

Comportamento Sazonal da Clorose Variegada dos Citros em Três Regiões do Estado de São Paulo

Francisco F. Laranjeira¹, Armando Bergamin Filho², Lilian Amorim² & João Roberto S. Lopes²

¹Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cx. Postal 007, CEP 44380-000, Cruz das Almas, BA. Fax: (75) 621-2149, e-mail: chico@cnpmf.embrapa.br; ²Departamento de Fitopatologia, ESALQ/USP, Cx. Postal 09, CEP 13418-900, Piracicaba, SP

(Aceito para publicação em 08/08/2003)

Autor para correspondência: Francisco F. Laranjeira

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* 28:633-641. 2003.

RESUMO

Caracterizou-se a evolução de variáveis relacionadas à clorose variegada dos citros em plantas de três regiões do Estado de São Paulo (Noroeste, Centro e Sul), visando determinar diferenças no padrão sazonal do patógeno, dos vetores, do hospedeiro e da doença. Foram avaliadas mensalmente 20 plantas sintomáticas em talhões de laranja (*Citrus sinensis*) 'Pêra' enxertada em limão (*Citrus limonia*) 'Cravo', em três regiões do Estado de São Paulo, no período de dezembro de 1998 a dezembro de 2000, utilizando-se as seguintes variáveis: número de brotações novas (bn); percentagem de ramos sintomáticos (prs); percentagem de ramos assintomáticos infetados (prai); percentagem total de ramos infetados (ptri) e estimativa de concentração bacteriana (ecb). Em cada região foram obtidas as variáveis temperatura mínima, temperatura máxima, precipitação pluviométrica e número de

cigarrinhas capturadas em armadilha amarela. Para a determinação de correlação entre variáveis, utilizou-se a análise de *Lags* Distribuídos e para a comparação de regiões e estações do ano, a análise de Kruskal-Wallis, Friedman e o teste de Nemenyi ($p < 0,005$). As variáveis relacionadas à doença (prs, prai, ptri e ecb) apresentaram padrões sazonais, mas não se observou diferença estatística entre as estações do ano. O pomar da Região Noroeste apresentou maior quantidade de brotações novas e maior quantidade de ramos sintomáticos. O pomar da Região Sul apresentou maior quantidade de ramos com infecção assintomática. Não houve diferença de concentração bacteriana entre os pomares das três regiões.

Palavras-chave adicionais: CVC, *Xylella fastidiosa*, epidemiologia.

ABSTRACT

Seasonal behaviour of citrus variegated chlorosis in three regions of São Paulo State, Brazil

This work was to characterize the evolution of Citrus variegated chlorosis (CVC) related variables in plants of three regions in the State of São Paulo (Northeast, Center and South), in order to demonstrate differences in seasonal pattern of the pathogen, *Xylella fastidiosa*, vectors (sharpshooters), host [sweet orange (*Citrus sinensis*) 'Pera' grafted on Rangpur lime (*Citrus limonia*)] and disease. Twenty symptomatic plants were evaluated monthly from December 1998 to December 2000. The following variables were measured: number of new flushes (nf), percentage of symptomatic branches (psb), percentage of infected asymptomatic branches (piab), percentage of infected branches

(pib), estimation of bacteria concentration (ebc), lower and higher temperatures, rain fall and number of sharpshooters in yellow traps. The correlations among variables were tested by Distributed Lag Analysis and the comparison between regions and season was performed by Kruskal-Wallis and Friedman ANOVA and Nemenyi test ($p < 0,005$). The CVC related variables (psb, piab, pib and ebc) showed seasonal patterns but no statistical differences were detected among seasons. The Northeast orchard showed the highest number of new flushes and percentage of symptomatic branches. The South orchard had the higher percentage of asymptomatic infected branches. There were no statistical differences among regions regarding the concentration of *Xylella*.

INTRODUÇÃO

A clorose variegada dos citros (CVC) já causou perdas da ordem de 650 milhões de reais (Prejuízos, 2001), sendo considerada a mais importante doença citrícola do Estado de São Paulo. Desde 1987, quando foi constatada pela primeira vez (Rossetti *et al.*, 1990), muito se fez para identificar e caracterizar a causa do problema. Os postulados de Koch, associando a bactéria *Xylella fastidiosa* Wells *et al.* à CVC, foram cumpridos em 1993 (Chang *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1993). Constatou-se que essa bactéria é transmitida por cicadelídeos (cigarrinhas) (Lopes *et al.*, 1996), e já foram identificadas, até o

momento, 11 espécies transmissoras apenas no Estado de São Paulo (Fundecitrus, 2003a).

A epidemiologia da CVC tem recebido pouca atenção, o que contrasta com o rápido progresso na caracterização molecular do agente causal. No entanto, os poucos trabalhos epidemiológicos feitos até o momento foram capazes de revelar aspectos relevantes para o manejo da doença: principais fontes de inóculo, não-influência de vento ou passagem de máquina na disseminação, épocas de maior aparecimento de plantas doentes, além de fornecerem material descritivo básico sobre a dinâmica espaço-temporal da doença na Região Norte do Estado de São Paulo (Palazzo & Carvalho, 1992; Gottwald *et al.*, 1993;

Laranjeira, 1997; Nunes, 1999; Martins *et al.*, 2000; Pereira, 2000). Por outro lado, as diferenças na incidência e severidade da doença observadas entre as regiões citrícolas de São Paulo ainda não encontram explicação satisfatória. Em levantamentos feitos entre 1996 e 1999, Ayres (2000) mostrou que há um gradiente de incidência da doença entre as regiões citrícolas daquele Estado: Norte > Noroeste > Centro > Sul. O autor sugere relações com aspectos climáticos, estirpes do agente causal e inóculo inicial. Embora já tenham sido demonstradas certas diferenças entre regiões em relação à flutuação populacional de cigarrinhas e estirpes da bactéria (Pereira, 2000; Wendland, 2000), essas variáveis não puderam ser apontadas como explicações definitivas. O objetivo desse trabalho foi caracterizar a evolução de variáveis relacionadas à clorose variegada dos citros em plantas de três regiões citrícolas do Estado de São Paulo (Noroeste, Centro e Sul), visando determinar diferenças no padrão sazonal do patógeno, dos vetores, do hospedeiro e da doença.

