

Avanços no conhecimento sobre a clorose variegada dos citros: uma abordagem sobre os diferentes componentes do patossistema

Helvécio Della Coletta Filho^{1*} & Alessandra Alves de Souza¹

RESUMO

Passados um pouco mais de 25 anos do primeiro relato da clorose variegada dos citros (CVC) no estado de São Paulo, esta doença com ocorrência quase que exclusivamente em laranjeiras doces (*Citrus sinensis* L. Osbeck) e ocasionada pela bactéria *Xylella fastidiosa*, ainda hoje é um problema na citricultura brasileira. Pouquíssimos relatos fazem referência à CVC fora do Brasil e que é ocasionada pela mesma estirpe de *X. fastidiosa* (*X. fastidiosa* subesp. *pauca*) como descrito na Argentina e Paraguai. Vale destacar que, em sendo um problema exclusivo e de interesse da citricultura brasileira, os avanços no conhecimento aqui apresentados foram obtidos pela pesquisa nacional, alguns contando com a colaboração de pesquisadores de instituições estrangeiras, mas sempre em conjunto ou com a colaboração do setor citrícola. Estes esforços, somados à determinação dos citricultores, contrariaram as previsões pessimistas de que a CVC inviabilizaria a produção de laranjas doces no estado de São Paulo. Nesta revisão será abordada os avanços no conhecimento sobre o patossistema CVC neste período de cerca de 25 anos e as contribuições para o sucesso do manejo desta doença.

Termos de indexação: ‘amarelinho’, *Xylella fastidiosa*, doença cítrica, laranja doce.

SUMMARY

Advances on knowledge about citrus variegated chlorosis: an overview on different components of this pathosystem

The citrus variegated chlorosis (CVC) was firstly reported in 1987 in São Paulo state, Brazil, and after 25 years it became a problem around all citrus production areas in the country. This disease affects exclusively sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) but with few exceptions out this specie and it is caused by *X. fastidiosa* subesp. *pauca*. Excluding Argentina and Paraguay, CVC caused by *X. fastidiosa* subspecies *pauca* was no reported in any other country, which characterize as a problem of Brazilian citriculture. As consequence is necessary highlighted here that the majority of knowledge that will be discussed here were obtained by the researches conduced in Brazil in collaboration with all players of citrus industry. These efforts, together

¹ Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC. Rodovia Anhanguera, km 158, Caixa Postal 04, 13490-970, Cordeirópolis-SP

* Autor para correspondência - E-mail: helvecio@centrodecitricultura.br

with determination of growers, contradicted the pessimist predictions that the CVC would make the production of sweet orange in São Paulo state enviable. In this review will be show and discussed the advances on knowledge about the CVC pathosystem obtained during the 25 years of CVC and the contributions for the successful management of this disease.

Index terms: “amarelinho”, *Xylella fastidiosa*, Citrus disease, sweet orange.

INTRODUÇÃO E HISTÓRICO

A clorose variegada dos citros (CVC) surgiu inicialmente em 1987 como anomalias desconhecidas em plantas de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) observadas primeiramente na região Noroeste do estado de São Paulo, especificamente no município de Macaúbal. As hipóteses iniciais recaíram sobre problemas de deficiências nutricionais, emergência de um novo vírus e até a introdução do agente etiológico do HLB, doença que naquela época não havia sido ainda descrita no Brasil (Bové & Ayres, 2007). Os primeiros anos após o relato foram seguidos de um aumento rápido das plantas e áreas afetadas, uma vez que, não se conhecia a origem do problema. Os primeiros estudos epidemiológicos apontaram que um agente biológico contagioso transmitido planta a planta, provavelmente através de um inseto vetor, poderia estar associado (Gottwald et al., 1993). Paralelamente, trabalhos usando material biológico contaminado, como borbulhas e ramos, quando garfados em plantas sadias resultaram na transmissão de um provável agente causal, onde análises de microscopia mostraram a presença de uma bactéria no vaso do xilema daquelas plantas contaminadas (Rossetti et al., 1990).

Por volta de 1993 o postulado de Kock foi completamente elucidado por dois grupos de pesquisa (Chang et al., 1993; Hartung et al., 1994) que identificaram a presença de uma bactéria Gram-negativa, *X. fastidiosa*, como o agente etiológico, sendo o problema então denominado como clorose variegada dos citros (CVC), em alusão às pontuações cloróticas (amarelas) irregularmente distribuídas sobre o limbo foliar da planta infectada. Entre os produtores esta doença também foi denominada de “amarelinho dos citros”. Recentemente foi proposto uma subdivisão para *X. fastidiosa* sendo a causadora da CVC renomeada como *X. fastidiosa* subsp. *pauca* (Schaad et al., 2004; Schuenzel et al., 2005), cuja

denominação tem sido usada como alusão ao agente causal da CVC. Conhecendo-se então o agente causal da doença, as pesquisas expandiram-se em diferentes direções como a identificação do inseto vetor da bactéria, que estaria transmitindo-a planta a planta, conhecimentos sobre a epidemiologia da doença e também trabalhos de melhoramento genético, que abordavam desde a busca por fontes de resistência em Bancos de Germoplasma ou seleção massal em campo, até a hibridização controlada entre diferentes espécies de citros. O envolvimento de um vetor no processo de transmissão natural do patógeno planta a planta foi primeiramente reportado em 1996 (Roberto et al., 1996). Estudos epidemiológicos mostraram que o inseto vetor está principalmente envolvido na transmissão local, entre pomares próximos (transmissão primária) ou entre plantas dentro dos pomares (transmissão secundária) (Laranjeira et al., 1998a). Transmissão à longa distância parece estar mais relacionada ao trânsito de material infectado entre as regiões (Roberto et al., 2002). Além da infecção natural via vetores, seja em plantas nos pomares quanto em viveiros, que nos anos 90 eram conduzidos num sistema a céu aberto, as plantas poderiam ainda ser facilmente infectadas via enxertia utilizando borbulhas contaminadas. Como consequência do conhecimento gerado por essas informações, o manejo da CVC começou a ser discutido com objetivo de prevenir a introdução da *X. fastidiosa* no sistema de produção de mudas. Ainda como forma de manejo passou-se a recomendar o controle químico dos insetos vetores nos pomares e a diminuição de fontes de inóculo pela remoção de plantas doentes ou poda de ramos infectados, a depender da severidade dos sintomas e idade das plantas (Coletta-Filho et al., 2000). Estas propostas levaram a uma mudança no sistema de produção de mudas no estado de São Paulo que, por lei, todos os viveiros passaram de um sistema aberto no campo para um programa certificado, em telados, a partir de 2003 (Carvalho, 2003).

Devido ao impacto da CVC no sistema de produção citrícola em São Paulo a bactéria *X. fastidiosa* subsp. *pauca* foi o primeiro fitopatógeno a ter seu genoma sequenciado no mundo (Simpson, et al., 2000), proporcionando um grande avanço nos estudos genéticos acerca do mecanismo de patogenicidade dessa bactéria (de Souza et al., 2009). Hoje a CVC é uma doença endêmica em todas as regiões citrícolas do estado de São Paulo, assim como de outras regiões do Brasil que têm o cultivo de laranja doce em escala comercial, como os estados do Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Minas Gerais, Bahia, Sergipe, Rio de Janeiro, entre outros.

Dados de levantamento do Fundecitrus apontaram que em 2012 aproximadamente 40% das plantas de laranja doce nos estados de São Paulo e Sul do Triângulo Mineiro, em Minas Gerais, mostraram algum tipo de sintoma de CVC. A CVC está aparentemente restrita a outros países vizinhos do Brasil que produzem laranja doce, como Argentina e Paraguai (de Souza et al., 2009). Na América Central (Costa Rica) também foi relatado plantas de laranja doce com problemas de CVC (Montero-Astúa et al., 2007). Porém, em outras regiões produtoras de citros com expressão econômica, como a Flórida, China, África do Sul ou países do Mediterrâneo não há relatos da CVC. Portanto, pode-se afirmar que CVC é um problema quase que exclusivamente da citricultura brasileira. As perdas devido à CVC no Brasil, seja pelo aumento do custo de produção ou pela redução na produção ou perda da viabilidade econômica das plantas com CVC são estimadas em US\$ 120 milhões anuais (Bové & Ayres, 2007).

O AGENTE CAUSAL DA CVC

X. fastidiosa subsp. *pauca*, assim como as demais subespécies de *X. fastidiosa* como *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa*, *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* e *X. fastidiosa* subsp. *sandy* (Schaad et al., 2004; Schuenzel et al., 2005), embora seja primariamente considerada como um patógeno de planta, coloniza dois ambientes distintos, a própria planta e o inseto vetor, as cigarrinhas. Como mostrado pelos trabalhos de epidemiologia esta dupla colonização é essencial para a disseminação do patógeno, muito embora as pesquisas tenham dado mais atenção à colonização da planta.

