

Dinâmica Espacial da Clorose Variegada dos Citros em Três Regiões do Estado de São Paulo

Francisco F. Laranjeira¹, Armando Bergamin Filho², Lilian Amorim² & Tim R. Gottwald³

¹Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA, Brasil, Cx. Postal 007, CEP 44380-000, Fax: (75) 621 2149, e-mail: chico@cnpmf.embrapa.br; ²Departamento de Fitopatologia, ESALQ/USP, Piracicaba, SP; ³USDA-ARS, Fort Pierce, Flórida, EUA

(Aceito para publicação em 02/10/2003)

Autor para correspondência: Francisco F. Laranjeira

LARANJEIRA, F.F., BERGAMIN FILHO, A., AMORIM, L. & GOTTWALD, T.R. Dinâmica espacial da clorose variegada dos citros em três regiões do Estado de São Paulo. *Fitopatologia Brasileira* 29:056-065. 2004.

RESUMO

A Clorose Variegada dos Citros (CVC) tem sido considerada a mais importante doença citrícola no Brasil, mas diversos aspectos de sua epidemiologia ainda não são bem conhecidos. O presente trabalho objetivou estudar o arranjo espacial das plantas afetadas, visando caracterizar a dinâmica da doença em três regiões do Estado de São Paulo (Nordeste, Centro e Sul). Por meio de avaliação de sintomas visuais, foram mapeados, quinzenalmente, três talhões de laranja-doce (*Citrus sinensis*) Pêra enxertada em limão Cravo (*Citrus limonia*), em três regiões do Estado de São Paulo, desde julho de 1998 até dezembro de 2000. Para o estudo da dinâmica espacial, foram aplicadas as seguintes

análises: seqüências ordinárias; áreas isópatas; lei de Taylor modificada; índice de dispersão e análise de dinâmica e estrutura de focos. As seqüências ordinárias indicaram uma tendência à aleatoriedade na maioria das avaliações, indicando baixa transmissão a plantas imediatamente vizinhas. A análise de áreas isópatas mostrou pouca formação de focos compactos, numa tendência à uniformidade da incidência da CVC. As demais análises demonstraram pouca diferença no padrão espacial da doença entre as regiões, que pode ser considerado levemente agregado.

Palavras-chave adicionais: Citros, CVC, *Xylella fastidiosa*, epidemiologia, padrão espacial.

ABSTRACT

Spatial dynamics of Citrus Variegated Chlorosis in three regions of São Paulo, Brazil

CVC is considered the most important disease of Brazilian citrus industry but many aspects of its epidemiology are still unknown. This work aimed to characterize the spatial pattern of CVC affected trees in three regions (Northwest, Center and South) of São Paulo state, Brazil. Three orchards of Pêra sweet orange (*Citrus sinensis*) grafted on Rangpur lime (*Citrus limonia*) were evaluated twice a month by visual assessments from July 1998 to December

2000. For each evaluation all plants were inspected and assigned as diseased or healthy and cumulative maps were produced. The following analyses were performed: ordinary runs, isopath areas, Taylor law, dispersion index and foci structure and dynamics analysis. Ordinary runs indicated a trend to randomness. Isopath areas analysis showed few compact foci and a trend to uniform incidence in all areas. The other analysis showed few if any differences between regions and results that could classify CVC pattern as slightly aggregated.

INTRODUÇÃO

A Clorose Variegada dos Citros (CVC) já causou perdas da ordem de 650 milhões de reais (Prejuízos, 2001). Tornou-se a mais importante doença citrícola do Estado de São Paulo pouco tempo após ter sido constatada pela primeira vez, em 1987 (Rossetti *et al.*, 1990). Desde então, muito se fez para identificar e caracterizar a causa do problema e os postulados de Koch, associando a bactéria *Xylella fastidiosa* Wells *et al.* a CVC foram cumpridos em 1993 (Chang *et al.*, 1993). Essa bactéria é transmitida por cigarrinhas (Lopes *et al.*, 1996), tendo sido identificadas, até o momento, 11 espécies transmissoras apenas em São Paulo (Fundecitrus, 2003).

A epidemiologia da doença tem recebido pouca atenção, o que contrasta com rápido progresso na caracterização molecular do agente causal (Simpson *et al.*, 2000). Entretanto, nos poucos trabalhos epidemiológicos feitos até o momento

(Gottwald *et al.*, 1993; Laranjeira, 1997; Nunes, 1999; Martins *et al.*, 2000) revelaram-se aspectos relevantes para o manejo da doença: principais fontes de inóculo, não-influência de vento ou passagem de máquina na disseminação, épocas de maior aparecimento de plantas doentes, além de fornecerem material descritivo básico sobre a dinâmica espacial-temporal da doença na região Norte de São Paulo.

