

REAÇÃO DE VARIEDADES E CLONES DE LARANJAS A *Xylella fastidiosa*¹

PAULO SERGIO DE SOUZA², ANTONIO DE GOES³, EDUARDO SANCHES STUCHI⁴, ELENA PAOLA GONZÁLEZ JAIMES⁵, ESTER WICKERT⁶, SIMONE RODRIGUES DA SILVA⁷, LUIZ CARLOS DONADIO⁸

RESUMO - A clorose variegada dos citros (CVC) é uma doença grave, causada por *Xylella fastidiosa*. As medidas usuais de controle mostram-se pouco eficientes ou práticas e com alto custo. Dessa forma, o uso de variedades resistentes e/ou tolerantes desponta como a alternativa mais eficiente, razão pela qual se julgou oportuna a realização deste trabalho. O presente estudo teve como objetivo avaliar o comportamento de variedades e clones de laranjas introduzidas em relação a *X. fastidiosa*. Foram estudados 59 variedades e clones de laranjas doces e 2 de laranjas azedas introduzidos da França, Itália e Portugal. O delineamento experimental foi o de blocos casualizados (DBC), com 62 tratamentos e 4 repetições, incluindo a variedade 'Pêra', como padrão. Cada parcela continha duas plantas, sendo uma inoculada e a outra sem inoculação. Para a inoculação do patógeno, foi empregado o método de encostia, utilizando-se de mudas infectadas. Para a avaliação da incidência da doença, utilizou-se de dados qualitativos, positivos ou negativos, enquanto para severidade empregou-se escala de notas, que foi estabelecida baseando-se nos sintomas de CVC, confirmados através dos testes de PCR. As variedades de laranjas azedas Beja e Sr. Pinto e as laranjas doces Navelina ISA 315, Navelina SRA 332 e Newhall Navel SRA 343 não apresentaram sintomas em folhas até 27 meses após a inoculação.

Termos de indexação: citros, CVC, bactéria, tolerância, doença.

REACTION OF ORANGES VARIETIES AND CLONES TO *Xylella fastidiosa*

ABSTRACT - Citrus variegated chlorosis (CVC) is a serious disease, caused by *Xylella fastidiosa*, being the most important to the Brazilian citriculture. The usual measures of control show less efficient or practice and they are very expensive. The use of resistant varieties is showed as the most efficient, consisting the aimed of this research. The objective of the present work was study the behavior of varieties and clones introduced in relation to *X. fastidiosa*. Were studied 59 varieties and clones of sweet oranges and 2 sour oranges introduced from France, Italy and Portugal. The experimental layout was a complete randomized block design, with 4 replicates and 62 treatments, with 'Pêra' variety as control. Each treatment had two plants, one inoculated and the other without inoculation. For the pathogen inoculation was used the grafting approach with infected seedlings. For the disease incidence measurement was used qualitative data, positive or negative, while for the severity it, was used a note scale based on CVC symptoms confirmed through the PCR tests. The sour oranges varieties Beja and Sr. Pinto and the sweet oranges Navelina ISA 315, Navelina SRA 332 e Newhall Navel SRA 343, have not presented leaves symptoms until 27 months after inoculation.

Index Terms: citrus, CVC, bacteria, tolerance, disease.

O agente causal da doença é a bactéria *Xylella fastidiosa*, que tem como principais vetores algumas espécies de cigarrinhas da família Cicadellidae. Outra maneira de transmissão é através de borbulhão (ramos com três gemas) contaminado (Li, 1997). Sendo que Nunes (1999) observou que o método de encostia foi o mais eficiente na transmissão da bactéria quando comparado com os outros métodos testados.

Segundo Machado et al. (1992), de modo geral, os sintomas nas folhas podem ser associados à clorose pontuada ao acaso no limbo foliar, não apresentando reversão e com formação de goma na face abaxial desta e, um outro, associado à clorose entre nervuras, típica da deficiência de zinco, podendo evoluir para a formação ou não de goma na face abaxial da folha.

Admite-se que uma das maneiras de conviver com a CVC baseia-se no manejo dos pomares, empregando-se a poda dos ramos sintomáticos, em plantas adultas, alternativa essa ineficaz para o caso de plantas novas (Carlos et al., 1997). A bactéria *X. fastidiosa* foi observada em quase todas as variedades de laranja doce estudada no Brasil (Laranjeira et al., 1998). E o uso de variedades resistentes é a alternativa mais adequada no controle da CVC (Purcell, 1994).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a reação a *X. fastidiosa* de variedades e clones de laranjas introduzidas de bancos de germoplasma da França, Itália e Portugal.

