

Clorose Variegada dos Citros - Revisão*

Victoria Rossetti¹ & José Dagoberto De Negri²

SUMMARY

Citrus variegated chlorosis (CVC)

Citrus variegated chlorosis (CVC) is a new abnormality observed in citrus orchards of the Minas Gerais and São Paulo States of Brazil since 1987. This review refers to a brief history of the disease, its symptoms, research work developed aiming to determine the etiology of CVC, its transmissibility, the ultrastructure of the bacteria which were found in xylem vessels, and their isolation, the effect of nutritional disturbances, tentative chemical control and possible recovery of diseased trees and species are presented. The symptoms have been successfully transmitted by bud inoculation and side-grafting.

INTRODUÇÃO

A clorose variegada dos citros (CVC) é uma nova anormalidade observada primeiramente em pomares cítricos do Triângulo Mineiro, e das regiões Norte e Nordeste do Estado de São Paulo, de onde vem se alastrando muito rapidamente (3).

Formou-se, informalmente, um Grupo de Técnicos da Secretaria da Agricultura e Abastecimento de São Paulo, Universidade de São Paulo e Estadual Paulista, bem como da iniciativa privada, que se vem dedicando ao estudo do problema.

Em 24 de abril de 1990 o Sr. Secretario da Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo houve por bem instituir oficialmente esse Grupo, através da Resolução SAA-55.

HISTÓRICO

As primeiras observações sobre a CVC foram feitas em meados de 1987 no Triângulo Mineiro e no Norte e Nordeste do Estado de São Paulo, de onde vem se alastrando muito rapidamente.

O Grupo de Trabalho reuniu-se em agosto e dezembro de 1989, e fez uma excursão pela região afetada em janeiro de 1990, reunindo-se a seguir, pela 3ª ou 4ª vez. Nas reuniões anteriores, com a anuência do Grupo, resolveu-se enviar material para especialistas em “greening” que afeta o floema.

Durante a reunião de janeiro, pudemos anunciar ao Grupo que não se tratava do “greening”, pelos resultados obtidos na França. Entretanto, os especialistas da França constataram a ocorrência de bactérias no xilema das plantas doentes.

¹ Inst. Biológico/ SAA, SP

² CATI/SAA, Campinas, SP

* As informações relatadas nesta Revisão sobre a clorose variegada dos citros (CVC) são resultantes do trabalho de Técnicos do Grupo de Trabalho sobre a CVC e seus colaboradores.

LOCALIDADES ONDE FOI CONSTATADA A CVC

O Grupo de Trabalho decidiu que fosse feito um rastreamento preliminar para constatação da ocorrência de CVC no Estado de São Paulo.

A CVC foi constatada nas seguintes localidades: Araraquara, Ariranha, Arthur Nogueira, Auriflora, Badi Bassit, Barretos, Bebedouro, Borborema, Casa Branca, Catanduva, Catiguá, Colina, Cedral, Dobrada, Eugênio de Melo, Fernando Prestes, Guapiaçu, Guaraci, Guariba, Ibirá, Irapuã, Itajobi, Itápolis, Jaborandi, Jaci, José Bonifácio, Macaubal, Matão, Mirassol, Mogi Guaçu, Monções, Monte Alto, Nova Aliança, Nova Granada, Olímpia, Pindorama, Santa Adélia, São José do Rio Preto, Tabapuã, Taiacu, Tanabi, Taquaritinga, Terra Rocha, Uchoa, Urupês e Viradouro (3).

Também no Estado de Minas Gerais, a CVC foi constatada nas seguintes localidades: Alfenas, Frutal, Prata, Uberaba, Uberlândia.