No entanto, as diferenças observadas entre as regiões citrícolas de São Paulo ainda não encontram explicação satisfatória. Em levantamentos feitos entre 1996 e 1999, Ayres (2000) mostrou que há um gradiente de incidência da doença entre as regiões citrícolas daquele Estado: Norte > Nordeste > Centro > Sul. O autor sugere relações desse gradiente com aspectos climáticos, diferentes estirpes do agente causal e inóculo inicial. Embora já tenham sido demonstradas certas diferenças entre regiões em relação à flutuação populacional de cigarrinhas e às estirpes da bactéria, essas variáveis não

puderam ser apontadas como explicações definitivas para o gradiente de incidência entre regiões. O objetivo desse trabalho foi caracterizar a dinâmica espacial da CVC em talhões de três regiões do Estado de São Paulo (Noroeste, Centro e Sul), visando determinar possíveis diferenças no padrão de disseminação da doença.

MATERIAL E MÉTODOS

Áreas

Foram selecionados talhões homogêneos de laranja (*Citrus sinensis* L.) Pêra enxertada em limão Cravo (*Citrus limonia* Osbeck), representativos das três principais áreas citrícolas do Estado de São Paulo. Todas as plantas estavam com cerca de quatro anos de idade quando do início dos trabalhos.

- (i) Região Noroeste – Estância Lilian, localizada no município de Neves Paulista; a área selecionada contava com 684 plantas, dispostas em 18 linhas de plantio, pertencentes a pomar com cerca de 3.000 plantas.
- (ii) Região Central – Sítio Carioca, localizado no município de Gavião Peixoto; a área selecionada contava com 972 plantas, dispostas em 18 linhas de plantio, pertencentes a pomar com cerca de 5.000 plantas.
- (iii) Região Sul – Sítio Taquaral, localizado no município de Santa Rita do Passa Quatro; a área selecionada contava com 1.080 plantas, dispostas em 18 linhas de plantio, pertencentes a pomar com cerca de 8.000 plantas.

Avaliações

As avaliações foram quinzenais. Todas as plantas de cada talhão foram observadas em busca de sintomas típicos da CVC, em folhas ou em frutos. A presença ou ausência de sintomas e a posição relativa de cada planta foram anotados, obtendo-se assim um mapa de cada talhão para cada data de avaliação. A partir desses mapas foram obtidos mapas de incidência cumulativa, os quais consideram que uma planta doente em uma avaliação permanecerá doente nas posteriores, mesmo que esteja assintomática em qualquer dessas avaliações posteriores.

Análise de seqüências ordinárias (ASO)

A análise de seqüências ordinárias permite a constatação de agrupamento dentro de linhas de plantio ou em sentido perpendicular a elas. Assim, é possível relacionar (indiretamente) o padrão espacial encontrado a práticas de manejo adotadas nos locais estudados. A agregação foi testada considerando a área como um todo.

Para cada talhão, em cada avaliação, foi calculado o índice Zso. Para esse estudo foram seguidas as definições e diretrizes de Madden *et al.* (1982). Para essa análise, a hipótese de nulidade foi a de que um dado conjunto ordenado de símbolos (plantas infetadas) está distribuído de forma aleatória. A hipótese alternativa foi a de que as plantas infetadas estão agrupadas. Quanto mais agrupadas estiverem as plantas infetadas, mais negativo será o valor de Zso. Os talhões foram

considerados com agrupamento de plantas sintomáticas, ao nível de 5% de significância, se o valor de Zso foi igual ou inferior a -1,64. A premissa básica para o uso de tal análise foi a de que agrupamento significativo de plantas afetadas indica que o patógeno está se disseminando predominantemente de uma planta à imediatamente vizinha.

Índice de dispersão e aplicação da lei de Taylor modificada

Divisão das áreas e cálculo dep. Os mapas cumulativos foram transformados em uma matriz (x,y,z) , em que x era o número da linha de plantio; y , a posição da planta naquela linha e z , a condição da planta: 0, assintomática; 1, sintomática. Essa matriz foi utilizada pelo macro Quadratizer (T.R. Gottwald, USDA) para Excel para dividir cada mapa de cada área em *quadrats* de tamanhos 2x2, 3x3, 4x4, 3x5 e 5x3 (Tabela 1). Para cada *quadrat* foi determinada, também pelo Quadratizer, a proporção de plantas afetadas em cada avaliação e calculada a incidência da doença. Esses dados formaram a base para o estudo da lei de Taylor modificada, para o cálculo do índice de dispersão e para o estudo de áreas isópatas.