O experimento foi conduzido em condições de campo, na Estação Experimental de Citricultura de Bebedouro (EECB), Bebedouro-SP. Foram avaliados 59 variedades e clones de laranjas doces [*C. sinensis* (L.) Osb.]: Amares, Barile SRA 559, Barlerin SRA 568, Belladonna, Berna

IVIA - 43 - 1, Berna IVIA 43, Berna Peret IVIA 336, Biondo Corigliano I, Biondo Di Caccia, Boukhobza SRA 569, Cadenera Punchosa (Campo), Casa Grande SRA 183, Castellana IVIA-64 - 3, China SRA 547, China, Comuna IVIA-105, Convento, D. João, Doblefina, Fraga, Fukuhara SRA 561, Fullamenuda IVIA 92, Hall SRA 394, Jaffa, Maçã, Murtera - IVIA - 54, Navelina ISA 315, Navelina SRA 332, Newhall Navel SRA 343, Ovale Mut, Pala, Pêra Vidigueira (Sr. Antunes), Petit Pierre demi-sanguine SRA 570, Portela, Prata da Ponte, Prata, Premier SRA 510, Rotuna SRA 511, Sakatoro SRA 407, Sanford SRA 404, Sanguínea 66/Ssa/12, Seleta Tardia, Setubalense, Skaggs Bonanza Navel SRA 202, Sweet SRA 50, Torregrossa IVIA 103 - 6, Tua (Sr. Mamede), Tua Graúda 1, Tua Ponte, Tua S/S, Tua, Vale dos Besteiros, Valência Campbell, Valência Late Burjasot IVIA-35-2, Valência Rohde Red SRA 360, Valência Temprana IVIA 25, Vera 97 IVIA - 97, Verde de Espanha, Yoshida Navel SRA 558 e duas laranjas azedas (*C. aurantium* L.): Beja e Sr. Pinto, introduzidas pela EECB de bancos de germoplasma da França, Itália e Portugal, com a colaboração do Cenargen/Embrapa e Fundecitrus. Incluiu-se a variedade 'Pêra', como padrão de referência quanto à suscetibilidade a CVC. O delineamento experimental foi o de blocos casualizados (DBC), com 62 tratamentos e 4 repetições, incluindo a variedade 'Pêra', como padrão. Cada parcela continha duas plantas, sendo uma inoculada e a outra sem inoculação.

As variedades foram enxertadas em limoeiro 'Cravo', no mês de novembro de 2000, e mantidas em estufa com tela antiafídica. No plantio, adotou-se o espaçamento de 6x2 m. As mudas selecionadas foram transplantadas no campo, em haste única, em abril de 2001.

¹ (Trabalho 187/2004). Recebido: 20/12/2004. Aceito para publicação: 23/02/2006. Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor, do programa de Produção Vegetal, UNESP. FAPESP Processo nº 00/08692-9

² Engº Agrº, Dr. Pesquisador APTA Regional Nordeste Paulista, Av. Pres. Castelo Branco, s/n, CP.58, CEP 13730-970, Mococa-SP. e-mail: pas_souza@yahoo.com.br

³ Engº Agrº Prof. Dr. Departamento de Fitossanidade da FCAV/UNESP - Jaboticabal-SP

⁴ Engº Agrº, Dr. Pesquisador Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, EECB, CP. 74, CEP 14700-970, Bebedouro-SP.

⁵ Engª Agrª, Dra. FCAV/UNESP - Jaboticabal-SP.

⁶ Engª Agrª, Dra. FCAV/UNESP - Jaboticabal-SP.

⁷ Engª Agrª, MSc., Pesquisadora Estação Experimental de Citricultura de Bebedouro, EECB, CP. 74, CEP 14700-970, Bebedouro-SP

⁸ Engº Agrº Prof. Dr. EECB/UNESP - Jaboticabal-SP.

