

**Universidade de São Paulo**  
**Escola superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Cancro cítrico (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*) e sua interação  
com a lagarta minadora dos citros (*Phyllocnistis citrella*)  
em laranja doce (*Citrus sinensis*)**

**Rock Seille Carlos Christiano**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em  
Agronomia, Área de concentração: Fitopatologia

**Piracicaba**

**2006**

Rock Seille Carlos Christiano  
Engenheiro Agrônomo

Cancro cítrico (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*) e sua interação  
com a lagarta minadora dos citros (*Phyllocnistis citrella*)  
em laranja doce (*Citrus sinensis*)

Orientador:  
Prof. Dr. Armando Bergamin Filho

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em  
Agronomia, Área de concentração: Fitopatologia

Piracicaba  
2006

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/ USP**

Christiano, Rock Seille Carlos

Cancro cítrico (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*) e sua interação com a lagarta minadora dos citros (*Phyllocnistis citrella*) em laranja doce (*Citrus sinensis*) / Rock Seille Carlos Christiano. -- Piracicaba, 2006.  
82 p. : il.

Tese (Doutorado) -- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2006.

1. Bactéria patogênica 2. Cancro – cítrico 3. Efeito da temperatura 4. Epidemiologia  
5. Lagarta-minadora-dos-citros 6. Laranja doce 7. Molhamento I. Título

CDD 634.31

**“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”**

*Homens não são feitos por palavras,  
mas por atos ....*

*em memória de  
meu pai*

*Dedico,*

*À minha “pequeníssima” família:*

*Meus pais, Theia e Antonio (em memória),*

*pelo amor incondicional e exemplo de dedicação;*

*Aos meus irmãos,*

*Júnio, Neto, Carlinho, Cássia e Vanessa,*

*pelo afeto e presença constante;*

*Aos meus cunhados,*

*Joyce, Maristela, Adriana, Emerson e Arnaldo,*

*pelo companheirismo;*

*Aos meus sobrinhos,*

*Pedro, Carol, Thais, Kamilla e Gabriel,*

*pela alegria e molecagem.*

*À minha segunda família:*

*Beth, por ser um exemplo de mulher;*

*Marcus e Danny, por adicionarem afeto e alegria.*

*À minha ‘Pretinha’,*

*maravilhosa,*

*por me completar.*

## Agradecimentos

A Deus, pela luz que me guia;

À Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz, Setor de Fitopatologia, pela oportunidade de realização do curso de Doutorado;

Ao Prof. Dr. Armando Bergamin Filho, por me tornar um epidemiologista;

À Prof. Dra. Lílian Amorim, pelo 'mega' apoio e exemplo de profissional;

Ao Prof. Dr. José R. P. Parra, por ter disponibilizado o Setor de Entomologia;

À amiga Prof. Dra. Maristela Dalla Pria, pela ajuda constante na condução dos experimentos, paciência e, contudo, por sua pessoa;

À Adriana M. Nascimento, pela amizade e apoio fundamental nos experimentos com *P. citrella*, da qual sem, o trabalho não seria possível;

Aos professores do Setor da Fitopatologia: Aranha, Hiroshi (em memória), Ivan, Jorge, Mentem, Nelson e Sérgio, pelos conhecimentos ministrados e contribuição na minha formação como pesquisador;

Aos funcionários do Setor da fitopatologia, pelos momentos descontraídos;

A todos os amigos, cujos muitos nomes estão omitidos, por tornar jornada do doutorado mais leve e alegre;

À FAPESP, por investir nos novos pesquisadores brasileiros.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>8</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>9</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>10</b>
<b>2 DESENVOLVIMENTO .....</b>	<b>11</b>
<b>2.1 Revisão Bibliográfica .....</b>	<b>11</b>
<b>2.1.1 Suco de laranja, fonte de divisas.....</b>	<b>11</b>
<b>2.1.2 Cancro cítrico, breve histórico.....</b>	<b>12</b>
<b>2.1.3 Agente causal.....</b>	<b>13</b>
<b>2.1.4 Ciclo da doença.....</b>	<b>14</b>
<b>2.1.4.1 Disseminação .....</b>	<b>14</b>
<b>2.1.4.2 Infecção.....</b>	<b>15</b>
<b>2.1.4.3 Colonização/reprodução.....</b>	<b>17</b>
<b>2.1.4.4 Sobrevivência.....</b>	<b>18</b>
<b>2.1.5 Lagarta minadora dos citros.....</b>	<b>19</b>
<b>2.1.6 Um novo patossistema: citros-cancro cítrico-lagarta minadora.....</b>	<b>22</b>
<b>2.2 Material e métodos .....</b>	<b>24</b>
<b>2.2.1 Formação de mudas .....</b>	<b>24</b>
<b>2.2.2 Inóculo .....</b>	<b>25</b>
<b>2.2.3 Segurança fitossanitária .....</b>	<b>25</b>
<b>2.2.4 Suscetibilidade da folha intacta, do ferimento mecânico e da injúria de LMC em diferentes concentrações de inóculo na infecção de <i>Xac</i>.....</b>	<b>26</b>
<b>2.2.5 Período de suscetibilidade da folha intacta, do ferimento mecânico e da injúria de LMC ao cancro cítrico.....</b>	<b>28</b>
<b>2.2.6 Progresso do cancro cítrico em relação à temperatura e molhamento foliar .....</b>	<b>29</b>
<b>2.3 Resultados.....</b>	<b>31</b>
<b>2.3.1 Suscetibilidade da folha intacta, do ferimento mecânico e da injúria de LMC em diferentes concentrações de inóculo na infecção de <i>Xac</i>.....</b>	<b>31</b>

<b>2.3.2 Período de suscetibilidade da folha intacta, do ferimento mecânico e da injúria de LMC ao cancro cítrico.....</b>	<b>42</b>
<b>2.3.3 Progresso do cancro cítrico em relação à temperatura e molhamento foliar .....</b>	<b>52</b>
<b>2.4 Discussão.....</b>	<b>63</b>
<b>3 CONCLUSÃO.....</b>	<b>71</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>72</b>



## RESUMO

### **Cancro cítrico (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*) e sua interação com a lagarta minadora dos citros (*Phyllocnistis citrella*) em laranja doce (*Citrus sinensis*)**

O cancro cítrico, causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*), é um dos mais graves problemas fitossanitário da citricultura brasileira. Com a introdução da lagarta minadora dos citros (*Phyllocnistis citrella* [LMC]), houve um aumento drástico do número de focos do cancro cítrico, além da mudança do padrão espacial de fortemente agregado para moderadamente agregado e ao acaso. Foram avaliados: (1) suscetibilidade de três condições foliares: folha intacta, ferimento mecânico e injúria de LMC nas fases ovo, 1º instar, 3º instar e pupa, inoculados em diferentes concentrações de *Xac* ( $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^4$  e  $10^6$  ufc/ml); (2) período de suscetibilidade da folha intacta, do ferimento mecânico e injúria de LMC inoculados a  $10^6$  ufc/ml; e (3) efeito da temperatura (12, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 42°C) e duração do molhamento foliar (0, 4, 8, 12, 16, 20 e 24 h) em folhas sem ferimento inoculadas a  $10^6$  ufc/ml. A concentração mínima de inóculo para causar sintomas da doença em folha intacta, injúria de LMC fase ovo e 1º instar foi de  $10^4$  ufc/ml; em ferimento mecânico e injúria de LMC fase 3º instar e pupa,  $10^2$  ufc/ml. Injúria da fase pupa resultou em grande severidade do que nos demais tratamentos a  $10^6$  ufc/ml (2 vezes maior do que em folha intacta). O período de suscetibilidade da injúria de LMC foi seis vezes mais longo do que do ferimento mecânico e a máxima suscetibilidade foi três vezes maior que em folha intacta. A LMC está relacionada com o aumento do dano que expõem mesofilo foliar à infecção direta de *Xac*, aumentando a suscetibilidade da folha por longo período. A faixa de temperatura ótima para o desenvolvimento do cancro cítrico foi de 25-35°C. Entretanto, a severidade foi mais alta entre 30-35°C. Sintomas de cancro não desenvolveram a 42°C e na ausência de molhamento foliar. O efeito da temperatura foi maior do que a duração do molhamento foliar. A mínima duração de molhamento para infecção de *Xac* foi menor que 4 horas.

Palavra chave: *Xanthomonas smithii* ssp. *citri*, epidemiologia, molhamento foliar, temperatura, suscetibilidade.

## ABSTRACT

### **Citrus canker (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*) and its interaction with citrus leafminer (*Phyllocnistis citrella*) on sweet orange (*Citrus sinensis*)**

Asiatic citrus canker, caused by *X. axonopodis* pv. *citri* (*Xac*), is one of the most serious phytosanitary problems in Brazilian citrus crops. The introduction of the citrus leafminer (*Phyllocnistis citrella* [CLM]), has resulted in an increase in the number of disease foci and has changed the spatial pattern of citrus canker symptomatic trees from strong aggregation to intermediate aggregation and random patterns. We evaluated: (1) susceptibility of three distinct leaf condition: intact leaves, mechanical wounding, and injury caused by CLM at the egg stage, 1st instar, 3rd instar, and pupal stage, inoculated at different concentration of *Xac* ( $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^4$ , and  $10^6$  cfu/ml); (2) susceptibility period of intact leaves, mechanical wounding, and CLM injury inoculated at  $10^6$  ufc/ml; and (3) effect of temperature (12, 15, 20, 25, 30, 35, 40 and 42°C) and leaf wetness durations (0, 4, 8, 12, 16, 20, and 24 h) on unwounded leaves inoculated at  $10^6$  ufc/ml. The minimum inoculum concentration to cause symptom development in intact leaves, CLM injury at the egg stage and 1st instar was  $10^4$  cfu/ml; in mechanically wounded leaves and CLM injuries at the 3rd instar and pupa stage,  $10^2$  cfu/ml. The injuries from pupa stage resulted in greater disease severity than other treatments at  $10^6$  cfu/ml (two times higher than in the intact leaf). Susceptibility period of CLM injury was six time longer than mechanical wounding and maximum observed susceptibility was three times higher than intact leaf. CLM is related to the amount of damage that exposes mesophyll cells to direct *Xac* infection, increasing the susceptibility of leaf for long period. Optimal temperature for development of citrus canker was 25–35°C. However, disease severity was highest in the range 30–35°C. Symptoms did not develop at 42°C and zero hour of leaf wetness duration. Effect of temperature was .greater than leaf wetness duration. The minimum wetness duration for *Xac* infection was as short as 4 h.

Keywords: *Xanthomonas smithii* ssp. *citri*, epidemiology, leaf wetness, temperature, susceptibility.

## 1 INTRODUÇÃO

A citricultura destaca o Brasil na primeira posição no ranking mundial de produção e exportação de laranja. Cerca de metade do consumo mundial de suco de laranja é abastecida pelo País. O suco de laranja ocupa o 23º ranking dos produtos nacionais mais exportados e o 5º ranking de produtos agrícolas, gerando anualmente mais de um bilhão de dólares.

A competitividade brasileira na produção de citros apresenta grandes barreiras e desafios, principalmente relacionados a problemas fitossanitários, como o cancro cítrico, exigindo uma constante busca de conhecimento científico e tecnológico.

O cancro cítrico, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* Vauterin et al. (*Xac*), é uma das mais graves doenças da citricultura brasileira. A doença causa danos diretos na produção, como queda precoce de frutos. Entretanto, o maior impacto econômico está relacionado à restrição na comercialização de frutos e mudas para áreas livres do patógeno e a erradicação das árvores de citros doentes e das adjacentes a essas (principal método de controle).

Após a introdução, em 1996, de uma nova praga dos citros, *Phyllocnistis citrella* Stainton, conhecido como ‘lagarta minadora dos citros’ (LMC), houve um grande aumento no número de focos de cancro cítrico nos pomares, tornando a doença mais severa. A mudança do comportamento do cancro cítrico foi associada com as galerias feitas pela LMC na superfície das folhas de citros, favorecendo a infecção de *Xac* diretamente no mesófilo foliar exposto e a disseminação de *Xac* pela LMC no interior das galerias.

O conhecimento da estrutura e do comportamento da interação ‘*Citrus-Xanthomonas-Phyllocnistis*’ é essencial para a definição de medidas de controle mais eficientes do cancro cítrico.

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo investigar: (i) a suscetibilidade da folha sem ferimento (folha intacta), com ferimento mecânico e com injúria de LMC em diferentes concentrações de inóculo; (ii) o período de suscetibilidade da folha intacta, do ferimento mecânico e da injúria de LMC; e (iii) a influência da temperatura e da duração do molhamento foliar no desenvolvimento do cancro nas principais cultivares de citros: laranja Pêra, Natal, Valência e Hamlin.

## **2 DESENVOLVIMENTO**

### **2.1 Revisão Bibliográfica**

#### **2.1.1 Suco de laranja, fonte de divisas**

Em 2004, em termos de divisas, as exportações de sucos de laranja concentrado e subprodutos e de frutas de mesa captaram mais de US\$ 1,05 bilhão para o Brasil. O país é líder mundial nas exportações de suco de laranja. Cerca de metade do consumo mundial é abastecida pelo país. O suco de laranja ocupa a 23ª posição no ranking dos produtos nacionais mais exportados e a 5ª na categoria de produtos agrícolas (ANÁLISE EDITORIAL, 2005).

No Brasil, mais de 77% da produção de citros está concentrada no Estado de São Paulo. A citricultura paulista é a maior produtora mundial de citros, sendo composta em 90% por pomares de laranja doce. As principais cultivares de laranja doce são Pêra, Natal, Valência e Hamlin. O Estado também é responsável por 80% da produção de limão e 50% de tangerina (FNP, 2005).

A citricultura é a principal fonte econômica de 330 municípios paulistas e do Triângulo Mineiro, gerando mais de 420 mil empregos diretos e movimentando US\$ 7 bilhões anualmente (Souza, 2000).

A maior parte da citricultura (90%) é destinada para produção de suco de laranja concentrado. A pequena parcela da citricultura de frutas de mesa sofre com barreiras não-tarifárias, principalmente a fitossanitária, em importantes mercados importadores como os Estados Unidos e a União Européia.

A competitividade brasileira na produção de citros vem sendo ameaçada pelo graves problemas fitossanitários da citricultura, aumentando o custo de produção e desestimulando o citricultor.

### 2.1.2 Cancro cítrico, breve histórico

O cancro cítrico é originário do Sudoeste da Ásia, mesmo centro de origem dos citros, sendo por isso denominado também como cancro cítrico asiático. O cancro cítrico foi descrito pela primeira vez no ano de 1915 quando se deu a sua introdução nos EUA (HASSE, 1915). A constatação mais antiga da doença data entre 1827 e 1831, feita em folhas herbarizadas de *Citrus medica* provenientes da Índia (FAWCETT; JENKINS, 1933).

A disseminação do cancro cítrico para várias regiões do mundo, como Japão, Austrália, Nova Zelândia, Ilhas do Pacífico, sul e centro da África, sul da América e EUA, ocorreu, principalmente, através do transporte de mudas infectadas. Em muitas dessas regiões, a doença ocorre endemicamente, como na Argentina, Paraguai e Uruguai (LEITE JUNIOR, 1990). O sucesso da erradicação da doença foi mérito de poucos países, como Austrália, África do Sul e Nova Zelândia. Nos EUA, o cancro cítrico, apesar ter sido considerado erradicado em 1933 (DOPSON, 1964), foi re-introduzido diversas vezes no Estado da Flórida entre os anos de 1986 e 2001 (SCHUBERT et al., 2001; SCHUBERT; MILLER; GABRIEL, 1996; STALL; CIVEROLO, 1991).

A primeiro relato do cancro cítrico no Brasil foi feito no ano de 1957, na região de Presidente Prudente, em São Paulo (ROSSETTI, 1977). No mesmo ano foi identificado também no estado do Paraná, no município de Lupionópolis (LEITE JUNIOR, 1990). Para conter a disseminação e eliminar focos da doença foi criada a Campanha Nacional de Erradicação do Cancro Cítrico. Entretanto, apesar dos esforços para conter a doença, o cancro cítrico foi disseminado para vários estados. O cancro cítrico foi constatado nos estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Minas Gerais e, no ano de 2002, em Roraima (NASCIMENTO et al., 2003; MACIEL et al., 1998; FEICHTENBERGER; MÜLLER; GUIRADO, 1997).

A campanha de erradicação em São Paulo, apesar de não conseguir eliminar o cancro cítrico de seus pomares, permitiu durante várias décadas um relativo controle da doença e impediu a sua introdução na área nobre da citricultura paulista (FUNDECITRUS, 2006).

A partir do ano de 1996, com ocorrência da lagarta minadora do citros (LMC), inseto que abre galerias dentro das folhas de citros, houve um agravamento da doença. O número de focos

do cancro cítrico nos pomares aumentou drasticamente. Em São Paulo, a incidência da doença aumentou gradativamente. No ano 1999, o cancro cítrico era 1000 vezes mais severo que em 1995. Aproximadamente, 0,7% dos talhões dos pomares paulista estavam infectados (FUNDECITRUS, 2006; BARBOSA et al., 2001).

Houve uma mudança nas características epidemiológicas do patossistema do cancro cítrico em vigência, citros-*Xanthomonas*-LMC, diferindo das características do patossistema que existiu de 1957 a 1996, citros-*Xanthomonas* (BERGAMIN FILHO et al., 2001).

Uma nova legislação entrou em vigor em 1999 para conter o avanço do cancro cítrico. Em razão da nova campanha de erradicação, a incidência de cancro cítrico decresceu de 0,7% para aproximadamente 0,2% nos anos seguintes (FUNDECITRUS, 2006). A erradicação continua mostrando ser uma estratégia viável de controle do cancro cítrico.

### 2.1.3 Agente causal

A bactéria patogênica que causa o cancro cítrico é formalmente nomeada *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (VAUTERIN et al., 1995). A taxonomia do agente causal é bastante controversa, sendo constantemente revisada em razão do avanço das técnicas moleculares. Schaad et al. (2000) propôs a reclassificação para *Xanthomonas citri*, assim como foi feito posteriormente por Brunings e Gabriel (2003). Uma recente reclassificação para *Xanthomonas smithii* ssp. *citri* foi proposta por Schaad et al. (2005). Em virtude das constantes controvérsias das reclassificações, o autor do presente trabalho adotou o nome formal, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*), para o agente causal do cancro cítrico.

*Xac* pertence ao grupo das *Xanthomonas* (Bacteria, Proteobacteria, Subdivisão Gamma, Xanthomadales) e apresenta reação gram-negativa, respiração aeróbica, formato baciliforme e motilidade por um flagelo polar (monotríquia). A bactéria produz polissacarídeos extracelulares que auxiliam na sua dispersão e sobrevivência (GOTO; HYODO, 1985). Em meio nutritivo sólido, colônias de *Xac* são visíveis após 2-3 dias de incubação a 28°C (ROSSETTI et al., 1981).

O cancro cítrico também é denominado como cancro cítrico asiático ou cancrose A, sendo patogênico à maioria das espécies da família Rutacea, principalmente ao gênero *Citros*. Diversas espécies, híbridos e cultivares de citros podem apresentar diferentes níveis de suscetibilidade (GOTO, 1992; GOTTWALD et al., 1993; GRAHAM, 2001; LEITE JUNIOR; MOHAN, 1984a; ZUBRZYCKI; ZUBRZYCKI, 1981; KOIZUMI; KUHARA, 1982).

## **2.1.4 Ciclo da doença**

### **2.1.4.1 Disseminação**

O principal agente de disseminação do cancro cítrico é a chuva. As gotas chocam-se com a massa bacteriana de *Xac* exsudada pelas lesões de cancro cítrico, respingando gotículas de água contendo células bacterianas que podem atingir outros ramos da mesma planta ou das plantas vizinhas. A concentração do inóculo em gotas provenientes de folhas com lesões de cancro podem conter até  $10^8$  unidades formadoras de colônia (ufc) por ml (GOTO, 1992; STALL et al., 1980).

Na presença de vento, as gotículas podem ser carregadas a distâncias mais longas (GOTTWALD; McGUIRE; GARRAM, 1988; GOTTWALD; TIMMER, 1995). Stall et al. (1980) relatou a dispersão de *Xac* em até 32m de distância da planta foco, na Argentina. Entretanto, na presença de fortes tempestades, a dispersão pode alcançar distâncias mais longas, 10-15km (GOTTWALD; GRAHAM; SCHUBERT, 1997). No Sudeste brasileiro, o verão favorece a disseminação do cancro cítrico pela combinação de três fatores essenciais à dispersão da doença: altas temperaturas, chuvas intensas associadas com ventos fortes e novas brotações nos pomares (PALAZZO; MALAVOLTA JUNIOR; NOGUEIRA, 1984).

Na presença de alta umidade, as lesões de cancro exsudam *Xac* para a superfície. Em lesões novas a exsudação é instantânea quando há filme de água sobre as lesões, enquanto que em

lesões velhas e suberizadas, a liberação ocorre lentamente (TIMMER; GOTTWALD; ZITKO, 1991).

A disseminação de *Xac* para outras regiões normalmente é feita pela ação do homem, transportando mudas de citros, resto de cultura (frutos ou folhas) e equipamentos contaminados. No Brasil, a entrada do cancro cítrico em outros estados ocorreu principalmente devido ao transporte clandestino de mudas cítricas.

#### **2.1.4.2 Infecção**

A bactéria do cancro cítrico é capaz de infectar folhas, ramos e frutos. A via de penetração é passiva, ganhando o interior dos tecidos de citros através de aberturas naturais, como estômatos, e de ferimentos causados mecanicamente (espinhos, grãos de areia) ou pela atividade de insetos.

A concentração de inóculo para causar infecção varia de acordo com a via de penetração, sendo suficiente as concentrações de  $10^4$  a  $10^5$  ufc/ml para infecções via estômato e  $10^2$  ufc/ml para ferimento (ZUBRZYCKI; ZUBRZYCKI, 1987; GOODMAN, 1982). Entretanto, uma vez no interior do tecido, *Xac* apresenta uma alta capacidade de infectar, como foi demonstrado por Gottwald e Graham (1992), que inocularam duas células de *Xac* no interior da câmara sub-estomática.

Fatores climáticos exercem importante papel no sucesso da infecção. Temperaturas baixas afetam negativamente. A temperatura ótima para infecção é citada entre 20 e 30°C (KOIZUMI, 1977; PELTIER, 1920). A duração do molhamento foliar e a extensão do filme de água sobre a folha influenciam na capacidade da bactéria em ganhar o interior da câmara sub-estomática ou do ferimento.

Nas folhas de citros, a face abaxial apresenta uma elevada densidade de estômatos, favorecendo um maior número de sítios de infecção (GRAHAM et al., 1992a; MCLEAN, 1921).