Aplicação da lei de Taylor modificada. Para cada avaliação em cada área e para o conjunto de *quadrats* amostrados foi calculada a variância observada (v_{obs}) e a variância binomial esperada (v_{bin}) (Hughes & Madden, 1992). A lei de Taylor modificada (LTM) relaciona, por meio de regressão linear [$\log(V_{obs}) = A + b * \log(V_{bin})$], a variância observada e a variância esperada para um padrão aleatório. As regressões foram feitas por meio do método dos quadrados mínimos, utilizando-se o utilitário STATISTICA 5.0. Considerou-se como variável independente o $\log(V_{bin})$ estimado para cada avaliação e como variável dependente, o $\log(V_{obs})$. Da mesma forma, foi aplicada a regressão para os dados de todas as áreas e avaliações, em conjunto. A significância da regressão foi determinada pelo teste F e a adequação do ajuste do modelo aos dados foi determinada por meio dos valores dos coeficientes de determinação R^2 e dos padrões de distribuição dos resíduos, em gráficos de resíduos *versus* valores previstos de $\log(v_{bin})$ (Madden *et al.*, 1995). Avaliou-se a hipótese de $b=1$ pelo Teste t (Madden *et al.*, 1995). A hipótese alternativa foi a de $b > 1$. Valores de b significativamente diferentes de 1 ao nível de 5% de probabilidade foram considerados indicativos de agregação e valores estatisticamente iguais a 1 foram considerados indicativos de aleatoriedade. Os valores de b para cada

TABELA 1 - Número de *quadrats* utilizados para as análises em função de seu tamanho e da área com plantas de citros (*Citrus* spp.) avaliada

Áreas	Tamanho do <i>Quadrat</i> (plantas x plantas)				
	2 x 2	3 x 3	3 x 5	5 x 3	4 x 4
Noroeste	171	72	42	36	36
Centro	243	108	60	54	52
Sul	270	120	72	60	60

tamanho de *quadrat* foram comparados por análise de variância e teste de Tukey ($P < 0,001$) conforme método indicado por Zar (1996), considerando-se os dados em conjunto e separadamente para cada região.

Índice de dispersão (ID). O índice de dispersão foi calculado para todas as avaliações por meio da relação $ID = v_{obs} / v_{bin}$ (Gottwald *et al.*, 1996):

O afastamento da aleatoriedade foi determinado pelo teste de χ^2 ao nível de 5% de significância. A hipótese nula foi a de que o padrão observado era aleatório e a hipótese alternativa, de que era agregado. Valores de ID que não diferiram estatisticamente de 1 foram considerados como indicativo de aleatoriedade, enquanto que valores estatisticamente superiores a 1 foram tomados como indicativos de agregação.

Determinação de áreas isópatas

Para essa análise não há determinação de índices ou informações puramente matemáticas. Os mapas gerados representam a situação da doença em cada época e cada área isópata (AI) denota os locais de incidência semelhante. O estabelecimento das áreas isópatas para cada local e avaliação foi feito no utilitário STATISTICA 5.0, por meio do procedimento de uniformização dos quadrados mínimos, ponderados pela distância. Nessa determinação, foi utilizada a matriz dos valores não-transformados de proporção de plantas afetadas de cada *quadrat* (tamanho 3x5). Para cada talhão, o número de áreas isópatas previamente escolhidas foi igual. Entretanto, os níveis de cada área isópata, para cada talhão, foram arbitrariamente escolhidos, com o objetivo de realçar possíveis diferenças (Laranjeira, 1997).

Análise de dinâmica e estrutura de focos (ADEF)

Como premissa básica, foi adotada a seguinte definição de foco: área de concentração localizada de plantas doentes, quer sejam fontes primárias de infecção ou coincidentes com zonas originalmente favoráveis ao estabelecimento da doença e que tendem a influenciar no padrão posterior de transmissão da doença (Laranjeira, 1997).

A ADEF foi realizada a partir dos mapas cumulativos de cada talhão, em cada avaliação, levando-se em conta as diretrizes estabelecidas por Nelson (1996) e Laranjeira (1997). Considerou-se que só compartilhavam o mesmo foco aquelas plantas doentes imediatamente adjacentes no padrão de proximidade vertical, horizontal ou longitudinal. Contou-se o número de focos e o número de plantas em cada foco. Para cada área e avaliação, foram, também, calculados o número médio de plantas por foco (NMPF), o número de focos para cada 1.000 plantas (NFM) e o número de focos unitários (NFU).

