

Dinâmica espacial de foco da clorose variegada dos citros (CVC) avaliada por meio da sintomatologia e serologia

William Mário de Carvalho Nunes^{1*}, Marcos Antonio Machado², Maria Júlia Corazza-Nunes³ e Edson Luiz Furtado⁴

¹Departamento de Agronomia, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil.

²Centro de Citricultura Sylvio Moreira, IAC, Cordeirópolis, São Paulo, Brasil. ³Departamento de Biologia, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil. ⁴Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brasil. *Author for correspondence. e-mail: wmcnunes@uem.br

RESUMO. Objetivou-se neste trabalho determinar a relação entre a avaliação da incidência da clorose variegada dos citros (CVC) e de *Xylella fastidiosa* por meio da sintomatologia e serologia (DIBA – Dot immunobinding assay), para estudos de focos. As avaliações foram realizadas em pomar comercial de laranja Pera, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, enxertada sobre limoeiro Cravo (*Citrus limonia* Osbeck) (Rutaceae). A área experimental constituiu-se de duas parcelas, com 15 linhas e 10 plantas/linha, totalizando-se 300 plantas. Foram feitos quatro levantamentos em um período de nove meses. Todas as plantas do talhão foram avaliadas pela sintomatologia, procedendo-se à coleta de 20 folhas por planta nos quatro quadrantes para análise serológica. Pela sintomatologia, o número de focos foi menor do que o obtido por DIBA, apenas na primeira avaliação, e foi 3,1, 4,1 e 4,5 vezes maior na segunda, terceira e quarta avaliações, respectivamente. O tamanho dos focos definidos por DIBA foi maior do que aqueles definidos por sintomas. Assim, 92% dos focos avaliados por sintomas e 74% dos avaliados por DIBA foram menores do que 10 plantas. Os valores médios do índice de compactação de foco (ICF) foram 0,86 por sintomas e 0,85 por DIBA. O valor médio do índice de forma de foco (IFF) foi 1,17 na avaliação por sintomas e 0,94 por DIBA. A maior eficiência de detecção da incidência pelo DIBA em relação à sintomatologia é comprovada pelo menor número de focos e de focos unitários, assim como pelo maior número de plantas por foco, ressaltando-se a importância da utilização de métodos mais sensíveis para o estudo da epidemiologia da CVC.

Palavras-chave: *Xylella fastidiosa*, citros, DIBA, epidemiologia.

ABSTRACT. Spatial dynamics of citrus variegated chlorosis (CVC) foci by symptoms and serology. Relationship between incidence of citrus variegated chlorosis (CVC) and causal agent *Xylella fastidiosa* was determined by symptoms and serology (DIBA - Dot Immunobinding Assay) for foci analysis. Experimental area consisted of an orchard of sweet orange 'pera', *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, grafted on Rungpur lime (*Citrus limonia* Osbeck) (Rutaceae). Experimental area consisted of two blocks, with 15 rows and 10 plants/row, with a total of 300 plants. Four evaluations were made and all plants in the four quadrants of each block were evaluated for symptoms. Twenty leaves of each plant were collected for serological analysis. In the first evaluation, the number of foci for symptoms was smaller than that obtained by DIBA. In the second, third and fourth evaluations the number of foci for symptoms was 3.1, 4.1 and 4.5 times higher than that obtained by DIBA. On the other hand, foci defined by DIBA were always larger than the ones defined for symptoms. Ninety per cent of foci evaluated by symptoms and seventy per cent evaluated by DIBA were smaller than 10 plants. Averages of compact foci index (CFI) were practically similar: 0.86 for the evaluation for symptoms and 0.85 for DIBA. The average of the form foci index (FFI) was 1.17 by symptoms and 0.94 by DIBA. Highest efficiency of detection of incidence for DIBA in relation to symptoms is checked by the smallest number of foci and unitary foci, as well as for the largest number of plants per foci. The importance of more sensitive methods to study the CVC epidemiology is thus enhanced.

Key words: *Xylella fastidiosa*, citrus, DIBA, epidemiology.

O Brasil é o maior produtor mundial de laranja, com área cultivada de 1006 mil ha, produzindo ao

redor de 18 milhões de toneladas anuais (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 1999). A

produtividade brasileira, no entanto, ainda é baixa, com cerca de 2,3 caixas de 40,8 Kg/planta/ano, contra 6,0 na Flórida, Estados Unidos (FAO, 1994). A expansão na produção brasileira nas últimas décadas deveu-se basicamente ao incremento das áreas de plantio e não ao aumento na produtividade.