Em tecidos foliares, o período de expansão da folha é mais suscetível que aquele posterior à maturação. Nos frutos, o período de suscetibilidade ocorre entre 60 a 90 dias após a sua formação (LEE, 1922; STALL et al., 1982; GOTTWALD; GRAHAN, 1992; GRAHAM et al., 1992b).

Stall et al. (1982) mencionam que a diminuição da suscetibilidade em folha de citros ao longo de sua maturação está associada com a resistência do mesofilo foliar à multiplicação de *Xac*. Entretanto cultivares de citros resistentes ao cancro, como mandarin, comportam-se como suscetíveis quando inoculadas via ferimento. Aparentemente, a suscetibilidade do mesofilo foliar é semelhante entre cultivares resistentes e suscetíveis quando a infecção ocorre via ferimento, como demonstrado em diversos trabalhos (LEE, 1922; PELTIER, 1924; LEITE JUNIOR; MOHAN, 1984a; AGOSTINI et al., 1985; MATSUMOTO; OKUDAI, 1988; GOTTWALD et al., 1993). Segundo McLean e Lee (1921). O ferimento permite o contato direto da bactéria com o mesofilo da folha, quebrando qualquer eventual resistência estrutural da planta à infecção bacteriana.

Gottwald e Graham (1992) observaram que a pressão requerida para a entrada de inóculo na câmara sub-estomática aumentou drasticamente de folhas na fase 2/3 de expansão (folhas jovens) para folhas totalmente expandidas (folha madura). No trabalho de Graham et al. (1992a) a diferença foi associada com o espessamento da cutícula foliar. Em folhas jovens, em expansão, a fina parede celular e camada de cera oferecem menor resistência à entrada de água nos tecidos em relação a folhas maduras, totalmente expandidas, cujas parede celular e camada de cera são espessas.

McLean (1921) propôs que as características morfológicas do estômato são responsáveis pela variação na resistência ao cancro cítrico entre grapefruit (susceptível) e mandarim (resistente). Entretanto, Graham et al. (1992a) compararam a morfologia dos estômatos das mesmas cultivares por microscopia eletrônica de varredura e não observaram diferença significativa entre a área de abertura dos estômatos, câmara sub-estomática, quantidade de estômatos abertos e quantidade total de estômatos. A ausência de diferença na morfologia dos estômatos foi também observada entre folhas na fase 2/3 de expansão e totalmente expandida.

Graham et al. (1992a e 2004) propõem que as características da folha que influenciam na infiltração da água e no enxarcamento do tecido foliar, como cutícula e cera, são mais

importantes para o sucesso da penetração da bactéria do que as diferenças em densidade e estrutura de estômatos.

#### **2.1.4.3 Colonização/reprodução**

Uma vez no interior do tecido de citros, a colonização por *Xac* restringe-se ao sítio de infecção. No início da colonização, as células de *Xac* multiplicam-se no espaço intercelular envolvidas por uma matriz de polissacarídeo extracelular. Após 7 a 10 dias da infecção, no sítio de infecção, aparecem lesões salientes formadas por hipertrofia e hiperplasia de células do mesófilo foliar. As lesões apresentam coloração amarela no início de sua formação e vão se tornando de cor marrom e corticosa ao longo do tempo. Ao redor das lesões podem-se formar halos cloróticos e/ou halos aquosos. Lesões oriundas de infecção via estômato são tipicamente visíveis em ambas as faces da folha.

A taxa de expansão da lesão em folha é aproximadamente de 1 mm por mês durante 6 a 8 meses. Em ferimento mecânico (agulha histológica) as lesões crescem rapidamente até os 30 dias após a inoculação. Dos 30 a 40 dias, as lesões expandem-se lentamente e a partir dos 40 dias, a taxa de expansão decresce a próximo de zero (GRAHAM; GOTTWALD; FARDELMAN, 1990).

A multiplicação de *Xac* no sítio de colonização ocorre somente durante a fase de expansão da lesão. A população de bactéria produzida por lesão está fortemente relacionada ao tamanho da lesão (GRAHAM et al., 1992a).

Espécies de citros suscetíveis ao cancro cítrico normalmente apresentam uma quantidade de lesões inferior às espécies resistentes. Entretanto, materiais suscetíveis podem conter um número de lesões semelhante ou menor que a resistente, porém a população bacteriana por lesão é significativamente superior (GRAHAM; GOTTWALD; FARDELMAN, 1990).

Graham et al. (1992a) observaram resistência do mesófilo foliar à colonização de *Xac* em citros resistentes ao cancro, como previamente postulado por Stall et al. (1982). Plantas suscetíveis e resistentes foram inoculadas via estômato com algumas células de *Xac*. No início da

colonização não houve diferença entre as populações coletadas. A diferença, no entanto, foi aumentando ao longo do tempo. A expressão da resistência do mesófilo somente ocorreu horas após a infecção, reduzindo a taxa de crescimento da população de *Xac*.

#### 2.1.4.4 Sobrevivência

A principal fonte de sobrevivência de *Xac* são lesões de cancro em ramos de citros. Em ramos vivos, lesões de cancro são viáveis por vários anos (GOTO, 1992; KOIZUMI, 1977). Em folhas e frutos, *Xac* sobrevive de uma estação para outra antes deles caírem. A viabilidade da lesão dependerá da longevidade do tecido de citros infectado. Sem a proteção no interior da lesão, *Xac* sobrevive poucas horas na superfície, exposta à dessecação e raios solares (GRAHAM et al., 2000).

As condições tropicais favorecem o crescimento contínuo da população bactéria nas margens de lesão velha, enquanto que em condições de baixa temperatura, a população declina rapidamente (PRUVOST et al., 2002).

Células de *Xac*, exsudadas sobre a superfície da lesão, produzem matriz de polissacarídeo extracelular que auxilia na fixação e proteção à dessecação, favorecendo a dispersão e a sobrevivência (GOTO; HYODO, 1985).

Na ausência de citros, *Xac* possui um período relativamente curto de sobrevivência devido ao antagonismo e competição de microorganismos saprófitas. Em folhas e frutos em decomposição, a sobrevivência de *Xac* é de 1 a 2 meses (GRAHAM et al., 1989; LEITE JUNIOR, 1990). Entretanto, se os tecidos infectados forem preservados em local seco e sem contato com o solo, *Xac* pode sobreviver por vários anos (GOTO, 1992).

Células de *Xac* livres no solo sobrevivem por alguns dias. Porém, na rizosfera de gramíneas, como capim amargoso (*Trichachne insularis*) e capim colônia (*Panicum maximum*), a sobrevivência pode chegar a meses (GOTO; OHTA; OKABE, 1975; PEREIRA et al., 1976 e

1978). Contudo, não há evidências que células de *Xac* que sobrevivem no solo ou rizosfera possam ser fonte de inóculo (GOTO; OHTA; OKABE, 1975).

Em materiais feitos de metal, plástico, tecido ou madeira, expostos no sol ou na sombra, a capacidade de sobrevivência de *Xac* é de 24 a 72 horas (GRAHAM et al., 2000).

### 2.1.5 Lagarta minadora dos citros

A lagarta minadora dos citros (LMC), fase imatura de *Phyllocnistis citrella* Stainton, tem o centro de origem no Sudeste da Ásia. O primeiro relato foi feito em 1856, a partir de espécimes coletados na Índia. LMC ficou restrita por anos à região da Oceania, ao leste da África, Ásia, Austrália, China, Índia, Japão, Filipinas, Tailândia, Nova Guiné e Ilhas do Pacífico. A primeira constatação nas Américas foi em 1993, nos pomares da Flórida, EUA. Posteriormente foi encontrada no México e Honduras. Em 1996, a LMC estava presente no Caribe, América Central e nos países do norte da América do Sul (KNAPP et al., 1993; PEÑA; DUNCAN; BROWNING, 1996; PERIOTO, 1997).

No Brasil, a LMC foi constada pela primeira vez em março de 1996, na região de Limeira, no sul do Estado de São Paulo (FEICHTENBERGER; RAGA, 1996). No final do mesmo ano, a praga foi encontrada em diversos estados ao longo do país, como Piauí, sul de Minas Gerais, oeste do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Em um a dois anos após a sua detecção, LMC estava presente em todas as regiões citrícolas do país (CHIARADIA; MILANEZ, 1997; LOLATO; MORAES, 1997; LOPES; PAMPLONA; TELES, 1997; LIMA; AGUIAR, 1997; MOREIRA; MEDEIROS; DUARTE, 1997; SILVA et al., 1997; RODRIGUES et al., 1998; MORAES et al., 1999). Na Argentina, a LMC foi encontrada no final de 1996, dispersando-se rapidamente também por todo o país (SACARIAS; CANALES, 1999).

O adulto da LMC (*P. citrella*) é um microlepidóptero da família Gracillariidae. Por ser um lepidóptero, os entomologistas nomeiam ‘lagarta’ a fase larval de *P. citrella*, como é feito para outros lepidópteros na fase larval. O inseto é diminuto, cerca de 4 mm de envergadura. As asas anteriores são cobertas com escamas de coloração branca e prata brilhante com uma mancha

preta bem característica na região apical da asa anterior. As asas posteriores e o corpo são brancos.

*P. citrella* pode ter de 5 a 13 gerações em um ano. Os adultos machos e fêmeas apresentam longevidade de 1 a 7,5 e 1 a 22,5 dias, respectivamente. As fêmeas, durante esse período, ovipositam entre 21 a 28 ovos, dependendo da espécie hospedeira (CLAUSEN, 1931; RADKE; KANDALKAR, 1987; BATRA et al., 1988; HUANG; LI, 1989; WILSON, 1991).

Chagas e Parra (2000) desenvolveram uma metodologia de criação de *P. citrella* em condições de laboratório. Plantas de limão Cravo (*Citrus limonia* L. Osbeck) com 25 a 30 cm de altura, cultivadas em tubetes de 20 cm por 1,5 cm, são podadas a 1/3 do seu ápice. As plantas, apresentando brotações recém emergidas, com cerca de 6 mm de folhas tenras, são colocadas em gaiola entomológica com casais de *P. citrella*, na proporção de um inseto para cada três plantas, nas condições de 60% UR e fotofase de 14 h. O tempo de exposição é de no máximo 3 dias, resultando mais de 70% das plantas infestadas com ovos. O período de incubação do ovo e a duração dos ínstaes variam em função da temperatura. Folhas com pupas são depositadas em câmaras de emergência. Após a emergência, os adultos são liberados no interior das gaiolas de postura.

A oviposição é feita preferencialmente (acima de 80%) na superfície abaxial das folhas. Os ovos concentram-se, em mais de 80%, nas porções mediana e apical das folhas e principalmente (72,8%) na nervura principal. Em casos de alta infestação, é comum encontrar ovos nos dois lados do limbo foliar (CHAGAS; PARRA, 2000).

Os ovos de *P. citrella* são de difícil visualização a olho nu, sendo convexos, translúcidos e medindo 0,3 x 0,2 mm. Os ovos tornam-se mais visíveis próximos à eclosão, quando assumem coloração amarela opaca (BATRA et al., 1988; GARIJO; GARCIA, 1994; HEPPNER, 1995; ALBA, 1996). O tempo de duração da fase ovo é de 2,1 dias, a 25°C (CHAGAS; PARRA, 2000).

Após a eclosão, a LMC penetra rapidamente no tecido foliar iniciando a construção de minas típicas em forma de serpentina e de coloração prateada, tornando as folhas retorcidas no final do ataque. Normalmente, apenas uma lagarta se desenvolve por folha, entretanto podem ocorrer de 2 a 3 lagartas/folha em altas infestações. *P. citrella* apresenta quatro estádios larvais: 1º ínstar, 2º ínstar, 3º ínstar e 4º ínstar, e a duração de cada estádio é de 1,5; 1,7; 1,6 e 0,8 dia respectivamente, a 25°C (CHAGAS; PARRA, 2000).

A formação da pupa ocorre dentro da mina, em uma câmara pupal, localizada na maioria das vezes à margem da folha, formada pelo enrolamento de sua borda, unida por fios de seda. A fase pupa, a 25°C, dura cerca de 8,1 dias (CHAGAS; PARRA, 2000).

Os estádios de desenvolvimento da LMC, descritos por Chagas e Parra (2000), são afetadas pela temperatura. As fases de ovo a pupa podem variar de 32,8 e 11,4 dias nas temperaturas de 18°C e 32°C, respectivamente, em condições de laboratório, com 60% UR e fotofase de 14 h. Em condições de campo, Paiva et al. (1998) também relataram a influência da temperatura na duração do ciclo larval de LMC, variando de 16 dias no inverno (temperatura baixa) a 7 dias no verão (temperatura elevada) em condições de campo.

Embora *P. citrella* tenha preferência por folhas novas, as lagartas podem se desenvolver no interior do pecíolo das brotações ou até mesmo em frutos (SPONAGEL; DÍAZ, 1994; HEPPNER, 1995).

Esta praga ataca principalmente plantas da família Rutacea, sendo atraída principalmente por plantas do gênero *Citrus* (HEPPNER, 1993; ARGOV; ROSSLER, 1996). O adulto não causa danos. Somente durante a fase imatura que *P. citrella* tem importância direta para a citricultura. A LMC alimenta-se do tecido paliçádico de folhas novas, formando galerias (minas) entre a epiderme e o parênquima. As folhas infestadas se enrolam e tornam-se cloróticas ou até necróticas, reduzindo a sua capacidade fotossintética. Em alto nível de infestação da praga, ocorre queda prematura de folhas, redução de crescimento e desenvolvimento das brotações e diminuição de produtividade (CLAUSEN, 1931; HUANG; LI, 1989; WILSON, 1991; HEPPNER, 1993; ARGOV; ROSSLER, 1996; PEÑA; DUNCAN; BROWNING, 1996; MORAES et al., 1999; NASCIMENTO et al. 2003). Entretanto, os danos indiretos são os mais graves. O mesofilo foliar exposto pela galeria aberta pela minadora pode permitir a entrada direta de microrganismos fitopatogênicos, como *Xac*, e fungos saprófitas, como *Alternaria* spp. e *Paecilomyces* spp. (SOHI; SANDHU, 1968; COOK, 1988).

### 2.1.6 Um novo patossistema: citros-cancro cítrico-lagarta minadora

Com o surgimento da LMC a partir de 1996, houve um considerável aumento na severidade do cancro cítrico e mudança do comportamento da doença em pomares do Paraná, Rio Grande do Sul e São Paulo (BERGAMIN FILHO et al., 2001; RODRIGUES et al., 1998).

A incidência do cancro cítrico em pomares de citros no Estado de São Paulo era relativamente baixa. Em 1995, a incidência foi de 45 focos em todo o estado. Após a introdução da LMC, o número de focos aumentou drasticamente e, em 1999, foram registrados 4180 focos (FUNDECITRUS, 2006).

O padrão espacial do cancro cítrico, nos anos anteriores a 1996, era fortemente agregado, com ocorrência de disseminação principalmente por respingos de chuva da planta foco para as plantas adjacentes. Após 1996, o padrão espacial passou a ser moderadamente agregado a ao acaso, com disseminação por respingos de água e por aerossóis, alcançando distâncias mais longas (BERGAMIN FILHO et al., 2001).

Levantamentos realizados em pomares de citros infectados com *Xac* em outros países, como nos EUA, no Estado da Florida, têm demonstrado também mudança na epidemiologia do cancro cítrico após a introdução da LMC (GOTTWALD; GRAHAM; SCHUBERT, 1997).

A mudança no comportamento do cancro cítrico foi relacionando com uma provável interação da LMC com a *Xac* através de duas hipóteses (GOTTWALD; GARNSEY, 1991; GOTTWALD; GRAHAM, 1992; GOTTWALD et al., 1993; GOTTWALD; GRAHAM; SCHUBERT, 1997). A primeira hipótese sugere que o mesofilo foliar exposto pelo processo de alimentação e formação das galerias de LMC favorece a penetração direta *Xac* no tecido foliar. A segunda sugere que a LMC em contato com células de *Xac* pode transportar e disseminar a bactéria no interior da galeria durante o processo de formação da mina, proporcionando numerosas infecções no mesofilo da folha.

A ausência de indícios da aquisição de *Xac* pelo adulto de *P. citrella* e, conseqüentemente, a transmissão da bactéria pela lagarta na folha infestada, demonstram que *P. citrella* não é um eficiente vetor (CHAGAS et al., 2001; BELASQUE et al., 2005).

As injúrias de LMC em folhas jovens de citros podem cobrir toda a área foliar (RODRIGUES et al., 1998), transformando os aerossóis em mecanismos eficientes de disseminação da doença. As injúrias de LMC permitem a penetração de *Xac* no mesofilo exposto durante um período de 10 a 14 dias, enquanto que nos ferimentos mais severos, como aqueles produzidos por espinhos ou vento, esse período é de um ou dois dias (GOTO, 1990).

Segundo Koizumi et al. (1996), na coincidência do fluxo de brotação do citros com a presença da minadora e de aerossóis, células bacterianas capazes de causar infecção podem alcançar distâncias superiores a um quilômetro.

Folhas com galerias de LMC apresentam maior taxa de incidência e uma maior quantidade de lesões de cancro do que folhas não infestadas pela LMC (SOHI; SANDHU, 1968; COOK, 1988; HEPPNER, 1993). Em hospedeiros moderadamente resistentes, como mandarin, a infecção de *Xac* ocorre freqüentemente em sinergismo com a LMC.

O patossistema que ocorre hoje no Brasil, citros-*Xac*-LMC, tem características epidemiológicas diferentes daquele patossistema que existiu no país de 1957 a 1996, citros-*Xac* (BERGAMIN FILHO et al., 2001). Informações precisas sobre esse aspecto do ciclo da doença são indispensáveis para que uma estratégia racional de controle da doença possa ser proposta, seja para tornar a erradicação mais eficiente, seja para tornar o convívio com o patógeno menos oneroso ao produtor (AMORIM; BERGAMIN FILHO, 2001).



## 2.2 Material e métodos

### 2.2.1 Formação de mudas

As mudas das cultivares laranja Natal, Pêra, Valência e Hamlin foram obtidas através do plantio das sementes das respectivas cultivares em substrato de vermiculita e composto vegetal, em tubetes de 20 cm de altura por 1,5 cm de diâmetro.

A produção de mudas em tubetes foi realizada devido à necessidade de conduzir os experimentos em salas fechadas e com espaço físico restrito, a fim de cumprir as normas de segurança fitossanitária referentes ao cancro cítrico. Grades de tubos de ensaio de 40 lugares foram utilizadas como suporte para as plantas em tubetes.

Mudas com 20 a 25 cm de altura foram podadas a, aproximadamente, 1/3 de seu ápice e mantidas em casa de vegetação com sistema de irrigação por micro-aspersão no campo experimental do Setor de Entomologia/ESALQ. Após 20 dias da poda, as brotações emergentes das plantas estavam aptas a serem empregadas nos experimentos.

Nos experimentos com a lagarta minadora dos citros, as mudas de laranja doce foram infestadas pela lagarta utilizando-se a metodologia desenvolvida por Chagas e Parra (2000). As mudas de laranja Natal, Pêra e Valência, com brotação de novos ramos e folhas, apresentando folhas novas e tenras de 6 a 10 mm de comprimento, foram transferidas para gaiola entomológica contendo casais de *P. citrella*, a 25°C, 60 % UR e fotofase de 14 h. Após dois dias de oviposição, as mudas foram retiradas da gaiola e somente as que apresentavam ovos de LMC na superfície das folhas novas foram utilizadas nos experimentos com LMC.

### 2.2.2 Inóculo

O isolado de *X. axonopodis* pv. *citri* (estirpe IBSBF 1421), utilizado em todos os experimentos, foi fornecido pelo Dr. Júlio Rodrigues Neto, do Laboratório de Bacteriologia Vegetal do Instituto Biológico de São Paulo, Campinas/SP.

Para manutenção e preservação da viabilidade da bactéria foi empregado o método de Castellani (1939) para o armazenamento do inóculo a curto período (máximo de 6 meses) e o método de congelamento a - 80°C em glicerol 10% ao longo prazo (QUADLING, 1960), preservando o inóculo durante o período de condução do experimento.

O inóculo foi obtido a partir de cultura bacteriana de *Xac* cultivada em meio nutriente-agar (NA) por 48 horas a 28° C. A cultura da bactéria foi suspendida em água destilada e estéril. A concentração da suspensão bacteriana foi ajustada por turbidimetria, em espectrofotômetro a 480 nm, cuja transmitância de 51,2% corresponde à concentração de  $3,4 \times 10^8$  ufc/ml. Depois, o inóculo foi diluído em água destilada esterilizada na concentração desejada.

### 2.2.3 Segurança fitossanitária

O cancro cítrico é uma doença quarentenária e sujeita a erradicação no Estado de São Paulo. Para conduzir os experimentos, medidas de segurança foram adotadas: (i) condução dos experimentos somente em salas fechadas, sem janelas, destinadas exclusivamente ao projeto; (ii) presença de ante-sala com tela anti-afídeos e pedelúvio com amônio quaternário para a desinfestação da sola dos calçados; (iii) restrição ao acesso de pessoas não vinculadas ao projeto.

Todos os materiais utilizados no projeto foram esterilizados conforme as normas de segurança fitossanitária referentes ao cancro cítrico. As vidrarias e mudas descartadas no final das avaliações foram esterilizados via autoclave. As prateleiras, câmaras de crescimento, mesas e outros foram esterilizados com amônio quaternário e/ou hipoclorito de sódio a 5%.

#### **2.2.4 Suscetibilidade da folha intacta, do ferimento mecânico e da injúria de LMC em diferentes concentrações de inóculo na infecção de *Xac***

O efeito de diferentes condições foliares na infecção de *Xac* foi testado: (1) folhas intactas (penetração via estômato), (2) ferimento mecânico, e (3) injúria causada por LMC. Todos os tratamentos foram realizados em mudas de laranja Natal, Pêra e Valência apresentando folhas novas (menos que 75% de expansão foliar).

O ferimento mecânico em folhas foi obtido perfurando-se as folhas novas com agulha histológica em 6 pontos equidistantes. As folhas infestadas com LMC foram obtidas segundo a metodologia de Chagas e Parra (2000) e as plantas separadas em 4 fases de desenvolvimento da LMC: (1) fase ovo, caracterizada pela presença do ovo de *P. citrella*; (2) 1º ínstar, caracterizado por uma injúria linear paralela à nervura principal, (3) 3º ínstar, caracterizado por 75% do limbo foliar injuriado; e (4) fase pupa, caracterizado por cerca de 100% do limbo foliar injuriado e a presença de pupa no bordo da folha.