MATERIALE MÉTODOS

Áreas

Foram selecionados talhões homogêneos de laranja (*Citrus sinensis* Osbeck) 'Pêra' enxertada em limão (*Citrus limonia* Osbeck) 'Cravo', representativos das três principais áreas citrícolas do Estado de São Paulo. Todas as plantas estavam com cerca de quatro anos de idade quando do início dos trabalhos: i) Região Citrícola Noroeste – município de Neves Paulista; ii) Região Citrícola Central – município de Gavião Peixoto; iii) Região Citrícola Sul – município de Santa Rita do Passa Quatro (Fundecitrus, 2003b).

Avaliações

A caracterização epidemiológica intra-plantas (em uma mesma planta) foi feita por meio de quatro variáveis: percentagem de ramos sintomáticos, percentagem de ramos infetados (sintomáticos + assintomáticos), concentração relativa de bactéria em tecidos assintomáticos e estudo da dinâmica de fluxos de brotação, determinadas em 20 plantas sintomáticas em cada área, selecionadas ao acaso após o primeiro mapeamento em julho de 1998. Para as três primeiras variáveis as avaliações foram mensais e, para a última, quinzenais. Os dados foram organizados em curvas de variável x tempo.

Após a obtenção dos dados iniciais, foram calculados os valores de área abaixo das curvas (AAC), por meio do somatório das médias entre duas avaliações, multiplicadas pelo intervalo de tempo que as separaram (Campbell & Madden, 1990). A determinação da AAC foi feita para estações do ano, por ano e período total, para cada uma das plantas selecionadas, para cada uma das variáveis (com exceção da estimativa de concentração bacteriana) e em cada região.

Percentagem de Ramos Sintomáticos

Das 20 plantas de cada área foram retiradas 20 folhas por mês, sendo uma folha por ramo, totalizando 400 folhas/

mês/região. Coletaram-se apenas folhas adultas, independente da presença de sintomas. As folhas eram levadas ao laboratório e separadas em sintomáticas e assintomáticas, determinando-se a percentagem de ramos sintomáticos para cada planta, em cada área e em cada época.

Percentagem de Ramos Infetados

Esse dado foi obtido somando-se o número de folhas sintomáticas com o número de folhas assintomáticas positivas para *X. fastidiosa*, dividindo-se o resultado pelo número total de folhas coletadas. A partir desses dados foram obtidas duas variáveis: Infecção em Folhas Assintomáticas e Infecção Total. Para determinação de folhas assintomáticas, porém positivas para *X. fastidiosa*, utilizaram-se as folhas assintomáticas separadas durante a determinação da percentagem de ramos sintomáticos. Cada uma das folhas teve seu pecíolo e nervura central picados mecanicamente com um bisturi, em fatias de 1 a 3 mm de espessura, até alcançar 100 mg e acondicionados em tubos de microcentrífuga de 1,5 ml. Em seguida, as amostras foram suspensas em tampão carbonato (Laranjeira, 2002) na proporção 1/10 (p/v) e fervidas em banho-maria por 10 min. Após resfriamento, as amostras foram armazenadas em refrigerador (-20 °C) para posterior análise pelo teste sorológico Dot Blot (Laranjeira, 2002).

Concentração Relativa de Bactéria em Material Assintomático

Foram utilizadas as amostras positivas determinadas anteriormente. Um número variável de amostras (mínimo de 15) por época e área foram submetidas a teste PTA-ELISA (Plate Trapped Antigen – Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) (Laranjeira, 2002). Para evitar amostras negativas que porventura tenham sido determinadas como positivas pelo Dot Blot (falsos positivos), adotou-se o método descrito por Zar (1996). Por esse método, são consideradas positivas apenas aquelas amostras cujos valores (V) excedam os obtidos pela expressão $V = y + 3,29(\sigma)$, em que y é a média dos padrões negativos e σ é seu desvio padrão. Por esse método, a probabilidade de aceitar um falso negativo é de 0,1%. Os padrões negativos foram previamente testados para normalidade, condição necessária ao método estatístico utilizado. Os valores obtidos para os padrões "Branco" foram subtraídos dos valores das amostras e dos padrões negativos. Em seguida, dividiu-se o valor de cada amostra pela média dos padrões negativos, obtendo-se um índice que representou a concentração relativa de bactéria. Para análise estatística foram utilizadas as médias de cada região e mês.

Dinâmica de Fluxos de Brotação

As 20 plantas marcadas de cada área foram avaliadas quanto à quantidade de novos brotos, por meio de contagem do número total de brotações. Os brotos foram considerados apenas enquanto apresentassem estrutura triangular típica no ramo e coloração verde-pálida, também característica.

Variáveis climatológicas

Foram consideradas informações de precipitação e de

temperaturas mínimas e máximas, obtidas em estações climatológicas localizadas num raio não superior a 5 km das áreas experimentais.

Análises Estatísticas

Testes preliminares indicaram a existência de correlação entre médias e variâncias das variáveis consideradas, o que levou à necessidade de uso de métodos não-paramétricos (Zar, 1996). Foram utilizadas duas análises de variância, Kruskal-Wallis e Friedman, e o teste Nemenyi de separação de tratamentos, similar ao teste paramétrico de Tukey (Zar, 1996).

A Análise de Kruskal-Wallis foi utilizada para apontar a existência de diferenças entre os talhões das três regiões estudadas. As variáveis dependentes foram “brotação”, “infecção”, “infecção total”, “sintomas” e “concentração de bactéria”. A análise de Friedman foi usada para comparar as estações do ano. As variáveis dependentes foram as mesmas usadas para comparar as regiões citrícolas.

Análise de Lags Distribuídos para Séries Temporais

Esta análise estuda a correlação entre variáveis – diferentes séries temporais – mas é especializada para valores separados por 1, 2, 3, n intervalos de tempo. Assim, os coeficientes de correlação são apresentados para os diferentes Lags. Foi utilizado o método de Lags polinomiais de Almon de ordem 1 para reduzir a multicolinearidade (Statsoft, 1994), e as correlações foram feitas até o lag 9, correspondendo a intervalos de nove meses. O uso da ordem 1 para o método de Almon foi escolhido por tentativas, usando como base dados reconhecidamente correlacionados. Optou-se por analisar até o lag 9 em função da limitação do método. O número de pontos válidos – no caso desse trabalho, 24 para todas as séries – deve ser sempre maior que $[2 * lag + 3]$ (Chatfield, 1985). Para essa análise, realizada no programa Statistica 5.0, foram utilizadas as seguintes séries em frequência mensal, para cada região: “brotações”, “infecções assintomáticas”, “ramos sintomáticos”, “infecção total”, “concentração bacteriana”, “temperaturas mínima e máxima”, e “precipitação pluviométrica”. Além dessas, foram utilizadas as séries de “número de cigarrinhas capturadas em armadilhas amarelas”, obtidas por Pereira (2000) para as mesmas áreas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Padrão das Variáveis

Como os dados originais plotados mês a mês não apresentaram padrões temporais identificáveis (dados não apresentados), foi adotado o critério das “Áreas Abaixo das Curvas” (Figura 1).