RESULTADOS

Análise de seqüências ordinárias (ASO)

A variação no índice Z_{so} está apresentada na Figura 1. No talhão da região Noroeste (Figura 1a) a maioria das avaliações gerou resultados indistintos da aleatoriedade, para

as duas direções analisadas. A direção ALL (ao longo das linhas), até cerca de 40% de incidência, apresentou índices negativos, estatisticamente inferiores a $-1,64$, indicativos de agrupamento das plantas doentes. Entre 80 e 100% de incidência, três avaliações obtiveram índices superiores a $1,64$, indicativo de regularidade na padrão das plantas sintomáticas. Para a direção EL (entre linhas) os índices até 40% de incidência variaram, indicando ora aleatoriedade, ora agrupamento. Entre 40% e 80% de incidência, os valores de Z_{so} mantiveram-se dentro da faixa da aleatoriedade, mas, então, tenderam a valores mais negativos, ultrapassando o limite do agrupamento. No início da epidemia, os valores do Z_{so} para a direção ALL tenderam a ser menores que os da direção EL, ao passo que no final da epidemia, essa tendência se inverteu.

Os valores do índice calculados para a direção ALL na

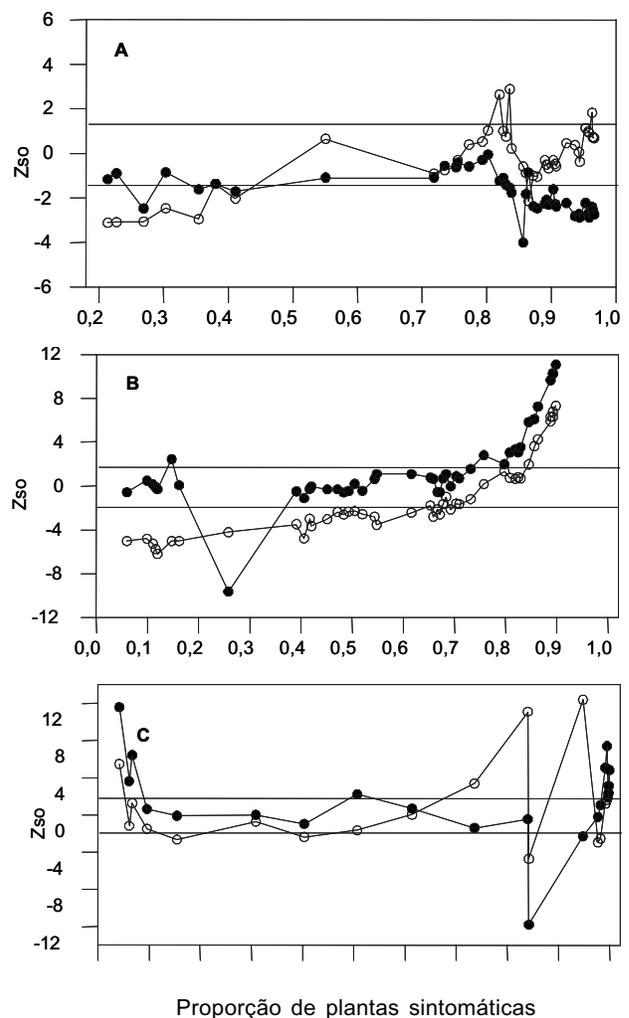


FIG. 1 - Variação do índice Z_{so} em função da incidência de Clorose Variegada dos Citros, em duas direções - ao longo das linhas [○] e entre linhas [●] - nos talhões das regiões Noroeste (A), Centro (B) e Sul (C) de plantas de citros (*Citrus* spp.). As linhas contínuas dentro dos gráficos indicam os limites de valores aleatórios ($-1,64$ a $1,64$).

região Centro (Figura 1b) tiveram aumento ao longo de toda a epidemia. Começaram com indicação de alta agregação (inferiores a -4) e elevaram-se a até quase 8, indicando alta regularidade no arranjo de plantas afetadas. No entanto, até os 70% de incidência, os valores do índice sempre foram inferiores a -1,64. Na direção EL, apenas em uma avaliação, entre os 20% e 30% de incidência, houve indicação de agregação. Na maioria das avaliações o índice flutuou na faixa da aleatoriedade (-1,64 a 1,64), apresentando uma tendência à regularidade após os 70% de incidência.

Na região Sul (Figura 1c) até os 60% de incidência os índices Z_{so} apresentaram a mesma tendência para ambas direções (ALL e EL). No início da epidemia os índices eram bastante superiores a 1,64, mas logo caindo para a faixa entre -1,64 e 1,64. Ao final da epidemia, os valores para a direção ALL variaram bastante, ora superiores a 1,64, ora inferiores a -1,64. Após os 80% de incidência, os valores do índice para direção EL tiveram grande queda em apenas uma avaliação, aumentando em seguida até quase atingir o valor 8.