Mudas com folhas intactas, ferimento mecânico e injúria de LMC foram inoculadas por aspersão com suspensão de *Xac* nas concentrações de  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^4$  e  $10^6$  ufc/ml. Depois de inoculadas, as plantas foram mantidas em condições de câmara úmida em caixas de acrílico por 72 h a 28°C e fotofase de 12 h. Posteriormente, as plantas foram transferidas para prateleiras, sob as mesmas condições de temperatura e fotofase.

A inoculação por aspersão foi obtida com o emprego de bomba a vácuo com pulverizador, inoculando-se os dois lados do limbo foliar, tomando-se o cuidado em enxaguar o pulverizador no ato da troca da concentração de inóculo. A câmara úmida foi obtida através caixas de acrílico vedadas, com as paredes umidecidas.

O experimento teve um total de 72 tratamentos (6 condições foliares x 4 concentrações de inóculo x 3 cultivares de citros), cada tratamento repetido 8 vezes, em delineamento completamente casualizado. O experimento foi repetido duas vezes.

A incidência de cancro cítrico (% de plantas doentes) foi avaliada a cada dois dias. Aos 30 dias após a inoculação, nos tratamentos de concentração de  $10^4$  e  $10^6$  ufc/ml, coletou-se uma

folha de cada planta com lesões de cancro cítrico, totalizando 8 folhas por tratamento. O mesmo procedimento foi realizado 50 dias após a inoculação para os tratamentos de  $10^1$  e  $10^2$  ufc/ml.

O prazo de trinta dias para coleta das folhas foi determinado através de estudos que demonstram que a taxa de expansão de lesões em folhas é aproximadamente de 1 mm por mês durante 6 meses. Em ferimento mecânico (agulha histológica), as lesões crescem rapidamente até os 30 dias após a inoculação a partir do qual a expansão decresce até próximo de zero (GRAHAM; GOTTWALD; FARDELMAN, 1990). A diferença no tempo de coleta das folhas dos tratamentos com alta e baixa concentração foi pelo fato dos sintomas desenvolverem-se lentamente em baixa concentração de inóculo (GOODMAN, 1982).

As folhas coletadas foram digitalizadas e a severidade da doença de cada folha determinada por software de quantificação de doença, QUANT v.1.0 (VALE et al., 2003). Nas folhas com ferimento mecânico ou injúria de LMC, somente as lesões associadas ao trauma foram mensuradas e a severidade calculada em relação à área foliar. Lesões nas partes não danificadas da folha não foram mensuradas para demonstrar o efeito isolado da injúria na infecção e subsequente desenvolvimento dos sintomas.

Com os dados de incidência foi obtido o período de incubação. O período de incubação, definido como o tempo compreendido entre a deposição do patógeno sobre o hospedeiro (ou inoculação) e o aparecimento dos sintomas visíveis (VANDERPLANK, 1963; BERGAMIN FILHO; AMORIM, 1996), foi determinado para cada tratamento quando 50% das plantas apresentavam lesões, obtendo-se o período de incubação médio em dias.

O tamanho de lesão foi determinado através da área total de lesões de cancro cítrico dividido pelo número total de lesões de cada folha coletada. A densidade de lesões foi obtida dividindo-se o número de lesões da folha pela área foliar.

O modelo exponencial foi ajustado ao progresso da severidade, densidade e tamanho de lesão de cancro em relação à concentração de inóculo, utilizando-se o software STATISTICA (STATSOFT, 2001). Para uma mesma concentração de inóculo, a severidade, densidade e tamanho de lesão da doença dos tratamentos folha intacta, ferimento mecânico e injúria de LMC foram analisados por ANOVA no esquema fatorial 3x6, ao nível de 5% de significância ( $p < 0.05$ ), usando o software SAS (SAS INSTITUTE, 2001).

### **2.2.5 Período de suscetibilidade da folha intacta, do ferimento mecânico e da injúria de LMC ao cancro cítrico**

O papel da duração da suscetibilidade do ferimento mecânico, da injúria de LMC e da folha intacta no desenvolvimento do cancro cítrico foi avaliado nas cultivares de laranja doce: Natal, Pêra e Valência. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e o experimento repetido duas vezes no tempo. Cada tratamento apresentou 8 repetições, sendo cada repetição constituída por uma planta.

Nos tratamentos de folha intacta, folhas de mudas de laranja doce com 5 a 7 dias após a sua emissão foram marcadas destacando-se todas as outras folhas da parte superior das plantas. Assim, as plantas continham, na parte superior, somente folhas de 5 a 7 dias de idade. A cada cinco dias, as plantas foram inoculadas por aspersão com suspensão de *Xac* a  $10^6$  ufc/ml, compondo os tratamentos folha intacta com 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 dias de idade. Durante a condução do experimento, as folhas emergentes eram destacadas, evitando-se possíveis equívocos com as folhas marcadas.

Nos tratamentos de ferimento mecânico, as folhas novas das mudas de laranja doce foram perfuradas com agulha histológica em seis pontos equidistantes. As folhas com 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 dias após o ato de ferimento foram inoculadas por aspersão a  $10^6$  ufc/ml, compondo os tratamentos de folhas com ferimentos de 0 a 8 dias de idade.

Nos tratamento de injúria de LMC, as mudas de laranja doce com brotações novas foram colocadas à postura de *P. citrella* em gaiolas entomológicas (CHAGAS; PARRA, 2000). Plantas com folhas infestadas com ovos de *P. citrella* foram inoculadas por aspersão a  $10^6$  ufc/ml após 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34 e 36 dias da oviposição, compondo os tratamentos injúria de LMC de 0 a 36 dias de idade.

A inoculação por aspersão foi obtida com o emprego de bomba a vácuo com pulverizador, inoculando-se os dois lados do limbo foliar. Depois de inoculadas, as plantas foram mantidas em condições de câmara úmida por 72 h. O experimento foi conduzido em sala climatizada a 28° C e fotofase de 12 h.

Em cada tratamento, após 30 dias após a inoculação, coletou-se uma folha de cada planta com lesões de cancro cítrico, totalizando 8 folhas por tratamento. As folhas foram digitalizadas e a severidade da doença foi determinada pelo software de quantificação de doença, QUANT v.1.0 (VALE et al., 2003). Nos tratamentos de ferimento mecânico e injúria de LMC, somente as lesões associadas à área injuriada foram mensuradas.

O tamanho de lesão foi determinado através da área total de lesões de cancro cítrico dividido pelo número total de lesões de cada planta. A densidade de lesão foi obtida dividindo-se o número de lesões da folha pela área foliar.

O dados de severidade, densidade e tamanho de lesão dos tratamentos foram analisados por regressão por meio do STATISTICA (STATSOFT, 2001). Os valores máximos das variáveis observados nos tratamentos folha intacta, ferimento mecânico e injúria de LMC foram comparados por ANOVA no esquema fatorial 3x3 (3 condições foliar x 3 cultivares), ao nível de 5% de significância ( $p < 0.05$ ), usando o software SAS (SAS INSTITUTE, 2001)

### **2.2.6 Progresso do cancro cítrico em relação à temperatura e molhamento foliar**

Ensaio em câmaras de crescimento permitem isolar os efeitos de fatores ambientais específicos, fornecendo dados que explicam o desenvolvimento epidêmico da doença em campo (KRANZ; HAU, 1980). Desta forma, para determinar o efeito do ambiente nos processos de infecção e colonização do cancro cítrico em cultivares de laranja doce, foram conduzidos experimentos em câmaras de crescimento (Convicon, modelo E-7), com três repetições no tempo. Foram testadas as temperaturas de 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 42°C e os períodos de molhamento foliar de 0, 4, 8, 12, 16, 20 e 24 horas, de maneira combinada, resultando em 56 tratamentos para cada cultivar de laranja doce, distribuídos em parcelas sub-divididas, sendo as temperaturas as parcelas principais e os períodos de molhamento foliar as sub-parcelas, com 8 plantas por sub-parcela.

Mudas de laranja doce das cultivares Hamlin, Natal, Pêra e Valência, em tubetes, apresentando brotações novas, recém emergidas, sem ferimentos ou injúrias, foram inoculadas

por aspersão com suspensão bacteriana de *Xac* na concentração de  $10^6$  ufc/ml. Após a inoculação, grupos de 8 plantas foram envolvidos em sacos plásticos previamente umedecidos (condições de câmara úmida) e transferidos para câmaras de crescimento nas temperaturas de 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 42 °C, com fotofase de 12 horas. Os grupos de plantas foram mantidos em condições de câmara úmida durante 0, 4, 8, 12, 16, 20 e 24 h. O período de molhamento foliar de 0 h correspondeu à ausência da câmara úmida após a inoculação. Nos tratamentos a 40 e 42°C, as câmaras de crescimento foram reguladas para a temperatura de 35°C durante o período noturno, a partir das 48 horas após a inoculação, com o objetivo de evitar danos causados pelo calor excessivo sobre as plantas.

As variáveis avaliadas no experimento foram período de incubação, incidência da doença, severidade da doença, densidade de lesão e tamanho de lesão. Período de incubação foi definido como o período em que 50% das plantas apresentavam sintomas de cancro cítrico. A incidência da doença foi avaliada a cada dois dias. A severidade da doença e o número de lesões foram mensurados 30 dias após a inoculação nos tratamentos a 25°C ou acima; 40 dias no tratamento a 20°C e 60 dias nos tratamentos com 12° e 15°C. Em condições adversas, os sintomas podem demorar até 60 dias para aparecer (GOTTWALD; GRAHAM, 1992). A severidade da doença foi mensurada através de software quantificação de doenças, QUANT v. 1.0 (VALE et al., 2003) a partir da imagem digitalizada de duas folhas por planta com lesões de cancro.

O tamanho de lesão foi calculado dividindo-se a soma total das áreas das lesões pelo número total de lesões na folha de cada planta. A densidade de lesões foi obtida dividindo-se o número de lesões pela área foliar.

A função beta generalizada (HAU; KRANZ, 1990) e o modelo monomolecular (CAMPBELL; MADDEN, 1990) foram ajustados às variáveis severidade, densidade e tamanho de lesão do cancro cítrico em relação ao efeito da temperatura e do período de molhamento foliar, respectivamente, por meio de regressão não-linear pelo software STATISTICA (STATSOFT, 2001). A função Beta generalizada é descrita por:  $Y = b_1(T - b_2)^{b_3}(b_4 - T)^{b_5}$  e o modelo monomolecular é descrito por:  $Y = b_6(1 - (1 - b_7)\exp(-b_8M))$  onde  $b_1$ ,  $b_3$ ,  $b_5$ ,  $b_6$ ,  $b_7$  e  $b_8$  são parâmetros a serem estimados;  $b_2$  e  $b_4$  representam, respectivamente, as temperaturas (°C) mínima e máxima para o desenvolvimento da doença;  $T$  é a temperatura (°C);  $M$ , o período de

molhamento foliar (h); e Y, as variáveis: severidade (%), densidade de lesão (lesões/cm<sup>2</sup>) ou tamanho de lesão (mm<sup>2</sup>).

Para descrever o efeito combinado da temperatura e do período de molhamento foliar nas variáveis severidade, densidade e tamanho de lesão, o modelo beta-monomolecular:  $Y = (b_1(T - b_2)^{b_3}(b_4 - T)^{b_5})(b_6(1 - (1 - b_7 \exp(-b_8 M))))$  (Hau; Kranz, 1990) foi ajustado aos dados, possibilitando a construção de uma superfície de resposta.

## 2.3 Resultados

### 2.3.1 Suscetibilidade da folha intacta, do ferimento mecânico e da injúria de LMC em diferentes concentrações de inóculo na infecção de *Xac*

Os resultados apresentados das cultivares Natal, Pêra e Valência referem-se aos dados médios obtidos das três repetições do experimento no tempo. As figuras e tabelas das análises se encontram no final desse tópico.

Lesões de cancro cítrico foram observadas em todos os tratamentos, inclusive na concentração de inóculo 10<sup>1</sup> ufc/ml. Todos os tratamentos inoculados a 10<sup>4</sup> e 10<sup>6</sup> ufc/ml apresentaram 100% de incidência (dados não mostrados). Em 10<sup>2</sup> ufc/ml, a máxima incidência observada foi próximo a 50% para ferimento mecânico e injúria de LMC fase pupa e 3º instar. Em 10<sup>1</sup> ufc/ml, a incidência foi menor que 30%, sendo os maiores valores observados em ferimento mecânico (30%) e injúria de LMC fase pupa (25%).

O período de incubação médio (PMI) do cancro cítrico variou de 8 a 25 dias, dependendo da via de penetração e concentração de inóculo. Os menores PMI foram determinados na concentração de 10<sup>6</sup> ufc/ml para os tratamentos ferimento mecânico e injúria de LMC fase 3º instar e fase pupa (média de 8 dias). Em folha intacta e LMC fase ovo e 1º instar, o PMI variou entre 11 a 14 dias. Nas concentrações de 10<sup>1</sup> e 10<sup>2</sup> ufc/ml, os tratamentos folha intacta e LMC fase ovo e 1º instar apresentaram maiores PMI, acima de 20 dias. Em geral, os tratamentos



ferimento mecânico, LMC fase 3º ínstar e fase pupa apresentaram relativa semelhança no PMI, assim como folha intacta foi semelhante em relação a LMC fase ovo e 1º ínstar, onde à medida que se diminuiu a concentração do inóculo, houve aumento no PMI.

A severidade da doença, em todos tratamentos, apresentou um crescimento exponencial à medida que aumentou a concentração de inóculo (Figura 1 e Tabela 1). Para melhor interpretação do efeito da injúria no progresso da severidade em relação à concentração de inóculo e as fases da LMC, foi usado o modelo exponencial-exponencial para construir uma superfície de resposta (Figura. 1 3A, 3B, 3C). Assim, as linhas paralelas ao eixo das fases de LMC representam o progresso da severidade em relação à fase da LMC para cada concentração de inóculo, e as linhas paralelas ao eixo da concentração de inóculo representam o progresso da severidade em relação a concentração de inóculo para cada fase da LMC. Independentemente da concentração do inóculo, a severidade da doença aumentou exponencialmente à medida que houve avanço nos estádios de desenvolvimento da LMC com taxas de crescimento semelhante entre as cultivares. O aumento da severidade em relação ao progresso das fases da LMC está relacionado principalmente com aumento da injúria da fase ovo a pupa.

A severidade do cancro cítrico em relação à cultivar, Natal, Pêra e Valência, e condição foliar, folha intacta, ferimento mecânico e injúria de LMC, foram comparadas por ANOVA Fatorial dentro de cada concentração de inóculo (Tabela 2). A interação entre cultivar e condição foliar não foi significativa ( $p>0,05$ ) em todas as concentrações. As cultivares apresentaram valores de severidade semelhantes em  $10^1$  ufc/ml. Entretanto, nas concentrações mais elevadas houve diferença. Laranja Natal foi menos suscetível à doença em  $10^2$  ufc/ml em relação às outras cultivares. Nas concentrações de  $10^4$  e  $10^6$  ufc/ml, a cultivar Pêra apresentou maior severidade.

Em relação à condição foliar, a severidade da doença em folha com injúria de LMC fase pupa foi superior a folha intacta em todas as concentrações. A severidade da doença da fase pupa foi no mínimo duas vezes maior em relação à folha intacta nas concentrações de inóculo testadas. Em  $10^6$  ufc/ml, a injúria de LMC foi mais suscetível ao cancro que o ferimento mecânico, entretanto nas demais concentrações não houve diferença. A fase ovo e 1º ínstar apresentaram valores de severidade menores que a folha intacta em  $10^6$  ufc/ml, provavelmente em razão do tamanho da folha. O adulto da LMC somente oviposita em folhas recém emitidas (em fase inicial de expansão), portanto, durante a inoculação as folhas com ovos e 1º ínstar de LMC, as folhas

eram menores e mais jovens do que as folhas intactas, quase a metade do tamanho do limbo foliar.

Os altos valores de severidade observados na fase pupa (acima de duas vezes da severidade em folha intacta) estão diretamente relacionados com o tamanho da área de injúria, que podem ocupar toda a área do limbo foliar, permitindo a infecção de *Xac* via contato direto com o mesofilo foliar exposto pelo ato alimentar da LMC.

A densidade de lesão das cultivares apresentou um crescimento exponencial com o aumento da concentração de inóculo em todos os tratamentos (Figura 2, Tabela 3). Entretanto o tamanho de lesão apresentou crescimento exponencial somente nos tratamentos com injúria de LMC (Figura 3, Tabela 4). Em folha intacta e ferimento mecânico, a variação do tamanho de lesão foi pequena em diferentes concentrações de inóculo. As médias do tamanho de lesão da folha intacta e ferimento mecânico observado em  $10^1$  a  $10^6$  ufc/ml foram de 1,68 e 2,43 mm<sup>2</sup>, respectivamente.

Nos tratamentos com injúria de LMC, os gráficos de densidade e tamanho de lesão apresentam dados em relação à concentração de inóculo e às fases de desenvolvimento da LMC. A densidade e o tamanho de lesão apresentaram também crescimento exponencial em relação ao progresso dos estádios da LMC e aumento da concentração de inóculo (Figura 2 e 3 em 3A, 3B, 3C; Tabela 4).

Os valores de densidade e tamanho de lesão em relação a cultivar e condição foliar na concentração de  $10^6$  ufc/ml foram analisados por ANOVA Fatorial (Tabela 5). A interação entre cultivar e condição foliar não foi significativa ( $p>0,05$ ) tanto para densidade de lesão como para tamanho de lesão. A cultivar laranja Natal apresentou maior densidade de lesão. As cultivares Pêra e Valência foram semelhantes em relação ao tamanho de lesão, entretanto a cultivar Pêra foi superior à Natal. Em relação à condição foliar, a densidade de lesão em injúria de LMC fase pupa foi semelhante à fase 3º instar, ferimento mecânico e folha intacta. Entretanto, o tamanho de lesão da fase pupa foi superior às demais.

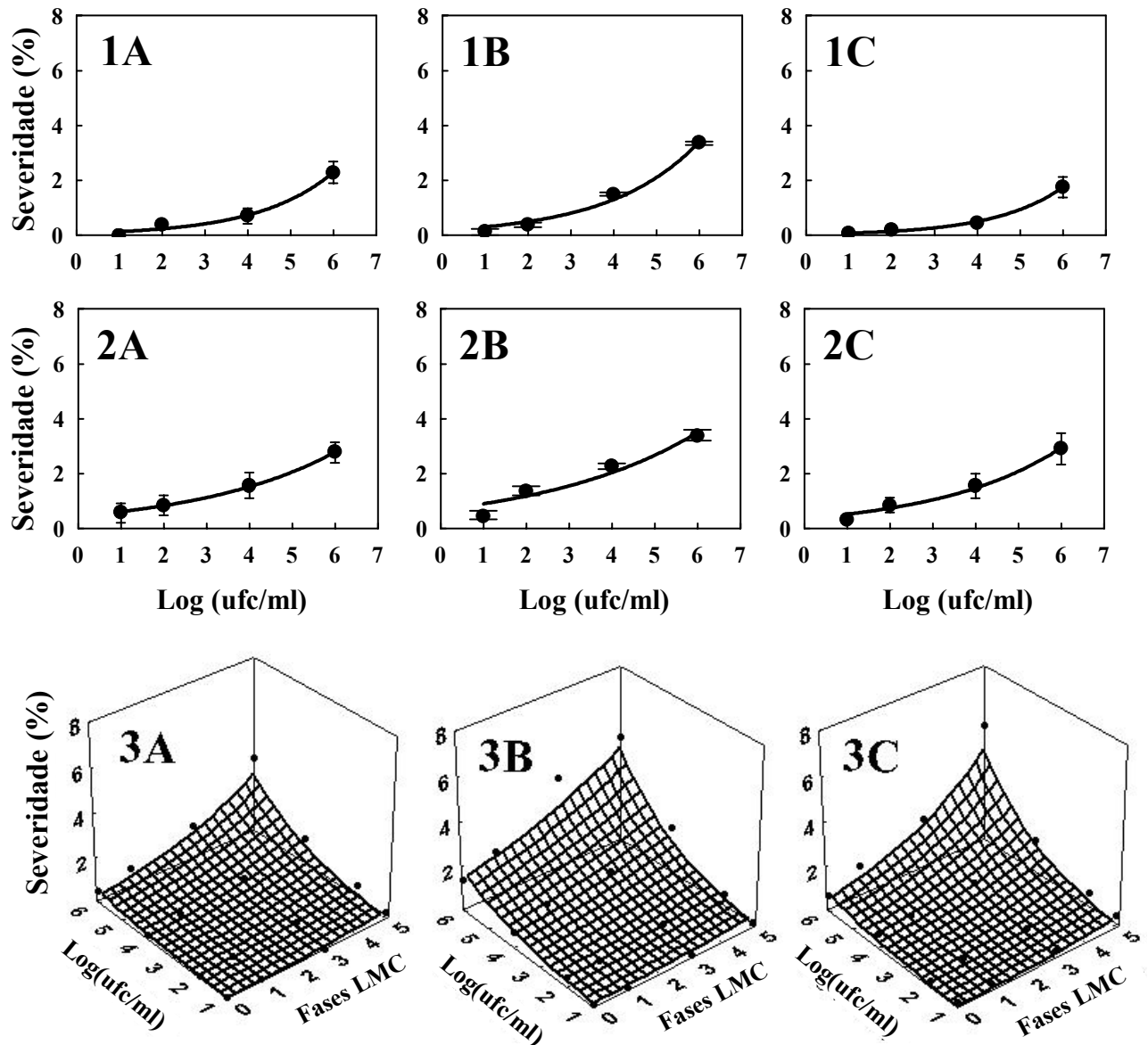


Figura 1- Severidade do cancro cítrico em laranja doce: Natal (A), Pêra (B) e Valência (C), em diferentes condições foliares: folhas intactas (1), ferimento mecânico (2) e injúria de LMC (3), inoculadas a  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^4$  e  $10^6$  ufc/ml. Cada ponto representa a média de três repetições. Barra vertical representa o desvio padrão. Linhas mostram os modelos exponencial (1 e 2) e exponencial-exponencial (3) ajustados aos dados. Fases da LMC estudadas estão representadas por '0' como fase ovo, '1' como 1º ínstar, '3' como 3º ínstar e '5' como pupa. Parâmetros estimados do modelo estão na Tabela 1

Tabela 1- Parâmetros estimados e coeficiente de determinação ( $R^2$ ) do modelo exponencial (1) e do modelo exponencial-exponencial (2) adaptados aos dados de severidade do cancro cítrico em folha intacta, ferimento mecânico e injúria de LMC de diferentes cultivares de laranja doce inoculadas em diferentes concentrações de inóculo

Condição foliar	Cultivar	Parâmetros do modelo				$R^2$
		$b_1$	$b_2$	$b_3$	$b_4$	
Folha intacta	Natal	0,07	0,57	n (3)	n	0,99
	Pêra	0,19	0,48	n	n	0,98
	Valência	0,04	0,62	n	n	0,99
Ferimento mecânico	Natal	0,45	0,30	n	n	0,99
	Pêra	0,69	0,27	n	n	0,94
	Valência	0,37	0,34	n	n	0,98
Injúria LMC	Natal	0,17	0,45	0,22	0,34	0,99
	Pêra	0,29	0,45	0,43	0,19	0,98
	Valência	0,07	0,48	0,72	0,34	0,97

<sup>(1)</sup>  $Y = b_1 \exp(b_2 X)$  para os tratamentos folha intacta e ferimento mecânico.