SINTOMAS

Os primeiros sintomas de CVC são:

- Clorose das folhas inicialmente na parte mediana e superior da copa, tomando depois toda a planta.
- Folhas com sintomas de deficiência nutricionais, mormente de zinco e carência de potássio (frutos miúdos) (1).
- Clorose variegada nas folhas mais desenvolvidas.
- As manchas cloróticas da pagina ventral, correspondente, em folhas mais velhas, pequenas bolhosidades cor de palha na pagina dorsal, semelhantes a manchas devidas à toxicidade de boro. A análise foliar entretanto, mostrou que não ocorre nível de boro próximo a toxicidade. (1)
- Frutos de tamanho reduzido e endurecidos, imprestáveis para o comércio, persistentes, com amarelecimento precoce.
- Em plantas muito afetadas notam-se, com bastante freqüência, galhos salientes na parte superior da copa, com folhas e frutos miúdos e alguma desfolha nos galhos ponteiros.

OBJETIVOS DAS PESQUISAS

As pesquisas em andamento, desenvolvidas por técnicos do Grupo de Trabalho e seus colaboradores, visam:

- definir a etiologia da doença;
- determinar a sua transmitibilidade;
- estudar a ultra-estrutura da bactéria constatada, como provável agente causal e seu isolamento em cultura pura;
- estudar o efeito de desequilíbrios nutricionais;
- realizar tentativas experimentais de controle químico da doença, e possível recuperação das plantas afetadas;
- pesquisar a resistência ou tolerância de espécies e variedades cítricas à doença.

Damos abaixo a metodologia utilizada por técnicos dos Institutos Biológico, Agrônomo, da CATI e ESALQ, no âmbito de suas especialidades e os resultados preliminares obtidos.

METODOLOGIA

Etiologia - Divisão de Patologia Vegetal e Seção de Bioquímica do Instituto Biológico, INRA (França) e CREC (Florida).

Pareceu necessário estudar a possibilidade de ser a clorose variegada causada pelo mesmo patógeno agente causal do “greening”, doença limitante as citricultura em países do Sudeste Asiático, na África do Sul, e outros. Para isso material fixado e material fresco colhido em pomares de diferentes localidades foi enviado repetidamente a pesquisadores da França, especialistas em “greening” e no seu agente causal, uma bactéria gram-negativo que afeta o floema das plantas cítricas. Material foi também encaminhado a pesquisadores da Florida (Estados Unidos) com a mesma finalidade.

Em colaboração com os colegas da França, foram estudados em microscopia eletrônica o floema e o xilema de tecidos de plantas afetadas pela doença, constatando-se elevada população de bactérias no xilema, mas não no floema (10, 11). Foram feitas também inoculações em estufa.

Em colaboração com os colegas da Florida, foram aplicados métodos comparativos como a cromatografia em camada delgada, e por sorologia com anticorpo policlonal de “greening” (2).

A causa da clorose variegada dos citros ainda não foi determinada, mas consideram-se três hipóteses principais:

- a) Ocorrência de bactérias semelhantes a *Xyllela fastidiosa*, patógeno da videira, ameixeira e

pessegueiro (4, 5, 6, 7). Essas bactérias foram constatadas somente em plantas com sintomas da doença, e não nas sadias. Ainda não foi definido se essa bactéria é, ou não, a causa da clorose variegada dos citros.

- b) Outros agentes patogênicos, como vírus, viroides ou micoplasma.
- d) Desequilíbrios nutricionais.

Transmitibilidade - Divisão de Patologia Vegetal e Seção de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico.

Vários métodos de transmissão de CVC estão sendo testados no Instituto Biológico de São Paulo, em campo (*) e em estufa, tais como:

- Enxertia por borbulhas de plantas doentes em mudas sadias.
- Enxertia por garfagem e por encostia.
- Extração das bactérias de nervuras das folhas e da columela de frutos de plantas doentes, e injeção das suspensões por microagulha, em folhas de plantas jovens sadias.
- Injeção dessas suspensões em tronco e ramos de mudas sadias.
- Inserção de pequenos segmentos de nervuras das folhas, columelas de frutos de plantas atacadas, em tronco e galhos de mudas sadias.
- Inoculações em plantas indicadoras de vírus, viróides e micoplasma.

Novos experimentos de transmissão, estudos sobre a resistência de espécies e variedades cítricas, e possível efeito no solo, estão sendo realizados em propriedades muito atacadas por CVC nos municípios de Prata, em Minas Gerais, e Colina em São Paulo, pelos técnicos do Instituto Biológico, e da Sucocitricultura Cutrale, com a cooperação e auxílio também de outros técnicos e auxiliares daquela Empresa.