A obtenção das mudas-fonte de *X. fastidiosa* utilizou-se de ramos da laranjeira 'Pêra' com sintomas da doença. Para isso, empregou-se o limoeiro 'Cravo', com aproximadamente 15 cm de altura. Retiraram-se os "cavalinhos" de limoeiro 'Cravo' dos tubetes, e o substrato foi envolvido em papel-jornal embebido em água e, por fim, envolvido com saco plástico devidamente amarrado, formando assim uma câmara úmida. Posteriormente, procedeu-se a encostia da haste principal do "cavalinho" em ramos de laranjeira 'Pêra' com sintoma da doença. Após 30 a 40 dias da enxertia, fez-se a retirada das mudas-fonte de bactéria da laranjeira 'Pêra'. Em janeiro de 2001, procedeu-se a inoculação através da enxertia das mudas-fonte pelo método de encostia (Nunes, 1999).

A avaliação de incidência e de severidade dos sintomas foi realizada mensalmente, a partir de dezembro 2001. Para a avaliação de incidência, tomaram-se como referência dados qualitativos, positivos ou negativos, enquanto para severidade foi empregada escala de notas, sendo: 0) planta sem sintomas; 1) sintomas em algumas folhas; 2) 50% das folhas da planta exibindo sintomas, e 3) toda planta sintomática.

"Polymerase Chain Reaction" (PCR) - Os extratos de folhas das plantas foram preparados a partir de cinco folhas maduras de cada planta de citros, totalizando 496 amostras. Os testes de PCR foram realizados em abril de 2002 e em maio de 2003, no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas da UNESP – Universidade Estadual Paulista, FCAV. Após a coleta das amostras, com auxílio de uma lâmina, fez-se a retirada da nervura principal juntamente com o pecíolo das folhas. Em seguida, as nervuras foram cortadas em pequenos fragmentos, maceradas em nitrogênio líquido e colocadas em "ependorfs" para a extração do DNA total. O procedimento de extração do DNA foi feito conforme protocolo proposto por Shillito & Saul (1998). A quantificação do DNA foi realizada em espectrofotômetro BECKMAN – DU 640, medindo-se a absorbância em contraste com uma amostra de TE, nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. Para estimar a quantidade de DNA, tomou-se como referência que uma unidade de densidade óptica (DO) equivale a 50 µg de DNA por mL de solução (Sambrook et al., 1989). Para reação de PCR, foram utilizados os primers específicos para *X. fastidiosa* CVC1, RST 31 e RST 33.

As avaliações de sintomas da doença foram realizadas mensalmente, a partir de dezembro de 2001. A laranja 'Pêra', utilizada como padrão, apresentou cinco plantas PCR positivo, sendo que quatro desenvolveram sintomas da doença, sendo três delas com elevado nível de severidade.

A maior presença de plantas sintomáticas foi verificada a partir de janeiro de 2003, passando de nove plantas em outubro de 2002 para 81; 193 e 210 plantas, respectivamente, em janeiro, abril e julho de 2003, ou seja, 18 meses após a inoculação. Tais fatos indicam que existe relação entre o período de incubação e o desenvolvimento das plantas em condições de campo, o que, conseqüentemente, interfere no aparecimento de sintomas (Palazzo & Carvalho, 1992; Laranjeira et al., 2003). Além disso, o verão é a estação do ano em que a população de cigarrinhas se mostra mais numerosa (Lopes, 1999). O elevado número de plantas sintomáticas observadas em abril de 2003 mostra-se convergente aos dados obtidos por Barbosa (2002), que verificou picos elevados de incidência da doença no outono e no inverno. Entretanto, ambos os resultados mostram-se divergentes daqueles reportados por Palazzo & Carvalho (1992), que verificaram aumento da incidência e da severidade da doença na época em que ocorre maior desenvolvimento vegetativo, ou seja, na primavera e no verão. Tal divergência pode estar relacionada ao fato de que todos os resultados se referem a uma única variedade, diferentemente do presente trabalho, onde a área experimental possuía 62 variedades em estudo, o que, provavelmente, contribuiu para as diferenças observadas.

Machado et al. (1997), estudando variedades de laranjas sobreexertadas em laranja 'Pêra' com sintomas típicos, observaram que todas as variedades de laranja apresentaram sintomas, porém houve diferenças na velocidade de expressão. De acordo com os autores, a 'Pêra' e a 'Barão' [*C. sinensis* (L.) Osb.] mostraram sintomas mais rápido, após 3 a 4 meses da sobreexertia, enquanto na 'Hamlin' [*C. sinensis*

(L.) Osb.], apesar de ser positiva nos testes sorológicos, a expressão dos sintomas foi mais lenta. As variedades Bahia e Baianinha [*C. sinensis* (L.) Osb.] não desenvolveram sintomas de CVC, e a bactéria também não foi detectada pelo método sorológico empregado, após três anos de sobreexertia. Por outro lado, em estudo semelhante, Laranjeira et al. (1998) observaram sintomas nove meses após o plantio, em 'Baianinha' e em outros clones de 'Bahia', em condições de campo, na região de Mirassol-SP.