Para emissão de brotações foram observados valores crescentes depois dos verões e decrescentes após o inverno (Figura 1A). Na Região Noroeste o padrão se repetiu apenas no segundo ano; no primeiro, após incremento significativo entre o verão e o outono, a quantidade de novas brotações manteve-se alta até o verão seguinte. Os valores da Área Abaixo da Curva de Emissão de Brotações (AACEB) apresentaram-se

maiores na Região Sul no pico do primeiro ano, mas essa mesma região apresentou os menores valores no pico do segundo ano. Os valores da AACEB para as duas outras regiões foram equivalentes nos picos de brotação, tanto em 1999 quanto em 2000.

O padrão de emissão de brotações foi contrário ao esperado. Via de regra, associam-se os fluxos de brotação à primavera e verão – como propuseram Palazzo & Carvalho (1992) e Laranjeira (1997) – em função de uma maior abundância de água, nutrientes e temperatura. Os resultados deste trabalho contrariam em parte as afirmações de Tubelis (1995) de que o período compreendido entre setembro e março é aquele onde se observam brotações mais intensas e rápido crescimento de ramos. No entanto, como as brotações foram contadas, sem considerar padrões de crescimento e vigor, é possível que, embora mais numerosas no final do inverno elas sejam maiores, mais vigorosas e/ou longevas na primavera e no verão. Apenas o padrão dessa variável não foi suficiente para distinguir entre as três regiões. Porém, o padrão desuniforme obtido na Região Noroeste poderia indicar que, talvez mais importante que o padrão, seja a regularidade na emissão de novas brotações.

A evolução da área abaixo da curva de ramos sintomáticos (AACRS) mostrou uma tendência crescente, em todos os talhões (Figura 1B). Pelo menos nas regiões Sul e Noroeste esse incremento não se deu de maneira linear, mas sim com alternâncias nos valores, ora com aumentos, ora com diminuições em relação ao valor anterior. No primeiro ano, a Região Centro apresentou crescimento linear nos valores de AACRS, mas em 2000 comportou-se como as outras regiões, ou seja, aumento do AACRS entre verão e outono, diminuição no inverno, e novo aumento na primavera.

A tendência ao acréscimo na evolução da AACRS era esperada, afinal espera-se que a incidência de uma doença de origem biótica, livre de controle, aumente com o tempo. Por outro lado, alternância tão grande de valores mais altos e mais baixos conforme a estação do ano é um dado novo. Palazzo & Carvalho (1992), trabalhando com incidência em folhas de ramos marcados – não em ramos ao acaso – encontraram certa alternância, mas relacionaram os picos de incidência aos verões e primaveras e os vales, aos invernos e outonos. Nos resultados aqui apresentados a alternância é maior. A diminuição dos valores de AACRS no inverno pode estar relacionada à maior quantidade de brotações, o que diluiria a presença de ramos sintomáticos. No entanto, explicações para os picos e vales de primavera e verão não passariam de especulação. Nesse sentido, novos conjuntos de dados precisariam ser coletados, inclusive em outras regiões e países (Nordeste do Brasil e Argentina, por exemplo) para que tais variações sejam elucidadas. Também não foi possível distinguir entre as três regiões pelo padrão dessa variável. A discrepância apresentada no primeiro ano pela Região Centro pode ser devida à não detecção de flutuações em condições de baixa incidência.

O padrão temporal da área abaixo da curva de infecções assintomáticas (AACIA) - infecções detectadas apenas em folhas que não manifestavam sintomas - apresentou tendência à diminuição nos valores. Essa tendência foi observada em