Inúmeros problemas fitossanitários estão estreitamente associados à baixa produtividade, como, por exemplo, a clorose variegada dos citros (CVC). Amaro *et al.* (1997) estimaram que, das 205 milhões de laranjeiras existentes em São Paulo em 1996, cerca de 12 milhões estariam afetadas com sintomas acentuados da CVC. A perda para a citricultura estaria na ordem de 150 milhões de dólares.

A análise do padrão espacial da doença pode fornecer informação vital sobre a dispersão dos patógenos e pode ser também a chave sobre seus mecanismos de sobrevivência. A análise do padrão pontual, a média e variância de uma amostra da população em estudo podem ser usadas para calcular índices de dispersão, os quais indicam a existência de casualidade ou agrupamento e quantificam o grau de agregação das plantas doentes (Davis e Brown, 1996).

Um dos objetivos da análise dos dados é reduzir a complexidade dos mesmos e organizá-los dentro de um sistema claro e significativo. Algumas formas de análise do padrão espacial falham neste acompanhamento e podem até aumentar a complexidade dos dados. A análise de distância de classe bidimensional (2DCLASS) é uma maneira menos complexa de análise.

Um foco de doença é “um ponto de concentração localizada de plantas doentes ou lesões discretas, podendo ser uma fonte primária de infecção ou coincidir com uma área originalmente favorável ao estabelecimento da doença e tendendo a influenciar o padrão posterior da doença” (Nelson, 1996). Similarmente, um grupo de doença pode ser definido como um número de plantas doentes agrupadas. Deste modo, os dois termos são sinônimos quando usados em relação a epidemias de doenças de plantas. De qualquer modo, uma distinção importante é feita entre estes dois termos: um foco da doença pode consistir de uma planta doente e considera-se um grupo doente quando este contém mais do que uma planta doente.

Um conceito da proximidade espacial é emprestado aqui do jogo de xadrez, e a análise da correlação espacial está associada aos dados contínuos (Gottwald *et al.*, 1992; Modjeska e Rawlings, 1983). O conceito pode ser aplicado para definir um foco da doença para dados binários. O

conceito estabelece um critério de distância-proximidade espacial para plantas doentes dentro de um foco de doença ou grupo (um critério de proximidade imediato). Uma planta doente que está adjacente à outra planta doente (distância espacial = 1) e parte de um lado (caso da torre) ou de um canto (caso do bispo), com uma planta doente num látice são consideradas partes do mesmo foco da doença (Figura 1) (Nelson, 1996). Dentro deste conceito, variáveis relacionadas podem ser definidas e seus valores calculados para intensificar o entendimento da dinâmica espacial. Assim, “número” de focos (N) é definido como o número total de focos de doença na matriz. “Tamanho” do foco (NPF) é definido como o número de plantas doentes em um foco da doença (cada planta reunindo o critério de proximidade imediato). “Dimensão” do foco é definida como a distância máxima entre “linha” (nl) e “coluna” (nc) estendida pelo foco. Um “índice de compactação do foco” (ICF) pode ser usado como uma indicação da compactação da organização do foco. O índice calculado (Nelson, 1996):

$$ICF = NPF / (nl \times nc) \quad (1)$$

é emprestado aqui da análise da distância entre classes espaço-temporal, na qual o valor para ICF foi usado para caracterizar a compactação do grupo central (Nelson, 1995). Uma alta frequência da conexão do caso da torre resulta numa relativa alta frequência da conexão do bispo, entre plantas. Ainda para avaliar a forma dos focos, tem-se o “índice de forma de foco” (IFF) (Laranjeira, 1998):

$$IFF = nl/nc \quad (2)$$

O método simples, proposto por Nelson (1996), apresenta duas premissas. Primeiro, é assumido que dados primários (presença/ausência) são relevantes simplificações do sistema. Distâncias entre linhas e entre plantas dentro de linhas são assumidas como constantes, embora não necessariamente iguais. Um programa de computador foi desenvolvido por Nelson (1996), com uma sub-rotina para encontrar e descrever foco da doença em espaço bidimensional. Laranjeira *et al.* (1998) estudaram a dinâmica de focos da CVC a partir da incidência da doença avaliada por sintomas.

A necessidade de desenvolver formas de controle da CVC é premente. Para tanto, estudos da epidemiologia e ecologia de *Xylella fastidiosa* (Monera), agente causal da CVC, tornam-se imprescindíveis. Assim, o objetivo do presente trabalho foi, para estudos de foco, determinar a relação entre a avaliação da incidência da doença pela sintomatologia e pela serologia (DIBA – Dot immunobinding assay).