Esses estudos poderão dar certa orientação para as pesquisas sobre o agente causal da CVC.

Estudos sobre a bactéria - Seções de Microscopia Eletrônica e Bacteriologia Fitopatológica do Instituto Biológico

A constatação da ocorrência de bactérias foi amplamente confirmada pelos técnicos da Seção de Microscopia Eletrônica do Instituto Biológico, que estudam a ultra-estrutura da bactéria com excelente documentação fotográfica. Também foi confirmada pelos técnicos da Seção Bacteriologia Fitopatológica.

A bactéria está sendo isolada em várias tentativas por técnicos do Instituto Biológico pois é absolutamente necessário se trabalhar com o microorganismo isolado em cultura pura. As bactérias do gênero *Xyllela fastidiosa* exigem substâncias específicas para se desenvolver em cultura pura.(4).

Estudos sobre a nutrição - Seção de Fertilidade do solo do Instituto Agrônomo e ESALQ.

Foram realizadas pesquisas por técnicos do Instituto Agrônomo e ESALQ, por análise foliar e do solo de plantas afetadas por CVC e sadias, estudando-se a absorção e a distribuição de vários nutrientes, nas plantas cítricas (1).

Tentativas de Controle - Divisão de Patologia Vegetal Seção de Bioquímica do Inst. Biológico e Fertilidade do Solo do Inst. Agrônomo, do Grupo técnico de Citricultura e Fruticultura Tropicais as CATI

Em alguns pomares muito afetados, estão sendo realizados experimentos de tratamento das plantas com antibióticos, como tentativas de sua recuperação, através do controle de bactérias do xilema.

Estão sendo testados antibióticos a base de oxitetraciclina, em propriedades particulares, pelas equipes do Instituto Biológico, do Instituto Agrônomo, da CATI e da Coopercitrus em estreita colaboração. Aplicações são feitas por vários métodos:

(*) Os experimentos de transmissão em campo são feitos com a colaboração do Engº Agrº Luiz Ventura de Aquino e Mauro Gomes Pereira, da Empresa Sucocitricultura Cutrale.

encharcamento do solo, pulverizações foliares, e injeções no tronco. Os técnicos tem tido todo o apoio das propriedades onde se instalam os experimentos, bem como dos produtores de oxitetraciclina (*).

RESULTADOS PRELIMINARES E DISCUSSÃO

Etiologia

Pelos resultados obtidos nos estudos realizados em colaboração com os técnicos da França, não foi constatado o patógeno do “greening” no floema. Por outro lado, os técnicos observaram a ocorrência de bactérias limitadas ao xilema de plantas com sintomas da doença, e não em plantas sadias dos mesmos pomares(9,10,11). Esse fato sugere que o microorganismo encontrado no xilema pode estar associado com a doença. Nos estudos comparativos realizados na Florida, não foram detectadas reações características do “greening” em nossos pomares afetados por CVC.

As bactérias constatadas no caso CVC, tem sido observadas nas plantas que mostram todo o quadro sintomatológico da doença, em todos os pomares afetados, e não nas plantas sadias dos mesmos pomares. Essa associação com a doença poderia, entretanto, ser devida ao fato de que o microorganismo poderia agir como “oportunistas”, invadindo os tecidos de plantas enfraquecidas pela ação de outros fatores, patogênicos ou não. Somente com a bactéria de cultura pura, poderá se proceder a experimentos com resultados exatos e confiáveis quanto a sua patogenicidade.

A causa é portanto, ainda desconhecida, e as três hipóteses mencionadas estão sendo pesquisadas: a bactéria, outros patógenos e desequilíbrios nutricionais.

Transmitibilidade

As inoculações feitas em 4 de setembro de 1989 por enxertia de borbulhas de plantas doentes em campo, em mudas novas sadias de laranja Natal sobre porta-enxerto de tangerina Cleópatra, mantidas

em pomar bastante afetado, da mesma combinação varietal, resultam na transmissão dos sintomas típicos, em 3 das 20 mudas expostas, 6 a 7 meses após a inoculação. É possível que a transmissão seja resultante da inoculação por borbulhas e/ou por insetos. As plantas protegidas por telas contra o ataque de insetos, até o momento não mostrou qualquer sintoma da doença. É, pois uma doença transmissível.