Genoma e genética

Comparado ao fitopatógeno geneticamente próximo como a *Xanthomonas* spp., o genoma da *X. fastidiosa* tem tamanho reduzido, ao redor de 2.6 Mb e, ao contrário de *Xanthomonas* spp., não possui o sistema de secreção, conhecido como sistema do tipo III que confere especificidade entre o patógeno e o hospedeiro vegetal (Simpson et al., 2000). Isto se deve provavelmente pelo fato da *X. fastidiosa* ser injetada diretamente na planta pelo inseto vetor e também por habitar superfícies desprovidas de células vivas tanto na planta hospedeira (vasos de xilema) quanto nas cigarrinhas (forro cuticular do estomodeu). Comparado ao genoma da *X. fastidiosa* que causa a doença de Pierce (PD) em videira, observa-se uma alta similaridade (ao redor de 98%) entre *X. fastidiosa* da CVC e de PD (van Sluys et al., 2003). As maiores diferenças observadas são em virtude de rearranjos de regiões genômicas como consequência de interações de elementos genéticos móveis como os fagos, o que caracterizam bactérias com potencial de alta adaptabilidade aos hospedeiros. Embora a *X. fastidiosa* da CVC (estirpe 9a5c) tenha em seu genoma o gene para síntese de poligalacturonase, enzima necessária para a degradação da pit membrana e então migração entre os vasos de xilema, este gene não é funcional, o que poderia explicar a menor agressividade de *X. fastidiosa* da CVC quando comparada à de PD, por exemplo. Por outro lado esta menor capacidade de colonização pode ser em decorrência da própria planta cítrica onde esta parece não ser um hospedeiro facilmente colonizável por *X. fastidiosa* quando comparado às videiras, por exemplo.

Análises comparativas entre diferentes isolados de *X. fastidiosa* da CVC têm mostrado diferenças genéticas entre estes (Metha & Rossatto, 2001). Esta diversidade genética é presenciada tanto por marcadores moleculares que registram baixas taxas de mutação como o Multi Locus Sequence Types (MLST) (Almeida et al., 2008) e mais ainda por marcadores de alta taxa de mutação como o Multi Locus Variable Number of Repeats (MLVR) (Coletta-Filho & Machado, 2003). No entanto, estas diferenças não puderam ser relacionadas às variedades de laranjas doces infectadas, ou seja, a diversidade genética da planta hospedeira não foi o fator que contribuiu para

a diversidade genética de *X. fastidiosa* (Coletta-Filho & Machado, 2002). Porém, foi identificado padrões genéticos dos isolados em relação à origem geográfica da planta hospedeira. Isolados da bactéria oriundos do Noroeste do estado de São Paulo (região de São José do Rio Preto) mostraram-se com muito mais variabilidade genética do que os isolados do Sul citrícola de São Paulo (região de Limeira) (Coletta-Filho & Machado, 2003). Esta variabilidade foi verificada entre isolados de *X. fastidiosa* colonizando um único ramo numa planta infectada, porém sendo sempre muito menor quando comparada a isolados entre plantas ou regiões. Isolamentos realizados num intervalo de 10 anos em uma mesma região resultaram em populações distintas desta bactéria, mostrando alterações genéticas ao nível de populações deste patógeno entre 2000 e 2010 (Coletta-Filho et al., 2014a). Mecanismos ativos envolvidos na troca de material genético de *X. fastidiosa* foram demonstrados por Kung et al. (2013). Esta competência natural na troca de material genético coloca *X. fastidiosa* como um patógeno potencial para quebra de resistência genética e/ou colonização de novos hospedeiros, podendo ser caracterizado como um patógeno emergente.

De fato tem sido verificado descrições de novas espécies de plantas suscetíveis à *X. fastidiosa* como o abacateiro (Montero-Astúa et al., 2008), plantas nativas nos Estados Unidos (Randall et al., 2009) e recentemente oliveiras na Itália (Saponari et al., 2013). Mesmo em plantas já descritas como hospedeiras, infecções *de novo* se deram por isolados de *X. fastidiosa* categorizadas em outras subespécies, como é o caso de laranjeiras na Costa Rica (Montero-Astúa et al., 2007). Especificamente neste caso, as laranjeiras doces com sintomas semelhantes aos de CVC são infectadas por isolados de *X. fastidiosa* que geneticamente são muito mais relacionadas a isolados causadores de PD nos Estados Unidos do que os que causam a CVC no Brasil.

HOSPEDEIROS

Em condições naturais do estado de São Paulo todas as variedades comerciais de laranja doce são afetadas pela *X. fastidiosa* da CVC, porém havendo diferenças na severidade dos sintomas. Laranjeira (2004) classificou as variedades Pêra e Folha Murcha como altamente suscetíveis, Valência e Baianinha como

suscetíveis e as variedades Lue Gin Gong e Westin como moderadamente suscetíveis. Ainda dentro das variedades de laranjeiras doces, recentemente Fadel et al. (2014) demonstraram que a variedade Navelina ISA 315, do tipo Baianinha, embora tenha possibilitado temporalmente a multiplicação de *X. fastidiosa* nos vasos do xilema, não apresentou sintomas de CVC em ensaios conduzidos a campo durante 10 anos. Além das laranjeiras doces, em algumas variedades de tangerinas (Carvalhais, Emperor, Wilking e Tankan), de laranja azeda (*C. aurantium* L.), em alguns híbridos como tangelos (Page, Swanee, e Williams), e tangores (Dweet, Hansen, Ortanique, Temple, e Umatilla) puderam ser observados sintomas de CVC (Laranjeira et al., 1998b). Foram considerados tolerantes ou resistentes outras variedades de tangerinas (*C. reticulata*) como a Ponkan, a lima ácida Tahiti (*C. aurantifolia*), os limões verdadeiros (*C. limon*), os pomelos (*C. paradisi*) e o tangor Murcott (*C. sinensis* x *C. reticulata*), além de *Poncirus trifoliata* e seus híbridos (Laranjeira et al. 1998b; Coletta-Filho et al. 2007). Com base nestas informações, a busca por genótipos resistentes a CVC dentro de laranjeiras doces, seja por hibridização controlada ou mesmo por seleção massal a campo é um processo que não pode ser desconsiderado. O programa de melhoramento de citros conduzido no Centro de Citricultura Sylvio Moreira-IAC tem analisado híbridos de tangor Murcott x laranja Pêra resistentes a CVC e com características hortícolas potenciais para atender o mercado de suco e fruta fresca (Cristofani et al., 2005; Coletta-Filho et al., 2007).

Informações quanto a hospedeiros naturais de *X. fastidiosa* da CVC são bastantes escassas. Lopes et al. (2003) encontraram a bactéria em 10 diferentes espécies de plantas daninhas, de 23 testadas, mas, segundo os autores, com baixo potencial na importância epidemiológica da doença, dado as condições de baixa concentração da bactéria nestes hospedeiros alternativos. São hospedeiros de *X. fastidiosa* da CVC a Alfafa-creoula (*Medicago sativa*), o Capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*), o Capim-braquiária (*Brachiaria decumbens*), o Capim-marmelada (*Brachiaria plantaginea*) e a Maria-pretinha (*Solanum americanum*). Afetando plantas ornamentais foram observados *X. fastidiosa* em hibisco (Kitajima et al., 2000), porém sendo geneticamente distinta da subespécie que causa a CVC.

EPIDEMIOLOGIA

Transmissão via material vegetal

Semelhante a outras bactérias e vírus presentes nos vasos condutores de seiva das plantas (floema e xilema), a *X. fastidiosa* da CVC é transmitida via enxertia de material infectado, como borbulhas. Muito provavelmente esta foi a forma de transmissão responsável pela rápida disseminação da bactéria entre as regiões produtoras de citros anteriormente à lei normatizando a produção de mudas certificadas (IN 16 de 18/03/2003). Outro fator importante foi o período de latência da doença, que muitas vezes é acima de 6 meses podendo chegar a anos, o que pode ter favorecido a utilização não intencional de borbulhas infectadas. Este pressuposto tem respaldo pelo fato de que borbulhas retiradas de ramos assintomáticos resultaram em mudas contaminadas com *X. fastidiosa* numa frequência de 28,5%, mas somente 24 meses após a enxertia, onde todas as mudas infectadas ainda não apresentavam sintomas de CVC (Coletta-Filho et al., 2000). Transmissões de *X. fastidiosa* via enxertia natural de raízes de laranjeiras doces também foram relatadas (He et al., 2000). No entanto, no campo, a possibilidade de transmissão de *X. fastidiosa* via raízes é improvável uma vez que nos porta-enxertos mais utilizados como o limão Cravo (*C. limonia*) e o citrumelo Swingle raramente foi encontrada *X. fastidiosa* quando estavam sob laranjeiras doces com CVC (He et al., 2000).

