

# Análise espaço-temporal da clorose variegada dos citros no Noroeste do Paraná, com uso de PCR para detecção de *Xylella fastidiosa*

William Mário de Carvalho Nunes\*, Carlos Alexandre Zanutto, Maria Júlia Corazza-Nunes e Rúbia de Oliveira Molina

Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada (NBA), Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil. \*Autor para correspondência. e-mail: wmcnunes@uem.br

**RESUMO.** A citricultura é afetada por inúmeras doenças, como a clorose variegada do citros (CVC), causada pela bactéria *Xylella fastidiosa*. O objetivo deste trabalho foi determinar a distribuição espacial da doença dentro de pomares comerciais do Noroeste do Paraná com o uso de métodos moleculares. Foram selecionados pomares sintomáticos para CVC com as variedades 'Pêra', 'Valência' e 'Folha Murcha' (*Citrus sinensis* Osbeck). Foram marcadas para cada variedade, 4 plantas-referência positivas para CVC (por sintomas e análise molecular) e 8 plantas ao redor de cada uma das plantas-referência foram amostradas, num total de 36 plantas por variedade. Realizou-se o teste da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) para detecção da bactéria e na mesma época foram conduzidas avaliações visuais de sintomas de CVC. Os resultados da análise temporal, utilizando-se os modelos Monomolecular, Logístico e Gompertz, apontaram o modelo Logístico como o que melhor se ajustou para descrever o comportamento da doença no tempo, para todas as variedades estudadas. Observou-se que o comportamento espacial da doença diferiu quando a mesma área foi avaliada pelos métodos visual e molecular, resultando em uma diferença no padrão espacial das áreas avaliadas. Portanto, ambos os métodos empregados, sintomas e PCR, foram capazes de constatar as mudanças no padrão espacial apresentado, sendo que a análise molecular (PCR) foi mais sensível para detectar as mudanças ocorridas.

**Palavras-chave:** diagnóstico molecular, epidemiologia, *Xylella fastidiosa*.

**ABSTRACT.** Spatio-temporal analysis of the citrus variegated chlorosis (CVC) in the Northwest of Paraná, using PCR for detection of *Xylella fastidiosa*. Countless diseases affect the citriculture, as the citrus variegated chlorosis (CVC) which is caused by the bacteria *Xylella fastidiosa*. The aim of this work was to determine the space distribution of the disease inside commercial orchards in the Northwest of Paraná, using molecular methods. Symptomatic orchards were selected for CVC with the varieties 'Pêra', 'Valência' and 'Folha Murcha' (*Citrus sinensis* Osbeck). For each variety, 4 positive reference-plant for CVC (presence of CVC symptoms or molecular analysis by PCR) and 8 plants around of each one reference-plant were evaluated, totaling 36 plants for variety. The detection of the bacteria was conducted by Polymerase Chain Reaction (PCR) technique. Simultaneously, evaluations through visual symptoms of CVC were conducted. The results of the temporal analysis were obtained using the Monomolecular, Logistic and Gompertz models. The Logistic model was the one that best fit to describe the behavior of the disease in the time, for all the studied varieties. Data showed that the space behavior of the disease differed when the same area was evaluated by visual and molecular methods, resulting in a difference in the space pattern of the evaluated areas. Therefore, the two used methods, symptoms and PCR, were capable of verifying these changes in the presented space pattern, but the molecular analysis (PCR) was better at detecting the happened changes.

**Key words:** molecular diagnosis, epidemiology, *Xylella fastidiosa*.

## Introdução

A citricultura é atingida por inúmeros problemas, refletindo-se deste modo na baixa produtividade apresentada no Brasil. Desses problemas temos uma ampla gama de agentes patogênicos causadores de

doenças, dos quais destaca-se a bactéria *Xylella fastidiosa*, agente causal da clorose variegada do citros (CVC) (Rossetti *et al.*, 1990a, b; Chagas *et al.*, 1992). O primeiro relato desta doença no Brasil foi feito em 1987, em Minas Gerais e São Paulo (Rossetti *et al.*, 1990a, b; Lee *et al.*, 1991).