<sup>(2)</sup>  $Y = b_1 \exp(b_2 X) b_3 \exp(b_4 Z)$  para o tratamento injúria de LMC, sendo Y, severidade da doença (%); X, concentração de inóculo em log(ufc/ml); Z, fase da LMC;  $b_1$ ,  $b_2$ ,  $b_3$  e  $b_4$ , parâmetros do modelo

<sup>(3)</sup> Parâmetro não existente no modelo

Tabela 2- Severidade do cancro cítrico em relação à cultivar de laranja doce e condição foliar inoculadas em diferentes concentrações de inóculo

Tratamento	Concentração de inóculo (ufc/ml)			
	10 <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>6</sup>
<b>Cultivar</b>				
Natal	(1) 0,20 a	0,43 b	0,84 b	1,96 b
Pêra	0,20 a	0,68 a	1,59 a	3,05 a
Valência	0,29 a	0,55 ab	1,00 b	2,45 b
<b>Condição foliar</b>				
Folha intacta	0,08 c	0,32 c	0,86 bc	2,41 bc
Ferimento mecânico	0,43 a	0,99 a	1,75 a	2,96 b
LMC fase ovo	0,14 c	0,28 c	0,55 c	0,96 d
LMC fase 1 ínstar	0,18 c	0,41 bc	0,86 bc	1,51 cd
LMC fase 3 ínstar	0,22 bc	0,55 bc	1,06 b	2,76 b
LMC fase pupa	0,45 a	0,84 a	1,72 a	4,60 a

<sup>(1)</sup> Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Tukey a 5%

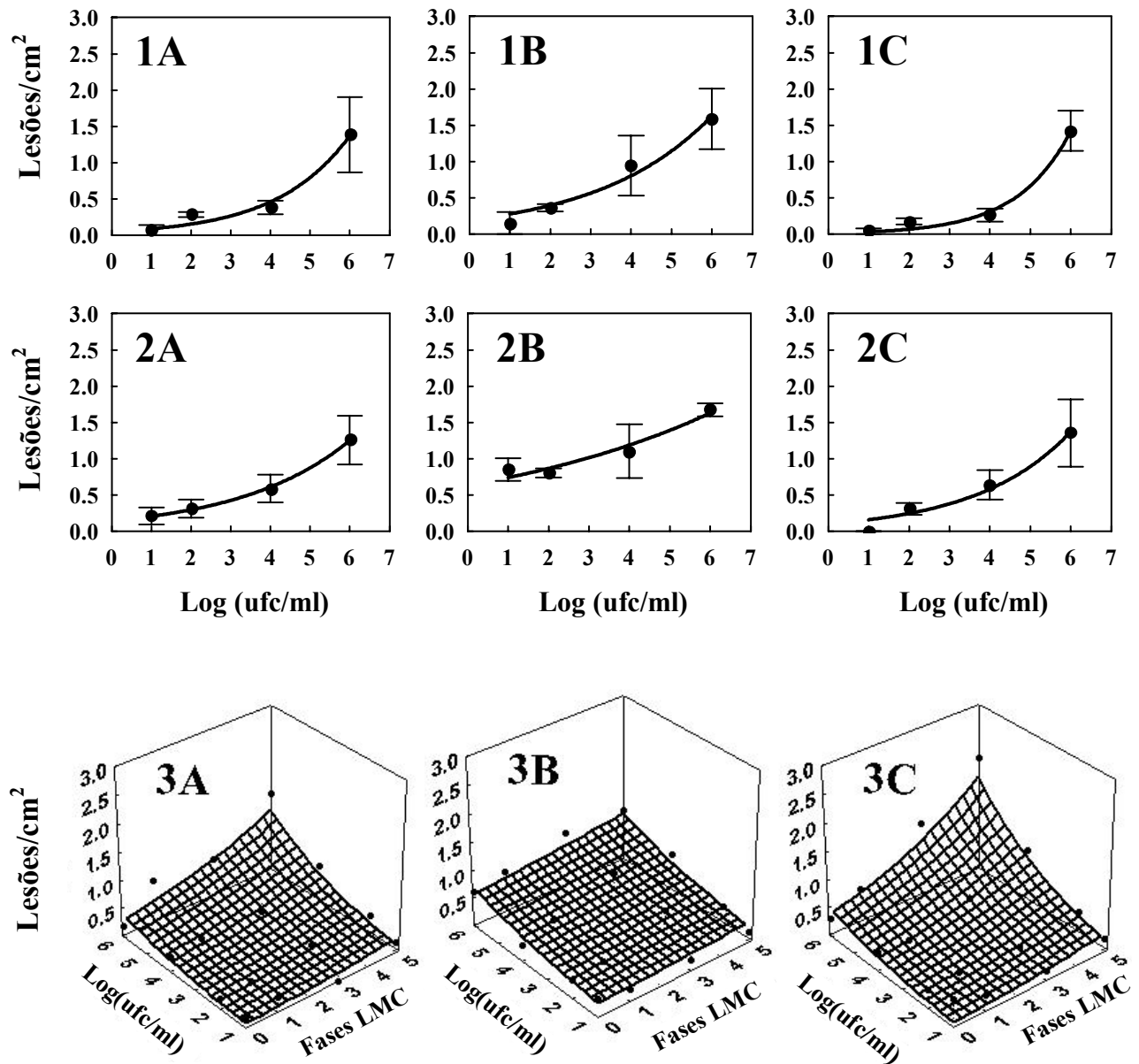


Figura 2- Densidade de lesão do cancro cítrico em laranja doce: Natal (A), Pera (B) e Valência (C), em diferentes condições foliares: folhas intactas (1), ferimento mecânico (2) e injúria de LMC (3), inoculadas a 10<sup>1</sup>, 10<sup>2</sup>, 10<sup>4</sup> e 10<sup>6</sup> ufc/ml. Cada ponto representa a média de três repetições. Barra vertical representa o desvio padrão. Linhas mostram os modelos exponencial (1 e 2) e exponencial-exponencial (3) ajustados aos dados. Fases da LMC estudadas estão representadas por '0' como fase ovo, '1' como 1º instar, '3' como 3º instar e '5' como pupa. Parâmetros estimados do modelo estão na Tabela 3

Tabela 3- Parâmetros estimados e coeficiente de determinação ( $R^2$ ) do modelo exponencial (1) e do modelo exponencial-exponencial (2) adaptados aos dados de densidade de lesão do cancro cítrico em folha intacta, ferimento mecânico e injúria de LMC de diferentes cultivares de laranja doce inoculadas em diferentes concentrações de inóculo

Condição foliar	Cultivar	Parâmetros do modelo				$R^2$
		$b_1$	$b_2$	$b_3$	$b_4$	
Folha intacta	Natal	0,05	0,55	n (3)	n	0,98
	Pêra	0,19	0,35	n	n	0,97
	Valência	0,02	0,75	n	n	0,98
Ferimento mecânico	Natal	0,15	0,36	n	n	0,99
	Pêra	0,63	0,16	n	n	0,96
	Valência	0,10	0,43	n	n	0,97
Injúria LMC	Natal	0,06	0,33	0,924	0,23	0,86
	Pêra	0,67	0,20	0,32	0,07	0,71
	Valência	0,19	0,36	0,34	0,26	0,90

<sup>(1)</sup>  $Y = b_1 \exp(b_2 X)$  para os tratamentos folha intacta e ferimento.

<sup>(2)</sup>  $Y = b_1 \exp(b_2 X) b_3 \exp(b_4 Z)$  para o tratamento injúria de LMC; Y, densidade de lesão (lesões/cm<sup>2</sup>); X, concentração de inóculo em log(ufc/ml); Z, fase da LMC;  $b_1$ ,  $b_2$ ,  $b_3$  e  $b_4$ , parâmetros do modelo

<sup>(3)</sup> Parâmetro não existente no modelo

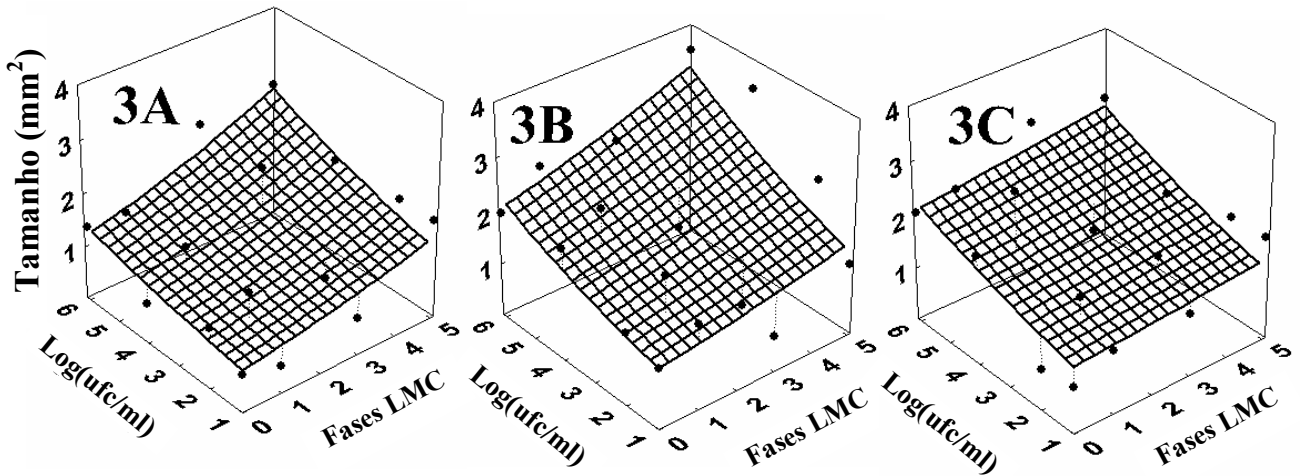


Figura 3- Tamanho de lesão do cancro cítrico em injúria de LMC, em laranja doce: Natal (A), Pêra (B) e Valência (C), inoculadas a  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^4$  e  $10^6$  ufc/ml. Cada ponto representa a média de três repetições. Linhas mostram o modelo exponencial-exponencial ajustado aos dados. Fases da LMC estudadas estão representadas por '0' como fase ovo, '1' como 1º instar, '3' como 3º instar e '5' como pupa. Parâmetros estimados do modelo estão na Tabela 4



Tabela 4- Parâmetros estimados e coeficiente de determinação ( $R^2$ ) do modelo exponencial-exponencial (1) adaptados aos dados de tamanho de lesão do cancro cítrico em injúria de LMC de diferentes cultivares de laranja doce inoculadas em diferentes concentrações de inóculo

Condição foliar	Cultivar	Parâmetros do modelo (1)				$R^2$
		$b_1$	$b_2$	$b_3$	$b_4$	
Injúria LMC	Natal	0,73	0,11	0,99	0,13	0,72
	Pêra	0,86	0,19	0,78	0,16	0,71
	Valência	0,39	0,11	2,82	0,04	0,60

<sup>(1)</sup>  $Y = b_1 \exp(b_2 X) b_3 \exp(b_4 Z)$  sendo Y, tamanho de lesão ( $\text{mm}^2$ ); X, concentração de inóculo em  $\log(\text{ufc/ml})$ ; Z, fase da LMC;  $b_1$ ,  $b_2$ ,  $b_3$  e  $b_4$ , parâmetros do modelo

Tabela 5- Densidade lesão e tamanho de lesão do cancro cítrico em relação à cultivar de laranja doce e condição foliar inoculadas a  $10^6$  ufc/ml

<b>Tratamento</b>	<b>Densidade (lesões/cm<sup>2</sup>)</b>	<b>Tamanho (mm<sup>2</sup>)</b>
<b>Cultivar</b>		
Natal	(1) 0,97 <b>b</b>	2,06 <b>b</b>
Pêra	1,13 <b>b</b>	2,47 <b>a</b>
Valência	1,28 <b>a</b>	2,28 <b>ab</b>
<b>Condição Foliar</b>		
Folha intacta	1,47 <b>a</b>	1,85 <b>c</b>
Ferimento mecânico	1,39 <b>a</b>	2,46 <b>b</b>
LMC fase ovo	0,40 <b>b</b>	1,84 <b>c</b>
LMC fase 1 ínstar	0,74 <b>b</b>	2,05 <b>c</b>
LMC fase 3 ínstar	1,28 <b>a</b>	2,25 <b>bc</b>
LMC fase pupa	1,49 <b>a</b>	3,00 <b>a</b>

<sup>(1)</sup> Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Tukey a 5%

### 2.3.2 Período de suscetibilidade da folha intacta, do ferimento mecânico e da injúria de LMC ao cancro cítrico

Os resultados apresentados das cultivares Natal, Pêra e Valência referem-se aos dados médios obtidos das três repetições do experimento no tempo. As figuras e tabelas das análises se encontram no final desse tópico.

.Na folha intacta, a infecção de *Xac* via penetração por estômatos ocorreu em folhas com até 25 dias de idade, ou seja, 25 dias após a emissão das folhas em todas as três cultivares testadas (Figura 4: 1A, 1B, 1C). A partir dos 30 dias de idade da folha, não foram observados sintomas de cancro cítrico nas folhas. A função beta generalizada explicou melhor o progresso da severidade da doença, com coeficientes de determinação acima de 0,89 (Tabela 6). No decorrer do experimento, a severidade da doença observada foi crescendo com o aumento da idade de folha, atingindo o máximo aos 10 dias de idade, a partir do qual decresceu até a ausência da doença. A severidade máxima da doença observada variou entre as cultivares de laranja doce, sendo de 2,23% para a cultivar Natal, 4,52% para a cultivar Pêra e 3,68% para a cultivar Valência.

Os dados de densidade e de tamanho de lesão de cancro cítrico em diferentes idades de folha intacta foram melhores interpretados pela função beta generalizada (Tabela 6). A densidade de lesão aumentou até, aproximadamente, 8 dias da emissão da folha, a partir do qual diminuiu (Figura 4: 2A, 2B, 2C). Para o tamanho de lesão também houve acréscimo com aumento da idade da folha até 8 dias de idade, a partir do qual decresceu (Figura 4: 3A, 3B, 3C). O máximo tamanho de lesão pouco variou entre as cultivares, cujo valor foi próximo de 3,3 mm<sup>2</sup>. Entretanto, a densidade variou entre 0,5 e 1,3 lesões/cm<sup>2</sup> (laranja Natal e Valência, respectivamente). O decréscimo tanto da densidade como do tamanho de lesão a partir dos 8 dias contribuiu para a diminuição da severidade da doença até aos 25 dias de idade da folha.

Com ferimento mecânico (agulha histológica), a infecção de *Xac* via penetração pelo ferimento ocorreu até 5 dias após o ato do ferimento em todas as cultivares testadas (Figura 5). A equação exponencial, descrita na Tabela 7, teve melhor ajuste ao progresso da severidade da doença com coeficientes de determinação acima de 0,96. À medida que a idade do ferimento

aumentou, a severidade da doença decresceu (Figura 5: 1A, 1B, 1C). As severidades máximas de doença observadas foram de 2,14% (Natal), 2,49% (Pêra) e 3,21% (Valência).

A densidade e o tamanho de lesão com ferimento mecânico foram ajustados pela equação exponencial (Tabela 7) em relação à idade do ferimento. A densidade (Figura 5: 2A, 2B, 2C), assim como o tamanho de lesão (Figura 5: 3A, 3B, 3C) decresceram exponencialmente com o avanço do tempo. A densidade de lesões variou de 0,56 a 0,89 lesões/cm<sup>2</sup>, para Natal e Pêra, respectivamente (Figura 5, 2A e 2B). O máximo tamanho de lesão observado variou de 3,2 mm<sup>2</sup>, na cultivar Natal (Figura 5, 3A), a 2,29 mm<sup>2</sup>, na cultivar Pêra (Figura 5, 3C).

No tratamento com injúria de LMC, a infecção de *Xac* ocorreu até 26 dias após a oviposição de *P. citrella* para a cultivar Valência e 28 dias para as cultivares Natal e Pêra (Figura 6). A equação beta generalizada, explicou melhor o progresso da severidade da doença ( $R^2= 0,69$  para a cultivar Natal e  $R^2= 0,90$  para a cultivar Pêra e Valência) (Tabela 8). A severidade do cancro aumentou no decorrer do tempo até próximos a 16 dias de injúria de LMC (ponto máximo), a partir da qual a severidade decresceu. As máximas severidades observadas da doença foram 6,04% (cultivar Natal), 7,50% (cultivar Pêra) e 12,34% (cultivar Valência).

A densidade de lesão para a injúria de LMC (Figura 6: 2A, 2B, 2C) foi ajustada pela função beta generalizada (Tabela 8). Com o avanço do tempo, a densidade aumentou até 11 dias para a cultivar Natal e 15 dias para as cultivares Pêra e Valência. O tamanho de lesão (Figura 6: 3A, 3B, 3C) também foi ajustado pela função beta generalizada (Tabela 8). O comportamento do tamanho de lesão em relação ao avanço da idade de injúria de LMC foi semelhante à densidade. As lesões tiveram máximo tamanho com 17 dias de idade na cultivar Natal, 9 dias na cultivar Pêra e 14 dias na cultivar Valência. O máximo tamanho estimado foi de 4,5 mm<sup>2</sup> (cultivar Natal), 8 mm<sup>2</sup> (cultivar Pêra) e 5,5 mm<sup>2</sup> (cultivar Valência).

Os valores máximos das variáveis foram analisados em esquema fatorial. Para a variável severidade da doença, houve interação entre condição foliar e cultivar (Tabela 9). As severidades do cancro entre as cultivares não diferiam entre si para as condições foliares de folha intacta e ferimento mecânico. Para injúria de LMC, a severidade da doença na cultivar Valência foi superior ( $p < 0,05$ ) às demais cultivares testadas. Em relação à condição foliar, em todas as cultivares, a severidade do cancro foi superior para injúria de LMC. Comparando-se com a folha

intacta, a máxima severidade para injúria de LMC foi em média três vezes maior para a cultivar Natal e Valência e 1,5 vez maior para a cultivar Pêra.

Os valores máximos da densidade e tamanho de lesão não diferiram entre as cultivares (Tabela 10). Para injúria de LMC, a densidade e tamanho de lesão foram superiores às demais condições foliares.

Em todas as variáveis (severidade da doença, densidade e tamanho de lesão) a injúria de LMC foi significativamente superior ( $p < 0,05$ ) em relação à folha intacta e ao ferimento mecânico (Tabelas 9 e 10).

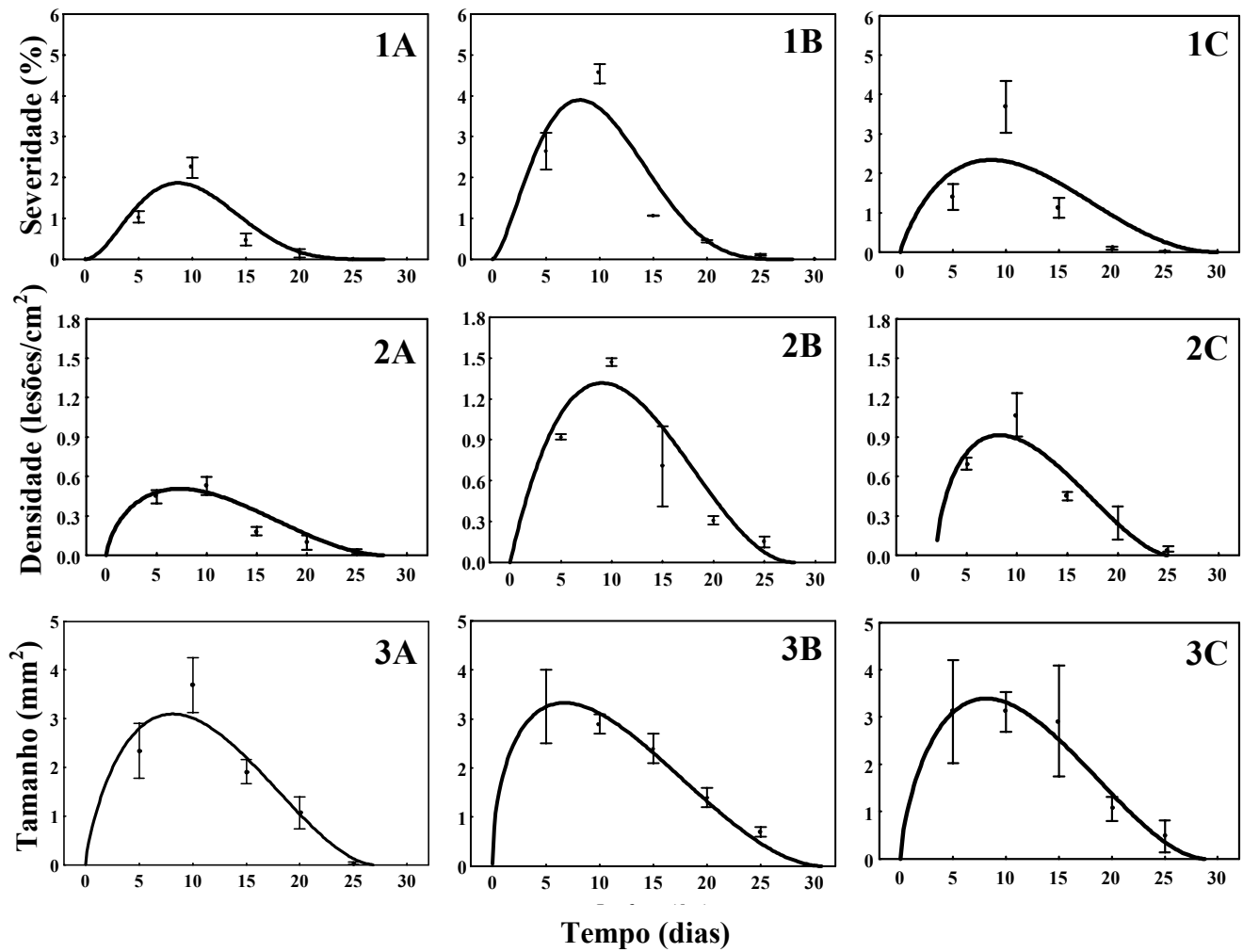


Figura 4- Efeito do período de suscetibilidade da folha intacta na severidade (1), densidade de lesão (2) e tamanho médio de lesão (3) do cancro cítrico em cultivares de laranja doce: Natal (A), Pera (B) e Valência (C). Cada ponto representa a média de três repetições. Barra vertical representa o desvio padrão. Linhas mostram a função beta generalizada ajustada aos dados. Parâmetros estimados do modelo estão na Tabela 6

Tabela 6- Parâmetros estimados e coeficiente de determinação ( $R^2$ ) da função beta generalizada (1) ajustados aos dados de severidade, densidade e tamanho de lesão do cancro cítrico em relação ao período de suscetibilidade da folha intacta de diferentes cultivares de laranja doce

Variável	Cultivar	Parâmetros do modelo (1)					$R^2$
		$b_1$	$b_2$	$b_3$	$b_4$	$b_5$	
Severidade (%)	Natal	0,0001	0	2,06	27,98	4,59	0,89
	Pêra	0,0001	0	1,64	27,98	3,97	0,89
	Valência	0,0004	0	0,87	30,00	2,16	0,96
Densidade de lesão (lesões/cm <sup>2</sup> )	Natal	0,0001	0	2,06	27,98	4,59	0,89
	Pêra	0,0001	0	1,64	27,98	3,97	0,89
	Valência	0,0004	0	0,87	30,00	2,16	0,96
Tamanho de lesão (mm <sup>2</sup> )	Natal	0,0030	0	0,78	26,98	1,81	0,92
	Pêra	0,0034	0	0,51	30,74	1,84	0,98
	Valência	0,0032	0	0,71	28,86	1,81	0,97

<sup>(1)</sup>  $Y = b_1((X-b_2)^{b_3}(b_4-X)^{b_5})$ , sendo: Y, severidade da doença (%), densidade de lesão (lesões/cm<sup>2</sup>) ou tamanho de lesão (mm<sup>2</sup>); X, idade da folha em dias;  $b_2$  e  $b_4$ , idade mínima e máxima da folha;  $b_1$ ,  $b_3$ ,  $b_5$ , parâmetros estimados.