Índice de dispersão (ID)

Não houve uma tendência clara para a maioria das avaliações apresentarem valor calculado de ID estatisticamente superior ou inferior a 1 ao nível de 5% de significância pelo teste de χ^2 . Os resultados variaram conforme a área e o tamanho de *quadrat*.

Para o talhão da região Noroeste a evolução do índice ID seguiu um padrão similar para todos os tamanhos de *quadrat*. No início da epidemia os IDs variaram pouco, apresentaram um aumento quando a incidência chegou a 40% e, logo em seguida, um decréscimo acentuado até 70% de incidência. A partir daí os valores de ID variaram sem padrão para o *quadrat* 4x4 até o fim da epidemia. Para os outros *quadrats* a redução nos valores continuou até cerca de 80% de incidência, para em seguida apresentar picos entre 80% e 90% e decair até o fim da epidemia. O valor limite entre a aleatoriedade e a agregação, assim como o número de avaliações que apresentaram plantas agregadas, variou conforme o tamanho de *quadrat* (Tabela 2). Em função desses limites, para o *quadrat* 2x2 as plantas doentes apresentaram-se agregadas em oito avaliações, para 3x3, em 25, para o 3x5 em 24 e para o 4x4 e 5x3, em nenhuma. Para nenhum tamanho de *quadrat* foram observados valores estatisticamente inferiores a 1, indicativos de regularidade.

Também para a região Centro os valores de ID seguiram padrão parecido em todos os tamanhos de *quadrat*. De início observaram-se dois picos de ID, um aos 10% de incidência e outro entre 20% e 30%. Em seguida, houve uma tendência generalizada para redução nos valores de ID. Essa tendência foi mais acentuada para alguns tamanhos de *quadrat* (4x4, por exemplo) que para outros (3x3). A diminuição do ID após 30% de incidência não foi contínua para nenhum tamanho de *quadrat*, ora apresentando valores maiores, ora menores que o anterior. No mais das vezes, o talhão da região Centro foi o que apresentou o maior número de avaliações com plantas doentes agregadas (Tabela 2).

De maneira geral a evolução do ID não apresentou padrões muito marcantes na região Sul. O *quadrat* 2x2 apresentou a menor variação nos valores de ID, enquanto que o 4x4 teve a maior. Notou-se, ainda, uma tendência em todos os *quadrats* para picos aos 10% e 40% de incidência e uma queda no ID quando a incidência se aproximou de 100%.

Aplicação da lei de Taylor modificada (LTM)

Após a regressão do logaritmo da variância observada pelo logaritmo da variância binomial estimada, foi possível determinar os valores dos parâmetros b e A . Na Tabela 3 são mostrados os valores de b , a indicação de sua significância ou não pelo teste t e os valores de A para cada *quadrat*, em cada região.

Quando todas as avaliações de todos os talhões foram consideradas em conjunto (113 pares de dados), para todos os *quadrats* obtiveram-se valores de A sempre superiores a 0 ($P < 0,001$) e de b superiores a 1 (*quadrat* 3x3, $P < 0,025$; demais, $P < 0,01$). A comparação dos valores de b por análise de variância e teste Tukey, indicou que o valor de b para o *quadrat* 4x4 (1,088) foi superior a todos os outros com exceção do *quadrat* 3x5 (1,074). Esse, por sua vez, não diferiu do *quadrat* 5x3 (1,067). Os *quadrats* 2x2 (1,041) e 3x3 (1,029) apresentaram os menores valores de b , diferindo de todos os outros, mas indistintos entre si.

A análise também foi individualizada para cada região (Tabela 3). Na região Noroeste, com exceção do *quadrat* 3x3,

TABELA 2 - Valores de Índice de Dispersão a partir dos quais há diferença estatística em relação a 1 e número de avaliações em que o ID o superou (NA) em três regiões e para cinco tamanhos de *quadrat*

Quadrat	Noroeste		Centro		Sul	
	ID limite	NA	ID limite	NA	ID limite	NA
2 x 2	1,18	8	1,15	24	1,14	8
3 x 3	1,29	25	1,23	11	1,22	11
3 x 5	1,38	24	1,32	21	1,29	14
5 x 3	1,41	0	1,33	18	1,32	9
4 x 4	1,41	0	1,34	26	1,32	12

TABELA 3 - Valores dos parâmetros b e A da equação de ajuste à Lei de Taylor Modificada para cinco tamanhos de *quadrat* e talhões de três regiões com plantas de citros (*Citrus* spp.)