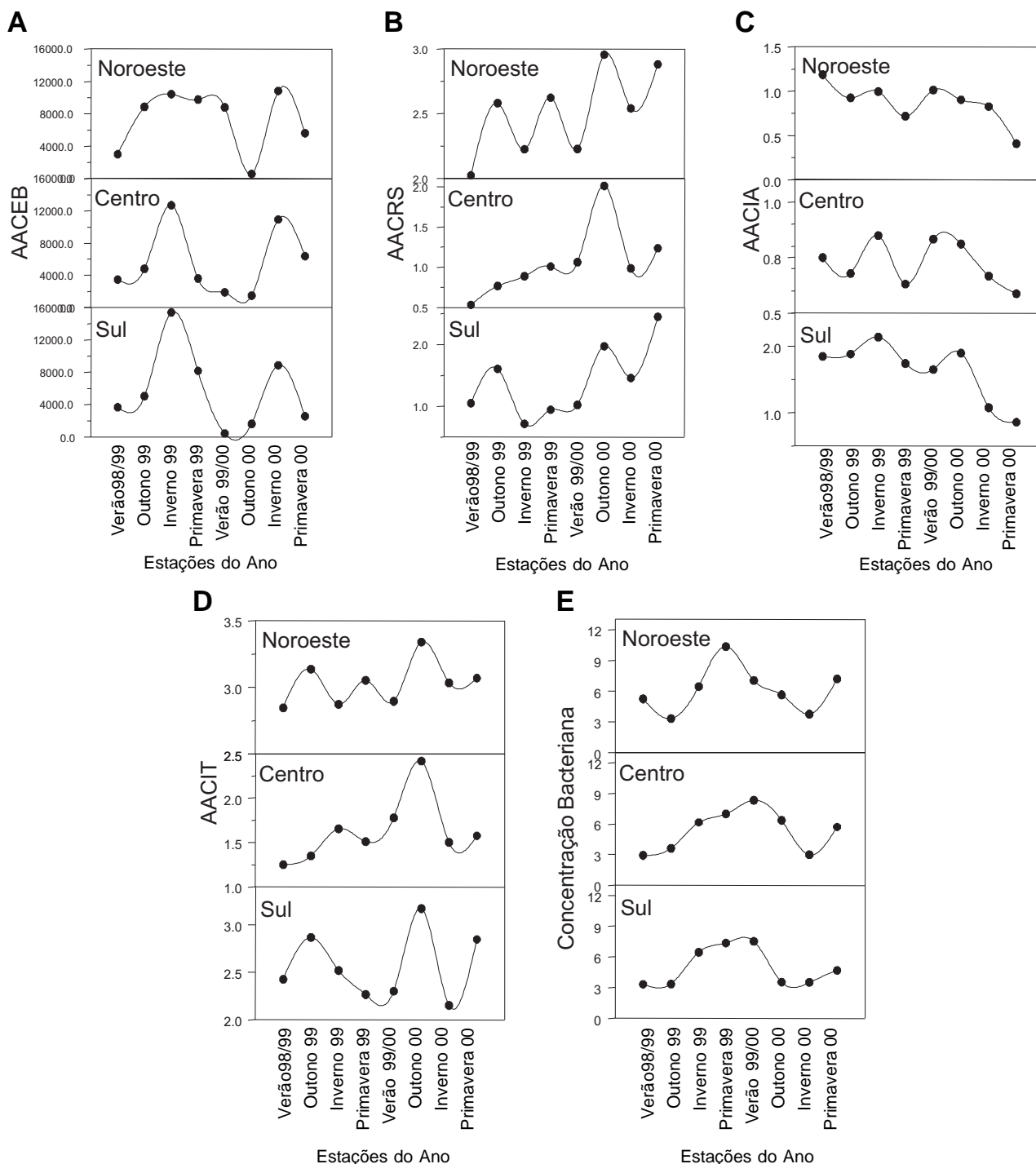


FIG. 1 - Evolução das Áreas Abaixo das Curvas de Emissão de Brotação (AACEB) (A), Ramos Sintomáticos (AACRS) (B), Infecções Assintomáticas (AACIA) (C), Infecção Total (AACIT) (D) e Concentração Bacteriana (E) em talhões de citros (*Citrus* spp.) de três regiões do Estado de São Paulo, entre os anos de 1999 e 2000, com Clorose variegada dos citros (CVC).

todas as regiões (Figura 1C). No entanto, a diminuição dos valores não ocorreu de maneira linear e sim com altos e baixos, e não apresentou um padrão característico, passível de descrição para as três regiões (Figura 1C). Essa tendência é consequência direta do aumento da incidência de ramos sintomáticos.

A evolução da área abaixo da curva de infecção total (AACIT) para cada uma das regiões seguiu um padrão muito semelhante àquele encontrado para a AACRS (Figura 1D), sem que tenha ocorrido um aumento intenso na incidência de *X. fastidiosa*. É possível que, em alguns casos, os picos de infecções assintomáticas coincidam com os vales de ramos

sintomáticos. Essa situação, impossível de comprovação pelos dados obtidos, ocorreria quando a bactéria já tivesse tido tempo e condições de se multiplicar até quantidades detectáveis, mas não tenha transcorrido todo o período de incubação e, ao mesmo tempo, tenha havido queda de folhas sintomáticas. Deve-se notar que o pequeno progresso na incidência de infecções em ramos foi acompanhado por um progresso intenso na incidência em plantas.

Apenas na Região Noroeste foi detectado um pico característico na evolução da área abaixo da curva de concentração bacteriana (AACCB) (Figura 1E). Nas outras duas regiões houve um aumento constante da AACCB entre o verão de 1999 e o verão de 2000, uma diminuição no outono e inverno seguintes, seguida de um discreto aumento na primavera de 2000. Na Região Noroeste também foi observada uma diminuição entre o verão e o inverno de 2000, seguido de um aumento na primavera. Supõe-se que essas flutuações sejam aleatórias. Pereira (2000), quantificando *X. fastidiosa* por meio de isolamento em meio de cultura, não encontrou diferenças significativas entre épocas do ano.

Comparação entre Regiões

A área abaixo da curva de emissão de brotações (AACCB) mostrou-se superior para a Região Noroeste, com valor mediano de 6.860 (Figura 2A). As regiões Centro (3.903) e Sul (4.447) não diferiram entre si. A AACRS (Figura 2D), apresentou o mesmo padrão, com valores superiores para a Região Noroeste (2,57) e sem diferença estatística para as outras regiões (0,68 no Centro e 1,27 no Sul). Observações anteriores e não publicadas indicavam que o padrão de brotações da Região Noroeste era distinto. Realmente as plantas cítricas dessa região tendem a emitir mais brotações que as plantas do Centro ou do Sul, provavelmente em função de temperaturas médias maiores registradas no Noroeste. Considerando as características do patossistema em questão, esse deve ser o fator mais importante para explicar as diferenças de incidência entre regiões. A ausência de diferenças significativas entre o Centro e Sul não era esperada. A hipótese inicialmente levantada considerava que havia um gradiente decrescente Norte – Sul para todas as variáveis. O resultado entre Centro e Sul pode, no entanto, ser explicado pelo fato das áreas experimentais estarem aproximadamente na mesma latitude (Gavião Peixoto e Santa Rita do Passa Quatro).

No caso da AACRS, valores maiores para o Noroeste já eram esperados, pois esta é considerada uma das regiões de maior incidência da CVC no Estado de São Paulo (Fundecitrus, 2003b). A inesperada indistinção entre Centro e Sul, no entanto, pode ser explicada se considerarmos a hipótese, apontada por Laranjeira (2002), de utilização de mudas infetadas na formação do pomar da Região Sul. Nessa circunstância, e considerando condições climáticas normais, plantas precocemente infetadas tenderiam a apresentar mais sintomas, igualando-se ou mesmo superando outras regiões. Por outro lado, a mesma latitude das duas áreas experimentais também pode ser uma explicação válida.