Plantas afetadas por essa doença apresentam clorose foliar semelhante à deficiência de zinco, que se inicia na parte superior da copa. Na face abaxial das folhas, correspondentes às manchas cloróticas da face adaxial, desenvolvem-se pontuações pequenas, de cor marrom claro, que podem se tornar marrom escuro ou mesmo necróticas (Lee *et al.*, 1991; Rossetti, 1993). A doença causa redução do tamanho dos frutos, casca endurecida, maturação precoce, ocorrendo em pencas de 4 a 10 frutos, o que é atípico. O crescimento da planta é mais lento, ocasionando morte dos ponteiros e queda das folhas (Lee *et al.*, 1991). A bactéria, além de ser transmitida através de material vegetal infectado, é transmitida de planta a planta por meio de insetos vetores que se alimentam de seiva do xilema, conhecidos como cigarrinhas, pertencentes às famílias Cercopidae e Cicadellidae (Lopes, 1999).

Na epidemiologia da CVC alguns dados têm sido coletados concernentes ao número de pomares infectados pelo tempo, a distribuição da idade de plantas infectadas e localização geográfica de pomares infectados (Palazzo e Carvalho, 1992; Gottwald *et al.*, 1993; Tubelis *et al.*, 1993; Salva *et al.*, 1995; Porto, 1995; Barbosa, 1997; Nunes, 1999). A análise do padrão espacial da doença pode fornecer informações sobre a dispersão dos patógenos e, também sobre seus mecanismos de sobrevivência (Davis e Brown, 1996).

A reação da polimerase em cadeia (PCR), amplificando seqüências de DNA, mostrou-se um método sensível e altamente específico para detecção de patógenos (Coletta-Filho e Machado, 2001). Sua especificidade deriva do desenvolvimento de sondas (*primers*) de oligonucleotídeos que irão reconhecer seqüências específicas no DNA de determinado patógeno (Coletta-Filho e Machado, 2001). O objetivo deste trabalho foi verificar como ocorre a distribuição espacial da doença clorose variegada dos citros e de seu agente causal, a bactéria *Xylella fastidiosa*, com o uso da reação da polimerase em cadeia (PCR).

## Material e métodos

### Mapeamento das plantas no campo

O experimento foi conduzido em pomar comercial, com CVC, na região Noroeste do Paraná. As variedades de citros estudadas foram 'Pêra', 'Valência' e 'Folha Murcha' (*Citrus sinensis* Osbeck). Para cada uma das variedades estudadas, foram marcadas 4 plantas-referência positivas para CVC, diagnosticadas visualmente por meio de sintomas visuais e via análise molecular por PCR. Ao redor dessas plantas-referência, 8 plantas foram avaliadas quanto à incidência da doença via

sintomatologia e foram amostradas para detecção da bactéria por meio do PCR.

Foram efetuadas 4 avaliações (Tabela 1), e, conforme sugerido por Nunes (1999) e Pruvost *et al.* (1999) a cada avaliação plantas sintomáticas identificadas eram registradas em papel quadriculado, com o número da rua (linha) e da planta (cada quadrículo=1 planta). Assim, a cada avaliação novas plantas sintomáticas eram adicionadas aos mapas anteriores, obtendo-se o número acumulado de plantas doentes. Do mesmo modo, após realização da análise molecular (PCR), os resultados foram colocados em mapas para cada planta-referência de cada parcela plotando-se as plantas doentes.

### Coleta das amostras

As oito plantas ao redor das plantas-referência também foram amostradas para a detecção da bactéria por meio do PCR. As plantas com resultados PCR positivos para a presença da bactéria na primeira avaliação tiveram, na segunda avaliação, amostradas as plantas ao seu redor, ou seja, a cada avaliação o perímetro ampliava-se em função das plantas positivas. Também foram avaliadas por sintomas, ao acaso, 20 plantas dentro do talhão e realizado teste para detecção da bactéria através de PCR.

**Tabela 1.** Datas das avaliações da incidência de CVC e coleta de amostras para análise de PCR.

| Avaliação | Data       |
|-----------|------------|
| 1         | 15/12/2001 |
| 2         | 10/03/2002 |
| 3         | 19/04/2002 |
| 4         | 16/07/2002 |

### Reação da polimerase em cadeia (PCR)

Dois iniciadores (*primers*) específicos de *Xylella fastidiosa* de citros desenvolvidos por Pooler e Hartung (1995) foram utilizados. As reações de amplificação foram conduzidas de acordo com o proposto por Coletta-Filho *et al.* (1996): 25 µl de volume total, com 2,5 µl do tampão 10x; 2,00 mM de cada nucleotídeo; 12,5 ng de cada um dos *primers*; 20 ng de DNA; 1,5 unidade de Taq-polimerase. Utilizou-se amplificação de 30 ciclos de 1 min. a 94°C; 1 min. a 60°C; 2 min. a 72°C e 10 min. adicionais a 72°C. As reações de DNA de plantas positivas para CVC apresentaram produto de 500 pb, visualizados em gel de agarose e fotografados sob luz ultra violeta em equipamento de fotodocumentação (UVP GDS-8000 System). O preparo das amostras para a extração de DNA foi feito conforme o protocolo proposto por Murray e Thompson (1980).