Quadrat	Noroeste		Centro		Sul	
	A^a	b	A	b	A	B
2 x 2	0,212*	1,126* b A	0,177*	1,086* c B	0,094*	1,025* c C
3 x 3	0,087	0,978 d C	0,394*	1,195* b A	0,225*	1,059* b B
3 x 5	0,494*	1,156* a A	0,259*	1,074 c C	0,442*	1,115* a B
5 x 3	0,206*	1,103* c B	0,953*	1,449* a A	0,297*	1,078* b C
4 x 4	0,193*	1,092* c B	0,134	0,985 d C	0,440*	1,122* a A

^a Valores marcados com * indicam b estatisticamente superior a 1 ou A superior a 0 ($P < 0,01$). Letras iguais, minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal, indicam parâmetros b indistintos estatisticamente ($P < 0,001$).

para todos os outros casos os valores de A e b foram sempre significativos. A comparação entre *quadrats* indicou maior valor de b para o *quadrat* 3x5. A área da região Centro apresentou valores significativos de A e b para os *quadrats* 2x2, 3x3 e 5x3. O 3x5, apesar de ter o parâmetro b não superior a 1, apresentou o A superior a 0. Apenas o *quadrat* 4x4 teve os dois parâmetros não-significativos. O maior valor de b foi obtido para o *quadrat* 5x3. Na região Sul, todos os *quadrats* tiveram os dois parâmetros estatisticamente superiores aos padrões. O *quadrat* com maior valor para o b foi o 3x5. Nas três regiões, o *quadrat* com maior valor de b foi também o que apresentou maior valor para o parâmetro A .

Quando os valores do parâmetro b de cada *quadrat* foram comparados entre as regiões (Tabela 3), não foram observados padrões para a maioria dos tamanhos de *quadrat*. Os b_s da região Noroeste foram superiores aos demais para os *quadrats* 2x2 e 3x5, os da região Centro foram maiores para os *quadrats* 3x3 e 5x3, enquanto que o único valor de b na região Sul superior aos demais foi o do *quadrat* 4x4.

A comparação entre os parâmetros A e b para os *quadrats* 3x5 e 5x3, indica uma predominância de maiores valores para o 3x5 (Tabela 3). Isso só não ocorreu na região Centro. No entanto, quando a análise foi feita com todos os dados em conjunto, apesar dos valores de A e b para o 3x5 terem sido numericamente maiores que os do 5x3, não foi constatada diferença estatística ($P < 0,001$).

Determinação de áreas isópatas (AI)

Na área da região Noroeste foi possível distinguir um setor de mais alta incidência de CVC. Esse setor, estreito e comprido, localizou-se na extremidade sudoeste do talhão e foi evidente até os 153 dias após primeira avaliação [DAPA] (Figura 2a). Os pequenos focos de maior incidência não associados às bordas (111 e 153 DAPA) não apresentaram crescimento posterior a essas datas. De maneira geral a incidência foi relativamente uniforme em todo o talhão.

O foco mais evidente no talhão da região Centro localizou-se no setor noroeste, apresentando-se inicialmente com forma elíptica [153 e 231 DAPA] (Figura 2b). A partir dos 231 DAPA pôde ser observada a formação de um foco de maior extensão no setor sudoeste. No restante do talhão a incidência aumentou quase que homogeneamente.

Na região Sul não foram detectadas áreas delimitadas e de maior incidência da CVC (Figura 2c). Durante toda a epidemia as plantas doentes apareceram de maneira quase uniforme em todo o talhão. Apenas quando a incidência média já havia ultrapassado os 70% [195 DAPA] (Figura 2c) é que puderam ser observadas áreas de incidência superior a 94% na borda sudeste do talhão. Nas avaliações seguintes a incidência do restante do pomar se igualou às dessas áreas.

Análise de dinâmica e estrutura de focos (ADEF)

Como a quantidade de plantas em cada área era diferente, o número de focos teve que ser padronizado. Os dados básicos puderam ser então avaliados em conjunto, como número de focos por 1.000 plantas (NFM) e número de focos

unitários por 1.000 plantas (NFU). Quando os dados das três regiões foram analisados em conjunto, observou-se que o padrão das curvas de NFM e número de focos unitários por 1.000 plantas (NF1M) foi semelhante (Figura 3), alterando-se apenas os valores brutos. O pico de número total de focos por 1000 plantas (NFM) foi observado quando a proporção de plantas afetadas estava entre 0,1 e 0,2 (Figura 3b). A coalescência de focos foi constatada a partir da ocorrência do pico de NFM. Além da redução no número de focos, o aumento no seu tamanho (Figura 3c) é a outra evidência do fenômeno de agrupamento de focos. Os focos apresentaram tamanhos, na média, inferiores a 40 plantas até 0,4 de proporção de doença. A partir daí a tendência de aumento foi sigmóide (Figura 3c). Em apenas 12% dos casos os focos médios tiveram tamanho inferior a 20 plantas.