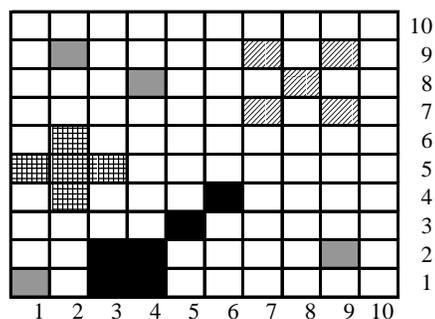


Figura 1. Mapa de plantas doentes (quadrados preenchidos) e saudáveis (quadrados vazios) num latices de dez linhas por dez colunas. O foco cinza é denominado unitário. O foco quadrado tracejado apresenta padrão vertical e horizontal de proximidade (caso torre). O foco tracejado apresenta padrão de proximidade longitudinal (caso bispo). Para o foco em preto, teria-se número de plantas por foco (NPF) = 6; ocupando 4 colunas (nc) e 4 linhas (nl), com índice de forma de foco (IFF) = 1,0 e índice de compactação do foco = 0,375

Material e métodos

O experimento foi realizado em pomar comercial de laranja doce da variedade Pera (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) sobre porta-enxerto limoeiro Cravo (*Citrus limonia* Osbeck) (Rutaceae), apresentando sintomas típicos da CVC. A área experimental foi implantada em duas parcelas, com 15 linhas, e 10 plantas/linhas foram delimitadas, totalizando-se 300 plantas.

Realizaram-se quatro avaliações, em um intervalo de nove meses. Todas as plantas do talhão foram avaliadas pelos sintomas em folhas e/ou frutos e presença de *X. fastidiosa* por serologia. Para a realização do teste serológico DIBA, consideraram-se as recomendações de De Boer *et al.* (1993) e Lee *et al.* (1992), com modificações. As nervuras cortadas em fatias finas foram suspensas em tampão de extração [15,15 g de Tris; 40,0 g de SDS (Sódio Duodecil Sulfato); 205 ml de Glicerol; 20,0 ml de mercaptoetanol, azul de bromofenol] e deixadas em repouso por uma noite. Os tubos foram colocados em banho-maria por 10 min a 60°C. Após o resfriamento, foram pipetados 2 µl em membranas de nitrocelulose (Hybond C extra, Amersham), as quais foram secas por 30 min a temperatura ambiente e lavadas com água e tampão TBS (10 mM Tris; 0,15 M NaCl, pH 8,0) por 2 min. A seguir, as membranas foram saturadas por 2,5 h com solução 5% de leite em pó desnatado em tampão TTBS (TBS e 0,1% Tween 20) e lavadas por quatro vezes neste mesmo tampão. As membranas foram então incubadas por no mínimo 4 h com anticorpos específicos para *X. fastidiosa* (UF-26) na diluição 1:30.000. Lavaram-se novamente as membranas por

quatro vezes com o tampão TTBS e incubaram-nas com antissoro anti-Ig de coelho conjugado com fosfatase alcalina (A-3937, Sigma. St Louis, MO, EUA), na diluição, em TTBS, de 1:8.000, por 2,5 horas. Após lavagem com TTBS, foi adicionado o tampão de revelação (0,1 M Tris, 0,1 M NaCl, 5 mM MgCl₂, pH 9,5) até desenvolvimento da cor.

A análise da dinâmica e estrutura de focos foi realizada considerando-se os mapas de incidência da doença feitos a partir das avaliações realizadas tanto pela sintomatologia (sintomas visuais) como pela serologia (DIBA). Uma planta doente que estava adjacente à outra planta doente lateral ou longitudinalmente foi considerada parte de um mesmo foco, conforme ilustrado na Figura 1. Foram contados o número de focos (NF), o número de plantas por foco (NPF), o número máximo de linhas (nl) e o número máximo de colunas (nc) ocupadas por foco. Com estes dados, calcularam-se o índice de forma de foco (IFF) e o índice de compactação por foco (ICF).

Para cada método de avaliação, foram calculados o número médio de plantas por foco (NMPF) e a distribuição da frequência de número de plantas por foco (NPF).