### Análise estatística

A análise estatística dos dados de incidência de CVC, tanto das plantas-referência, como da amostragem aleatória das plantas foram realizadas pela

transformação dos valores em  $\sqrt{x+1}$  e comparada pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

A análise temporal foi realizada com o uso dos modelos não lineares Monomolecular, Logístico e Gompertz, sendo utilizado o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) para determinar o modelo que melhor se ajustou para explicar o comportamento temporal da doença. O software utilizado para a análise espacial dos dados coletados foi o 2DCORR, que considera as diferenças entre populações de plantas-referência e plantas-marcadas, produzindo estimativa independente para a escala de comprimento sobre a qual a doença esta correlacionada e a probabilidade de desvio de uma distribuição espacial aleatória (Ferrandino, 1998).

### Resultados e discussão

Os resultados da análise temporal, utilizando-se os modelos Monomolecular, Logístico e Gompertz, apontaram o modelo Logístico (Tabela 2), como o que melhor se ajustou para descrever o comportamento da doença no tempo, para todas as variedades estudadas. De forma semelhante, Nunes (1999), concluiu em estudo sobre a epidemiologia da CVC, que o progresso da doença é melhor explicado pelo modelo Logístico, mesmo quando houve variação do método para diagnosticar a incidência da doença, ou seja, via sintomas, sorologia ou detecção molecular.

Laranjeira (2001), em estudo da epidemiologia da CVC observou que o progresso temporal da doença segue o padrão duplo-sigmóide, com maior taxa de progresso nos meses de primavera e verão, tendo na maioria das áreas maior incidência nas bordas dos talhões, associados a presença de talhões vizinhos mais velhos e infectados. Gottwald *et al.* (1993) determinou que o progresso temporal da CVC segue o modelo de Gompertz. Por outro lado, Barbosa (1997) encontrou no modelo Logístico generalizado de 5 parâmetros, que apresenta padrão duplo-sigmóide, o mais adequado na caracterização do progresso da doença.

**Tabela 2.** Coeficiente linear, coeficiente angular, coeficiente de determinação para ajuste entre valores observados e previstos da doença, sem transformação ( $R^{*2}$ ), estimados pela regressão linear através do modelo Logístico para explicar a evolução da clorose variegada dos citros (CVC) nas variedades 'Pêra', 'Valência' e 'Folha Murcha' em Nova Esperança, Estado do Paraná.

| Variedade      | Modelo    | Coeficiente Linear | Coeficiente Angular | $R^{*2}$ |
|----------------|-----------|--------------------|---------------------|----------|
| 'Pêra'         | Logístico | -1.039             | 0.015               | 0.959    |
| 'Valência'     | Logístico | -1.915             | 0.023               | 0.975    |
| 'Folha Murcha' | Logístico | -5.309             | 0.001               | 0.965    |

Para o entendimento do início da epidemia e do manejo da doença é essencial o conhecimento espacial da mesma, em função das relações intrínsecas entre padrão

espacial e o aumento da distribuição desta doença dentro da população de plantas. Padrões no espaço entre as plantas doentes sugerem o conceito de distância entre elas. As análises baseadas na distância entre plantas têm grande poder como ferramenta descritiva, analítica e comparativa (Nelson e Campbell, 1993).

O software 2DCORR, através da predição de cada classe orientação-distância, calcula a probabilidade radial cumulativa em função dos dados observados, permitindo determinar se há correlação espacial significativa. Pode-se determinar ainda qual a distância em que pares semelhantes, plantas infectadas junto com plantas infectadas ou plantas sadias junto com plantas sadias, apresentam esta correlação espacial significativa (Ferrandino, 1998).

Estão sumarizados na Tabela 3 os valores de  $r$ , que são as unidades de separação de plantas quando os valores máximos são obtidos entre a diferença dos valores preditos pelo modelo e os valores observados, denominado  $\Delta$  máximo.