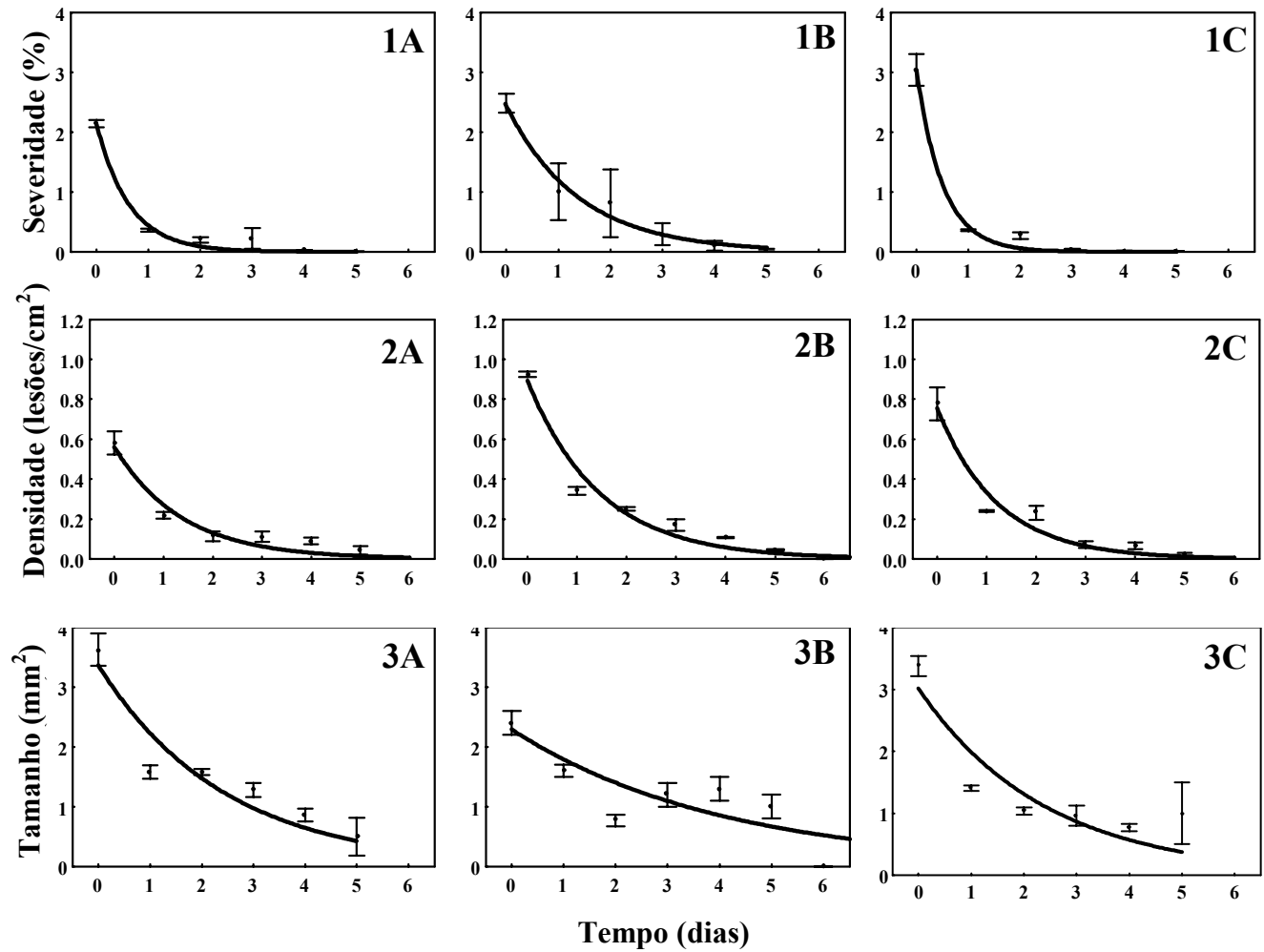


Figura 5- Efeito do período de suscetibilidade do fermento mecânico na severidade (1), densidade de lesão (2) e tamanho de lesão (3) do cancro cítrico em cultivares de laranja doce: Natal (A), Pera (B) e Valência (C). Cada ponto representa a média de três repetições. Barra vertical representa o desvio padrão. Linhas mostram o modelo exponencial ajustado aos dados. Parâmetros estimados do modelo estão na Tabela 7



Tabela 7- Parâmetros estimados e coeficiente de determinação ( $R^2$ ) do modelo exponencial (1) ajustados aos dados de severidade, densidade e tamanho de lesão do cancro cítrico em relação ao período de suscetibilidade do ferimento mecânico em folhas de diferentes cultivares de laranja doce

Variável	Cultivar	Parâmetros do modelo (1)		$R^2$
		$b_1$	$b_2$	
Severidade (%)	Natal	2,13	-1,58	0,96
	Pêra	2,43	-0,071	0,98
	Valência	3,03	-1,97	0,99
Densidade de lesão (lesões/cm <sup>2</sup> )	Natal	0,56	-0,073	0,95
	Pêra	0,89	-0,68	0,96
	Valência	0,76	-0,82	0,96
Tamanho de lesão (mm <sup>2</sup> )	Natal	3,35	-0,41	0,91
	Pêra	2,29	-0,25	0,67
	Valência	3,01	-0,41	0,79

<sup>(1)</sup>  $Y = b_1 \exp(b_2 X)$ , sendo: Y, severidade da doença (%), densidade de lesão (lesões/cm<sup>2</sup>) ou tamanho de lesão (mm<sup>2</sup>); X, idade da folha em dias;  $b_1$  e  $b_2$ , parâmetros estimados.

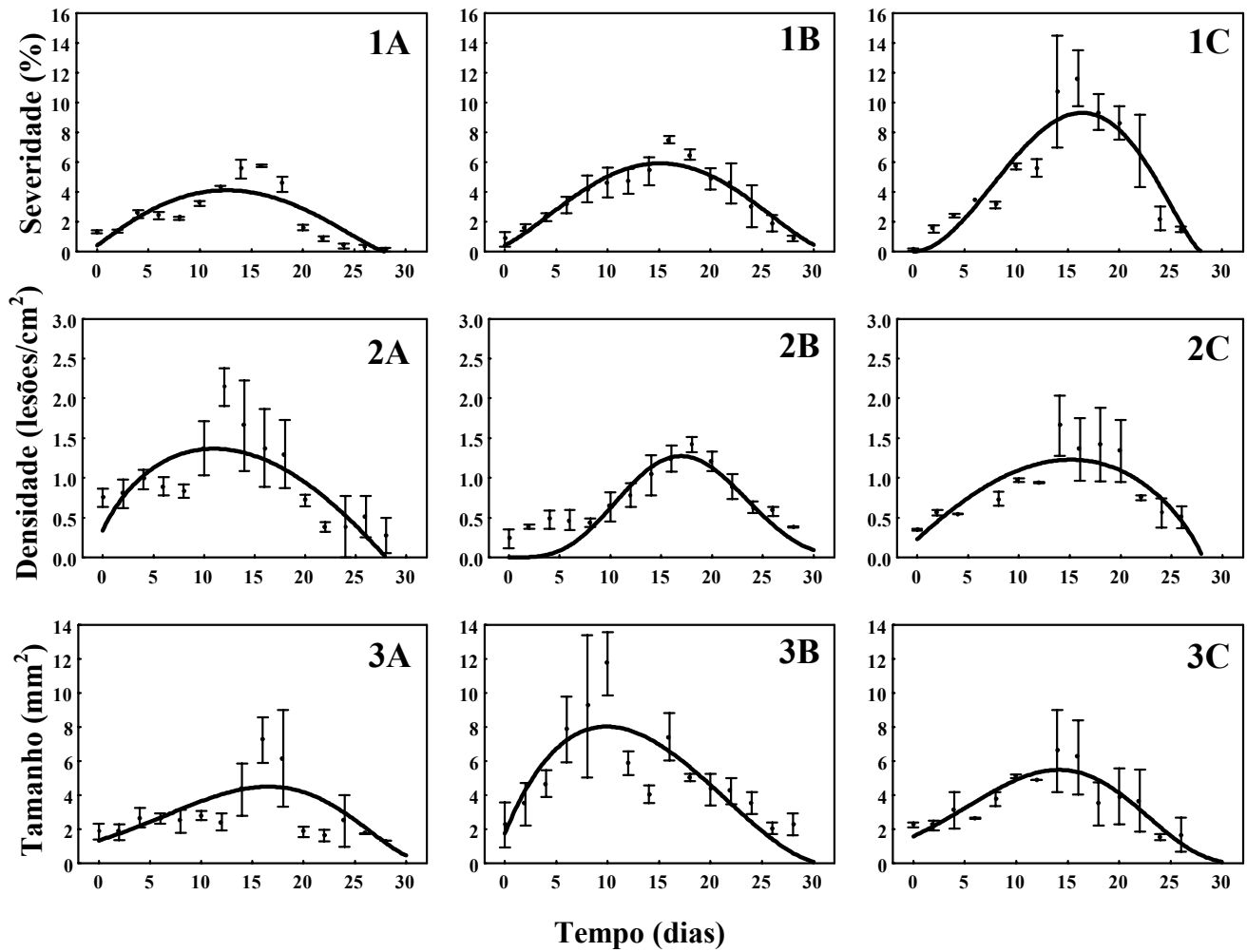


Figura 6- Efeito do período de suscetibilidade da injúria de LMC na severidade (1), densidade de lesão (2) e tamanho de lesão (3) do cancro cítrico em cultivares de laranja doce: Natal (A), Pêra (B) e Valência (C). Cada ponto representa a média de três repetições. Barra vertical representa o desvio padrão. Linhas mostram a função beta generalizada ajustada aos dados. Parâmetros estimados do modelo estão na Tabela 8

Tabela 8- Parâmetros estimados e coeficiente de determinação ( $R^2$ ) da função beta generalizada (1) ajustados aos dados de severidade, densidade e tamanho de lesão do cancro cítrico em relação ao período de suscetibilidade da injúria de LMC em diferentes cultivares de laranja doce

Variável	Cultivar	Parâmetros do modelo (1)					$R^2$
		$b_1$	$b_2$	$b_3$	$b_4$	$b_5$	
Severidade (%)	Natal	0,006	-0,89	1,15	28,0	1,32	0,69
	Pêra	0,0004	-1,93	1,72	32,0	1,71	0,90
	Valência	0,0001	-0,82	2,29	28,0	1,83	0,92
Densidade de lesão (lesões/cm <sup>2</sup> )	Natal	0,01	-0,80	0,71	28,0	1,03	0,70
	Pêra	$0,12e^{-11}$	-0,14	4,21	37,9	5,19	0,72
	Valência	0,007	-2,09	1,10	28,0	0,82	0,81
Tamanho de lesão (mm <sup>2</sup> )	Natal	$0,18e^{-13}$	-3,16	6,89	32,76	2,24	0,37
	Pêra	0,0039	-0,97	0,92	30,96	1,78	0,70
	Valência	$0,31e^{-15}$	-2,79	7,43	32,64	3,36	0,79

<sup>(1)</sup>  $Y = b_1((X - b_2)^{b_3}(b_4 - X)^{b_5})$ , sendo: Y, severidade da doença (%), densidade de lesão (lesões/cm<sup>2</sup>) ou tamanho de lesão (mm<sup>2</sup>); X, idade da folha em dias;  $b_2$  e  $b_4$ , idade mínima e máxima da folha;  $b_1$ ,  $b_3$ ,  $b_5$ , parâmetros estimados.

Tabela 9- Valores máximos da severidade do cancro cítrico observados durante o período de suscetibilidade da folha intacta, ferimento mecânico e injúria de LMC, em cultivares de laranja doce

Tratamento	Cultivar		
	Natal	Pêra	Valência
Folha Intacta	(1) 2,23 Ba	4,52 Ba	3,68 Ba
Ferimento mecânico	2,14 Ba	2,49 Ba	3,21 Ba
Injúria de LMC	6,04 Ab	7,50 Ab	12,34 Aa

<sup>(1)</sup> Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna ou de mesma letra minúscula na linha não diferem estaticamente pelo teste de Tukey ao nível de significância de 0.05.

Tabela 10- Valores máximos da densidade e tamanho de lesão do cancro cítrico observados durante o período de suscetibilidade da folha intacta, ferimento mecânico e injúria de LMC, em cultivares de laranja doce

Tratamento	Densidade (lesões/cm <sup>2</sup> )	Tamanho (mm <sup>2</sup> )
Folha Intacta	(1) 1,01 b	3,23 b
Ferimento mecânico	0,77 b	3,13 b
Injúria de LMC	1,47 a	6,95 a

<sup>(1)</sup> Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estaticamente pelo teste de Tukey ao nível de significância de 0.05.

### 2.3.3 Progresso do cancro cítrico em relação à temperatura e molhamento foliar

Os resultados referentes às cultivares Hamlin, Natal, Pêra e Valência estão expressos em dados médios obtidos das três repetições do experimento no tempo. As figuras e tabelas das análises se encontram no final desse tópico.

As incidências do cancro cítrico nas cultivares de laranja doce testadas foram semelhantes. Sintomas da doença foram observados em todas as temperaturas avaliadas, exceto na temperatura de 42°C. As folhas novas, na maioria das plantas, não suportaram o calor úmido a 42°C durante longo período de molhamento foliar (acima de 12 h) e nas plantas remanescentes, as brotações também sofreram estresse térmico mesmo depois da redução da temperatura durante o período noturno. No tratamento de 0 h de molhamento foliar, a doença manifestou-se em 4 plantas de um total de 56 (1 a 15°C, 1 a 20°C e 2 a 25°C).

Em 20 a 35°C, todos os períodos de molhamento foliar de 4-24 h apresentaram 100% de incidência da doença. Nas temperaturas extremas, a incidência da doença foi drasticamente afetada. Em 12°C, a incidência foi inferior a 30%. A 15°C, a incidência máxima foi 80% para longos períodos de molhamentos (20 e 24 h). Entretanto, a 40°C, somente as plantas submetidas a períodos de molhamento foliar curtos apresentaram lesões, abaixo de 50%.

O período médio de incubação, no qual 50% das plantas apresentavam sintomas, foi também bastante influenciado pela variação da temperatura e do período de molhamento foliar. Os períodos médios de incubação dos molhamentos foliar de 4 e 24 h foram, de 28 e 19 dias, respectivamente, a 20°C, comparado com 16 e 10 dias, respectivamente, a 25-35°C. A 12 e 15°C, o período de incubação foi de 30 dias para 24 h de molhamento foliar.

Os parâmetros estimados e os coeficientes de determinação obtidos pelo modelo monomolecular ajustado aos períodos de molhamento a 30°C estão apresentados na Tabela 11. Em geral, a severidade da doença aumentou com o aumento do período de molhamento em todas as temperaturas testadas (Figura 7). Os tratamentos com 24 h de molhamento apresentaram os valores máximos de severidade enquanto que os de 4 h apresentaram os valores mínimos.

O coeficiente de determinação e os parâmetros estimados pela função beta generalizada ajustados à severidade da doença em diferentes temperaturas a 24 h de molhamento estão na

Tabela 12. A severidade aumentou gradualmente com a elevação da temperatura até 30-35°C, a partir do qual decresceu acentuadamente (Figura 8).

A função beta-monomolecular possibilitou a construção de superfície de resposta para a severidade da doença (Figura 9), densidade de lesão (Figura 10) e tamanho de lesão (Figura 11) para cada cultivar. Os coeficientes de determinação e os parâmetros estimados em cada ajuste encontram-se na Tabela 13. As temperaturas mínima e máxima estimadas pela equação Beta-monomolecular foram 12 e 40°C, respectivamente (Tabela 13). Em geral, à medida que a temperatura aumentou, a severidade da doença, densidade de lesão e o tamanho de lesão aumentaram até próximo de 35°C, a partir da qual decresceram acentuadamente (Figuras 9 a 11). A máxima severidade estimada foi determinada para o período de molhamento de 24 h entre 31,6 e 34,9°C para Valência e Hamlin, respectivamente (Tabela 14). A cultivar Valência apresentou o menor valor máximo de severidade (1,01%), seguido por Pêra e Valência, e Hamlin o maior valor (1,86%). A cultivar Hamlin apresentou quase o dobro de densidade de lesão (1,13 lesões/cm<sup>2</sup>) em relação às outras cultivares, que apresentaram em média de 0,54 lesão/cm<sup>2</sup>. A cultivar Pêra apresentou maior lesão, 2,39 mm<sup>2</sup>, e Valência, menor, 1,17 mm<sup>2</sup> (Tabela 14).

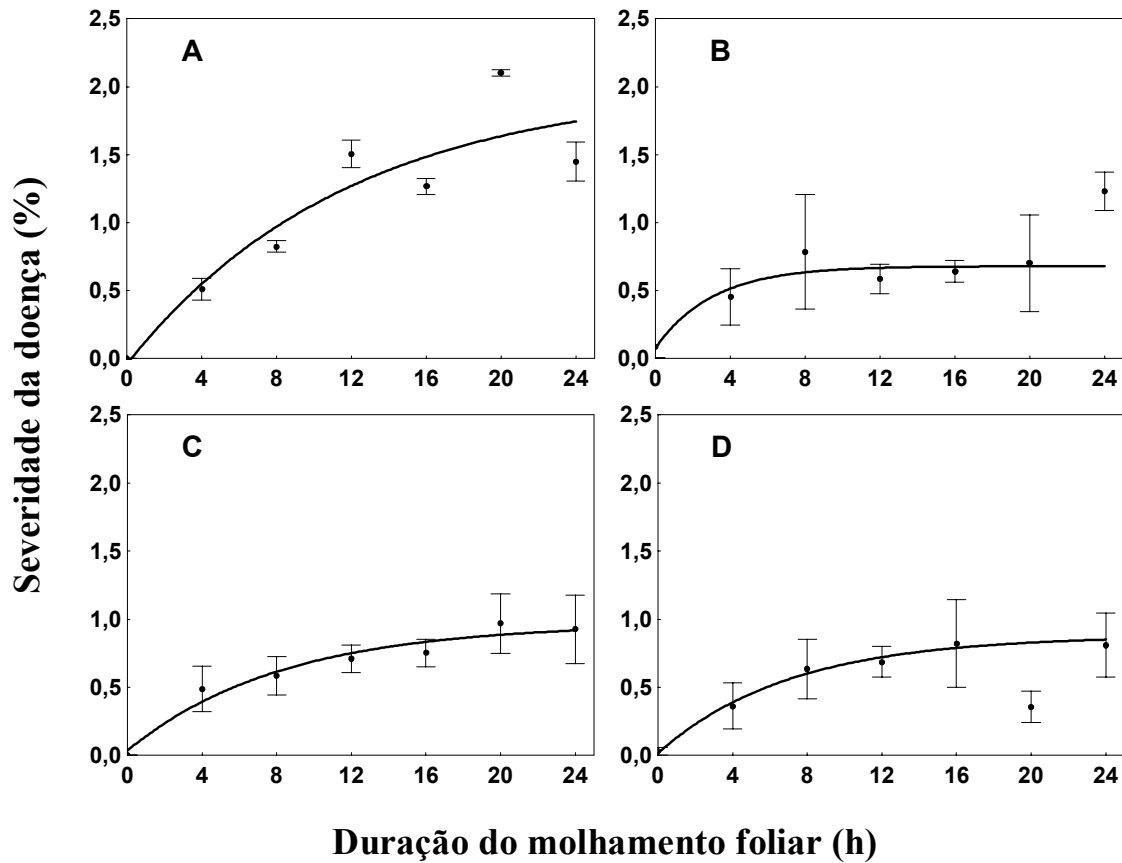


Figura 7- Efeito do período do molhamento foliar (0, 4, 8, 12, 16, 20, ou 24 h) na severidade de cancro cítrico em cultivares de laranja doce Hamlin (A), Natal (B), Pêra (C), e Valência (D) a 30°C. Linhas mostram o modelo monomolecular ajustado aos dados. Cada ponto representa a média de 3 repetições. Barra vertical representa o desvio padrão. Parâmetros estimados estão representados na Tabela 11

Tabela 11- Parâmetros estimados e coeficiente de determinação ( $R^2$ ) do modelo monomolecular (1) ajustados aos dados de severidade do cancro cítrico em cultivares de laranja doce sob diferentes períodos de molhamento foliar (0, 4, 8, 12, 16, 20, ou 24 h) a 30°C

<b>Cultivar</b>	<b>Parâmetros do modelo (1)</b>			<b>R<sup>2</sup></b>
	<b>b<sub>6</sub></b>	<b>b<sub>7</sub></b>	<b>b<sub>8</sub></b>	
<b>Hamlin</b>	2,02	-0,02	0,08	0,82
<b>Natal</b>	0,67	0,12	0,32	0,89
<b>Pêra</b>	1,10	0,18	0,07	0,97
<b>Valência</b>	0,88	0,02	0,14	0,94

<sup>(1)</sup> Modelo monomolecular:  $Y=b_6(1-b_7\exp(-b_8M))$ ; Y, severidade da doença (%); b<sub>6</sub>, b<sub>7</sub>, b<sub>8</sub>, parâmetros estimados; M, período do molhamento foliar (h).