É esta a primeira vez que se conseguiu a transmissão da CVC.

Os experimentos de campo que estão sendo repetidos em diferentes localidades, por técnicos do Instituto Biológico com a valiosa colaboração dos técnicos e auxiliares de campo da Sucocitrico Cutrale, são recentes e ainda não há resultados.

Dos experimentos realizados em estufas do Instituto Biológico, até o momento há apenas alguns indícios de transmissão, ainda não confirmados.

Estudos sobre a bactéria

As bactérias que se encontram com abundância nos vasos do xilemas são filamentosas, medem 1 a 4 µm de comprimento, e 0,25 a 0,5 µm de diâmetro. Sua parede é crenulada .

São muito numerosos os vasos da columela dos frutos e na nervura principal das folhas de plantas com sintomas (11). Essas características correspondem a várias estirpes de *Xylella fastidiosa* (4) patógenos que podem ser transmitidos por cigarrinhas, abundantes em nossos pomares (10). Parece haver periodicidade da estrutura da parede bacteriana ao longo do seu corpo, dando-lhe aspecto espiralado.

Todas essas observações foram amplamente confirmadas pelas pesquisas sobre a ultra-estrutura das bactérias, realizadas por técnicos da Seção de Microscopia Eletrônica do Instituto Biológico. A grande semelhança com *Xylella fastidiosa* (8), agente causal da doença de Pierce da Videira também foi confirmada pelos técnicos da Seção de Bacteriologia Fitopatológica do Instituto Biológico e seus colaboradores.

(*) Os ensaios de controle estão localizados em Barretos (Fazenda Murata), em Catanduva(Fazenda Promissão), e em Alfenas, MG(Fazenda de Ipanema Agro-Industria S/A)

Estudos sobre a nutrição

Pelas pesquisas realizadas por técnicos do Instituto Agrônomo e ESALQ, constatou-se que a clorose variegada dos citros afeta a absorção e a redistribuição de alguns nutrientes na planta. Os nutrientes mais afetados são o potássio e o zinco, cujos teores foliares ficam bastante reduzidos em folhas de plantas com sintomas da doença, independentemente de seus teores no solo e nas adubações foliares de zinco aplicadas. Por outro lado, os teores foliares de cálcio e boro aumentam nas plantas afetadas, em relação as sadias (1).

Tentativas de controle - Ainda não há resultados.

Variedades afetadas

Observou-se que algumas espécies e variedades cítricas parecem ser tolerantes à CVC, tais como as tangerinas e o limoeiro Taiti. As plantas de laranja doce parecem ser todas bastante suscetíveis em todos os porta-enxertos comumente usados. Constatou-se que a doença parece afetar tanto as plantas de viveiro, como as as 3-4 ou mais anos de idade.

RECOMENDACÕES

1. Deve ser feito, com urgência, um levantamento da ocorrência da Clorose Variegada dos Citros para aplicação de medidas de Defesa Sanitária Vegetal, especialmente quanto à formação de mudas, e trânsito de mudas e borbulhas.

2. Deve ser desestimulada a utilização de material vegetativo procedente das propriedades afetadas por Clorose Variegada dos Citros.

3. É de urgente necessidade que os bacteriologistas consigam preparar um "kit" ou estojo, com base em estudos sorológicos da bactéria, que possa ser utilizado em campo, para detectar com segurança a ocorrência da doença nas várias localidades.

COLABORADORES

A equipe de técnicos colaboradores que vem trabalhando sobre o assunto é composta por:

- Victória Rossetti, Maria Julia G. Beretta, Cesar M. Chagas, Ana Regina R.R. Teixeira, Julio Rodrigues

Neto e colaboradores, do Instituto Biológico.