**Tabela 3.** Valores de  $r$ , unidades de plantas sobre as quais se estendem quando o máximo do desvio,  $\Delta$ , é obtido entre o predito e o observado para cada classe de orientação-distância, nas áreas marcadas das variedades Folha Murcha, Pêra e Valência, avaliadas por sintomas (S) e por detecção molecular (PCR), nas quatro avaliações realizadas.

| Planta referência | Avaliação  | $r$            |     |                |                |                |                |
|-------------------|------------|----------------|-----|----------------|----------------|----------------|----------------|
|                   |            | 'Folha Murcha' |     | 'Pêra'         |                | 'Valência'     |                |
|                   |            | S              | PCR | S              | PCR            | S              | PCR            |
| Planta I          | 15/12/2001 | - <sup>a</sup> | 2   | - <sup>a</sup> | 2 <sup>*</sup> | - <sup>a</sup> | 2              |
|                   | 10/03/2002 | -              | 2   | -              | 2 <sup>*</sup> | -              | -              |
|                   | 19/04/2002 | -              | 3   | -              | 2 <sup>*</sup> | -              | 2              |
|                   | 16/07/2002 | -              | 2   | -              | 3              | -              | 2              |
| Planta II         | 15/12/2001 | -              | 2   | 3 <sup>*</sup> | 3 <sup>*</sup> | 2              | 2              |
|                   | 10/03/2002 | -              | 2   | 3 <sup>*</sup> | 3 <sup>*</sup> | 2              | 2              |
|                   | 19/04/2002 | 3              | 3   | 2              | 3 <sup>*</sup> | 2              | 2              |
|                   | 16/07/2002 | -              | 3   | 3              | 3 <sup>*</sup> | 2              | 3              |
| Planta III        | 15/12/2001 | -              | 3   | 3 <sup>*</sup> | 3 <sup>*</sup> | 2              | 2              |
|                   | 10/03/2002 | -              | 2   | 4 <sup>*</sup> | 3 <sup>*</sup> | 2              | 2              |
|                   | 19/04/2002 | 3              | 3   | 3 <sup>*</sup> | 4 <sup>*</sup> | 2              | 2              |
|                   | 16/07/2002 | -              | 3   | 3 <sup>*</sup> | 3 <sup>*</sup> | 2              | 3 <sup>*</sup> |
| Planta IV         | 15/12/2001 | -              | 3   | 3 <sup>*</sup> | 3              | 5              | 2              |
|                   | 10/03/2002 | -              | 2   | 4 <sup>*</sup> | 3 <sup>*</sup> | 3              | 2              |
|                   | 19/04/2002 | 3 <sup>*</sup> | 3   | 3              | 5              | 2              | 2              |
|                   | 16/07/2002 | -              | 5   | 3 <sup>*</sup> | 4              | 2 <sup>*</sup> | 2              |

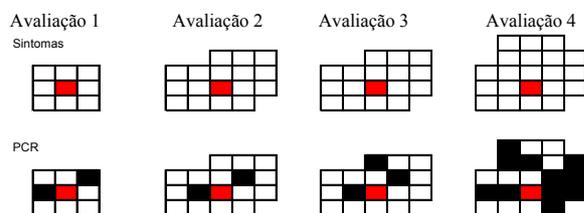
\* desvio do comportamento aleatório ao nível de  $\alpha = 0,05$ . <sup>a</sup> - não realizado

No início da avaliação não houve correlação espacial, o que é explicado pelo fato de não haver número de plantas infectadas que possa influir no comportamento espacial da doença. No entanto, na medida em que se avançou no tempo verificou-se o aparecimento da correlação espacial. Esta correlação diminuiu assim que a área estava quase completamente tomada com plantas doentes.

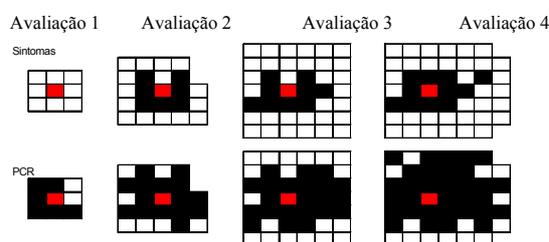
Observou-se que o comportamento espacial da doença diferiu quando a mesma área foi avaliada pelos dois métodos, resultando em diferença no padrão espacial das áreas avaliadas. Os dois métodos empregados, sintomas e PCR, foram capazes de constatar estas mudanças no padrão espacial apresentado, sendo que o teste molecular (PCR), foi

mais sensível para detectar estas mudanças.