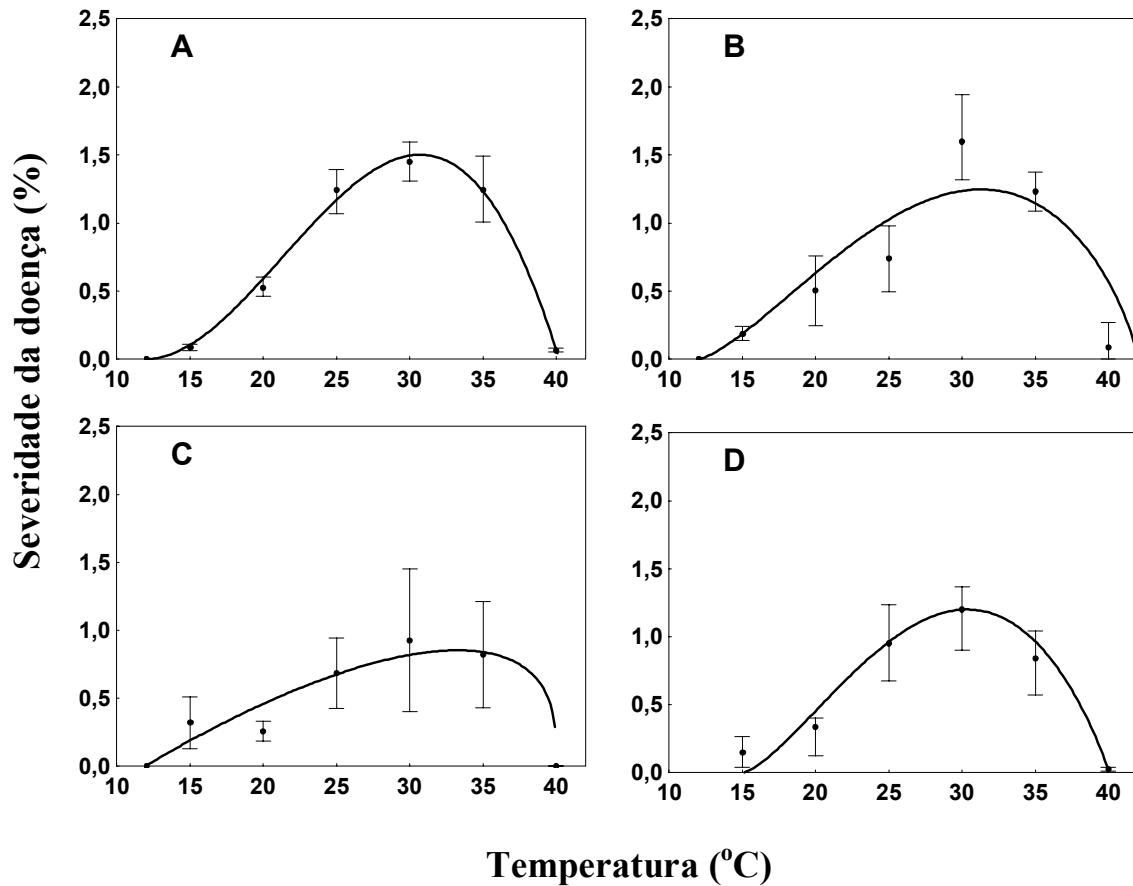


Figura 8- Efeito da temperatura (12, 15, 20, 25, 30, 35, ou 40°C) na severidade do cancro cítrico em cultivares de laranja doce Hamlin (A), Natal (B), Pêra (C), e Valência (D) para o período de molhamento foliar de 24 h. Linhas mostram a função beta generalizada ajustada aos dados. Cada ponto representa a média de 3 repetições. Barra vertical representa o desvio padrão. Parâmetros estimados estão representados na Tabela 12

Tabela 12- Parâmetros estimados e coeficiente de determinação ( $R^2$ ) da função beta generalizada (1) ajustados aos dados de severidade do cancro cítrico em cultivares de laranja doce sob diferentes temperaturas. (12, 15, 20, 25, 30, 35, ou 40°C) em 24 h de molhamento foliar

<b>Cultivar</b>	<b>Parâmetros do modelo (1)</b>					<b>R<sup>2</sup></b>
	<b>b<sub>1</sub></b>	<b>b<sub>2</sub></b>	<b>b<sub>3</sub></b>	<b>b<sub>4</sub></b>	<b>b<sub>5</sub></b>	
<b>Hamlin</b>	0,0004	12,0	1,99	40,2	1,01	0,99
<b>Natal</b>	0,003	12,0	1,41	42,0	0,78	0,86
<b>Pêra</b>	0,02	11,9	0,99	40,0	0,31	0,92
<b>Valência</b>	0,003	15,0	1,47	40,0	0,93	0,93

(1) Função beta generalizada:  $Y = b_1((T - b_2)^{b_4}(b_3 - T)^{b_5})$ ; Y, severidade da doença (%); T, temperatura (°C); b<sub>1</sub>, b<sub>3</sub>, b<sub>5</sub>, parâmetros estimados; b<sub>2</sub>, b<sub>4</sub>, temperatura (°C) mínima e máxima, respectivamente.

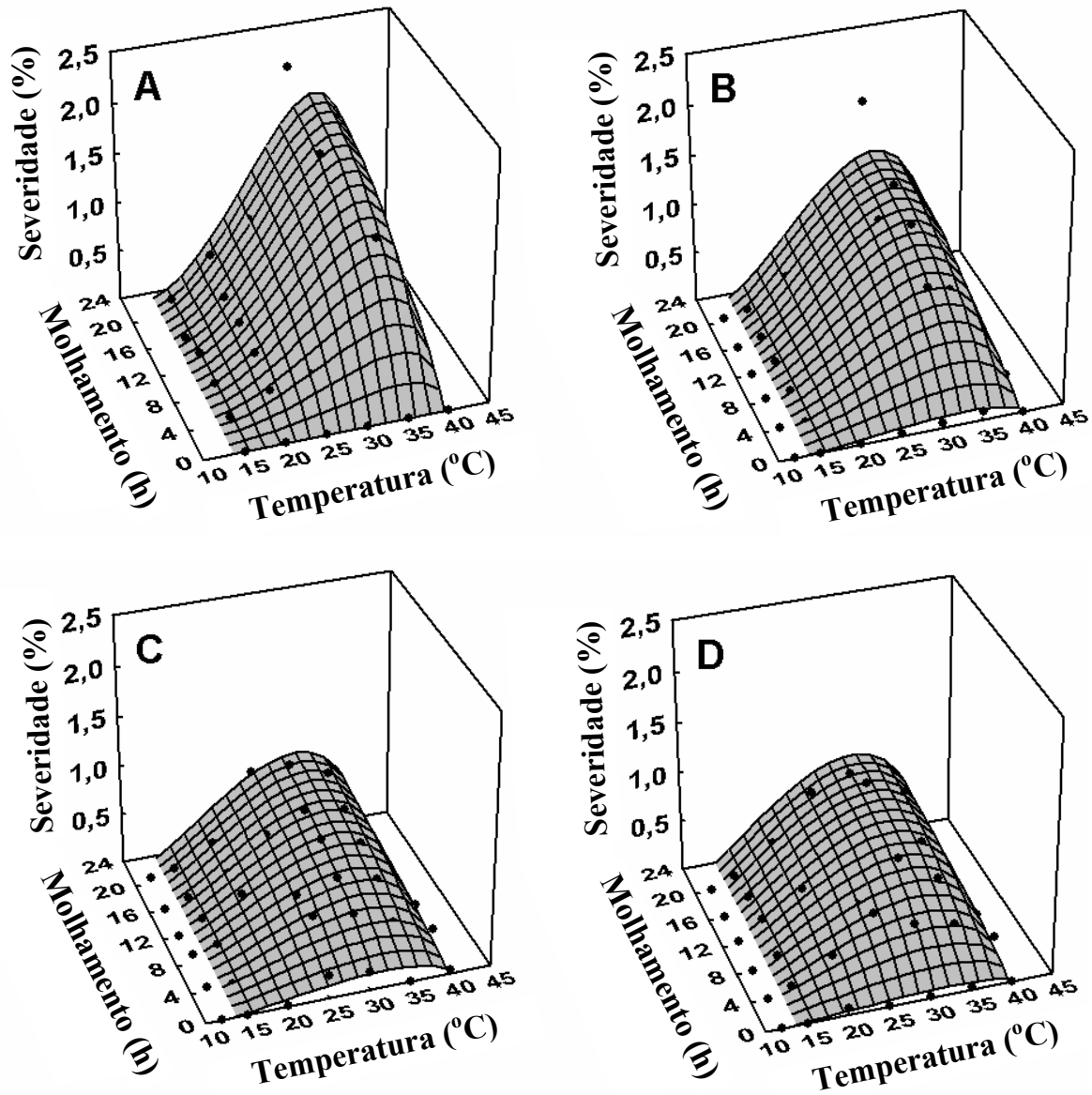


Figura 9- Efeito combinado da temperatura (12, 15, 20, 25, 30, 35, ou 40°C) e do período de molhamento foliar (0, 4, 8, 12, 16, 20, ou 24h) na severidade do cancro cítrico em cultivares de laranja doce Hamlin (A), Natal (B), Pêra (C) e Valência (D). Linhas mostram a função beta-monomolecular ajustada aos dados. Cada ponto representa a média de 3 repetições. Barra vertical representa o desvio padrão. Parâmetros estimados estão representados na Tabela 13

Tabela 13- Parâmetros estimados e coeficiente de determinação ( $R^2$ ) da função beta-monomolecular (1) ajustada aos dados de severidade, densidade e tamanho de lesão do cancro cítrico em cultivares de laranja doce sob diferentes temperaturas (12, 15, 20, 25, 30, 35, ou 40°C) e período de molhamento foliar (0, 4, 8, 12, 16, 20, ou 24h)

Variável	Cultivar	Parâmetros do modelo*								$R^2$
		$b_1$	$b_2$	$b_3$	$b_4$	$b_5$	$b_6$	$b_7$	$b_8$	
Severidade da doença (%)	Hamlin	0.001	11.9	1.98	40.0	0.44	1.97	-0.004	0.11	0.81
	Natal	0.06	12.0	1.58	40.0	0.56	0.07	0.09	0.11	0.77
	Pêra	0.02	12.0	1.36	40.1	0.54	0.33	0.15	0.08	0.90
	Valência	0.01	12.0	1.21	40.0	0.52	0.95	0.11	0.13	0.83
Densidade de lesão (lesões/cm <sup>2</sup> )	Hamlin	0.14	12.0	1.08	40.1	0.31	0.17	-0.02	0.14	0.72
	Natal	0.13	11.2	0.90	40.0	0.20	0.19	0.18	0.20	0.75
	Pêra	0.15	11.0	0.63	40.1	0.29	0.27	0.23	0.27	0.62
	Valência	0.06	11.0	1.0	40.0	0.25	0.25	0.15	0.57	0.51
Tamanho de lesão (mm <sup>2</sup> )	Hamlin	0.02	12.0	0.63	40.0	0.12	0.09	-0.21	0.25	0.72
	Natal	0.07	11.3	0.70	40.1	0.22	0.02	0.49	0.69	0.57
	Pêra	0.02	11.9	0.65	40.0	0.16	0.12	0.34	0.41	0.64
	Valência	0.01	11.6	0.62	40.0	0.10	0.14	0.02	0.53	0.62

(1) Função beta-monomolecular:  $Y=(b_1(T-b_2)^{b_3}(b_4-T)^{b_5})(b_6(1-b_7)\exp(-B_8M))$ ; Y, severidade da doença (%), densidade de lesão (lesões/cm<sup>2</sup>) ou tamanho de lesão (mm<sup>2</sup>); T, temperatura (°C); M, período de molhamento foliar (h);  $b_1$ ,  $b_3$ ,  $b_5$ ,  $b_6$ ,  $b_7$ ,  $b_8$ , parâmetros estimados;  $b_2$ ,  $b_4$ , temperatura (°C) mínima e máxima, respectivamente.

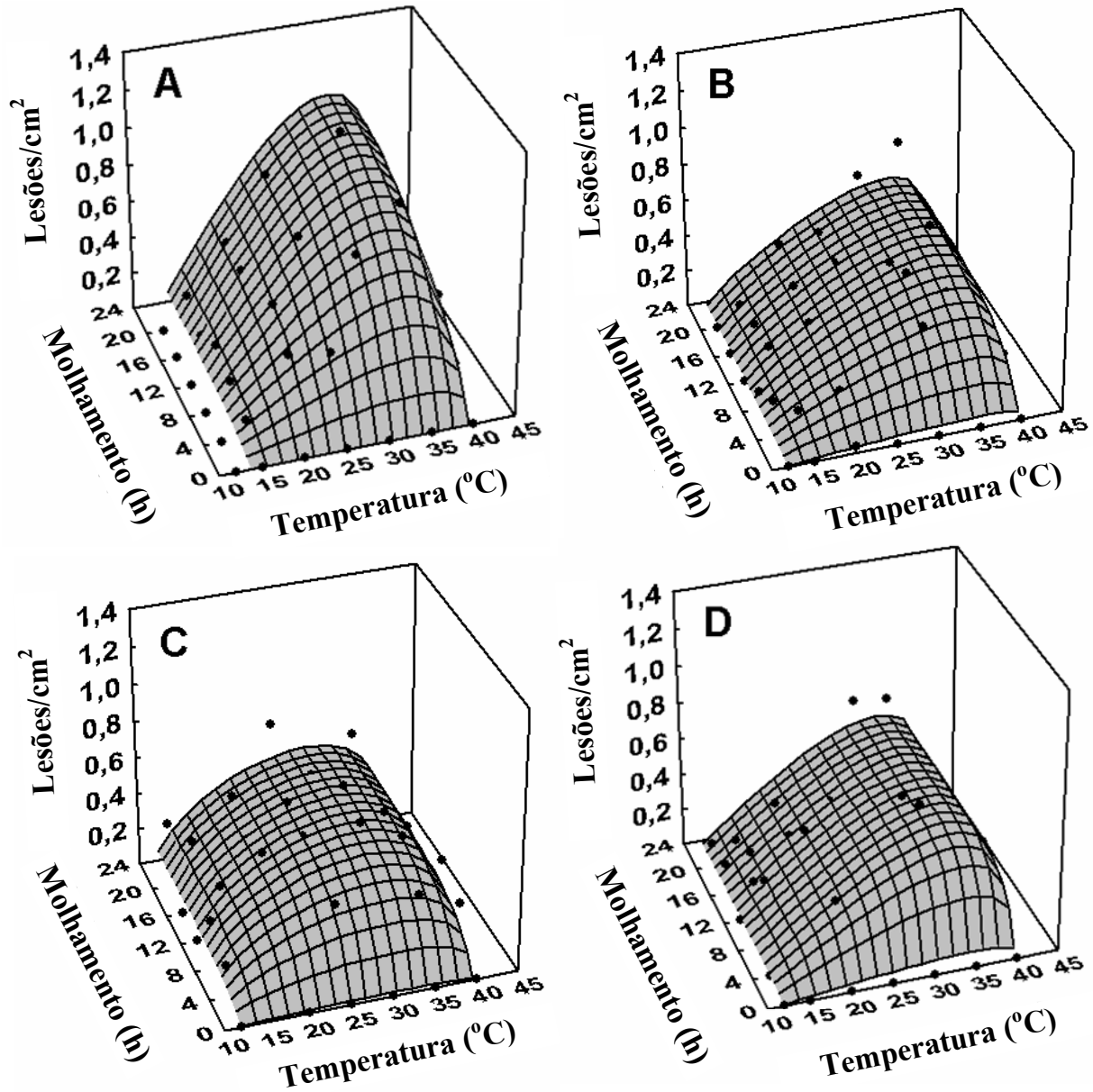


Figura 10- Efeito combinado da temperatura (12, 15, 20, 25, 30, 35, ou 40°C) e do período de molhamento foliar (0, 4, 8, 12, 16, 20, ou 24h) na densidade de lesão (lesões/cm<sup>2</sup>) do cancro cítrico em cultivares de laranja doce Hamlin (A), Natal (B), Pêra (C) e Valência (D). Linhas mostram a função beta-monomolecular ajustada aos dados. Cada ponto representa a média de 3 repetições. Barra vertical representa o desvio padrão. Parâmetros estimados estão representados na Tabela 13

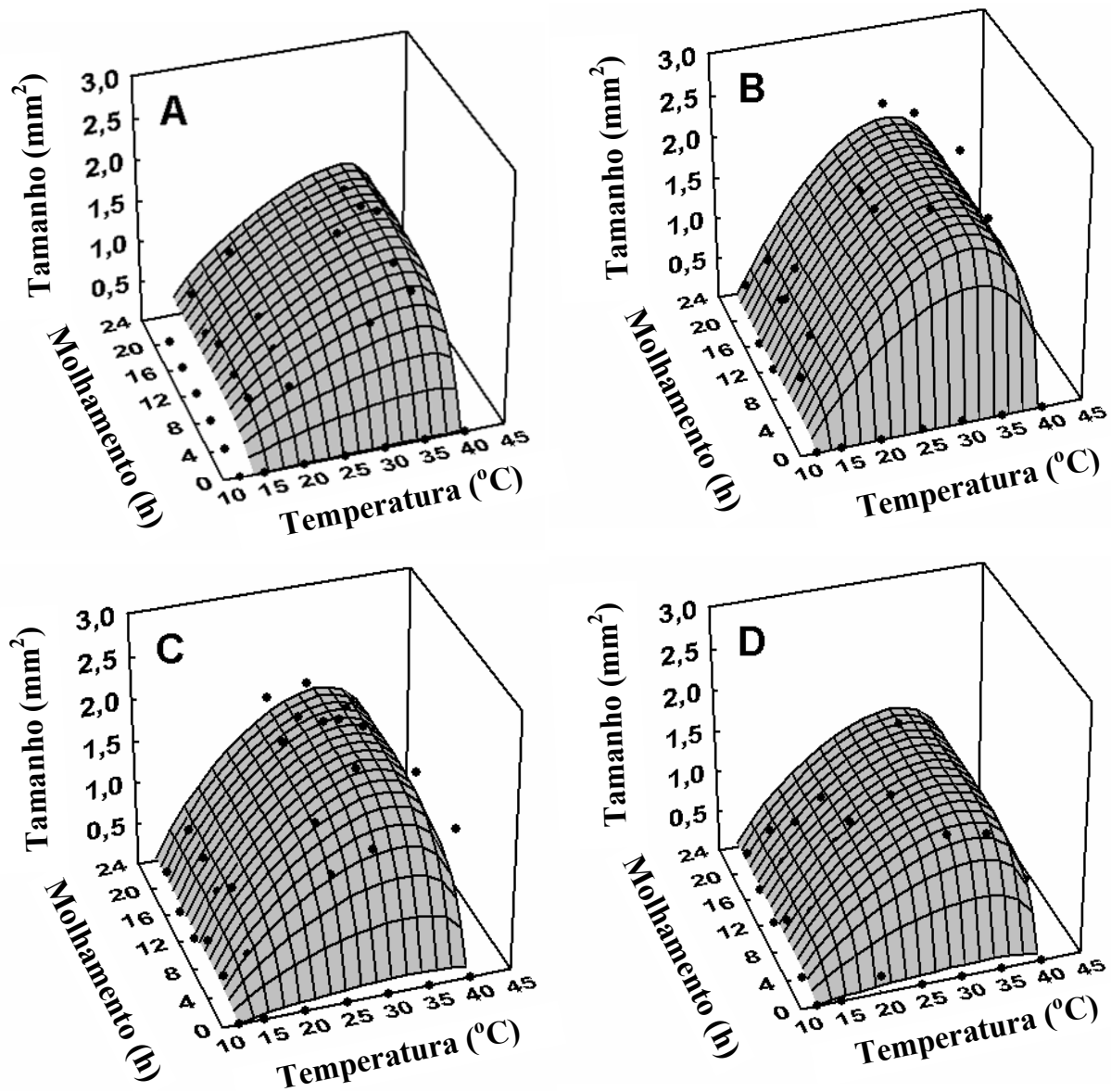


Figura 11- Efeito combinado da temperatura (12, 15, 20, 25, 30, 35, ou 40°C) e do período de molhamento foliar (0, 4, 8, 12, 16, 20, ou 24h) no tamanho de lesão (mm<sup>2</sup>) do cancro cítrico em cultivares de laranja doce Hamlin (A), Natal (B), Pêra (C) e Valência (D). Linhas mostram a função beta-monomolecular ajustada aos dados. Cada ponto representa a média de 3 repetições. Barra vertical representa o desvio padrão. Parâmetros estimados estão representados na Tabela 13

Tabela 14- Valores máximos da severidade da doença, densidade de lesão e tamanho de lesão e suas respectivas temperaturas estimados pela função beta-monomolecular em 24 h de molhamento foliar

<b>Cultivar</b>	<b>Severidade (%)</b>	<b>T<sub>sev</sub> (1) (°C)</b>	<b>Densidade (lesões/cm<sup>2</sup>)</b>	<b>T<sub>dl</sub> (1) (°C)</b>	<b>Tamanho (mm<sup>2</sup>)</b>	<b>T<sub>tl</sub> (1) (°C)</b>
<b>Hamlin</b>	1,86	34,9	1,13	33,9	1,57	35,5
<b>Natal</b>	1,44	32,7	0,59	34,8	1,86	33,2
<b>Pêra</b>	1,05	32,1	0,50	31,0	2,39	34,5
<b>Valência</b>	1,01	31,6	0,54	34,2	1,17	36,0

<sup>(1)</sup> T<sub>sev</sub>, T<sub>dl</sub>, T<sub>tl</sub>, temperaturas estimadas para valores máximo de a severidade da doença, densidade de lesão e tamanho de lesão, respectivamente.

## 2.4 Discussão

Em relação à concentração de inóculo, todas as condições foliares testadas (folha intacta, ferimento mecânico e injúrias de LMC) mostraram-se suscetíveis a cancro cítrico mesmo em baixa concentração de inóculo ( $10^1$  ufc/ml). A ocorrência da doença em baixa concentração de *Xac* demonstra a eficiência da bactéria em infectar e causar doença. A alta capacidade infectiva de *Xac* também foi observada por Gottwald e Graham (1992), que observaram lesões de cancro provenientes da inoculação de duas células bacterianas no interior da câmara sub-estomática.