Outra possibilidade de transmissão estudada foi via sementes. A transmissão vertical (sementes para plântulas) de *X. fastidiosa* foi mostrada por Li et al. (2003) que, segundo estes autores, em 15% das plântulas oriundas de sementes de laranja doce obtidas de frutos com CVC foi possível diagnosticar a presença da bactéria. Contrariamente a este trabalho, dois outros foram enfáticos em afirmar que embora *X. fastidiosa* fosse encontrada em sementes de laranjas doces coletadas de frutos sintomáticos, nas plântulas germinadas destas sementes não foi encontrado o patógeno (Coletta-Filho et al., 2014b; Cordeiro et al., 2014), mesmo após anos de manutenção das plântulas em casa-de-vegetação, o que caracteriza ausência de transmissão vertical de *X. fastidiosa*.

Transmissão via vetores

A distribuição espacial da doença no campo mostra uma distribuição irregular, característica de doenças transmitidas por vetores (Gottwald et al. 1993), com uma estrutura de focos coalescentes com significativa incidência de plantas doentes, porém não iniciando-se de forma organizada nestes focos (Laranjeira et al., 2004). Além da transmissão primária (de fora para dentro do pomar) a transmissão secundária (planta a planta dentro do pomar) é um processo importante na epidemiologia da CVC (Laranjeira et al. 1998a). Até o presente são conhecidas 13 espécies de cigarrinhas transmissoras da *X. fastidiosa* da CVC (Roberto et al. 1996, Krügner et al. 2000, Yamamoto et al. 2002), sendo as espécies *Acrogonia citrina*, *Bucephalagonia xanthophis*, *Dilobopterus costalimai* e *Oncometopia facialis* as de maior importância na epidemiologia do patógeno.

Uma vez adquirida na fase adulta da cigarrinha, *X. fastidiosa* pode ser transmitida de forma persistente (Almeida et al., 2005). No entanto, a aquisição na fase de ninfas não leva a adultos infectivos, uma vez que a bactéria é perdida durante as fases de ecdises. Em videiras foi demonstrado que a eficiência de aquisição de *X. fastidiosa* pelas cigarrinhas esteve positivamente correlacionada com título da bactéria na planta fonte onde concentrações menores que 10^6 UFC/grama de tecido resultaram em baixas eficiências de aquisição (Hill & Purcell, 1997). Comparado à colonização em videira, *X. fastidiosa* cresce em baixas concentrações em laranjeira, o que explica a baixa e variável (0,3 a 30%) eficiência de transmissão de *X. fastidiosa* por cigarrinhas em citros (Krügner et al., 2000; Yamamoto et al., 2002; Marucci et al., 2008). Trabalhos controlados têm demonstrado que períodos entre 48 e 72 horas são requeridos para aquisição e transmissão de *X. fastidiosa* pelas cigarrinhas, não sendo requerido um período de latência (Purcell & Finlay, 1979; Redak et al. 2004).

As cigarrinhas escolhem seus hospedeiros para alimentação principalmente em função da disponibilidade de brotações novas. Na ausência das mesmas ou em condições de estresse hídrico no pomar, as plantas nativas seriam um refúgio para estes insetos, que migrariam novamente para os citros quando estes estiverem com as brotações novas restabelecidas, uma vez que, as cigarrinhas têm forte preferência por

fluxos vegetativos das plantas cítricas (Marucci et al. 2004). Processo similar foi descrito e detalhadamente estudado no patossistema *X. fastidiosa*-PD, nos Estados Unidos (Purcell & Saunders, 1999). Portanto, os períodos do ano de maiores taxas de transmissão de *X. fastidiosa* pelos vetores compreendem o final da primavera e o verão, quando as plantas emitem brotações constantes que coincidem também com as altas populações dos vetores (Coelho et al. 2008). Isto reforça a ideia de que plantas cítricas próximas a lugares úmidos e matas ciliares sejam mais propensas a infecções que plantas em lugares altos (Giustolin et al., 2009). Coelho et al., (2008) mostraram que embora as 4 espécies de cigarrinhas mais importantes na transmissão de *X. fastidiosa* subsp. *pauca* (*A. citrina*, *B. xanthophis*, *D. costalimai* e *O. facialis*) foram as predominantes tanto no interior como nas bordas de matas e periferia de talhões, a preferência por estes habitats foi evidente para as espécies *A. citrina*, *B. xanthophis*, e *O. facialis*. Ao passo que *D. costalimai* teve preferência para o interior de talhões. Isto sugere que, num sistema de manejo da CVC, o controle do vetor em bordas de talhões e em talhões cuja borda vizinhe a matas mereceria maior atenção, assim como também já evidenciado para o controle, em bordas de talhões, do vetor (*Diaphorina citri*) da bactéria *Candidatus Liberibacter* de que causa o HLB.

Incidência e severidade de sintomas

Muito embora a distribuição geográfica da bactéria seja ampla tanto ao nível de Brasil quanto ao de São Paulo, o que levou *X. fastidiosa* não ser mais considerada um patógeno quarentenário, a severidade dos sintomas é diferente entre as regiões geográficas. Ao nível de Brasil esta informação não é muito bem detalhada, diferentemente do estado de São Paulo. Resultados dos levantamentos amostrais realizados pelo Fundecitrus têm-se registros da incidência desta doença estratificados por idade das plantas entre 1996 e 2012, e por regiões de cultivo entre 2009 e 2012. Para detalhes das informações que serão apresentadas a seguir consultar o endereço <http://www.fundecitrus.com.br/levantamentos/cvc/9>.

Segundo dados, a região Norte do estado de São Paulo historicamente foi e ainda é a mais afetada, seguida das regiões Noroeste e Centro. A doença vem

crescendo na região Leste e praticamente não tem importância nas regiões Sul e Oeste do estado de São Paulo. As regiões Norte e Noroeste do estado de São Paulo são conhecidas por apresentarem temperaturas médias anuais mais elevadas e distribuições hídricas mais irregulares, com déficits hídricos estendendo-se entre abril e outubro. Embora, ao nosso conhecimento, não se tenha estudos mostrando correlações diretas envolvendo a combinação estresse hídrico e temperaturas elevadas favorecendo a incidência de CVC, alguns trabalhos mostraram que o estresse hídrico favoreceu a maior severidade da doença (Machado et al., 2007; Gonçalves et al., 2014), porém não impediu seu desenvolvimento. Inferências entre as condições climáticas presentes das regiões geográficas paulista (Norte, Centro e Sul) e incidência da CVC foi constada por Coletta-Filho et al. (2014). Estes autores mostraram, através de dados coletados em 2005, que a taxa de infecção latente por *X. fastidiosa* em laranjeiras doce da região considerada como sul citrícola (Porto Ferreira, Limeira e Botucatu) foi 31% na média. Por outro lado apenas 5% das plantas analisadas nestas regiões estavam com CVC. Já para plantas na região Norte (São José do Rio Preto, Olímpia, Catanduva, Bebedouro) a taxa de infecção latente variou entre 10 e 24%, ao passo que a de plantas doentes esteve entre 41 e 70%. Ou seja, a região Norte paulista favorece muito mais a expressão da doença que o Sul, como já é conhecido.

Ainda em relação a incidência de CVC é observado pelos dados amostrais do Fundecitrus uma nítida correlação entre idade da planta e incidência da doença, muito embora também é nítido que a incidência da doença dentro de cada grupo analisado (0-2, 3 a 5, e 6 a 10 anos) caiu entre 2009 e 2012, tendo como exceção a faixa que contempla plantas acima de 10 anos. A esta diminuição da CVC nos pomares pode-se atribuir ao sistema de produção de mudas certificadas, garantindo aos produtores mudas livres do patógeno na formação dos pomares; e o uso intensivo de inseticidas para controle do vetor, que se intensificou com a chegada no HLB na citricultura paulista em 2004.