- J. Dagoberto De Negri e Claudio Giusti, da CATI.
- J.A. Quaggio, Pedro Furlan do Instituto Agrônomo.
- G.C. Vitti da ESALQ.
- Luiz Ventura de Aquino, Marco A. Marchesi e Mauro Pereira Gomes da Sucocitric - Cutrale S/A.
- Roberto Ferreira da Coopercitrus.

AGRADECIMENTOS

O grupo de trabalho sobre a CVC agradece o apoio recebido das Empresas em cujas propriedades se instalaram os experimentos citados nesta Revisão: Sucocitric Cutrale (em Barretos, SP e Prata, MG); Fazenda Promissão (em Catiguá, SP); Murato (em Barretos, SP); Ipanema Agroindústria S.A. (em Afeenas, MG); Pfizer (em São Paulo).

Agradece principalmente os demais técnicos e auxiliares que vem acompanhando e colaborando nos experimentos em andamento: Helio Zancaner Sanches, Andre Sanches e Jose Tatangelo (Fazenda Promissão); Jose Rodrigues Santiago de Oliveira (Pfizer); Flavio Pinto Silva, Ademir Neves Paixão e Natalino Oliveira Machado (Sucocitric Cutrale S.A.); Silvio Ortega Filho, Carlos Picin e Helio Casale (Ipanema Agroindústria S.A.) e Agostino M. Boggio (Coopercitrus).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ATA da 2ª Reunião do Grupo de Trabalho sobre a Clorose Variegada dos Citros - 1989. exposição de J.A.Quaggio. Análise de solo e foliar de plantas afetadas por CVC.
2. BERETTA, M.J.G., 1990. Relatório de viagem à Flórida. Datilografado. Instituto Biológico, S.Paulo. 6p.
3. De Negri, J.D., 1990. Clorose variegada dos Citros: uma nova anomalia afetando pomares em S.Paulo e Minas Gerais. Comunicado Técnico nº 82. Extensão Rural, Coord. Ass. Téc. Integral (CATI), Campinas, 6p.
4. HOPKINS, D.L., 1983. Gram-negative, xylem-limited bacteria in plant disease. *Phytopathology*, 73: 347-350.

5. HOPKINS, D.L., 1982. Relation of Pierce's disease bacterium to a wilt-type disease in citrus in the greenhouse. *Phytopathology*, 72: 1090-1092.
6. HOPKINS, D.L. 1981. Seasonal concentration of the Pierce's disease bacterium in grapevine stems, petioles and leaf veins. *Phytopathology*, 71: 415-418.
7. HOPKINS, D.L. & MOLLENHAUER, H.H. , 1972. Rickettsia - like bacterium associated with Pierce's disease of grapes. *Science*, 179: 298-300.
8. MOLLENHAUER, H.H. & . HOPKINS, D.L., 1974. Ultrastructural study of Pierce's disease bacterium in grape xylem tissue. *Journal of Bacteriol.*, 119, 2: 612-618.
9. ROSSETTI, V.& De NEGRI, J.D., 1990. Relatório preliminar do Grupo do Trabalho sobre clorose variegada dos citros, instituído pelo Sr. Secretário da Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, 25-5-1990. 9p.
10. ROSSETTI, V.; GARNIER, M.; BERETTA, M.J.G.; TEIXEIRA, A.R.R.; QUAGGIO, J.A.; BATTAGLIA, O.C.; GOMES, M.P.; De NEGRI, J.D.; BOVE, J.M., 1990. Resultados preliminares de estudos sobre uma nova anormalidade dos citros observada nos Estados de São Paulo e Minas Gerais. Congr. Paul. Fitopatologia – XIII- Instituto Biológico, São Paulo. *Summa Phytopathologica* 16, 1, 1990, Resumo nº 14, p.13.
11. ROSSETTI, V.; GARNIER, M.; BOVE, J.M.; BERETTA, M.J.G.; TEIXEIRA, A.R.R.; QUAGGIO, J.A. e de NEGRI, J.D., 1990. Présence de bactéries dans le xylème d'orangers atteints de chlorose variégée, une nouvelle maladie des agrumes au Brésil. *Comptes Rendus Acad.des Sci. Paris*, 310, Serie III, p.345-349.