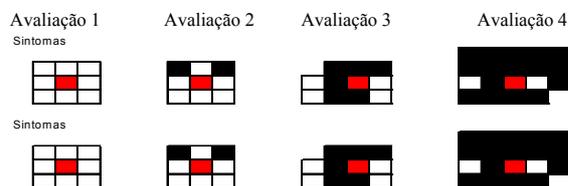
Os mapas de cada área com as plantas-referência em cada avaliação têm as plantas positivas simbolizadas como um quadrado preto e as negativas um quadrado branco (Figuras 1, 2 e 3). Baseados nestes mapas foram realizadas as análises.



**Figura 1.** Mapa da planta marcada I, da variedade Folha Murcha, nas quatro avaliações para acompanhamento da doença através de sintomas e detecção molecular por PCR.



**Figura 2.** Mapa da planta marcada I, da variedade Pera, nas quatro avaliações para acompanhamento da doença através de sintomas e detecção molecular por PCR.



**Figura 3.** Mapa da planta marcada I, da variedade Valencia, nas quatro avaliações para acompanhamento da doença através de sintomas e detecção molecular por PCR.

Como um dos objetivos deste trabalho foi o de avaliar a eficiência do método diagnóstico molecular PCR em relação a avaliação realizada pela sintomatologia, comparou-se os dois métodos através da análise de variância para incidência da doença

Pela análise da média geral da percentagem de incidência da doença através dos métodos de avaliação por sintomas e por PCR, tanto nas plantas-referência (Tabela 4), como nas coletas aleatórias de plantas de cada parcela (Tabela 5), verifica-se que o método que apresentou maior valor na detecção da doença foi o PCR. Ao se comparar a incidência avaliada por sintomas e PCR, verifica-se que o PCR foi sempre mais eficiente, principalmente, devido a sua capacidade de detectar a presença da bactéria mesmo quando em baixas concentrações na planta (plantas assintomáticas). Às vezes, em virtude da

amostragem ser aleatória na planta, ocorreu coletar folhas que não apresentavam a bactéria na extração do DNA, como em alguns casos da variedade 'Valencia'. Mesmo assim o PCR foi um método que mostrou, portanto, ser bastante promissor para estudos epidemiológicos. Outra questão foi na variedade 'Folha Murcha' em que plantas que foram positivas pelo PCR não expressou rapidamente os sintomas de CVC, em virtude de a bactéria demorar mais para colonizar essa variedade e deste modo demorar mais para expressar os sintomas. Essa colonização da bactéria mais lenta depende da variedade, como observamos na variedade 'Pêra' que foi a que apresentou maior suscetibilidade.

**Tabela 4.** Valores [média  $\sqrt{x+1}$ ] da incidência de CVC comparada pelo teste de Tukey ( $\alpha=0.05$ ) na amostragem das plantas-referência.

| Métodos de Avaliação | % Incidência (média) |
|----------------------|----------------------|
| Sintomatologia       | 1,4658 A*            |
| Molecular (PCR)      | 1,4966 B             |

\* diferem significativamente.

**Tabela 5.** Valores [média  $\sqrt{x+1}$ ] da incidência de CVC comparada pelo teste de Tukey ( $\alpha=0.05$ ) na amostragem aleatória de plantas.

| Métodos de Avaliação | % Incidência (média) |
|----------------------|----------------------|
| Sintomatologia       | 1,4659 A*            |
| Molecular (PCR)      | 1,4884 B             |

\* diferem significativamente.

## Conclusão

A incidência da doença estimada por sintomas e a incidência de bactérias por PCR, tanto nas plantas-referência, como nas coletas aleatórias de plantas de cada parcela, verifica-se que o método que apresentou maior valor na detecção da doença foi o PCR. Ao se comparar à incidência avaliada por sintomas e PCR, verifica-se que o PCR foi sempre mais eficiente, principalmente, devido a sua capacidade de detectar a presença da bactéria mesmo quando em baixas concentrações na planta (plantas assintomáticas). Mostrando, portanto, ser bastante promissor para estudos epidemiológicos.