A epidemiologia da *X. fastidiosa* da CVC pode ser alterada se novas espécies de cigarrinhas vetores com diferentes hábitos forem introduzidas. Um exemplo disso é o caso da introdução, na Califórnia-

USA, da espécie de cigarrinha *Homalodisca vitripennis* que potencializou a epidemiologia da *X. fastidiosa* causadora da PD naquele Estado (Redak et al. 2004, Almeida et al. 2005). Também, o mapa espacial da severidade da doença pode ser alterado caso mudanças climáticas em curso possam alterar o regime pluviométrico no estado de São Paulo.

PATOGENICIDADE

O mecanismo de patogenicidade mais aceito da bactéria *X. fastidiosa* é decorrente da sua capacidade de colonizar os vasos do xilema da planta formando biofilmes, que são agregados densos de células (Figura 1). A formação desses biofilmes leva a oclusão dos vasos do xilema e subsequente prejuízo na condutância hídrica (estresse hídrico) e de nutrientes para a planta (Hopkins & Purcell 2002; Ribeiro et al, 2004; De Souza et al., 2009), somado a indução na formação de tiloses que potencializaria ainda mais a severidade da doença (Sun et al., 2013). Sabe-se que, quando as células estão em biofilme, existe um mecanismo de comunicação entre as células, denominado de “*quorum sensing*”, que permite que as bactérias produzam proteínas e fatores de patogenicidade, como a secreção de toxinas, que lhes conferem uma maior capacidade competitiva e adaptativa dentro da planta (De Souza et al., 2004; Chatterjee et al., 2008).

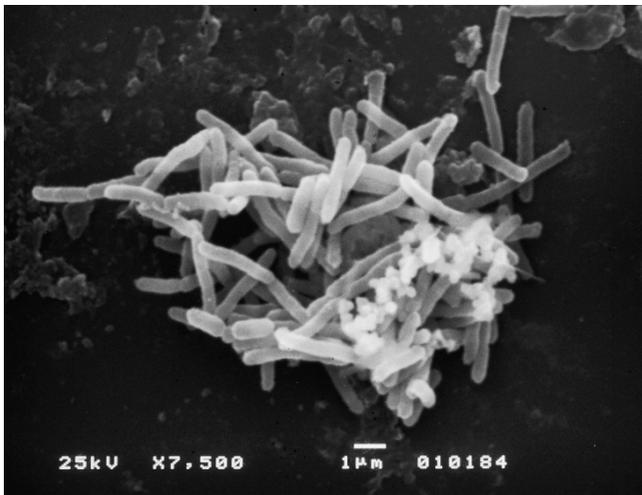


Figura 1. Células de *Xylella fastidiosa* aderidas umas às outras formando biofilme.

Contrariando a hipótese da presença de biofilme bacteriano como única explicação para os sintomas ocasionados por *X. fastidiosa*, Gambetta et al. (2007) não encontraram correlação entre concentração desta bactéria com os sintomas de escaldadura de folhas de videira em Pierce Disease (PD). Outras respostas fisiológicas de plantas afetadas por *X. fastidiosa* incluem sintomas típicos de deficiência hídrica como decréscimo na fotossíntese, na transpiração, na condutância estomática e no potencial de água (Ribeiro et al, 2004). Os mesmos autores mostraram que o metabolismo de nitrogênio (N) em plantas sintomáticas é altamente afetado como observado pelo desbalanço de enzimas como a glutamina sintetase e proteases. Porém, não se sabe se este efeito negativo é decorrente da presença do patógeno ou da deficiência hídrica das plantas afetadas. A *X. fastidiosa* produz enzimas degradadoras de parede celular e proteases que podem estar envolvidas na degradação de pit membranas facilitando a migração entre os vasos de xilema (Fedatto et al., 2006). Em animais é muito bem demonstrado a função de proteases na patogenicidade, sendo dependente da interação patógeno-hospedeiro. As proteases têm ação em muitas funções fisiológicas do hospedeiro, assim como inibidores de proteases estão envolvidos em variadas funções metabólicas, sendo o equilíbrio proteases-antiproteases responsável pelos sintomas desencadeados durante a infecção (Wolf, 1992). Os sintomas desencadeados pela infecção de *X. fastidiosa* são diferentes em laranjeiras (cloroses foliares) quando comparados a outros hospedeiros como videira e ameixeiras (requeimas foliares). Estas observações reforçam a hipótese de que outros fatores poderiam estar associados a sintomatologia, além da oclusão física do xilema.

SINTOMATOLOGIA E DIAGNÓSTICO

Diferentemente da maioria das doenças causadas por *X. fastidiosa*, em plantas de laranja doce não ocorre requeima da borda das folhas, como observado em videira, ameixeira, nozes pecan e outras plantas ornamentais (Hopkins & Purcell, 2002). Em condições naturais os sintomas se iniciam de forma setorizada em um único ramo e com o tempo evoluem por toda a copa. Inicialmente, nas folhas maduras de laranja doce, tipicamente ocorre pontos cloróticos distribuídos irregularmente na parte superior do limbo foliar, com

a correspondente presença de uma lesão levemente convexa e de coloração marrom ou parda na face inferior da folha (Figura 2). Com a evolução, estas lesões tornam-se necróticas chegando às vezes a ter congruência de lesões, a depender da intensidade da doença. Nos ramos afetados ocorre um claro desenvolvimento anormal deste, com queda de folhas e a medida que a doença torna-se sistêmica, as plantas têm o crescimento reduzido, o mesmo acontecendo com os frutos, que ficam pequenos e duros, impróprios para o comércio *in natura* ou até mesmo para a indústria processadora. Deficiências nutricionais como as de zinco, boro e potássio são também encontradas nas folhas de plantas com CVC (Carlos et. al., 1998). Frutificações em ‘pencas’ são também observadas nas plantas severamente afetadas, sendo os frutos severamente reduzidos em diâmetro. Reduções na produtividade em torno de 30 a 35% foram observadas quando comparadas plantas doentes com plantas assintomáticas (Palazzo & Carvalho, 1993) e com uma redução em torno de 70% no peso e número de frutos (Laranjeira, 2004).

O diagnóstico da *X. fastidiosa* da CVC pode ser feito por isolamento em meio de cultura como, por exemplo, o PW (Davis et al. 1981), o PWG (Hill & Purcell, 1995) ou BCYE (Wells et al. 1981). Normalmente observa-se pequenas colônias convexas (0,30 mm de diâmetro), de coloração branca quando isoladas de pecíolo de folhas sintomáticas ou ramos de 0,3 a 0,4 cm de diâmetro. Estas colônias são observadas sob lupa ao redor de 10 dias após o isolamento quando as placas são mantidas entre 28 a 30°C; porém, às vezes necessitando até 20 dias ou mais para que isso ocorra. Tríplexes repicagens são aconselhadas para verificar a pureza do isolado. Crescimentos prévios a 10 dias, em média, observados a olho nu são prováveis contaminantes. Portanto, a natureza fastidiosa desta bactéria impossibilita usar o isolamento em meio de cultura rotineiramente como forma de diagnose. Diagnósticos serológicos têm sido amplamente utilizados, no entanto, até o momento, anticorpos monoclonais específicos para *X. fastidiosa* subsp. *pauca* não estão comercialmente disponíveis. Protocolos