Quando se comparam os níveis de incidência e de severidade entre as plantas inoculadas e as não-inoculadas, verifica-se, proporcionalmente, mais plantas sintomáticas, e com mais severidade entre as plantas inoculadas (Figuras 1). Resultado semelhante foi encontrado por Pereira (2001) que, estudando inoculação artificial de *X. fastidiosa*, verificou que as plantas inoculadas na primavera e no verão desenvolveram mais rapidamente os sintomas.

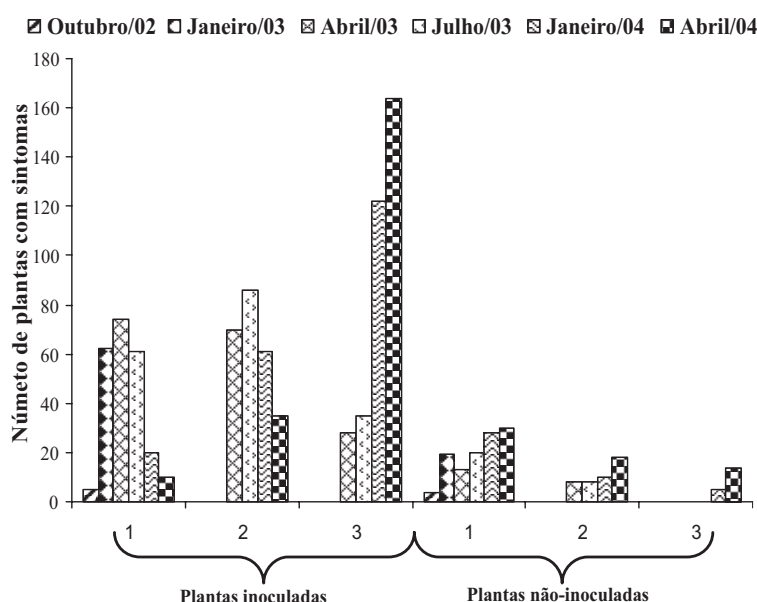


Figura 1 – Número de plantas com sintomas de CVC nos níveis de severidade 1; 2 e 3, de outubro de 2002 a abril de 2004, em plantas inoculadas e em não-inoculadas com *Xylella fastidiosa*, sob condições de campo, em Bebedouro-SP.

De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, verificou-se que o método de encostia, adotado para a inoculação da bactéria, fez com que se obtivesse maior número de plantas sintomáticas, com maiores níveis de severidade e em menor período. Com isso, houve uma pressão de inóculo no talhão, a qual possibilitou que as plantas não-inoculadas se tornassem infectadas naturalmente pelo vetor.

No mês de abril de 2004 (27 meses da inoculação e 36 meses do plantio), última avaliação de incidência e de severidade dos sintomas (dados não mostrados), verificou-se que as laranjeiras azedas Beja e Sr. Pinto e as laranjeiras doces Navelina ISA 315, Navelina SRA 332 e Newhall Navel SRA 343 não apresentaram sintomas da doença. Por outro lado, as variedades Berna IVIA 43, Casa Grande SRA 183, Castellana IVIA-64-3, China SRA 547, Comuna IVIA-105, D. João, Doblelina, Murtera – IVIA – 54, Pêra Vidigueira (Sr. Antunes), Petit Pierre demi-sanguine SRA 570, Prata da Ponte, Setubalense, Skaggs Bonanza Navel SRA 202, Tua (Sr. Mamede), Valência Campbell, Valência Rohde Red SRA 360, Valência Temprana IVIA 25 e Yoshida Navel SRA 558, mesmo estando em um talhão com alta incidência e severidade de CVC, não apresentaram sintomas nas plantas não-inoculadas. Tais resultados são promissores e podem, futuramente, determinar a viabilidade do uso dessas variedades como alternativa de tolerância ou resistência a *X. fastidiosa*, embora algumas dessas plantas tenham sido positivas no teste de PCR.