Em geral para as cultivares testadas, a mínima concentração de inóculo necessária para causar infecção em mais de 50% das plantas foi de  $10^4$  ufc/ml em folha intacta, injúria de LMC fase ovo e 1º ínstar; e  $10^2$  ufc/ml em infecções via ferimento mecânico e via injúria de LMC fase 3º ínstar e pupa. Goto (1992), Goodman (1982) e Zubrzycki e Zubrzycki (1987) também determinaram que as concentrações de inóculo de  $10^4$  ufc/ml e  $10^2$  ufc/ml eram suficientes para causar doença em folhas intactas e feridas, respectivamente.

Os valores de PMI do cancro cítrico proveniente de infecção via ferimento mecânico e injúria de LMC fase 3º ínstar e pupa foram semelhantes entre si, assim como foram semelhantes os PMI da folha intacta, injúria de LMC fase ovo e 1º ínstar nas diferentes concentrações de inóculo. Os menores PMI observados foram com ferimento mecânico e injúria de LMC fase 3º ínstar e pupa (8 dias em  $10^6$  ufc/ml) e a diferença com os PMI das demais condições foliares foi aumentando em concentrações menores de inóculo.

A severidade da doença, densidade de lesão e tamanho de lesão apresentaram um crescimento exponencial em relação ao aumento da concentração de inóculo. As variáveis em relação ao progresso das fases da LMC também apresentaram um crescimento exponencial. Somente em folha intacta e ferimento mecânico os valores de tamanho de lesão pouco variaram em relação a concentração de *Xac* (Figuras 1-3).

A diferença entre a severidade da doença nas cultivares de laranja Natal, Pêra e Valência diminuiu em função do decréscimo da concentração de inóculo, igualando-se em  $10^1$  ufc/ml (Tukey a 5%). A cultivar Pêra foi a mais suscetível nas concentrações elevadas de *Xac* (Tabela 2).



Na concentração de  $10^6$  ufc/ml, a injúria de LMC fase pupa foi mais suscetível que as demais condições foliares (Tabela 2). Entretanto, a suscetibilidade da fase pupa assemelhou-se à do ferimento mecânico nas concentrações menores, enquanto que a suscetibilidade das folhas com injúrias de LMC fase ovo a 3º instar foram semelhantes à da folha intacta.

A  $10^6$  ufc/ml, os valores baixos da severidade em folha com injúria de LMC fase ovo e 1º instar estão relacionados ao tamanho diminuto da folha no momento da inoculação (Tabela 2). O adulto da LMC somente oviposita em folhas extremamente jovens, com poucos dias após a emissão da folha.

A semelhança entre a severidade da folha intacta com a injúria de LMC fase ovo e 1º instar sugere que a infecção de *Xac* nas folhas com injúria de LMC nessas fases ocorreu via estômato. No momento da inoculação, a área injuriada pelo 1º instar da LMC é extremamente pequena, sendo uma linha paralela à nervura principal da folha, e no caso da fase ovo, a área injuriada é inexistente. O papel da LMC nessas duas fases não contribui significativamente para o aumento da severidade do cancro cítrico.

A fase pupa favoreceu a infecção de *Xac* de forma semelhante ou superior a um recente ferimento mecânico em folhas de citros. Aparentemente o papel da LMC na infecção de *Xac* é relevante somente a partir da fase 3º instar. A principal diferença entre a fase ovo e pupa é o tamanho da área injuriada, mínima naquela e máxima nesta. Durante o desenvolvimento da LMC, a lagarta alimenta-se do tecido paliádico foliar, aumentando continuamente a área injuriada até a formação da câmara pupal. O crescimento exponencial da severidade da fase ovo a pupa da LMC (Figura 1) mostra que a severidade aumenta à medida que a área injuriada cresce, destacando-se o papel do tamanho da área injuriada na suscetibilidade da folha de citros ao cancro cítrico.

Os trabalhos de Gottwald e colaboradores (GOTTWALD; GARNSEY, 1991; GOTTWALD; GRAHAM, 1992; GOTTWALD et al., 1993; GOTTWALD; GRAHAM; SCHUBERT, 1997) sugerem duas hipóteses quanto ao papel da LMC no aumento da severidade do cancro cítrico: exposição do mesofilo foliar e disseminação da bactéria no interior das galerias. O papel da LMC na exposição do mesofilo foliar, favorecendo a infecção direta de *Xac* no tecido foliar, foi observado em nossos experimentos, evidenciando que quanto maior for a área de mesofilo exposto (injúria) maior será a suscetibilidade da folha à infecção. Entretanto, o papel da LMC na disseminação de *Xac* no interior das galerias em formação não foi observado.

As severidades das folhas com LMC fase ovo e 1º instar foram semelhantes àquelas de folhas não infestadas pela LMC (folha intacta).

As lesões de cancro cítrico são formadas no mesmo local da ocorrência da infecção de *Xac*, ou seja, no sítio de infecção. Assim, a quantidade de lesão de cancro, ou seja, a densidade de lesão na folha, pode ser interpretada como o número de infecções de *Xac* bem sucedidas. Logicamente, à medida em que se eleva a concentração de *Xac*, o número de infecções aumenta porque há maior cobertura da população bacteriana sobre a superfície foliar, aumentando as chances da bactéria ser depositada sobre uma abertura natural ou ferimento. A  $10^6$  ufc/ml, a densidade de lesão em injúrias de LMC fase pupa foi semelhante à folha intacta e ferimento mecânico (Figura 2, Tabela 5). Isso indica que provavelmente o número de infecções foi semelhante entre essas condições foliares. Entre as cultivares, a  $10^6$  ufc/ml, a Valência apresentou um maior número de lesões (Tabela 5).

O tamanho de lesão pode ser interpretado como o crescimento populacional de *Xac* após a infecção. A população bacteriana produzida está fortemente relacionada com o tamanho da área da lesão de cancro (GRAHAM; GOTTWALD; FARDELMAN, 1990). Nas concentrações de  $10^1$  a  $10^6$  ufc/ml, o tamanho de lesão pouco variou em folha intacta e ferimento mecânico. Isso leva a supor que independentemente da concentração de inóculo, *Xac* é capaz de colonizar eficientemente o tecido foliar uma vez que a infecção seja estabelecida. O tamanho de lesão em folha com injúria da fase pupa, em  $10^6$  ufc/ml, foi superior às demais condições foliares (Tabela 5). Provavelmente, o grande tamanho das lesões desta fase é proveniente de várias lesões pequenas que coalescem. A coalescência de lesões mascara a densidade de lesão e assim, o número de infecções pode ter sido superior àquela que foi observado.

Em relação ao período de suscetibilidade, a infecção de *Xac* via estômato (folha intacta) ocorreu até 25 dias após a emissão da folha (Figura 4). A suscetibilidade da folha aumentou até próximo de 10 dias de idade da folha a partir da qual decresceu, tornando-se resistente a partir de 25 dias de idade. A diminuição da suscetibilidade provavelmente está relacionada com mecanismos que conferem resistência a *Xac* e são formados ou tornam-se eficazes com a maturação da folha.

Na literatura, diversos autores citam a mudança do comportamento de suscetibilidade de folhas novas e folhas maduras de citros (LEE, 1922; STALL et al., 1982; GOTTWALD;

GRAHAN, 1992; GRAHAM et al., 1992a). As mudanças fisiológicas e morfológicas que ocorrem na folha de citros durante o seu crescimento e maturação, que interferem na infecção de *Xac*, ainda não estão bem esclarecidas. Segundo Gottwald e Graham (1992), o espessamento da cutícula e cera durante a maturação da folha provavelmente dificulta a formação de filme d'água na cavidade sub-estomática, desfavorecendo a penetração da bactéria via estômato. A suscetibilidade ao cancro cítrico em relação à idade da folha, segundo Stall et al. (1982), está associada ao desenvolvimento de resistência do mesofilo à multiplicação de *Xac* em folhas maduras.

A infecção de *Xac* via ferimento mecânico (agulha histológica) ocorreu até cinco dias após o ato do ferimento, para todas as cultivares de laranja doce testadas (Figura 5). A suscetibilidade do ferimento mecânico decresceu continuamente após o ato do ferimento. A diminuição da suscetibilidade do ferimento em relação ao tempo provavelmente está relacionada com o processo de cicatrização da área ferida, impedindo o contato direto da bactéria com o mesofilo foliar. Segundo Goto (1990), ferimentos traumáticos cicatrizam rapidamente em 1 a 2 dias. Em nossos experimentos, o período de suscetibilidade do ferimento mecânico foi maior do que aquele sugerido por Goto (1990). Essa diferença pode ser explicada pelas condições controladas em que se efetuou o presente trabalho, na ausência de raios solares e ventos, o que pode ter retardado o processo de cicatrização do ferimento mecânico.

A infecção de *Xac* em injúria de LMC ocorreu por um período de 28 dias, de forma semelhante ao período de suscetibilidade da folha intacta (Figura 6). Entretanto, o pico máximo de suscetibilidade da folha intacta foi aos 10 dias após a emissão da folha e na injúria de LMC o pico máximo foi aos 16 dias após a oviposição. A suscetibilidade do ferimento mecânico diminuiu drasticamente já nas primeiras 24 horas, encerrando-se em 5 dias. Os ferimentos causados pela LMC demoram a cicatrizar, favorecendo a infecção direta de *Xac* no mesofilo foliar por várias semanas.

Goto (1990) observou a suscetibilidade de injúria de LMC a *Xac* até 14 dias em condição de campo. Talvez em condições de campo, na presença de luz solar e ventos, o processo de cicatrização seja mais rápido que em condições controlada, onde há pouca variação de temperatura, umidade relativa e de outros fatores ambientais.

A severidade em folhas com injúria de LMC foi até 3 vezes superior à severidade daquelas folhas sem ferimento (intactas) (Tabela 9). A injúria nas folhas facilita a infiltração da água, favorecendo a infecção de *Xac* no mesofilo foliar (GRAHAM et al. 2004).

O papel da injúria de LMC favorecendo a infecção de *Xac* é evidente em nossos experimentos, ao contrário da hipótese da disseminação da bactéria nas galerias pela LMC (GOTTWALD; GARNSEY, 1991). O ciclo larval de LMC é de seis dias nas condições de temperatura (28°C) em que foi conduzido o experimento (Chagas; Parra, 2000). O valor máximo de severidade de cancro cítrico foi observado em injúrias inoculadas após 16 dias da oviposição. Nessa data, a LMC não foi observada nas galerias, ou se presente, estava já na fase pupa. A ausência da LMC na galeria demonstra mais uma vez que o papel da LMC no progresso do cancro cítrico está fortemente relacionado com a exposição do mesofilo foliar à infecção de *Xac*.

O aumento da suscetibilidade da injúria de LMC até o 6º dia pode ser explicado pelo aumento observado da área injuriada durante o progresso da LMC das fases ovo a pupa. Após a formação da câmara pupal, o tamanho da área injuriada torna-se constante. Entretanto, a suscetibilidade da injúria continua aumentando mesmo sem ocorrer crescimento significativo da área injuriada. O aumento da suscetibilidade da injúria na ausência da LMC provavelmente pode estar relacionada com a formação de células calo durante o processo de cicatrização foliar. As células calo são células do tecido vegetal sem parede celular, formadas durante o processo de cicatrização da injúria causada por LMC, como observado por Achor, Browning e Albigo (1997).

Em relação às cultivares, os períodos de suscetibilidade e as datas dos picos máximos de suscetibilidade foram semelhantes. Os valores máximos de severidade em folha intacta e ferimento mecânico não diferiram entre as cultivares ( $p>0,05$ ). Entretanto, a injúria de LMC na cultivar Valência foi mais suscetível (Tabela 9).

No período máximo de suscetibilidade, ocorreu maior número de infecções em injúria de LMC, gerando maior densidade de lesão do que em folha intacta e ferimento mecânico (Tabela 10). O tamanho de lesão em injúria LMC (6,95 mm<sup>2</sup>) foi duas vezes maior que o tamanho de lesão em folha intacta e com ferimento mecânico (Tabela 10). As lesões com grande área são provenientes da coalescência de lesões de inúmeras infecções de cancro cítrico nas galerias de LMC.

O efeito da temperatura combinado com a duração do molhamento foliar influenciou o comportamento do cancro cítrico nas cultivares de laranja Hamlin, Natal, Pêra e Valência. A faixa de temperatura ótima para o desenvolvimento do cancro cítrico foi de 25 a 35°C, com menores períodos de incubação e máxima incidência (100%). As temperaturas extremas, maiores que 40°C e menores de 20°C, interferem no processo de infecção, reduzindo a incidência. Em temperatura na faixa ótima, todas as plantas apresentaram sintomas mesmo em curto período de molhamento, como de 4 h. O processo de infecção do cancro cítrico requer um curto período de molhamento. Como a incidência da doença de 100% ocorreu em temperaturas ótimas com molhamento foliar de 4 h, isso sugere que o mínimo período de molhamento foliar requerido para ocorrer infecção de *Xac* é menor que 4 h. Somente com 0 h de molhamento não foram observados sintomas da doença na maioria das plantas. As poucas plantas que tiveram lesões de cancro em 0 h de molhamento podem ser resultado da habilidade de poucas células da bactéria de infectar plantas uma vez dentro da câmara sub-estomática, como observado por Gottwald e Graham (1992) e Graham et al. (1992a). Nessas plantas, durante a inoculação, células de *Xac* podem ter sido introduzidas diretamente no interior da câmara sub-estomática.

A eficiência no processo de infecção, mesmo com curto período de molhamento, em temperaturas ótimas, pode estar relacionada com a interferência no ambiente pela própria bactéria. Consideráveis evidências indicam que bactérias podem modificar o ambiente nos seus sítios de infecção para intensificar a colonização das plantas, tais como aumento da concentração local de nutrientes ou pela produção de polissacarídeos extracelulares (Beattie; Lindow, 1999). Esses polissacarídeos podem fixar as células bacterianas na superfície da folha e prevenir a dessecação da folha, como também modificar o ambiente ao redor da célula, tornando-o mais favorável para o crescimento e a sobrevivência do patógeno.

O PMI da doença nas diferentes cultivares foi semelhante, variando entre 10 e 16 dias nas temperaturas de 25 a 35°C, inversamente. As temperaturas abaixo de 20°C resultaram longos períodos de incubação, acima de 20 dias. Gottwald e Graham (1992) relataram que sintomas de cancro cítrico podem aparecer depois de 60 dias quando em condições adversas para a infecção e incubação de *Xac*.

A combinação das equações obtidas para os dados de temperatura (beta generalizada) e molhamento foliar (monomolecular), possibilitou a construção de superfícies de resposta de

severidade de cancro cítrico para cada uma das cultivares de laranja doce, indicando severidade alta na faixa de 30-35°C em molhamento superior a 16 h

A 15 e 20°C, pequenos acréscimos na severidade da doença entre 0 e 24 h de molhamento foliar foram observados. Entretanto, o acréscimo torna-se bastante acentuado a 30 e 35°C. Assim, à medida em que a temperatura aumenta, os períodos de molhamento longos tornam-se mais eficientes no aumento da severidade. A partir de 35°C, a eficiência de longo período de molhamento diminui, e a diferença entre a severidade de 0 e 24 h torna-se novamente menos acentuada.

Entre 15 e 40°C, a severidade da doença cresceu até o ponto de inflexão (de 30 a 35°C), a partir do qual decresceu drasticamente aproximando-se de zero. A curva formada é assimétrica inclinada para a direita (Figura 9). Com o aumento do molhamento, a curva prolonga-se no sentido do eixo da ordenada.

A severidade máxima da doença estimada para a cultivar Hamlin foi mais alta (1,86%) que as severidades das demais cultivares testadas (Tabela 14), confirmando sua maior suscetibilidade (GOTTWALD et al., 2002). A maior valor de severidade na cultivar Hamlin foi em função do maior número de lesões (1,13 lesões/cm<sup>2</sup>) em comparação às demais cultivares, aproximadamente duas vezes maior.

A incidência e a severidade do cancro cítrico apresentaram valores elevados entre 25 e 35°C para as cultivares de laranja doce testadas. Esse resultado difere do reportado por Peltier (1920), que determinou a temperatura ótima entre 20 e 30°C. Entretanto, o autor usou espécie de citros diferente de *C. sinensis*.

Os valores de densidade de lesão e tamanho de lesão (Figura 10 e 11) aumentaram até o ponto de inflexão ao redor de 35°C, a partir do qual decresceram acentuadamente. A inclinação da superfície resposta para a direita mostra a maior influência da temperatura e o pequeno efeito do molhamento foliar no aumento da quantidade e tamanho de lesões. Os dados de densidade de lesão e de tamanho de lesão mostram o efeito da temperatura sobre o processo de infecção e sobre o crescimento populacional da bactéria, respectivamente. O tamanho de lesão está fortemente relacionado com a população da bactéria (GRAHAM; GOTTWALD; FARDELMAN, 1990). As temperaturas extremas, abaixo de 25°C e acima de 35°C, afetam o sucesso da infecção

de *Xac* e diminuem o crescimento populacional de *Xac* no interior do tecido, resultando na diminuição da severidade da doença.

A temperatura pode agir diretamente sobre *Xac*, afetando a sobrevivência e o crescimento pré e pós-infecção, assim como, indiretamente, afetando a fisiologia dos citros. Estudos realizados por Reuther (1977) demonstram que temperaturas abaixo de 13°C e acima de 40°C paralisam o crescimento dos citros. O máximo desenvolvimento ocorre a 30°C. Esses dados coincidem com o efeito da temperatura no progresso do cancro cítrico, cujo desenvolvimento ocorre de 12-40°C, com máximo em 30-35°C. A temperatura, além de alterar a fisiologia da planta, influencia também a abertura dos estômatos, afetando o processo de infecção de *Xac* via estômato.

Com o surgimento da LMC houve um considerável aumento na severidade do cancro cítrico e mudança do comportamento da doença (GOTTWALD; GRAHAM; SCHUBERT, 1997; RODRIGUES et al., 1998; BERGAMIN FILHO et al., 2001). Com os dados destes experimentos, fica evidente o efeito da injúria de LMC e seu forte sinergismo com a *Xac*, potencializando o desenvolvimento da doença, principalmente pela exposição do mesófilo foliar, favorecendo o processo de infecção de *Xac*.

A temperatura exerce maior influência na infecção e desenvolvimento do cancro cítrico do que a duração do molhamento foliar, em condições controladas. Epidemias no campo são mais influenciadas pela diferenças no regime de temperatura, uma vez que o período mínimo de molhamento necessário para se estabelecer à infecção é curto. Vale ressaltar que na região de maior ocorrência do cancro cítrico no Estado de São Paulo, a região Noroeste, predominam temperaturas elevadas, superiores a 30°C, com alta umidade relativa. Os resultados obtidos nesses experimentos explicam a alta incidência do cancro cítrico nessa região.

### 3 CONCLUSÃO

- A faixa de temperatura ótima para a infecção e progresso do cancro cítrico é de 25 a 35°C.
- A temperatura exerce maior efeito no processo de infecção e desenvolvimento do cancro cítrico que o período de molhamento foliar.
- O mínimo período de molhamento foliar necessário para a infecção é inferior a quatro horas.
- O papel da LMC no aumento da severidade do cancro cítrico está relacionado com a exposição do mesofilo foliar às células de *Xac*.
- A suscetibilidade da injúria de LMC ao cancro cítrico é três vezes maior que a suscetibilidade da folha sem ferimento (intacta).
- O período de suscetibilidade da injúria de LMC é seis vezes mais longo do que o período de suscetibilidade do ferimento mecânico.
- A injúria de LMC possibilita a infecção de *Xac* mesmo em baixas concentrações de inóculo. Esse fato explica a mudança recente do comportamento espacial do cancro cítrico em condições de campo.



## REFERÊNCIAS

ACHOR, D.S.; BROWNING, H.W.; ALBRIGO, L.G. Anatomical and histological effects of feeding by *citrus* leafminer (*Phyllocnistis citrella* Stainton) in citrus leaves. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Alexandria, v.122, p.829-836, 1997.

AGOSTINI, J.P.; GRAHAM, J.H.; TIMMER, L.W. Relationship between development of citrus canker and rootstock cultivar for young 'Valencia' orange trees in Misiones, Argentina. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Winter Haven, v.98, p.19-22, 1985.

ALBA, C.G. **El minador de los cítricos, *Phyllocnistis citrella*, Stainton. Introducción y comportamiento em España. Descripción, daños y caracterización ecológica: estrategia de lucha.** Malaga: Consejería de Agricultura y Pesca, 1996. 18p.

AMORIM, L; BERGAMIN FILHO, A. A epidemiologia do cancro cítrico. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.27, p.151-156, 2001.

ANÁLISE EDITORIAL. **Análise**: anuário comércio exterior. São Paulo, 2005. 304p.

ARGOV, Y.; ROSSLER, Y. Introduction, release and recovery of several exotic natural enemies for biological control of the citrus leafminer, *Phyllocnistis citrella*, in Israel. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v.24, p.33-38, 1996.

BARBOSA, J.C.; GIMENES-FERNANDES, N.; MASSARI, C.A.; AYRES, A.J. Incidência e distribuição de cancro cítrico em pomares comerciais do Estado de São Paulo e sul do Triângulo Mineiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.27, p.30-35, 2001.

BATRA, R.C.; SANDHU, S.C.; SHARMA, S.C.; SINGH, R. Biology of the citrus leafminer on some rootstocks and its relationships with abiotic factors. **The Punjab Horticultural Journal**, Punjab, v.28, p.30-35, 1988.

BEATTIE, G.A.; LINDOW, S.E. Bacterial colonization of leaves: A spectrum of strategies. **Phytopathology**, St. Paul, v.89, p.353-359, 1999.

BELASQUE, J.JUNIOR.; PARRA-PEDRAZZOLI, A.L.; NETO, J.R.; YAMAMOTO, P.T.; CHAGAS, M.C.M.; PARRA, J.R.P.; VINYARD, B.T.; HARTUNG, J.S. Adult citrus leafminers

(*Phyllocnistis citrella*) are not efficient vectors for *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 89, p. 590-594, 2005.

BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. **Doenças de plantas tropicais: epidemiologia e controle econômico**. São Paulo, Ceres, 1996. 299 p.

BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L.; GOTTWALD, T.R.; LARANJEIRA, F.F. Spatial distribution of citrus canker in São Paulo – Brazil. In: INTERNACIONAL WORKSHOP ON PLANT DISEASE EPIDEMIOLOGY, 8., 2001, Ouro Preto. **Proceedings...** Ouro Preto: Internacional Society of Plant Pathology, 2001. p. 28-29.

BRUNINGS, A.M.; GABRIEL, D.W. *Xanthomonas citri*: breaking the surface. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v.4, p. 141-157, 2003.