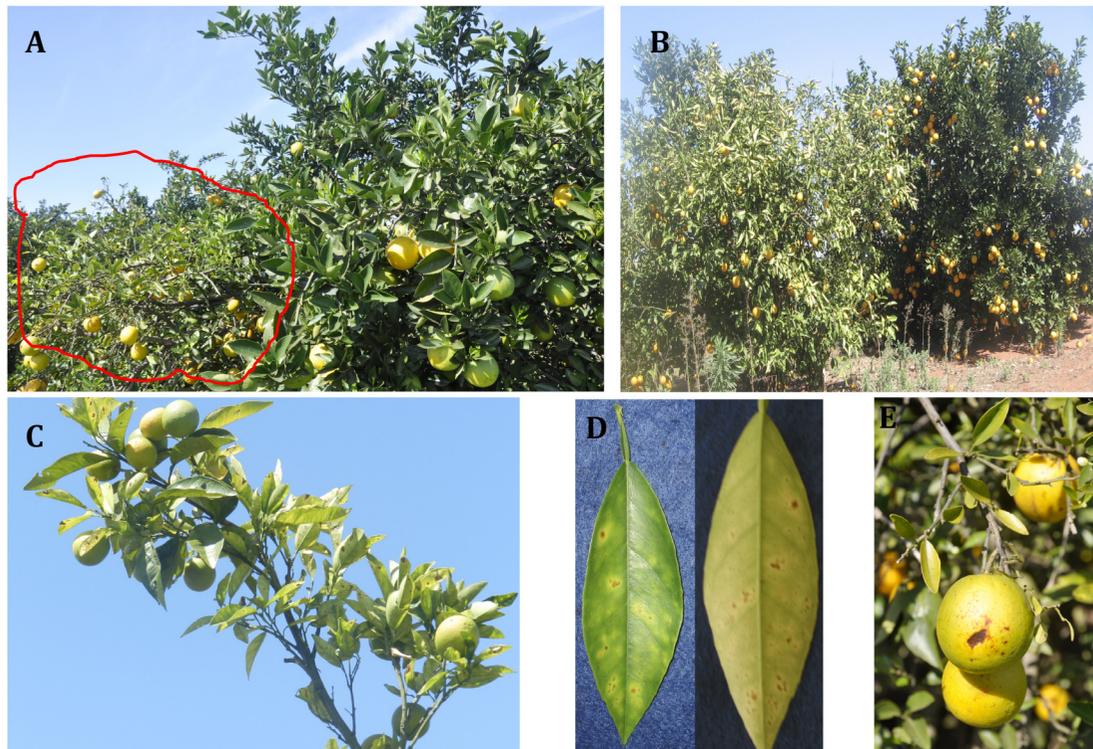


Figura 2. Sintomas de CVC em laranjeira doce (*C. sinensis*). A. Sintomas setorizados na copa (destaque em vermelho); B. Planta severamente afetada (esquerda), com sintomas distribuídos por toda a copa, inclusive com murcha foliar; C. Detalhe de ramo com frutos pequenos e maturação precoce; D. Folhas com sintomas cloróticos na fase dorsal (esquerda) e ventral (direita); E. Frutos afetados com tamanho reduzido, onde manchas de coloração marrom são observadas, sinalizando infestação severa.

padrões para diagnóstico de *X. fastidiosa* aceitos pela EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization) recomendam o uso dos testes serológicos baseados em DAS-ELISA e Dot immunoblotting assay – DIBA (<http://www.eppo.int>), porém com anticorpos policlonais. Como consequência da popularização das técnicas baseadas em DNA, a detecção de *X. fastidiosa* através da PCR passou a ser rotina nos laboratórios. Regiões do DNA específicos para diagnóstico de *X. fastidiosa* (RST31/33) foram descritos por Misanvage et al. (1994) e para *X. fastidiosa* que causa CVC (CVC-1 e 272-2int) descritos por Pooler & Hartung (1995). Estes últimos também funcionam para isolados de *X. fastidiosa* de café. Descrições detalhadas de protocolos para diagnóstico de *X. fastidiosa* podem ser encontrados no site da EPPO [(European and Mediterranean Plant Protection Organization) no endereço [https://www.eppo.int/QUARANTINE/bacteria/Xylella_fastidiosa/pm7-24\(1\)%20XYLEFA%20web.pdf](https://www.eppo.int/QUARANTINE/bacteria/Xylella_fastidiosa/pm7-24(1)%20XYLEFA%20web.pdf).] Embora a EPPO tenha bem descrito os protocolos moleculares e serológicos para *X. fastidiosa*, faltam informações sobre diagnósticos baseados em PCR quantitativo em tempo real (qPCR). Estes protocolos utilizando o sistema TaqMan foram desenvolvidos por vários autores, sendo específicos à subespécie *pauca* (Oliveira et al., 2002; Li et al., 2013) ou específicos a *X. fastidiosa* spp. (Schaad et al., 2002; Francis et al., 2006).

MANEJO E PREVENÇÃO

O manejo da CVC esta alicerçado nos princípios da exclusão através do plantio de mudas sadias, da erradicação por meio de eliminação de fontes de inóculo e da proteção, aplicando-se inseticidas para controle da população de vetores (Laranjeira et al., 1998b).

O processo de exclusão do patógeno por plantio de mudas sadias é uma das mais importantes estratégias para o manejo da CVC e de outras doenças. Pode-se afirmar que a CVC deixou à citricultura paulista como herança um sistema modelo de produção de mudas, que tornou-se mandatório no Estado a partir de 2003. A este sistema também tem-se atribuído ganhos em produtividade para a cultura ao redor de 21% (Gonçalves et al., 2011), além da própria redução na incidência da CVC nos pomares em formação ou com idades até 10 anos (Revista Citricultor, ano

IV, no. 18, 2013). Ganhos significativos quanto a sanidade das mudas para outros patógenos como *Phytophthora nicotiane* (gomose), nematoides de citros (*Tylenchulus semipenetrans* e *Pratilencus* sp.) e *Candidatus Liberibacter* spp. (HLB) estão sendo também evidentes.

Porém, hospedando-se numa planta perene como laranjeira doce e sendo a transmissão planta a planta importante na epidemiologia, a eliminação de fontes de inóculo do patógeno tem um papel fundamental no manejo da doença (Rodas, 1994). Esta eliminação da fonte de inóculo tem sido feita por meio de poda de ramos infectados ou mesmo pela remoção total da planta. O modelo a ser adotado depende do estágio da infecção, assim como da idade da planta. Poda em plantas de até 3 anos mostrou-se ineficiente, assim como em plantas onde os sintomas estavam espalhados pela planta, independente da idade (Coletta-Filho et al., 2000). Analisando-se cerca de 770 amostras coletadas em diferentes partes de três plantas de laranjeira doce com 4 anos de idade, cujos sintomas de CVC estavam restritos a apenas algumas folhas, observou-se *X. fastidiosa* apenas nas folhas que mostravam sintomas ou próxima a estas (Figura 3A) (H. D. Coletta-Filho, comunicação pessoal). Esta seria a situação ideal para a realização de poda, onde a remoção dos ramos com corte 30 cm abaixo das folhas sintomáticas teria grande sucesso visando na eliminação de fontes de inóculo. Porém, em amostras obtidas de duas outras plantas selecionadas nas mesmas condições descritas acima, foi encontrada *X. fastidiosa* sistemicamente distribuída por toda a planta (Figura 3B). Portanto, com base nestes resultados pode-se afirmar que a remoção de ramos sintomáticos para a CVC com objetivo de eliminar a bactéria do hospedeiro é um processo cujo sucesso é dependente de situações muito específicas, necessitando ser analisado com mais critério.

Finalizando, quanto ao sucesso no manejo da CVC, o princípio de proteção do hospedeiro quanto a presença dos insetos vetores é fundamental. Embora não se tenha estabelecido a concentração mínima da *X. fastidiosa* na planta para aquisição pelas cigarrinhas, é fato que a bactéria consegue hospedar tanto ramos assintomáticos quanto sintomáticos (Marucci et al., 2005). O controle das cigarrinhas é feito por meio de inseticidas de contato, aplicados sobre a copa ou por meio de inseticidas sistêmicos aplicados no tronco,

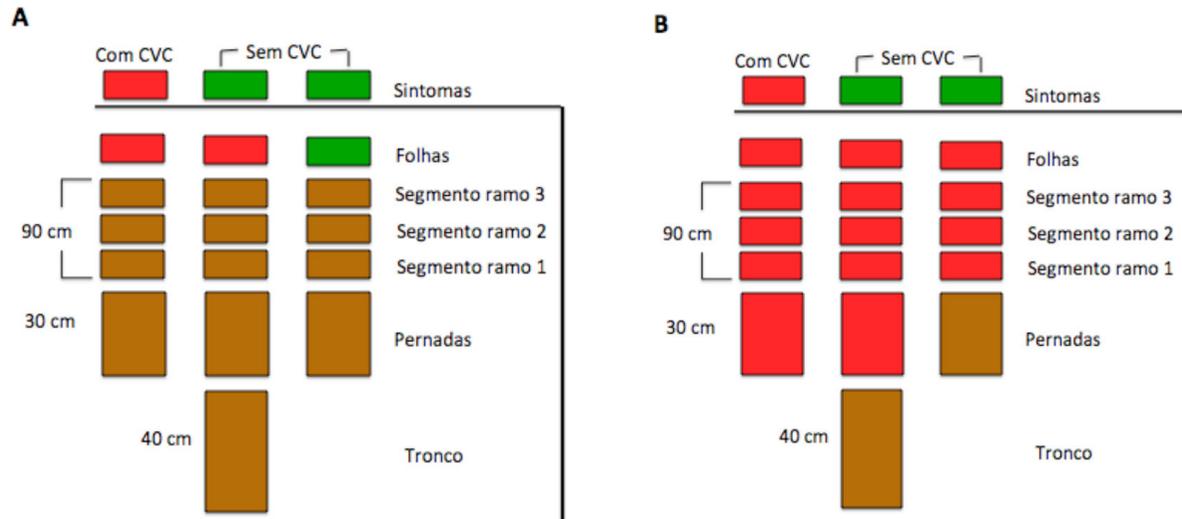


Figura 3. Representação esquemática de plantas de laranja doce Pêra enxertadas em limão Cravo com 4 anos de idade, analisadas por PCR para a presença de *X. fastidiosa* em amostras coletadas nos diferentes segmentos (tronco, pernadas, ramos e folhas). A. Resultados oriundos de análises em três plantas amostradas coincidentemente até o mês de Junho. B. Resultados de duas plantas coletadas a partir de Agosto. As cores indicam a presença (vermelho) e/ou ausência (verde ou marrom) de *X. fastidiosa*. A ocorrência de uma única amostra positiva, dentre as diversas realizadas em cada segmento amostrado, foi suficiente para considerar as amostras como infectadas e portanto atribuir a cor vermelha.

