinhas *Dilobopterus costalimai*, *Acrogonia terminalis* e *Oncometopia fascialis* em citros. **Fitopatologia Brasileira**, v.21, n.4, p.517-518, 1996.
- ROBERTO, S.R.; PRIA JÚNIOR, W.D.; YAMAMOTO, P.T.; FELLIPE, M.R.; FREITAS, E.P. Espécies e flutuação populacional de cigarrinhas em viveiro de citros, em Gavião Peixoto (SP). **Laranja**, v.21, n.1, p.49-64, 2000.
- ROSSETTI, V.; GONZALES, M.A.; DONADIO, L.C. Histórico. In: DONADIO, L.C.; MOREIRA, C.S. (Ed.). **Clorose variegada dos citros**. Bebedouro: FUNDECITRUS, 1997. cap.1, p.1-21.
- 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 des agrumes au Brésil. **Comptes Rendus de l'Academie de Sciences**, Paris, v.310 (Serie III), p. 345-349, 1990.

- SALIBE, A.B. Reação de plantas cítricas à bactéria *Xylella fastidiosa* em função de diferentes métodos de inoculação. Piracicaba, 2001. 75p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- SALVA, R.A.; ROBERTO, R.S.; CARLOS, E.F. Situação da clorose variegada dos citros no Estado de São Paulo. **Laranja**, v.16, p.155-164, 1995.
- SCHOLANDER, P.F.; HAMMEL, H.T.; BRADSTREET, E.D.; HEMMINGSEN, E.A. Sap pressure in vascular plants. **Science**, v.148, p.339-346, 1965.
- SEMPIONATO, O.R.; GIROTTO, L.F.; STUCHI, E.S. Produção de mudas sadias. In: DONADIO, L.C.; MOREIRA, C.S. (Ed.). **Clorose variegada dos citros**. Bebedouro: FUNDECITRUS, 1997. cap.5, p.75-92.
- SEVERIN, H.H.P. Transmission of the virus of Pierce’s disease by leafhoppers. **Hilgardia**, v.19, p.190-202, 1949.
- SHERALD, J.L.; LEI, J.D. Evaluation of a rapid ELISA test kit for detection of *Xylella fastidiosa* in landscape trees. **Plant Disease**, v.75, n.2, p.200-203, 1991.
- SILVEIRA NETO, S.; NAKANO, O.; BARDIN, D.; VILLA NOVA, N. **Manual de ecologia dos insetos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1976. 419p.
- 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, F.F.; COSTA, M.C.R.; COSTA-NETO, C.M.; COUTINHO, L.L.; CRISTOFANI, 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.; TSUHAKE, 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**, v.406, p.151-157, 2000.
- SOUZA, L.C.A. Produção e caracterização de mutantes do operon *Gum* de *Xylella fastidiosa*. Piracicaba, 2002. 79p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed.Porto Alegre: Artmed, 2004. cap.4, p.75-93: Balanço hídrico das plantas.
- THORNTWAITE, C.W.; MATHER, J.R. **The water balance**. New Jersey: Drexel Institute of Technology, 1955. 104p. (Publications in Climatology).
- TUBELIS, A.; BARROS, J.C.; LEITE, R.M.V.B. Difusão da clorose variegada dos citros em pomares comerciais de laranja no Brasil. **Laranja**, v.14, n.1, p.239-254, 1993.
- TURNER, W.F.; POLLARD, H.N. **Insect transmission of phony peach disease**. Davis: USDA, 1959. 27p. (USDA. Technical Bulletin, 1193).
- WELLS, J.M.; RAJU, B.C.; HUNG, H.Y.; WEISBERG, W.G.; MANDELCO-PAUL, L.; BRENNER, D.J. *Xylella fastidiosa* gen. nov., sp. nov: Gram-negative, xylem-limited fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.37, n.2, p.136-143, 1987.

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

YAMAMOTO, P.T.; PRIA Jr., W.D.; ROBERTO, S.R.; FELIPPE, M.R.; FREITAS, E.P. Flutuação populacional de cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae) em pomar cítrico em formação. **Neotropical Entomology**, v.30, n.1, p.175-177, 2001.