CAMPBELL, C.L.; MADDEN, L.V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: John Wiley, 1990. 532p.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Hanover, v.42, p.225, 1939.

CHAGAS, M.C.M.; PARRA, J.R.P. *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera: Gracillariidae): técnica de criação e biologia em diferentes temperaturas. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v.29, p.227-235, 2000.

CHAGAS, M.C.M.; PARRA, J.R.P.; NAMEKATA, T.; HARTUNG, J.S.; YAMAMOTO, P.T. *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera: gracillariidae) and its relationships with the citrus canker bacterium *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* in Brazil. **Neotropical Entomology**, Jaboticabal, v.30, p.55-59, 2001.

CHIARADIA, L.A.; MILANEZ, J.M. “Lagarta minadora-dos-citros”, uma nova praga na citricultura catarinense. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v.10, p.20-21, 1997.

CLAUSEN, C.P. Two citrus leaf miners of the far east. **USDA Technical Bulletin**, Washington, v.252, p. 1-13, 1931.

COOK, A.A. Association of citrus canker pustules with leaf miner tunnels in North Yemen. **Plant Disease**, St. Paul, v.72, p.546, 1988.

DOPSON, R. N. The eradication of citrus canker. **Plant Disease Reporter**, St. Paul, v.48, p.30-31, 1964.

FAWCETT, H.S.; JENKINS, A.E. Records of citrus canker from herbarium specimens of the genus *Citrus* in England and the United States. **Phytopathology**, St. Paul, v. 23, p.820-824, 1933.

FEICHTENBERGER, E.; RAGA, A. First Record of citrus leafminer *Phyllocnistis citrella* (Lep.: Gracillariidae) in Brazil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 14; 1996, Curitiba. **Resumos...** Curitiba: SBF, 1996. p.445.

FEICHTENBERGER, E.; MÜLLER, G.W.; GUIRADO, N. Doenças dos citros (*Citrus* spp.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. ; REZENDE, J.A.M. (Ed.). **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v.2, p.261-296.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. **Agrianual, 2005: anuário da agricultura brasileira**. São Paulo, 2005. 520p.

FUNDECITRUS. **Cancro Cítrico**. Disponível em:  
<<http://www.fundecitrus.com.br/cancro.html>>. Acesso em: 6 maio 2006.

GARIJO, C.; GARCIA, E.J. *Phyllocnistis citrella* (Stainton, 1856) (Insecta:Lepidoptera: Gracillariidae: Phyllocnistinae) em los cultivos de citricos de andalucia (Sur España): biologia, ecologia y control de la plaga. **Boletin de Sanidad Vegetal: Plagas**, Barcelona, v.20, p.815-816, 1994.

GOODMAN, R. N. The infection process. In: MOUNT, M. S.; LACY, G. H. (Ed.). **Phytopathogenic Prokariotes**. London: Academic Press, 1982. chap. 2, p.31-62.

GOTO, M. **Fundamentals of bacterial plant pathology**. San Diego: Academic Press, 1990. 342p.

GOTO, M. Citrus canker. In: KUMAR, J.; CHAUBE, H.S.; SINGH, U.S.; MUKHOPADHYAY, A.N. (Ed.). **Plant diseases of international importance**. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1992. chap. 3, p.170-208.

GOTO, M.; HYODO, H. Role of extracellular polysscharides of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* in the early stage of infection. **Annual Phytopathology Society of Japan**, Tokio, v.51, p.22-31, 1985.

GOTO, M.; OHTA, K.; OKABE, N. Studies on saprophytic survival of *Xanthomonas citri* (Hassé) Dowson. 2. Longevity and survival density of the bacterium on artificially infested weeds, plant residues and soils. **Annual Phytopathology Society**, Tokyo, v.41, p.141-147, 1975.

GOTTWALD, T.R.; GARNEY, S.M. Major citrus diseases in southeast Asia. **Citrus Industry**, Tampa, v. 71, p.58-63, 1991.

GOTTWALD, T.R.; GRAHAM, J.H. A device for precise and nondisruptive stomatal inoculation of leaf tissue with bacterial pathogens. **Phytopathology**, St. Paul, v.82, p.930-935, 1992.

GOTTWALD, T.R.; TIMMER, L.W. The efficacy of windbreaks in reducing the spread of citrus canker caused by *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. **Tropical Agriculture**, London, v.72, p.194-201, 1995.

GOTTWALD, T.R.; McGUIRE, R.G.; GARRAM, S. Asiatic citrus canker: spatial and temporal spread in simulated new planting situations in Argentina. **Phytopathology**, St. Paul, v.78, p. 739-745, 1988.

GOTTWALD, T.R.; GRAHAM, J.H. ; SCHUBERT, T.S. An epidemiological analysis of the spread of citrus canker in urban Miami, Florida, and synergistic interaction with the Asian leaf miner. **Fruits**, Paris, v.52, 383-390, 1997.

GOTTWALD, T.R.; GRAHAM, J.H.; CIVEROLO, E.L.; BARRETT, H.C.; HEARN, C.J. Differential host range reaction of citrus and citrus relatives to citrus canker and citrus bacterial spot determined by leaf mesophyll susceptibility. **Plant Disease**, St. Paul, v.77, p.1004-1009, 1993.

GOTTWALD, T.R.; SUN, X.; RILEY, T.; GRAHAM, J.H.; FERRANDINO, F.; TAYLOR, E.L. Geo-referenced spatiotemporal analysis of the urban citrus canker epidemic in Florida. **Phytopathology**, St. Paul, v.92, p.361-377, 2002.

GRAHAM, J.H. Varietal susceptibility to citrus canker: Observations from southern Brazil. **Citrus Industry**, Tampa, v.82, p.15-17, 2001.

GRAHAM, J.H., GOTTWALD, T.R.; FARDELMAN, D. Cultivar-specific interactions for strains of *Xanthomonas campestris* from Florida that cause citrus canker and citrus bacterial spot. **Plant Disease**, St. Paul, v.74, p. 753-756, 1990.

GRAHAM, J.H., GOTTWALD, T.R., CIVEROLO, E.L.; MCGUIRE, R.G. Population dynamics and survival of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* in soil in citrus nurseries in Maryland and Argentina. **Plant Disease**, St. Paul, v.73, p.423-427, 1989.

GRAHAM, J.H.; GOTTWALD, T.R.; RILEY, T.D.; ACHOR, D. Penetration through leaf stomata and growth of strains of *Xanthomonas campestris* in citrus cultivars varying in susceptibility to bacterial diseases. **Phytopathology**, St. Paul, v.82, p. 1319-1325, 1992a.

GRAHAM, J.H., GOTTWALD, T.R., RILEY, T.D.; BRUCE, M.A. Susceptibility of citrus fruit to bacterial spot and citrus canker. **Phytopathology**, St. Paul, v.82, p.452-457, 1992b.

GRAHAM, J.H.; GOTTWALD, T.R.; CUBERO, J.; ACHOR, D.S. *Xanthomonas campestris* pv. *citri*: factors effecting successful eradication of citrus canker. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v.5, p.1-15, 2004.

GRAHAM, J.H.; GOTTWALD, T.R.; RILEY, T.D.; CUBERO, J.; DROUILLARD, D.L. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Xcc) on various surfaces and chemical control of asiatic citrus canker (ACC). In: INTERNACIONAL CITRUS CANKER RESEARCH WORKSHOP, **Proceedings...** Fort Pierce, 2000. Disponível em: <<http://www.docs.state.fl.us/canker>>. Acesso em: 25 out. 2005.

HASSE, C.H. *Pseudomonas citri*, the cause of citrus-canker. A preliminary report. **Journal of Agriculture Research**, Washington, v.4, p.97-100, 1915.

HAU, B.; KRANZ, J. Mathematics and statistics for analysis in epidemiology. In KRANZ, J. (Ed.). **Epidemics of plant diseases. Mathematical analysis and modeling**. Berlin: Springer, 1990. p.12-52.

HEPPNER, J.B. Citrus leaf miner, *Phyllocnistis citrella*, in Florida (Lepdoptera: Gracillariidae: Phyllocnistinae). **Tropical Lepdoptera**, Gainesville, v.4, p.49-64, 1993.

HEPPNER, J.B. Citrus leafminer (Lepdoptera: Gracillariidae) on fruit in Florida. **Florida Entomologist**, DeLeon Springs, v.78, p.182-186, 1995.

HUANG, M.D.; LI, S.X. The damage and economic threshold of citrus leaf miner, *Phyllocnistis citrella* Stainton to citrus. In: CHANG, C.X.; HUANG, M.D.; LI, S.X.; MAI, X.H.; TAN, W.C.; SZETU, J. (Ed.). **Studies on the integrated management of Citrus insect pests**. Guangzhou: Academic Book & Periodical Press, 1989, chap.4, p.84-89.

KNAPP, J.; PEÑA, J.; STANSLY, P.; HEPPNER, J.; YANG, Y. Citrus Leafminer, a new pest of citrus in Florida. **Citrus Industry**, Tampa, v.74, p.42-43, 1993.

KOIZUMI, M. Relation of temperature to the development of citrus canker lesions in the spring. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 2., 1977, Orlando. **Proceedings...** Riverside: International Society of Citriculture, 1977. p.924-928.

KOIZUMI, M.; KUHARA, S. Evaluation of citrus plants for resistance to bacterial canker disease in relation to lesion extension. **Bulletin Tree Fruit Research**, Washington, v.4, p.73-92, 1982.

KOIZUMI, M.; KIMIJIMA, E.; TSUKAMOTO, T.; TOGAWA, M.; MASUI, S. Dispersal of citrus canker bacteria in droplets and prevention with windbreaks. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 8., 1996, Sun City. **Proceedings...** Riverside: International Society of Citriculture, 1996. v.1, p. 340-344.

KRANZ, J.; HAU, B. Systems analysis in epidemiology. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.18, p.67-83, 1980.

LEE, H. A. Relation of the age of citrus tissues to the susceptibility to citrus canker. **Journal of the Science**, London, v.20, p.331-341, 1922.

LEITE JUNIOR, R.P. **Cancro cítrico**: prevenção e controle no Paraná. Londrina: Fundação Instituto Agrônômico do Paraná, 1990. 51 p. (Circular, 61).

LEITE JUNIOR, R.P.; MOHAN, S.K. Evaluation of citrus cultivars for resistance to canker caused by *Xanthomonas campestris* pv.*citri* (Hasse) Dye in the State of Paraná, Brazil. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 5., 1984, São Paulo. **Proceedings...** Riverside: International Society of Citriculture, 1984a. v.2, p.385-389.

LEITE JUNIOR, R.P.; MOHAN, S.K. Survival of *Xanthomonas campestris* pv.*citri* (Hasse) Dye in soil and in association with some gramineous plants. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 5., 1984, São Paulo. **Proceedings...** Riverside: International Society of Citriculture, 1984b. v.2, p.365-368.

LIMA, A.F.; AGUIAR, L.A. Ocorrência e infestação de larva minadora dos citros *Phyllocnistis citrella* (Lepidoptera: Gracillariidae) no Estado do Rio de Janeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 16., Salvador, 1997. **Resumos...** Salvador: SEB, 1997, p.229.

LOLATO, A.; MORAES, J.C. Ocorrência da “Lagarta Minadora das Folhas de Citros” *Phyllocnistis citrella* Stainton, 1856 (Lepidoptera: Gracilariidae) em Lavras, sul de Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.21, p.521-522, 1997.

LOPES, C.M.D.A.; PAMPLONA, A.M.S.R.; TELES, B.R. Ocorrência e levantamento do minador das folhas de citros *Phyllocnistis citrella* (Lepidoptera: gracilariidae) no Estado do Amazonas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 16., Salvador, 1997. **Resumos...** Salvador: SEB, 1997. p.285.

MACIEL, J.L.N.; DUARTE, V. ; AYUB, M.A.Z. Plasmid DNA restriction profile and copper sensitivity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* from Rio Grande do Sul, Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.23, p.116-120, 1998.

MATSUMOTO, R.; OKUDAI, N. An early evaluation of citrus seedlings for the resistance to bacterial canker disease *Xanthomonas campestris* pathovar *citri* by a needle prick inoculation. **Bulletin Fruit Tree Research**, Okitsu, v.9, p.11-24, 1988.

MCLEAN, F.T. A study of the structure of stomata of two species of citrus in relation to citrus canker. **Bulletin of Torrey Botanic Club**, Bronx, v.48, p.101-106, 1921.

MCLEAN, F.T.; LEE, A.H. The resistance to citrus canker of *Citrus nobilis* and a suggestion as to the production of resistant varieties in other *Citrus* species. **Phytopathology**, St. Paul, v.11, p.109-114, 1921.

MORAES, L.A.H.; SOUZA, E.L.S.; BECKER, R.F.P.; BRAUN, J. Controle químico do minador-das-folhas dos citros *Phyllocnistis citrella* Staintonm 1856. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, Florianópolis, v.5, p.19-22, 1999.

MOREIRA, M.A.B.; MEDEIROS, R.D.; DUARTE, O.R. Ocorrência e avaliação do dano da lagarta minadora dos citros *Phyllocnistis citrella* (Lepidoptera: Gracilariidae) em Roraima. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 16., Salvador, 1997. **Resumos...** Salvador:SEB, 1997. p.88.

NASCIMENTO, J.F.; RODRIGUES NETO, J.; ALVES, J.M.A.; RÊGO, M.M.; ARAÚJO, A.E.S. Ocorrência de cancro cítrico no Estado de Roraima. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.29, p.81-82, 2003.

PAIVA, P.E.B.; BENVENGA, S.R.; GRAVENA, S. Observações sobre a lagarta minadora dos citros e seus parasitóides no Estado de São Paulo. **Laranja**, Cordeirópolis, v.19, p.285-292, 1998.

PALAZZO, D.A.; MALAVOLTA JUNIOR, V.A.; NOGUEIRA, E.M.C. Influência de alguns fatores climáticos sobre o índice de infecção de cancro cítrico, causado por *Xanthomonas campestris* pv. citri, em laranjeira Valência (*Citrus sinensis*), em Bataguassu, MS. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.9, p.283-290, 1984.

PELTIER, G.L. Influence of temperature and humidity on the growth of *Pseudomonas citri* and its host plants and infection and development of disease. **Journal of Agriculture Research**, Washington, v.20, p.447-505, 1920.

PELTIER, G.L. Further studies on the relative susceptibility to citrus canker on different species and hybrids of the genus *Citrus*, including the wild relatives. **Journal Agriculture Research**, Washington, v.28, p.227-239, 1924

PEÑA, J.E.; DUNCAN, R.; BROWNING, H. Seasonal abundance of *Phyllocnistis citrella* (Lepidoptera: Gracillariidae) and its parasitoids in south Florida citrus. **Environmental Entomology**, College Park, v.25, p.698-702, 1996.

PEREIRA, A.L.G.; WATANABE, K.; ZAGATO, A.G.; CIANCIULLI, P.L. Sobrevivência de *Xanthomonas citri* (Hasse) Dowson em capim amargoso (*Trichachne insularis* (L.) Nees) de pomares erradicados, no Estado de São Paulo. **Biológico**, São Paulo, v.42, p.217-221, 1976

PEREIRA, A.L.G.; WATANABE, K.; ZAGATTO, A.G.; CIANCIULLI, P.L. A sobrevivência de *Xanthomonas citri* (Hasse) Dowson, agente causal do cancro cítrico na rizosfera de capim colônia (*Panicum maximum* Jacq.). **Biológico**, São Paulo v.44, p.135-138, 1978.

PERIOTO, N.W. Primeira ocorrência do Gênero *Galeopsomyia* Girault (Hymenoptera: Chalcidoidea: Eulophidae) para o Brasil. **Biológico**, São Paulo, v.59, p.97-98, 1997.

PRUVOST, O.; GOTTWALD, T.R.; BROCHERIEUX, C. The effect of irrigation practices on the spatio-temporal increase of Asiatic citrus canker in simulated nursery plots in Reunion Island. **European Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v.105, p.23-27, 1999.

QUADLING, C. Preservation of *Xanthomonas* by freezing in glycerol broth. **Canadian Journal of Microbiology**, Saskatoon, v.6, p.475, 1960.

RADKE, S.G.; KANDLKAR, H.G. Bionomics of citrus leafminer. **PKV Research Journal**, PKV, v.11, p.9102, 1987.



RODRIGUES, J.C.V.; ROSSETTI, V.; MACHADO, M.A.; TEÓFILO SOBRINHO, M.; NOGUEIRA, N.L. Larva dos citros: um fator de aumento de pragas e cancro cítrico. **Laranja**, Cordeirópolis, v.19, p.49-60, 1998.

ROSSETTI, V. Citrus canker in Latin America: a review. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 2., Orlando, 1977. **Proceedings...** Riverside: International Society of Citriculture, 1977. v.3, p.918-924.

ROSSETTI, V. Identificação de cancro cítrico. **Biológico**, São Paulo, v.47, p.145-153, 1981.

SACARIAS, E.N.; CANALES, A.C. *Ageniaspis citricola* Logvinovskaya, 1983 (Hymenoptera: encyrtidae) controlador de *Phyllocnistis citrella* “minador de la hoja de los citros”: experiência peruana. Lima: SENASA, 1999. 88p.

SAS INSTITUTE. **SAS System 8.2**. Cary. 2001. 4 CD-ROM.

SCHAAD, N.W.; VIDAVER, A.K.; LACY, G.H.; RUDOLPH, K.; JONES, J.B. Evaluation of proposed amended names of several Pseudomonads and Xanthomonads and recommendations. **Phytopatology**, St. Paul, v.90, p.208-213, 2000.

SCHAAD, N.W.; POSTNIKOVA, E.; LACY, G.H.; SECHLER, A.; AGARKOVA, I.; STROMBERG, P.E.; STROMBERG, V.K.; VIDAVER, A.K. Reclassifications of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (ex Hasse 1915) Dye 1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* subsp. *citri* (ex Hasse) sp. nov. nom. rev. comb. nov., *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (ex Gabriel 1989) sp. nov. nom. rev. comb. nov., and *X. alfalfae* subsp. *citrumelo* (ex Riker and Jones) Gabriel et al., 1989 sp. nov. nom. rev. comb. nov.; *X. campestris* pv. *malvacearum* (ex Smith 1901) Dye 1978 as *X. smithii* subsp. *smithii* nov. comb. nov. nom. nov.; *X. campestris* pv. *alfalfae* (ex Riker and Jones, 1935) Dye 1978 as *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* (ex Riker et al., 1935) sp. nov. nom. rev.; and “var. *fuscans*” of *X. campestris* pv. *phaseoli* (ex Smith, 1987) Dye 1978 as *X. fuscans* subsp. *fuscans* sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v.28, p.494–518, 2005.

SCHUBERT, T. S., MILLER, J. W.; GABRIEL, D. W. Another outbreak of bacterial canker on citrus in Florida. **Plant Disease**, St Paul, v.80, p.1208, 1996.

SCHUBERT, T.S.; RIZVI, S.A.; SUN, X.; GOTTWALD, T.R.; GRAHAM, J.H.; DIXON, W.N. Meeting the challenge of eradicating citrus canker in Florida – again. **Plant Disease**, St. Paul, v.85, p.340-356, 2001.

SILVA, P.H.S.; SILVA, R.B.Q.; MENESES, R.V.S.; COSTA, R.L. Ocorrência do minador dos citros *Phyllocnistis citrella* Stainton, 1856 (Lepidoptera: Gracillariidae) em Teresina-PI. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.21, p.393-394, 1997.

SOHI, G.S.; SANDHU, M.S. Relationship between Citrus leafminer (*Phyllocnistis citrella* Stainton) injury and Citrus canker (*Xanthomonas citri* (Hasse) Dowson) incidence on citrus leaves. **Journal of Research of the Punjab Agricultural University**, Punjab, v.5, p.66-69, 1968.

SOUZA, A.C., BEZERRA, E.S. Agronegócio nacional: uma análise das principais cadeias e sugestões para o ganho competitivo. Rio de Janeiro: UFRRJ, 2000. Disponível em: <<http://pa.esalq.usp.br/andr0501.pdf>>. Acesso em: 29 nov. 2003.

SPONAGEL, KW.; DIAZ, F.J. El minador de las hojas de los cítricos *Phyllocnistis citrella*, un insecto plaga de importancia económica en la citricultura de Honduras. Lima: FHA, 1994. 32p

STALL, R.E.; CIVEROLO, E.L. Research relating to the recent outbreak of citrus canker in Florida. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.29, p.339-420, 1991.

STALL, R.E., MARCO, G.M., CANTEROS DE ECHENIQUE, B.I. Importance of mesophyll in mature-leaf resistance to canker of citrus. **Phytopathology**, St Paul, v.72, p.1097-1100, 1982.

STALL, R.E.; MILLER, J.W.; MARCO, G.M.; ECHENIQUE, B.I.C. Population dynamics of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* causing canker of citrus in Argentina. **Proceedings of Florida State Horticultural Society**, Tampa, v.93, p.10-14, 1980.

STATSOFT. **Statistica 6.0**. Tulsa. 2001. 1 CD-ROM.

TIMMER, L.W.; GOTTWALD, T.R.; ZITKO, S.E. Bacterial exudation from lesions of Asiatic citrus canker and citrus bacterial spot. **Plant Disease**, St. Paul, v.75, p. 192-195, 1991.

VALE, F.X.R.; FERNANDES FILHO, E.I.; LIBERATO, J.R. Quant. A software plant disease severity assessment. IN: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT PATHOLOGY, 8., 2003, Christchurch. **Proceedings...** Christchurch: Internacional Society of Plant Pathology, 2003. p.105.

VANDERPLANK, J.E. **Plant diseases: epidemics and control**. New York:Academic, 1963. 349p.

VAUTERIN, L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Reclassification of *Xanthomonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.45, p.472-489, 1995.

WILSON, C.G. Notes on *Phyllocnistis citrella*, Staiton (Lepidóptera:Phyllocnistidae)\_attacking four citrus varieties in Darwin. **Journal of the Australian Entomological Society**, Canberra, v.30, p.77-78, 1991.

ZUBRZYCKI, H. M.; ZUBRZYCKI A.D. Resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Hasse) Dowson in oranges (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). In: INTERNATIONAL SOCIETY OF CITRICULTURE, 1., 1981, Tokyo. **Proceeding...** Tokyo: ISC, 1981. p.405-409.

ZUBRZYCKI, H. M.; ZUBRZYCKI, A.D. Relationship between the amount of inoculum and the infection caused by *Xanthomonas campestris* pv. *citri* on citrus seedlings through natural infections in the field. In: INTERNATIONAL SOCIETY OF CITRICULTURE, 7., 1987, Tokyo. **Proceeding...** Tokyo: ISC, 1987. p.379-382.