via ‘drench’, ou mesmo foliar. Portanto, muito similar, se não idêntico, às recomendações para o controle do psilídeo, vetor da bactéria do HLB. O modo de aplicação irá depender principalmente da disponibilidade hídrica do solo e da idade da planta. Proteções devem ser realizadas principalmente na primavera e verão, ou mesmo no outono, quando houver fluxos de brotações intensas do pomar, sempre com ênfase nas plantas em formação. Em pomares adultos acima de 7-8 anos, o monitoramento de populações de cigarrinhas por meio de armadilhas adesivas amarelas colocadas a 1,8 m de altura na copa das plantas é uma alternativa para um controle mais sustentável destes vetores. Bordas de talhões, principalmente aqueles próximos a locais de várzea (úmidos) assim como de matas devem ser priorizados.

Moléculas com ações bacteriostáticas como o análogo ao aminoácido N-Acetyl Cisteína (NAC) têm mostrado bons resultados em experimentos de casa-de-vegetação, tanto inibindo o crescimento de *X. fastidiosa* quanto atuando na remissão dos sintomas de CVC (Muranaka et al., 2013). No entanto, estes resultados precisam ser validados em condições de campo.

CONCLUSÕES

Quando passados 10 anos do primeiro relato da ocorrência da CVC no estado de São Paulo, o pesquisador científico F.F. Laranja (Laranja, 1997) publicou uma interessante revisão sobre os avanços acerca deste patossistema naquele intervalo de tempo. Destaca-se na revisão “... a pesquisa em torno da CVC é ampla, abordando diversos aspectos. Entretanto, salientam-se esforços em relação a variedades resistentes, produção de material propagativo livre da bactéria, identificação e controle dos vetores e estudos de convivência com a doença. É fundamental compreender que a CVC é originária do Brasil. Dessa forma, não existem soluções já desenvolvidas, sendo, praticamente todo o trabalho de pesquisa e controle em nosso país, desde a estaca zero”.

Passados mais 15 anos desde a revisão de Laranja (1997) muito se avançou no conhecimento da CVC, onde os detalhes podem ser vistos nesta revisão. Fazendo referência aos esforços de pesquisa necessários e apontados por Laranja (1997), têm-se hoje os programas de melhoramento genético

desenvolvidos no Centro de Citricultura Sylvio Moreira-IAC que, em colaboração com outros grupos de pesquisa, geraram materiais genéticos tolerantes a CVC e com potencial comercial. Todo o sistema de produção de mudas cítricas está em ambiente protegido, isento de *X. fastidiosa* e outros patógenos, sendo modelo mundial de qualidade e sanidade de mudas cítricas. São conhecidas cerca de 13 espécies de cigarrinhas como vetores da *X. fastidiosa*, conhecendo-se também as espécies mais prevalentes, a distribuição faunística nos pomares e épocas do ano. Em relação a convivência com a doença, um pacote tecnológico englobando a necessidade de controle do vetor, a remoção de fontes de inóculo em condições específicas e o uso de material de propagação sadio advindo de viveiros certificados vem suportando a produção de laranjas doces no estado de São Paulo, até surgirem soluções mais sustentáveis.

Finalizando, em sendo um problema quase que exclusivamente brasileiro em citros, a CVC demandou, e tem demandado, esforços de pesquisas em conjunto com o setor como um todo. Desta forma, se não se tem uma solução definitiva, ao menos conhecendo a doença é possível seu manejo.

Mais uma vez fazendo referência ao trabalho de Laranjeira (1997) o qual referiu-se ao pesquisador Alexander H. Purcell, um dos ícones da pesquisa em *X. fastidiosa* e seus vetores ... “Não há garantia que a pesquisa resolverá todos os problemas, mas nenhum problema será resolvido sem pesquisa”.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida RPP, Blua MJ, Lopes JRS & Purcell AH (2005) Vector transmission of *Xylella fastidiosa*: Applying fundamental knowledge to generate disease management strategies. *Annals of the Entomological Society of America* 98: 775-786.
- Almeida RPP, Nascimento FE, Chau J, Prado SS, Tsai CW, Lopes SA & Lopes JRS (2008) Genetic structure and biology of *Xylella fastidiosa* causing disease in citrus and coffee in Brazil. *Applied and Environmental Microbiology* 74:3690-3701.
- Bové JM & Ayres AJ (2007) Etiology of three recent diseases of citrus in São Paulo State: sudden death, variegated chlorosis and Huanglongbing. *IUBMB Life* 59: 346-354.
- Carlos EF, Neto JR & Beretta MJG (1998) The bacterium *Xylella fastidiosa*. In: Donadio LC & Moreira CS (Eds). *Citrus Variegated Chlorosis*. Bebedouro, p. 23-53.
- Carvalho SA (2003) Regulamentação atual da Agência de Defesa Agropecuária para a produção, estocagem, comércio, transporte e plantio de mudas cítricas no Estado de São Paulo. *Laranja* 24: 199-239.
- Chang CJ, Garnier M, Zreik L, Rossetti V & Bové JM (1993) Culture and serological detection of *Xylella fastidiosa*, the xylem-limited bacterium associated with citrus variegated chlorosis disease. *Current Microbiology* 27: 137-142.
- Chatterjee S, Almeida RPP & Lindow S (2008) Living in two worlds: the plant and insect lifestyles of *Xylella fastidiosa*. *Annual Review Phytopathology* 46: 243-271.
- Coelho HCJ, Ximenes NL, Felipe MR, Montenegro LH, Garbim LF, Sanches LA, Pria-Júnior WD & Yamamoto PT (2008) Faunistic analysis of sharpshooters (Hemiptera: Auchenorrhyncha, Cicadellidae) in a ‘Westin’ sweet orange orchard. *Neotropical Entomology* 37: 449-456.
- Coletta-Filho HD, Francisco CS & Almeida RPP (2014) Temporal and spatial scaling of the genetic structure of a vector-borne plant pathogen. *Phytopathology* 104:120-125.
- Coletta-Filho HD, Carvalho SA, Silva LFC, Machado MA (2014) Seven years of negative detection results confirm that *Xylella fastidiosa*, the causal agent of CVC, is not transmitted from seeds to seedlings. *Eur J Plant Pathol.*, 139:593-596.
- Coletta-Filho HD, Carlos EF, Targon MLPN, Cristofani M, Souza AA & Machado MA (2000) Distribution of *Xylella fastidiosa* within sweet orange trees: influence of age and level of symptom expression of citrus variegated chlorosis. *Proceedings of 14th International Organization of Citrus Virologists*, p. 243-248, Riverside, CA.
- Coletta-Filho HD & Machado MA (2002) Evaluation of the genetic structure of *Xylella fastidiosa* populations from different *Citrus sinensis* varieties. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(8): 3731-3736.