Quanto aos resultados de PCR (dados não mostrados), verificou-se aumento do número de plantas PCR positivo, de 175 para 403, do ano de 2002 para 2003, representando 81,25% dentre as 496 plantas. Em abril

de 2003, entre as 248 plantas inoculadas, 226 (91,13%) apresentaram PCR positivo. Esses dados demonstram que todas as variedades ou clones apresentaram pelo menos uma planta PCR positivo, ou seja, são portadoras da bactéria, podendo expressar sintomas futuramente.

Souza et al. (2000) e González-Jaimes et al. (2002), em condições de casa de vegetação e mediante inoculação da bactéria através da técnica de borbulhão, obtiveram resultados PCR positivo nas variedades Doblefina, Seleta Tardia, Tua Graúda 1, Amares, Murtera IVIA 92, Setúbal, Vanilla, Convento e nas tangerinas Rodeking SRA 431 e Natal Tightskin SRA 481, corroborando os resultados obtidos no presente trabalho, sob condições de campo.

Pelos resultados neste experimento, pode-se concluir que as laranjeiras azedas Beja e Sr. Pinto e as laranjeiras doces Navelina ISA 315, Navelina SRA 332 e Newhall Navel SRA 343 não apresentaram sintomas de CVC decorridos 27 meses da inoculação.

Nossos agradecimentos ao Departamento de Fitossanidade e ao Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas da FCAV/UNESP, à Estação Experimental de Citricultura de Bebedouro, ao Fundecitrus e à Fapesp, que contribuíram para a realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- BARBOSA, F.F.L. **Epidemiologia da clorose variegada dos citros no Estado de São Paulo**. 2002. 158f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.
- CARLOS, E.F. et al. Uso de podas em pomares com C.V.C. In: DONADIO, L.C.; MOREIRA, C.S. (Ed.). **Clorose variegada dos citros**. Bebedouro: Estação Experimental de Citricultura, 1997. v.1, p.113-22.
- GONZALEZ-JAIMES, E.P. et al. Avaliação da resistência a *Xylella fastidiosa* de germoplasmas introduzidos da Itália e Córsega. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.24, n.2, 2002.
- LARANJEIRA, F.F. et al. Comportamento sazonal da clorose variegada dos citros em três regiões do Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n.6, p.633-641, 2003.
- LARANJEIRA, F. F. et al. Cultivares e espécies cítricas hospedeiras de *Xylella fastidiosa* em condições de campo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.23, n.2, p.147-154, 1998.
- LOPES, J. R. S. Estudos com vetores de *Xylella fastidiosa* e implicações no manejo da clorose variegada dos citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v.20, n.2, p.329-344, 1999.
- LI, W.B. **Avaliação do comportamento de variedades de copas e porta-enxertos à clorose variegada dos citros**. 1997. 55f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1977.
- MACHADO, M.A. et al. Detecção de *Xylella fastidiosa* em espécies e variedades de citros sobre enxertadas em laranja Pêra com Clorose Variegada dos Citros (CVC). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.22, n.1, p.30-33, 1997.
- MACHADO, M.A. et al. Avaliação de transmissão e seleção de variedades à clorose variegada dos citros (I). **Laranja**, Cordeirópolis, v.13, p.515-31, 1992.
- NUNES, W.M.C. **Epidemiologia da clorose variegada dos citros (CVC) avaliada por sintoma e diagnóstico serológico e molecular de *Xylella fastidiosa***. 1999. 144f. Tese (Doutorado em Proteção de Plantas) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Butucatu, 1999.
- PALAZZO, D.A.; CARVALHO, M.L.V. Desenvolvimento e progresso da Clorose Variegada dos Citros (CVC) em pomares de Colina-SP. **Laranja**, Cordeirópolis, v.13, n.2, p.489-502, 1992.
- PEREIRA, E.F. **Estudo de fatores sazonais relacionados à transmissão de *Xylella fastidiosa* em pomares de citros**. 2001. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.
- PURCELL, A.H. Cigarrinhas na cultura de citros. In: DONADIO, L.C.; GRAVENA, S. **Manejo integrado de pragas dos citros**. Campinas: Fundação Cargill, 1994. p.195-209.
- SAMBROOK, J.; MANIATIS, T.; FRITSH, E.F. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- SHILLITO R.D.; SAUL M.W. Protoplast Isolation and Transformation. In: SHAW, C.H. (Ed.). **Plant molecular biology: a practical approach**. Oxford: IRL, 1998. p.181.
- SOUZA P. S. et al. Avaliação de alguns genótipos de citros em relação à Clorose Variegada dos Citros (CVC). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.22, n.2, p.148-152, 2000.