As infecções assintomáticas, comparadas como AACIA

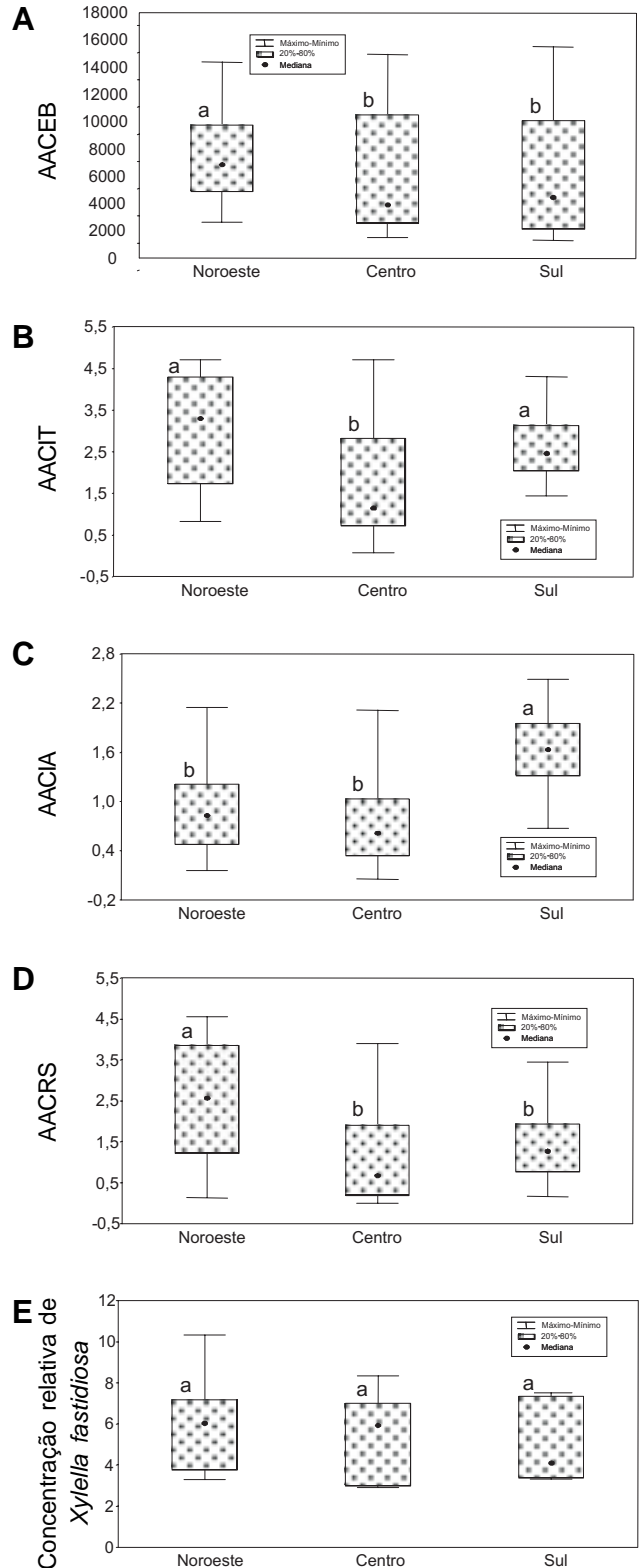


FIG. 2 - Valores medianos, máximos e mínimos para Área Abaixo das Curvas de Emissão de Brotações (A), Infecção Total (B), Infecções Assintomáticas (C) e Ramos Sintomáticos (D), e Concentração Relativa de *Xylella fastidiosa* (E) em três regiões do Estado de São Paulo. Tratamentos marcados com letras minúsculas iguais não diferiram entre si pelo teste Nemenyi ao nível de 0,5% de probabilidade de erro.

mostrou valores maiores para a Região Sul (1,63) e valores inferiores e comparáveis para as regiões Noroeste (0,83) e Centro (0,62) (Figura 2C). No entanto, quando o foco foram as infecções totais, representados pela sua Área Abaixo da Curva (AACIT), as regiões Noroeste (3,30) e Sul (2,46) obtiveram valores que não diferiram entre si, porém superiores ao obtido na Região Centro (1,15) (Figura 2B). Os maiores valores da Região Sul nas infecções assintomáticas indicam que seu nível de infecção é alto. Se, por outro lado, a expressão de sintomas é relativamente pequena (em ramos sintomáticos), mas alta no percentual de plantas afetadas, tem-se a seguinte situação: muitas plantas infetadas, muitos ramos infetados, baixa expressão dessas infecções. Esse quadro é indicativo de uma origem pré-plantio (mudas infetadas) de grande parte das infecções, associada a uma baixa favorabilidade ambiental para a expressão de sintomas. A semelhança entre os valores de infecção assintomática para Noroeste e Centro deve indicar apenas que a maior parte das infecções no Noroeste revertem-se rapidamente para manifestação de sintomas (ramos sintomáticos no Noroeste são mais abundantes que no Centro). Os resultados para infecções totais indicam que, caso a hipótese de introdução de mudas infetadas no Sul esteja correta, a manifestação da CVC é comparável entre pomares localizados em regiões com altas taxas de infecção e regiões com baixas taxas, mas nas quais foram plantadas mudas infetadas.

Não houve diferença estatística entre regiões considerando a concentração relativa de *X. fastidiosa* ($P>0,08$) (Figura 2E). No entanto, os valores tenderam a um gradiente entre a Região Sul (4,11), Centro (5,93) e Noroeste (6,03). A ausência de diferença estatística entre regiões aparentemente indica que o clima em diferentes regiões não afeta a multiplicação da bactéria na planta. Essa conclusão é corroborada pela ausência de correlação entre variáveis climáticas e concentração relativa de bactéria.

Comparação entre Estações do Ano

Os valores médios das brotações no inverno (11.596) foram estatisticamente superiores aos das demais estações (Figura 3A). A mediana para a primavera ficou numa posição intermediária (5.536), seguida dos valores para o outono (3.367) e o verão (2.554), que não diferiram entre si. Esses resultados contrariam o senso comum, que considera brotações mais abundantes na primavera e no verão. Apesar disso, as brotações de primavera ainda possuem uma posição de destaque. Os valores para AACRS (sintomas) não diferiram entre si: primavera (1,41), verão (0,98), outono (1,71) e inverno (0,94) (Figura 3D). Embora esses dados divirjam dos apresentados por Laranjeira (1997), deve-se notar que no presente estudo avaliou-se percentagem de ramos sintomáticos e não percentagem de plantas sintomáticas, como fez aquele autor.