- Coletta-Filho HD & Machado MA (2003) Geographical genetic structure of *Xylella fastidiosa* from citrus in São Paulo State, Brazil. *Phytopathology* 93: 28-34.
- Coletta-Filho HD, Pereira EO, Souza AA, Takita MA, Cristofani-Yaly M & Machado MA (2007) Analysis of resistance to *Xylella fastidiosa* within a hybrid population of Pera sweet orange x Murcott tangor. *Plant Pathology* 56: 661-668.
- Coletta-Filho HD, Borges KM & Machado MA (2000) Ocorrência de *Xylella fastidiosa* em plantas candidatas a matrizes de laranja-doce, e transmissão por borbulhas contaminadas. *Laranja* 21: 335-343.
- Cordeiro AB, Sugahara VH, Stein B & Leite Junior RP (2014) Evaluation by PCR of *Xylella fastidiosa* subsp. *paucis* transmission through citrus seeds with special emphasis on lemons (*Citrus limon* (L.) Burm. f). *Crop Protection* 62: 86-92.
- Cristofani M, Novelli, VM, Perin MS, de Oliveira AC, Oliveira RP, Bastianel M & Machado MA (2005) Programa de melhoramento de citros por hibridização controlada no Centro APTA Citros Sylvio Moreira / IAC em 1997 – 2005. *Laranja* 26: 121-134.
- Davis MJ, French WJ & Schaad NW (1981) Axenic culture of the bacteria associated with phony disease of peach and plum leaf scald. *Current Microbiology* 6: 309-314.
- De Souza AA, Takita MA, Coletta-Filho HD, Caldana C, Yanai GM, Muto NH, Costa de Oliveira, R, Nunes, LR & Machado MA (2004) Gene expression profile of the plant pathogen *Xylella fastidiosa* during biofilm formation *in vitro*. *FEMS Microbiology Letters* 237: 341-353.
- De Souza AA, Takita MA, do Amaral AM, Coletta-Filho HD & Machado MA (2009) Citrus response to *Xylella fastidiosa* infection, the causal agent of Citrus Variegated Chlorosis. *Tree and Forest Science and Biotechnology* S2: 73-80.
- Fadel AL, Stuchi ES, Carvalho SA, Federici MT & Coletta-Filho HD (2014) Navelina ISA 315: A cultivar resistant to citrus variegated chlorosis. *Crop Protection* 64: 115-121.
- Fedatto LM, Silva-Stenicoa ME, Etchegaray A, Pacheco FTH, Rodrigues JLM & Tsai SM (2006) Detection and characterization of protease secreted by the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Microbiological Research* 161:263-272
- Francis M, Lin H, Rosa JC-L, Doddapaneni H & Civerolo EL (2006) Genome-based PCR primers for specific and sensitive detection and quantification of *Xylella fastidiosa*. *Eur. J. Plant Pathol.* 115: 203–213.
- Gambetta GA, Fei J, Rost TL & Matthews MA (2007) Leaf scorch symptoms are not correlated with bacterial populations during Pierce's Disease. *Journal of Experimental Botany* 58(15-16): 4037–4046.
- Giustolin TA, Lopes JRS, Querino RB, Cavichioli RR, Zanol K, Azevedo WS & Mendes MA (2009) Diversidade de Hemiptera Auchenorrhyncha em citros, café e fragmento de floresta nativa do estado de São Paulo. *Neotropical Entomology* 38: 834-841.
- Gonçalves FP, Stuchi ES, Lourenço SA, Kriss AB, Gottwald TR & Amorim L (2014) The effect of irrigation on development of citrus variegated chlorosis symptoms. *Crop Protection* 57: 8-14.
- Gonçalves FP, Stuchi ES, Silva SR, Reiff ET & Amorim L (2011) Role of healthy nursery plants in orange yield during eight years of Citrus Variegated Chlorosis epidemics. *Scientia Horticulturae* 129: 343-345.
- Gottwald TR, Gidtti FB, Santos JM & Carvalho AC (1993) Preliminary spatial and temporal analysis of citrus variegated chlorosis (CVC) in São Paulo, Brazil. *Anais 12th Conference International Organization of Citrus Virologists*. P. Moreno, JV. DaGraca J & Timmer LW (eds). Riverside, CA: 327-335.
- Hartung JS, Beretta MJG, Brlansky RH, Spisso J & Lee RF (1994) Citrus variegated chlorosis bacterium: axenic culture, pathogenicity, and serological relationships with other strains of *Xylella fastidiosa*. *Phytopathology* 84:591-597.
- He CX, Li W B, Ayres AJ, Hartung JS, Miranda VS & Teixeira DC (2000) Distribution of *Xylella fastidiosa* in citrus rootstocks and transmission of citrus variegated chlorosis between sweet orange plants through natural root grafts. *Plant Disease*: 84:622-626.

- Hill BL & Purcell AH (1995) Acquisition and retention of *Xylella fastidiosa* by an efficient vector, *Graphocephala atropunctata*. *Phytopathology* 85: 209-12.
- Hill BL & Purcell A H (1997) Populations of *Xylella fastidiosa* in plants required for transmission by efficient vector. *Phytopathology* 87: 1197-1201.
- Hopkins DL & Purcell AH (2002) *Xylella fastidiosa*: cause of Pierce's disease of grapevine and other emergent diseases. *Plant Disease* 86: 1056-66.
- Kitajima EW, Coletta-Filho HD, Machado MA, Novaes QS (2000) Escaldadura das folhas em *Hibiscus schizopetalus* associada à infecção por *Xylella fastidiosa* em Brasília, DF. Anais XXXIII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Belém, PA, p. 323.
- Krügner R, Lopes MTV de C, Santos JS, Beretta MJG & Lopes JRS (2000) Transmission efficiency of *Xylella fastidiosa* to citrus by sharpshooters and identification of two new vector species. Anais 14th Conference of International Organization of Citrus Virologists, Campinas, SP, p. 423.
- Kung SH, Retchless AC, Kwan JY & Almeida RPP (2013) Effects of DNA size on transformation and recombination efficiencies in *Xylella fastidiosa*. *Applied and Environmental Microbiology* 79:1712-1717.
- Laranjeira FF (1997) Dez anos de clorose variegada dos citros: o que sabemos? *Laranja* 18(1): 123-141.
- Laranjeira FF, Bergamin Filho A, Amorim L & Gottwald TR (2004) Dinâmica espacial da clorose variegada dos citros em três regiões do estado de São Paulo. *Fitopatologia Brasileira* 29:56-65.
- Laranjeira FF, Bergamin FA & Amorim L (1998a) Dinâmica e estrutura de focos da Clorose Variegada dos Citros (CVC). *Fitopatologia Brasileira* 23: 36-41.
- Laranjeira FF, Pompeu Jr. J, Harakava R, Figueiredo JO, Carvalho SA & Coletta-Filho HD (1998b) Cultivares e espécies cítricas hospedeiras de *Xylella fastidiosa* em condições de campo. *Fitopatologia Brasileira* 23: 147-154.
- Laranjeira FF (2004) Quantificação de danos causados por doenças em citros. Documentos 144, Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, 2004. 24p.
- Li W-B, Teixeira DC, Hartung JS, Huang Q, Duan Y, Zhou L, Chen J, Lin H, Lopes S, Ayres AJ & Levy L (2013) Development and systematic validation of qPCR assays for rapid and reliable differentiation of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chlorosis. *Journal of Microbiological Methods* 92: 79-89.
- Li W-B, Pria Jr WD, Lacava PM, Qin X & Hartung JS (2003) Presence of *Xylella fastidiosa* in sweet orange fruit and seeds and its transmission to seedlings. *Phytopathology* 93:953-958.
- Lopes SA, Marcussi S, Torres SCZ, Souza V, Fagan C, Franca SC, Fernandes NG & Lopes JRS (2003) Weeds as alternative hosts of the citrus, coffee, and plum strains of *Xylella fastidiosa* in Brazil. *Plant Disease* 87: 544-549.
- Machado EC, de Oliveira RF, Ribeiro RV, Medina CL, Stuchi ES & Pavani LC (2007) Deficiência hídrica agrava os sintomas fisiológicos da clorose variegada dos citros em laranja Natal. *Bragantia* 66: 373-379.
- Marucci RC, Lopes JRS, Vendramim JD & Corrente JE (2005) Influence of *Xylella fastidiosa* infection of citrus on host selection by leafhopper vectors. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 117: 95-103.
- Marucci RC, Lopes JRS, Vendramim JD & Corrente JE (2004) Feeding site preference of *Dilobopterus costalimai* Young and *Oncometopia facialis* (Signoret) (Hemiptera: Cicadellidae) on citrus plants. *Neotropical Entomology* 33: 759-768.
- Marucci RC, Lopes JRS & Cavichioli RR (2008). Transmission efficiency of *Xylella fastidiosa* by sharpshooters (Hemiptera: Cicadellidae) in coffee and citrus. *Journal of Economic Entomology* 101: 1114-21.
- Metha A & Rosato Y B (2001) Phylogenetic relationships of *Xylella fastidiosa* strains from different hosts based on 16S rDNA and 16S-23S intergenic spacer sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* 51: 311-318.
- Misanvage GV, Thompson CM, Hopkins DL, Leite RMVBC & Stall RE (1994) Development of a polymerase chain-reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. *Phytopathology* 84: 456-61.