DISCUSSÃO

Análise de seqüência ordinárias

No talhão da região Noroeste os resultados indicaram uma predominância da aleatoriedade, tanto ao longo das linhas de plantio quanto entre linhas. No início da epidemia, no entanto, predominou a agregação no padrão espacial das plantas sintomáticas para a direção das linhas de plantio. Esse fato provavelmente se deu em função da formação de focos ao longo das linhas (ver áreas isópatas). Por outro lado, a tendência para a agregação entre linhas de plantio ao final da epidemia (mais de 95% de incidência!) não tem explicação biológica plausível, podendo ser um artefato da técnica; quando a transmissão da doença se dá entre plantas imediatamente vizinhas, seria de se esperar que isso ocorresse dentro das linhas de plantio em função da maior proximidade entre plantas.

O aumento progressivo do índice Z_{so} ao longo das linhas, desde valores indicativos de agregação até a regularidade é uma indicação forte de que a epidemia na região Centro começou em focos mais delimitados, porém dispostos no sentido das linhas de plantio, evoluindo para o aparecimento de plantas doentes ao acaso e posterior formação de blocos homogêneos ao final da epidemia.

No talhão da região Sul a maioria das avaliações indicou resultados compatíveis com a aleatoriedade, nas duas direções estudadas. No entanto, também para as duas direções, o início da epidemia se deu de maneira altamente regular (Figura 1c). Essa situação é compatível com o plantio de grande proporção de plantas infetadas em viveiro ou infecção muito precoce e em larga escala após o plantio..

Considerando o observado nas três regiões, não se pode considerar que *X. fastidiosa* tenha uma disseminação predominante ao longo ou entre linhas de plantio. Mais ainda, considerando que aglomerações de plantas doentes indicam que o patógeno está sendo disseminado de planta a planta, não há como afirmar que a transmissão da doença se dê preferencialmente ao longo das linhas de plantio. Dessa forma, a contribuição que passagens de máquina possam ter dado à disseminação da bactéria nas áreas estudadas não deve ser

Dinâmica espacial da clorose variegada dos citros em três ...