Resultados e discussão

Na primeira avaliação, foram encontradas 14 plantas sintomáticas na parcela 1 e 17 na parcela 2 e pelo teste serológico DIBA, 37 e 24 plantas positivas para as parcelas 1 e 2, respectivamente (Figura 2). Aos 77 dias após a primeira avaliação, detectaram-se 22 plantas sintomáticas na parcela 1 e 34 plantas na parcela 2, enquanto que pelo teste DIBA 83 plantas positivas foram obtidas na parcela 1 e 74 na parcela 2 (Figura 2). Na terceira avaliação, 153 dias após a primeira, a parcela 1 apresentou 41 plantas sintomáticas e 89 plantas positivas pelo teste DIBA, enquanto a parcela 2 apresentou 48 plantas sintomáticas e 83 plantas positivas pelo DIBA (Figura 2). A última avaliação, realizada 254 dias após a primeira, apresentou 52 e 62 plantas sintomáticas, nas parcelas 1 e 2, respectivamente, e 91 e 89 plantas positivas pelo teste DIBA, nestas mesmas parcelas (Figura 2).

O número de focos por plantas sintomáticas foi menor apenas na primeira avaliação. Na segunda, terceira e quarta avaliações o número de focos por sintomas foi 3,1, 4,1 e 4,5 vezes maior, respectivamente, do que o obtido por DIBA (Figura 2; Tabela 1). Quanto ao tamanho, os focos definidos por DIBA foram sempre maiores do que os definidos por sintomas. Assim, 92% dos focos avaliados por sintomas e 74% dos avaliados por DIBA foram menores que 10 plantas.



Figura 2. Mapas da distribuição espacial das plantas afetadas pela CVC (quadrados pretos) detectadas pela sintomatologia e pelo DIBA, em quatro avaliações e duas parcelas com 150 plantas cada

Tabela 1. Número de focos, número de plantas por foco e número de focos unitários avaliados por sintomas e pelo teste serológico DIBA, em quatro avaliações em duas parcelas

| Data avaliação | Parcela | Sintomas | | | | | |
|----------------|---------|-------------------|-----------------|---------------|-------------------|------------------|------------------|
| | | Incidência doença | NF ^a | Foco Unitário | NMPF ^b | ICF ^c | IFF ^d |
| 24.06.97 | 1 | 0.09 ^a | 9 | 5 | 1.56 | 0.97 | 1.17 |
| 10.09.97 | 2 | 0.11 | 12 | 9 | 1.42 | 0.89 | 1.00 |
| | 2 | 0.23 | 13 | 5 | 2.83 | 0.77 | 1.34 |
| 25.11.97 | 1 | 0.27 | 11 | 5 | 3.73 | 0.81 | 1.14 |
| | 2 | 0.32 | 14 | 6 | 3.43 | 0.81 | 1.18 |
| 06.03.98 | 1 | 0.35 | 10 | 5 | 5.20 | 0.82 | 1.18 |
| | 2 | 0.41 | 8 | 4 | 7.75 | 0.85 | 1.20 |
| Média | | 0.24 | 11.00 | 5.63 | 3.47 | 0.86 | 1.17 |
| Data avaliação | Parcela | DIBA | | | | | |
| | | Incidência doença | NF | Foco Unitário | NMPF | ICF | IFF |
| 24.06.97 | 1 | 0.16 | 12 | 3 | 3.67 | 0.88 | 1.47 |
| | 2 | 0.25 | 13 | 8 | 2.62 | 0.88 | 1.22 |
| 10.09.97 | 1 | 0.49 | 4 | 0 | 21.25 | 0.83 | 0.87 |
| | 2 | 0.55 | 4 | 3 | 18.75 | 0.87 | 0.92 |
| 25.11.97 | 1 | 0.55 | 2 | 0 | 44.50 | 0.79 | 0.58 |
| | 2 | 0.59 | 4 | 3 | 20.75 | 0.88 | 0.92 |
| 06.03.98 | 1 | 0.59 | 1 | 0 | 94.00 | 0.80 | 0.58 |
| | 2 | 0.61 | 3 | 2 | 30.33 | 0.89 | 0.92 |
| Média | | 0.47 | 5.38 | 2.38 | 29.48 | 0.85 | 0.94 |

^anúmero de focos; ^bnúmero médio de plantas por foco; ^cíndice de compactação de foco; ^díndice de forma de foco

Os valores médios do índice de compactação de foco (ICF) foram praticamente iguais: 0,86 pela avaliação por sintomas e 0,85 pela avaliação por DIBA. O valor médio do índice de forma de foco (IFF) foi 1,17 na avaliação por sintomas e 0,94 na avaliação pelo DIBA (Tabela 1).