- Montero-Astúa M, Saborío-R G, Chacón-Díaz C, Garita LVW, Moreira L, Hartung JS & Rivera C (2008) First Report of *Xylella fastidiosa* in Avocado in Costa Rica. *Plant Disease* 92: 175.
- Montero-Astúa M, Hartung JS, Aguilar E, Chacón C, Li W, Albertazzi FJ & Rivera C (2007) Genetic diversity of *Xylella fastidiosa* strains from Costa Rica, São Paulo, Brazil, and United States. *Phytopathology* 97:1338-1347.
- Muranaka LS, Giorgiano TE, Takita MA, Forim MR, Silva LFC, Coletta-Filho HD, Machado MA & de Souza AA (2013) N-Acetylcysteine in agriculture, a novel use for an old molecule: focus on controlling the plant-pathogen *X. fastidiosa*. *PLOS ONE*, 8:e72937.
- Oliveira AC, Vallim MA, Semighini CP, Araujo WL, Goldman GH & Machado MA (2002) Quantification of *Xylella fastidiosa* from citrus trees by real-time polymerase chain reaction assays. *Phytopathology* 92: 1048-1054.
- Pooler MR & Hartung JS (1995) Specific PCR detection and identification of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chlorosis. *Current Microbiology* 31: 377-381.
- Purcell AH & Finlay A (1979) Evidence for non-circulative transmission of Pierce's disease bacterium by sharpshooters. *Phytopathology* 69: 393-395.
- Purcell AH & Saunders SR (1999) Fate of Pierce's disease strains of *Xylella fastidiosa* in common riparian plants in California. *Plant Disease* 83:825-830.
- Randall JJ, Goldberg NP, Kemp JD, Radionenko M, French JM, Olsen MW & Hanson SF (2009) Genetic analysis of a novel *Xylella fastidiosa* subspecies found in the southwestern United States. *Applied and Environmental Microbiology* 75:5631-5638.
- Redak RA, Purcell AH, Lopes JRS, Blua MJ, Mizell RF & Andersen PC (2004) The biology of xylem fluid-feeding insect vectors of *Xylella fastidiosa* and their relation to disease epidemiology. *Annual Review of Entomology* 49: 243-270.
- Ribeiro RV, Machado EC & Oliveira RF (2004) Growth and leaf temperature effects on photosynthesis of sweet orange plants infected with *Xylella fastidiosa*. *Plant Pathology* 53: 334-340.
- Roberto SR, Coutinho A, Lima JEOD, Miranda VS & Carlos EF (1996) Transmissão de *Xylella fastidiosa* pelas cigarrinhas *Dilobopterus costalimai*, *Acrogonia terminalis* e *Oncometopia fascialis* em citros. *Fitopatologia Brasileira* 21: 517-518.
- Roberto SR, Farias PRS & Bergamin Filho A (2002) Geostatistical analysis of spatial dynamic of Citrus Variegated Chlorosis. *Fitopatologia Brasileira* 27: 599-604.
- Rodas V (1994) Convivência com a clorose variegada dos citros. *Laranja* 15:129-134.
- Rossetti V, Garnier M, Bové JM, Beretta MJG, Teixeira ARR, Quaggio JA & De Negri JD (1990) Présence de bactéries dans le xylème d'orangers atteints de chlorose varié, une nouvelle maladie des agrumes au Bresil. *Comptes rendus de l'Académie des sciences. Série 3, Sciences de la vie* 30: 345-349.
- Saponari M, Boscia D, Nigro F & Martelli GP (2013) Identification of DNA sequences related to *Xylella fastidiosa* in oleander, almond and olive trees exhibiting leaf scorch symptoms in Apulia (Southern Italy). *J. Plant Pathol.* 95:668.
- Schaad NW, Postnikova E, Lacy G, Fatmi MB & Chang CJ (2004) *Xylella fastidiosa* subspecies: *X. fastidiosa* subsp *piercei*, subsp nov., *X. fastidiosa* subsp *multiplex* subsp. nov., and *X. fastidiosa* subsp *pauca* subsp nov. *Systematic and Applied Microbiology* 27: 290-300.
- Schaad NW, Opgenorth D & Gauth P (2002) Real-time polymerase chain reaction for one-hour on-site diagnosis of Pierce's disease of grape in early season asymptomatic vines. *Phytopathology* 92:721-728.
- Schuenzel EL, Scally M, Stouthamer R & Nunney L (2005) A multigene phylogenetic study of clonal diversity and divergence in North American strains of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 3832-3839.
- Simpson AJ, Reinach FC, Arruda P, Abreu FA, Acencio M, Alvarenga R, Alves LM, Araya JE, Baia GS, Baptista CS, Barros MH, Bonaccorsi ED, Bordin

- S, Bové JM, Briones MR, Bueno MR, Camargo AA, Camargo LE, Carraro DM, Carrer H, Colauto NB, Colombo C, Costa FF, Costa MC, Costa-Neto CM, Coutinho LL, Cristofani M, Dias-Neto E, Docena C, El-Dorry H, Facincani AP, Ferreira AJ, Ferreira VC, Ferro JA, Fraga JS, França SC, Franco MC, Frohme M, Furlan LR, Garnier M, Goldman GH, Goldman MH, Gomes SL, Gruber A, Ho PL, Hoheisel JD, Junqueira ML, Kemper EL, Kitajima JP, Krieger JE, Kuramae EE, Laigret F, Lambais MR, Leite LC, Lemos EG, Lemos MV, Lopes SA, Lopes CR, Machado JA, Machado MA, Madeira AM, Madeira HM, Marino CL, Marques MV, Martins EA, Martins EM, Matsukuma AY, Menck CF, Miracca EC, Miyaki CY, Monteriro-Vitorello CB, Moon DH, Nagai MA, Nascimento AL, Netto LE, Nhani A Jr, Nobrega FG, Nunes LR, Oliveira MA, de Oliveira MC, de Oliveira RC, Palmieri DA, Paris A, Peixoto BR, Pereira GA, Pereira HA Jr, Pesquero JB, Quaggio RB, Roberto PG, Rodrigues V, de M Rosa AJ, de Rosa VE Jr, de Sá RG, Santelli RV, Sawasaki HE, da Silva AC, da Silva AM, da Silva FR, da Silva WA Jr, da Silveira JF, Silvestri ML, Siqueira WJ, de Souza AA, de Souza AP, Terenzi MF, Truffi D, Tsai SM, Tshako MH, Vallada H, Van Sluys MA, Verjovski-Almeida S, Vettore AL, Zago MA, Zatz M, Meidanis J & Setubal JC (2000) The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Nature* 406: 151-159.
- Sun Q, Sun YL, Walker MA & Labavitch JM (2013) Vascular occlusions in grapevines with Pierce's disease make disease symptom development worse. *Plant Physiol* 1529-1541.
- van Sluys MA, de Oliveira MC, Monteiro-Vitorello CB, Miyaki CY, Furlan LR, Camargo LE, da Silva AC, Moon DH, Takita MA, Lemos EG, Machado MA, Ferro MI, da Silva FR, Goldman MH, Goldman GH, Lemos MV, El-Dorry H, Tsai SM, Carrer H, Carraro DM, de Oliveira RC, Nunes LR, Siqueira WJ, Coutinho LL, Kimura ET, Ferro ES, Harakava R, Kuramae EE, Marino CL, Giglioti E, Abreu IL, Alves LM, do Amaral AM, Baia GS, Blanco SR, Brito MS, Cannavan FS, Celestino AV, da Cunha AF, Fenille RC, Ferro JA, Formighieri EF, Kishi LT, Leoni SG, Oliveira AR, Rosa VE Jr, Sasaki FT, Sena JA, de Souza AA, Truffi D, Tsukumo F, Yanai GM, Zaros LG, Civerolo EL, Simpson AJ, Almeida NF Jr, Setubal JC & Kitajima JP (2003) Comparative analyses of the complete genome sequences of Pierce's disease and citrus variegated chlorosis strains of *Xylella fastidiosa*. *Journal of Bacteriology* 185: 1018-1026.
- Wells JM, Raju B, Nyland G & Lowe SK (1981) Medium for isolation and growth of bacteria associated with plum leaf scald and phony peach diseases. *Applied Environmental Microbiology* 42: 357-363.
- Wolf DH (1992) Proteases as biological regulators introductory remarks. *Experientia* 48: 117-118.
- Yamamoto PT, Roberto SR, Pria Júnior WD, Felipe MR, Miranda VS, Teixeira D do C & Lopes JRS (2002) Transmissão de *Xylella fastidiosa* por cigarrinhas *Acrogonia virescens* e *Homalodisca ignorata* (Hemiptera: Cicadellidae) em plantas cítricas. *Summa Phytopathologica* 28: 178-181.

Recebido: 18/11/2013 – Aceito: 17/09/2014
(CRT 067-13)