Foi exígua a distinção entre os valores de AACIA para as quatro estações (Figura 3C). A mediana do verão (1,21) só se distinguiu estatisticamente da mediana da primavera (0,77). Os valores para o outono (1,01) e o inverno (1,04) não se distinguiram nem do verão nem da primavera. Para infecção

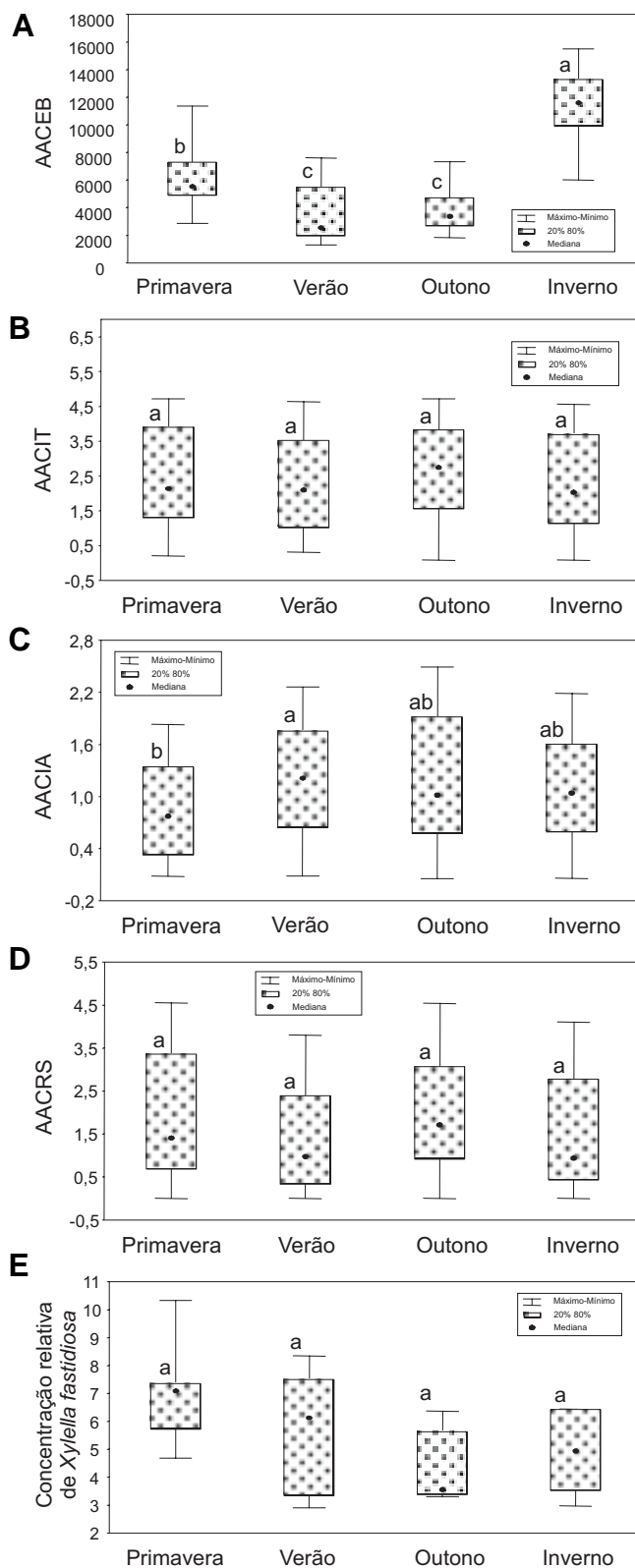


FIG. 3 - Valores medianos, máximos e mínimos para Área Abaixo das Curvas de Emissão de Brotações (AACEB) (A), Infecção Total (AACIT) (B), Infecções Assintomáticas (AACIA) (C) e Ramos Sintomáticos (AACRS) (D), e Concentração Relativa de *Xylella fastidiosa* (E) nas quatro estações do ano no Estado de São Paulo. Tratamentos marcados com letras minúsculas iguais não diferiram entre si pelo teste Nemenyi ao nível de 0,5% de probabilidade de erro.

total (AACIT) os valores da primavera (2,14), verão (2,10), outono (2,74) e inverno (2,03) foram indistintos estatisticamente (Figura 3B).

Não foram constatadas diferenças estatísticas para concentração relativa de *X. fastidiosa* (Figura 3E), embora tenha havido uma certa tendência para maiores valores na primavera (7,09) e verão (6,13) que para o outono (3,56) e inverno (4,95). Esse resultado, embora condizente com os dados de isolamento obtidos por Pereira (2000), precisa ser mais bem investigado. O padrão geral da variável aponta para maiores concentrações de bactéria na primavera e verão, o que encontra paralelo no modelo proposto por Laranjeira (1997) e também nos dados de infetividade apresentados por Pereira (2000), que mostrou maiores percentagens de infecção quando as plantas eram inoculadas na primavera e no verão.

Correlações entre Variáveis

Optou-se por estudar a correlação entre variáveis via análise de *Lags* distribuídos. Essa análise permite comparar valores defasados no tempo, por exemplo, a relação entre a precipitação em um mês e a expressão de sintomas três meses depois. Em verdade, trata-se de uma análise de regressão. Em função da natureza do estudo, de seus objetivos e por uma opção pela clareza, será adotada a palavra “correlação” para o relato dos resultados obtidos. Tanto para a correlação quanto para os *lags* foi adotada a probabilidade de erro de 1%.

A primeira análise relacionou as brotações e a expressão de sintomas, avaliada por meio do percentual de ramos sintomáticos. Para nenhuma das regiões a correlação foi significativa, tendo apresentado probabilidades de erro sempre acima de 2%. Em seguida, analisou-se a relação entre brotações e infecções assintomáticas (Tabela 1). As três regiões tiveram correlações significativas ($P < 0,01$), o que era esperado, pois admite-se que as cigarrinhas vetoras mais importantes alimentem-se de ramos novos (Laranjeira, 1997; Lopes, 1999). Para a Região Noroeste, o *lag* mais significativo foi o 6, mas desde o *lag* 4 até o 9 pôde-se constatar correlações com baixa probabilidade de erro. Na Região Centro, as correlações para todos os *lags* foram significativas, com exceção dos *lags* 2 e 7. Para essa região, a menor probabilidade de erro esteve associada ao *lag* 9. No talhão da Região Sul, o mais significativo foi o *lag* 8. Essa situação poderia explicar diferenças entre o Noroeste e o Centro, já que o tempo para o crescimento populacional detectável de *X. fastidiosa* no Noroeste seria menor. Assume-se então que os ciclos de disponibilidade de bactéria sejam menores nessa região. Esse quadro aponta uma efetiva ligação entre brotações e infecções, mas também mostra que o processo que leva à manifestação dos sintomas é mais complexo, não admitindo uma conclusão do tipo “quanto mais brotações, mais sintomas”. Assim, os resultados de brotações x infecção total estão confundidos por essas duas situações, já que a infecção total é resultante do somatório de infecções sintomáticas e assintomáticas. Considerando que a Região Sul foi superior às demais em termos de infecções assintomáticas, mas igual ao Centro em termos de sintomas, é razoável supor que a correlação entre

brotações e infecções assintomáticas no Sul não esteja ligada a novas infecções, mas apenas ao local – folhas razoavelmente novas – em que tais infecções são detectadas.