## Referências

- 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”, Piracicaba, 1997.
- CHAGAS, C.M. *et al.* Electron microscopy studies of a xylem-limited bacterium in sweet orange affected with citrus variegated chlorosis disease in Brazil. *J. Phytopathol.*, Berlin, v. 134, p. 306-312, 1992.
- COLETTA FILHO, H.D.; MACHADO, M.A. Hospedeiros, transmissão e técnicas de diagnóstico da bactéria *Xylella fastidiosa*. *Laranja*, Cordeirópolis, v. 22, n. 1, p. 121-132, 2001.

- COLETTA FILHO, H.D. *et al.* Detecção de *Xylella fastidiosa* da clorose variegada dos citros através de PCR. *Fitopatol. Bras.*, Brasília, v. 21 (supl.), p. 343, 1996.
- DAVIS, R.I.; BROWN, J.F. Epidemiology and management of kava dieback caused by cucumber mosaic cucumovirus. *Plant Dis.*, St. Paul, v. 80, p. 917-21, 1996.
- FERRANDINO, F.J. Past nonrandomness and aggregation to spacial correlation: 2DCORR, a new approach for discrete data. *Phytopathology*, St. Paul, v. 88, p. 84-91, 1998.
- GOTTWALD, T.R. *et al.* Preliminary spatial and temporal analysis of citrus variegated chlorosis (CVC) in São Paulo, Brazil. In: IOCV CONFERENCE, 12., 1993, Riverside. *Proceedings...* Riverside: International Organization of Citrus Virologists, 1993. p. 327-335.
- LARANJEIRA, F.F. Epidemiologia da clorose variegada dos citros. *Summa Phytopathol.*, Jaboticabal, v. 27, n. 1, p. 156-7, 2001.
- LEE, R.F. *et al.* Citrus variegated chlorosis: a new destructive disease of citrus in Brazil. *Citrus Industry*, Tarupa, v. 72, p. 12-15, 1991.
- 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. 229-344, 1999.
- MURRAY, M.G.; THOMPSON, W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.*, Oxford, v. 8, p. 4321-325, 1980.
- NELSON, S.C.; CAMPBELL, C.L. Disease progress, defoliation, and spatio pattern in a multiple-pathogen disease complex on white clover. *Phytopathology*, St. Paul, v. 83, p. 419-29, 1993.
- NUNES, W.M.C. *Epidemiologia da clorose variegada dos citros (CVC) avaliada por sintomas e diagnóstico serológico e molecular de Xylella fastidiosa*. 1999. Tese (Doutorado em proteção de Plantas)–Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 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.
- POOLER, M.R.; HARTUNG, J.S. Specific PCR detection and identification of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chlorosis. *Curr. Microbiol.*, New York, v. 31, p. 134-37, 1995.
- PORTO, O.M. Clorose variegada dos citros difunde-se no Rio Grande do Sul. In: REUNIÃO TÉCNICA DE FRUTICULTURA, 4., 1995, Porto Alegre. *Resumos...* Porto Alegre: Fapergs, 1995. p. 41-43.
- PRUVOST, O. *et al.* The effect of irrigation practices on the spatio-temporal increase of Asiatic citrus canker in simulated nursery plots in Reunion Island. *Eur. J. Plant Pathol.*, Heidelberg, v. 105, p. 23-37, 1999.
- ROSSETTI, V. Doenças dos citros. In: ROSSETTI, V. *et al.* (Ed.). *Doenças dos citros causadas por algas, fungos, bactérias e vírus*. Campinas: Fundação Cargill, p. 1-53, 1993.
- ROSSETTI, V. *et al.* Resultados preliminares de estudos sobre uma nova anormalidade dos citros observada nos estados de São Paulo e Minas Gerais. *Summa Phytopathol.*, Jaguariuna, v. 16, p. 13, 1990a. (resumos)
- ROSSETTI, V. *et al.* Presence de bacteries dans le xyleme d'oranges atteint de chlorose variégée, une nouvelle maladie des agrumes au Brésil. *C. R. Acad. Sci.*, Paris, v. 310, p. 345-349 (série III), 1990b.
- SALVA, R.A. *et al.* Situação da clorose variegada dos citros no estado de São Paulo. *Laranja*, Cordeirópolis, v. 16, n. 2, p. 155-64, 1995.
- TUBELIS, A. *et al.* Difusão da clorose variegada dos citros em pomares comerciais de laranja no Brasil. *Laranja*, Cordeirópolis, v. 14, n. 1, p. 239-54, 1993.

Received on April 18, 2006.

Accepted on August 14, 2006.