O número de focos unitários foi maior quando se avaliou por sintomas, face à menor coalescência de focos, quando comparado com DIBA. Pelo DIBA, mesmo nas plantas assintomáticas, se a bactéria estiver presente em quantidade suficiente, ela poderá ser detectada. E isto é um fator que determinará uma diminuição do número de focos unitários. Por outro lado, isso implica em um número médio de plantas por foco sempre maior quando avaliado pelo DIBA.

Quando se avaliaram os sintomas, os dados de comprimento maior do que a largura, verificado pelo índice de forma de foco (IFF), notou-se que eles são bastante similares aos resultados obtidos por Nelson (1996) e Laranjeira *et al.* (1998). Estes autores observaram que, a partir da incidência de 0.4, ocorreu um aumento no IFF, podendo ser este um

efeito da forma dos talhões, em sua maioria retangulares. Para os focos determinados pelo DIBA, com IFF menor, o que significa focos com largura maior, o que leva a inferir que a doença já se encontrava em uma área maior que a verificada por sintomas. Estudos mais detalhados com o uso do DIBA em áreas maiores e em áreas com baixa incidência da doença são prementes para um melhor entendimento deste patossistema. A variedade analisada aqui é uma das que apresentam evolução mais rápida dos sintomas, conforme constatado por Barbosa (1997). O estudo iniciou-se quando havia baixa incidência pela sintomatologia, porém, a bactéria estava mais disseminada e os resultados do DIBA o comprovaram.

Nota-se que os focos maiores tendem a ter valores menores de índice de compactação, o que sugere que a doença se dissemina de forma não homogênea, ao redor de uma primeira planta afetada, como constatado por Laranjeira *et al.* (1998). Estes autores inferem que a quantidade de focos unitários possa ter influenciado nos valores iniciais altos, porém, neste estudo, não foi encontrada esta relação.

A maior eficiência na detecção da incidência da CVC pelo DIBA do que pela sintomatologia é comprovada pelo menor número de focos e de focos unitários, assim como pelo maior número de plantas por foco. Isto vem ressaltar a importância da utilização de métodos mais sensíveis para o estudo da epidemiologia da CVC que permitam a detecção da bactéria, mesmo quando as plantas se apresentam assintomáticas.

Referências

AMARO, A.A. *et al.* Efeitos econômicos decorrentes da clorose variegada dos citros. In: DONADIO, L.C.;

MOREIRA, C.S. (Ed.). *Clorose variegada dos citros*. Bebedouro, 1997. p.123-135.

BARBOSA, F.F.L. *Dinâmica temporal e espacial da clorose variegada dos citros*. 1997. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1997.

DAVIS, R.I.; BROWN, J.F. Epidemiology and management of kava dieback caused by cucumber mosaic cucumovirus. *Plant Dis.*, St. Paul, v. 80, p. 917-921, 1996.

DE BOER, S.H.; *et al.* Detecting latent bacterial infections. In: DE BOER, S.H. *et al.* (Ed.). *Pathogen indexing technologists*. London: Academic Press, 1996. p.27-57.

FAO. *Production Yearbook* - 1993, Rome, v.47, p.160-163, 1994.

GOTTWALD, T.R. *et al.* LCORR2 - Spatial correlation analysis software for the personal computer. *Plant Dis.*, St. Paul, v. 76, p. 213-215, 1992.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. *Levantamento sistemático da produção agrícola*. Rio de Janeiro, 1999.

LARANJEIRA, F.F. *et al.* Dinâmica e estrutura de focos da clorose variegada dos citros (CVC). *Fitopatol. Bras.*, Brasília, v. 23, p. 36-41, 1998.

LEE, R.F. *et al.* Development of a serological assay for citrus variegated chlorosis: a new disease of citrus in Brazil. *Proc.Fla.State Hortic.Soc.*, Winter Haven, v. 105, p. 32-35, 1992.

MODJESKA, J.S.; RAWLINGS, J. O. Spatial correlation analysis of uniformity data. *Biometrics*, Washington D.C., v. 39, p. 373-384, 1983.

NELSON, S.C. A simple analysis of disease foci. *Phytopathology*, St. Paul, v. 86, p. 332-339, 1996.

NELSON, S.C. Spatiotemporal distance class analysis of plant disease epidemics. *Phytopathology*, St. Paul, v. 85, p. 37-43, 1995.

Received on May 30, 2001.

Accepted on September 03, 2001.