Brotações versus infecção total foi a terceira relação a ser examinada. Para as regiões Noroeste e Centro a correlação foi significativa, mas apenas a Região Centro teve *lag* significativo (9). A relação testada, na Região Sul, apresentou coeficiente de correlação menor que 0,95 e $P > 0,07$.

A última análise, com brotações como variável independente, relacionou-a à concentração bacteriana. Não houve correlação significativa entre as brotações nas regiões Noroeste e Centro e a concentração relativa de *X. fastidiosa* em folhas assintomáticas ($P > 0,12$ e $P > 0,05$, respectivamente). Já na Região Sul a correlação foi significativa ($P < 0,01$). O *lag* com menor probabilidade de erro associado foi o 3. Isso significa que picos de concentração bacteriana ocorreram três meses após os picos de brotação. Caso essa correlação dependesse das infecções ocorridas naquelas brotações, seria esperado que as outras regiões apresentassem algum grau de significância. Portanto, admite-se que essa correlação na Região Sul ocorre em função do aumento em infecções de ramos de brotações anteriores. Isso pode ser uma evidência de que a maioria das mudas da Região Sul estava infetada quando foram plantadas. Não houve correlação informativa entre infecções assintomáticas e sintomas. Nos casos em que a correlação foi significativa, não houve *lags* com probabilidade de erro baixa. Situação semelhante ocorreu para infecções assintomáticas versus infecção total. Da mesma forma, não houve correlação dessa mesma variável independente com concentração bacteriana. A correlação entre concentração bacteriana e sintomas também não foi informativa (ausência de significância para *lags*), apesar de ter sido significativa para a Região Noroeste.

A primeira relação a ser testada usando infecções assintomáticas como variável independente correlacionou-a

TABELA 1 - Coeficiente de correlação (R) e probabilidade de erro da correlação (P), *lag* mais significativo e probabilidade de erro associado (p) para a análise de *Lags* distribuídos. Relação entre variáveis independentes e dependentes em três regiões do Estado de São Paulo

Variável Independente X	Região	Parâmetros da Análise			
		R	P	Lag	p
Brotações X Infecções Assintomáticas	Noroeste	0,992	0,0007	6	0,0017
	Centro	0,987	0,0025	9	0,0067
	Sul	0,978	0,0079	8	0,0052
Precipitação Pluviométrica X Sintomas	Noroeste	0,987	0,0023	3	0,0012
	Centro	0,984	0,0039	3	0,0004
	Sul	0,981	0,0054	3	0,0013
Quantidade de Cigarrinhas X Infecções Assintomáticas	Noroeste	0,999	0,000003	8	0,00001
	Centro	0,976	0,0098	8	0,0162
	Sul	0,994	0,0004	8	0,0011

com a manifestação dos sintomas. Para o talhão da Região Noroeste, a correlação foi significativa, porém a *lag* com a menor probabilidade de erro não foi significativo ($p > 0,07$). Nas regiões Sul e Centro, a correlação não foi significativa ($p > 0,04$). Da mesma forma, em nenhum caso a relação entre infecções assintomáticas e concentração bacteriana foi significativa. As probabilidades de erro foram sempre maiores que 4%.

A única tentativa de correlação usando concentração bacteriana como variável independente foi feita considerando sintomas como variável dependente. Apenas a Região Noroeste apresentou correlação significativa. No entanto, nenhum *lag* sobressaiu.

A primeira tentativa de correlação envolvendo dados climáticos teve a variável brotações como variável dependente. Em nenhum caso - região ou variável independente - as correlações foram significativas. Como as séries usadas na análise tinham frequência mensal, não é impossível que tais correlações só sejam evidentes em curtíssimo prazo, por exemplo, dias.

As análises que consideraram temperatura (mínima e máxima) e sintomas indicaram ausência de correlação entre essas duas variáveis para as regiões Sul e Centro. Na Região Noroeste, o *lag* com menor probabilidade de erro associada foi o *lag* 8.

Quando se utilizou a precipitação pluviométrica como variável independente, obtiveram-se boas correlações com a expressão de sintomas, associadas a muito baixas probabilidades de erro (Tabela 1). Nas três regiões, o *lag* 3 foi sempre o mais significativo. Embora não seja possível saber se essa é apenas uma correlação ou uma relação causal, até o momento é a melhor relação já obtida entre uma variável climática e qualquer aspecto relacionado a CVC. Laranjeira (1997), apesar de mostrar que a forma da curva de derivadas do progresso da CVC assemelhava-se com as curvas de variáveis climáticas, não encontrou qualquer correlação significativa.

Foi analisado também o relacionamento entre temperaturas (mínima e máxima) e infecções assintomáticas. Nas três regiões foram obtidas correlações altamente significativas ($P < 0,0005$). No entanto, apenas na Região Noroeste detectou-se *lag* significativo (*lag* 3). De todas as correlações envolvendo precipitação pluviométrica e infecções assintomáticas, apenas a da Região Centro foi significativa. O *lag* 3 apresentou a menor probabilidade de erro associada. Em função da significância limitada, considera-se que essas correlações não foram informativas.

Nenhuma região apresentou qualquer correlação significativa entre variáveis climáticas e concentração bacteriana. Em todos os outros casos, a probabilidade de erro associada a cada uma das correlações foi sempre alta. Isso parece indicar que o crescimento de *X. fastidiosa* em citros não está relacionado a fatores externos, mas unicamente aos internos, relacionados ao estado fisiológico das plantas.

Quando as séries de quantidade de cigarrinhas capturadas foram utilizadas como variável dependente, nenhuma correlação foi significativa. A impossibilidade de correlacionar variáveis climáticas ou a presença de brotações

com a quantidade de cigarrinhas capturadas pode ter várias explicações. A mais simples seria a de que há interações mais complexas entre hospedeiros, clima e vetores e que, portanto, não se aplicariam correlações simples. Por outro lado, como foram utilizadas armadilhas amarelas, capazes de atrair cigarrinhas em voo, é possível que os dados não reflitam exatamente a quantidade de cigarrinhas presentes no talhão.

As séries de cigarrinhas capturadas também foram estabelecidas como variável independente e relacionadas a infecções assintomáticas, encontrando-se correlações significativas para todas as regiões (Tabela 1). Somente a Região Centro não apresentou *lag* com $p < 0,01$, ao passo que para as outras, o *lag* 8 se destacou. Aparentemente, essa relação tem uma defasagem de oito meses. Mesmo na Região Centro, cujo *lag* não passou no critério do 1% de probabilidade de erro, o *lag* mais significativo foi o 8, assim como nas outras regiões.

Quando a variável dependente foram os sintomas, nenhuma das três regiões apresentou correlação significativa. O Noroeste teve $P > 0,02$, o Centro, $P > 0,07$ e o Sul, $P > 0,26$. Para a relação cigarrinhas versus infecção total, apenas a Região Noroeste apresentou probabilidade de erro menor que 1%. No entanto, não apresentou nenhum *lag* significativo. Essas relações podem, então, ser consideradas biologicamente irrelevantes.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao técnico Genésio S. da Silva e Valéria Garcia (CCSM-IAC) a ajuda na coleta dos dados e processamento das amostras, ao Centro de Citricultura Sylvio Moreira – IAC, por ter permitido o uso de sua estrutura e ao Fundecitrus e à FAPESP pelo auxílio financeiro para execução desse trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AYRES, A. J. Intensidade da clorose variegada dos citros em pomares comerciais de laranja do Estado de São Paulo e sul do Triângulo Mineiro. (Dissertação de Mestrado). Jaboticabal. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/Universidade Estadual Paulista. 2000.
- CAMPBELL, C.L. & MADDEN, L.V. Introduction to plant disease epidemiology. New York: John Wiley, 1990.
- CHANG, C.J., GARNIER, M., ZREIK, L., ROSSETI, V. & BOVÉ, J.M. Culture and serological detection of the xylem-limited bacterium causing citrus variegated chlorosis and its identification as a strain of *Xylella fastidiosa*. Current Microbiology 27:137-142. 1993.
- CHATFIELD, C. The analysis of time series: an introduction. 3ª ed. New York. Chapman & Hall. 1985.
- FUNDECITRUS. Cigarrinhas. Disponível em: < <http://www.fundecitrus.com.br/cigar.html> > Acesso em: 21 mai. 2003a.
- FUNDECITRUS. Estatísticas CVC: incidência da CVC por região - 2001. Disponível em: < <http://www.fundecitrus.com.br/escvabr.html> > Acesso em: 21 mai. 2003b.
- GOTTWALD, T.R., GIDTTI, F.B., SANTOS, J.M. & CARVALHO, A.C. Preliminary spatial and temporal analysis of

- citrus variegated chlorosis in Brazil. Proceedings, 12th IOCV Conference, Riverside. 1993. pp.327-335.
- LARANJEIRA, F.F. Dinâmica espacial e temporal da clorose variegada dos citros. (Dissertação de Mestrado). Piracicaba. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/Universidade de São Paulo. 1997.
- LARANJEIRA, F.F. Epidemiologia da clorose variegada dos citros no Estado de São Paulo. (Tese de Doutorado). Piracicaba. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/Universidade de São Paulo. 2002.
- LEE, R.F., BERETTA, M.J.G., HARTUNG, J.H., HOOKER, M.E. & DERRICK, K.S. Citrus variegated chlorosis: confirmation of a *Xylella fastidiosa* as the causal agent. Summa Phytopathologica 19:123-125. 1993.
- LOPES, J.R.S. Estudos com vetores de *Xylella fastidiosa* e implicações no manejo da clorose variegada dos citros. Laranja 20:329-344. 1999.
- LOPES, J.R.S., BERETTA, M.J.G., HAKAWA, R., ALMEIDA, R.P.P., KRÜGNER, R. & GARCIA JR., A. Confirmação da transmissão por cigarrinhas do agente causal da clorose variegada dos citros, *Xylella fastidiosa*. Fitopatologia Brasileira 21:343. 1996.
- MARTINS, M.L., CEOTTO, G., ALVES, S.G., BUFON, C.C.B., SILVA, J.M. & LARANJEIRA, F.F. A cellular automata model for citrus variegated chlorosis. Physical Review E 62:7024-7030. 2000.
- NUNES, W.M.C. Epidemiologia da clorose variegada dos citros (CVC) avaliada por sintomas e diagnóstico serológico e molecular de *Xylella fastidiosa*. (Tese de Doutorado). Botucatu. Faculdade de Ciências Agrárias/Universidade Estadual Paulista. 1999.
- PALAZZO, D.A. & CARVALHO, M.L.V. Desenvolvimento e progresso da clorose variegada dos citros (CVC) em pomares de Colina, SP. Laranja 13:489-502. 1992.
- PEREIRA, E.F. Estudo de fatores sazonais relacionados a transmissão de *Xylella fastidiosa* em pomares de citros. (Dissertação de Mestrado). Piracicaba. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/Universidade de São Paulo. 2000.
- PREJUÍZOS com a CVC. Informativo CCSM. Setembro, 2001.
- ROSSETTI, V., GARNIER, M., BOVÉ, J.M. BERETTA, M.J.G., TEIXEIRA, A.R., QUAGGIO, J.A. & DeNEGRI, J.D. Présence de bactéries dans le xylème d'orangers atteints de chlorose variéegée, une nouvelle maladie des agrumes au Brésil. Comptes Rendus Académie des Sciences de Paris, t.310, serie III, 1990. pp.345-349.
- STATSOFT. Statistica volume III:statistics II. Tulsa:Statsoft Inc., 1994.
- TUBELIS, A. Clima:fator que afeta a produção e qualidade da Laranja. Laranja 16:179-211. 1995.
- WENDLAND, A. Diversidade genética de *Xylella fastidiosa* em três regiões produtoras de citros (*Citrus sinensis*) do Estado de São Paulo (Dissertação de Mestrado). Piracicaba. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/Universidade de São Paulo. 2000.
- ZAR, J.H. Biostatistical analysis. 3' ed. New Jersey. Prentice Hall. 1996.