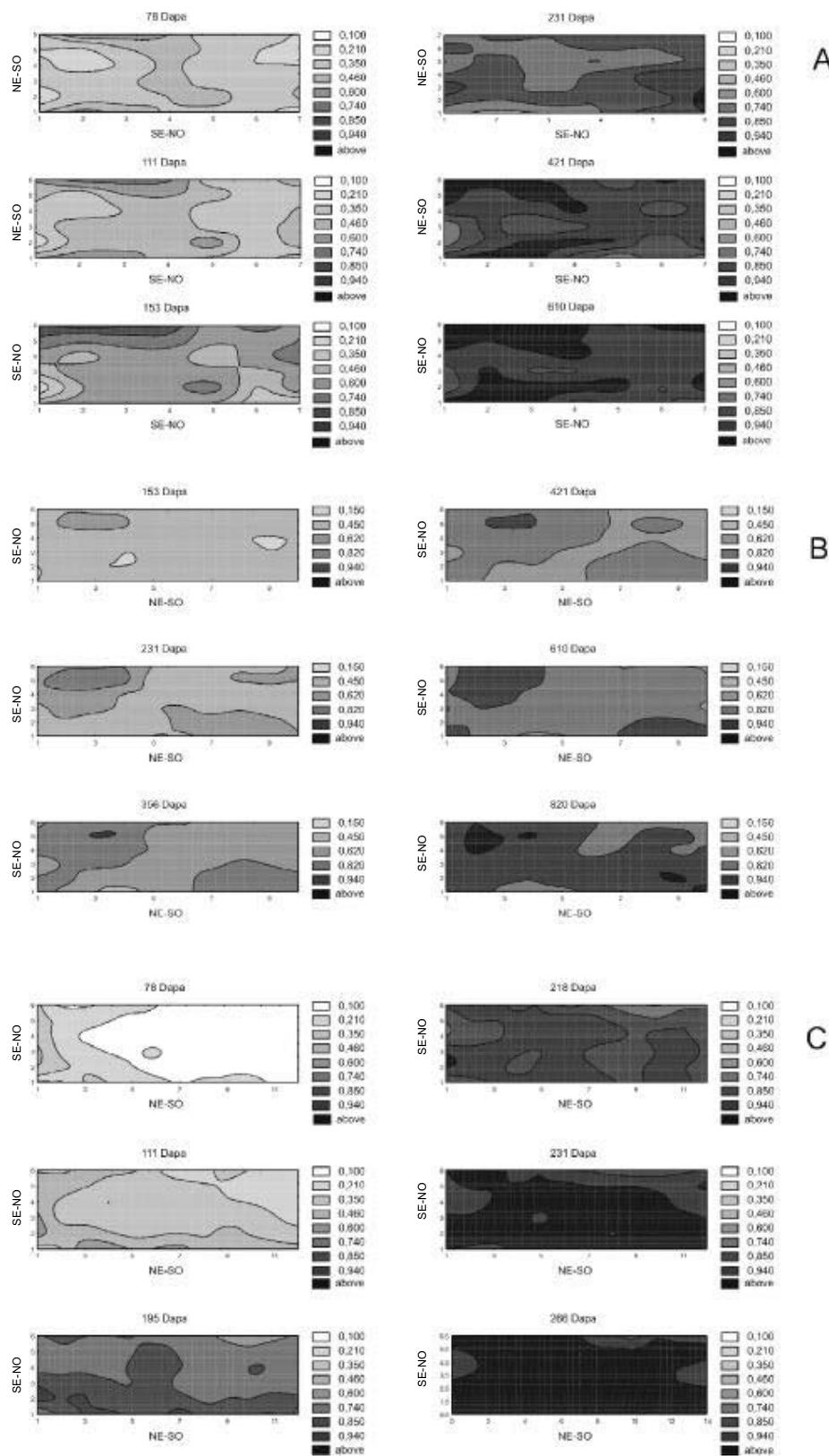


FIG. 2 - Áreas isópatas do talhão das regiões Noroeste (A), Centro (B) e Sul (C) em seis avaliações representativas. O aumento na incidência da doença é indicado pela variação de cores, do branco (menor incidência) ao preto (maior incidência).

significativa. Em outras palavras, essa é uma evidência indireta de que aplicações de defensivos e adubos, e ainda roçagens e gradagens, não devem influenciar a disseminação do patógeno ou a manifestação dos sintomas da CVC. Gottwald *et al.* (1993) e Laranjeira (1997), estudando o padrão espacial da CVC em pomares do Norte de São Paulo, e aplicando uma variante dessa técnica, chegaram à mesma conclusão. Em outros patossistemas envolvendo *X. fastidiosa*, não há informações sobre o uso desse tipo de análise ou mesmo de influência dos tratamentos culturais na disseminação da bactéria. Em outros patossistemas citrícolas com presença de vetor, a caracterização do agrupamento dentro de linhas de plantio não tem sido feita com o objetivo de avaliar o papel de atividades humanas na disseminação do patógeno; visa-se, mais, a simples determinação das características do agrupamento, que nem sempre é significativo (Gottwald *et al.*, 1991a; Gottwald *et al.*, 1991b; Gottwald *et al.*, 1996).

Segundo Heady & Nault (1985), a resposta de escape de cigarrinhas, ou seja, o vôo induzido por perturbações mecânicas no seu ambiente, pode variar conforme o gênero e até espécie. Assim, é possível que as cigarrinhas vetoras de *X. fastidiosa* em citros não tenham uma boa resposta de escape ou, nesse movimento, não tenham preferência pela planta mais próxima. Isso é mais flagrante quando se considera que os três talhões não apresentavam o mesmo perfil populacional de cicadélídeos (Pereira, 2000). Dessa maneira, as passagens de máquina pelos talhões não induziriam os insetos ao vôo ou, se induzidos, os vetores não tenderiam a pousar, necessariamente, nas plantas mais próximas (dentro das linhas de plantio, em função do menor espaçamento).

De maneira geral foram observadas mais similaridades que diferenças entre os talhões das três regiões. Não foi observada nenhuma característica que pudesse ser atribuída a epidemias de CVC desse ou daquele lugar. Como pôde ser constatado em comparação com outros trabalhos, aparentemente há constância nos atributos da análise de seqüências ordinárias ao longo do tempo e mesmo em áreas diferentes.

Índice de dispersão (ID)

Não houve uma tendência clara para a maioria das avaliações apresentarem valor calculado de ID estatisticamente superior ou inferior a 1 ao nível de 5% de significância pelo teste de χ^2 . Os resultados variaram conforme a área e o tamanho de *quadrat*.

A evolução similar do índice ID na região Noroeste para todos os tamanhos de *quadrat* era esperada. No entanto, não foi observado um padrão que, biologicamente, fizesse sentido. Não há, por exemplo, correspondência entre valores maiores ou menores de ID com os picos e vales dos gráficos de derivadas do progresso no tempo (Laranjeira, 2002). O número de avaliações em que as plantas foram consideradas agregadas foi maior para os tamanhos de *quadrat* 3x3 e 3x5. Isso indica, parcialmente, que os focos nessa região teriam entre 9 e 15 plantas. Esse tamanho estaria em acordo com os resultados apresentados por Laranjeira (1997), que encontrou tamanho médio de onze plantas por foco. Para os dois tamanhos

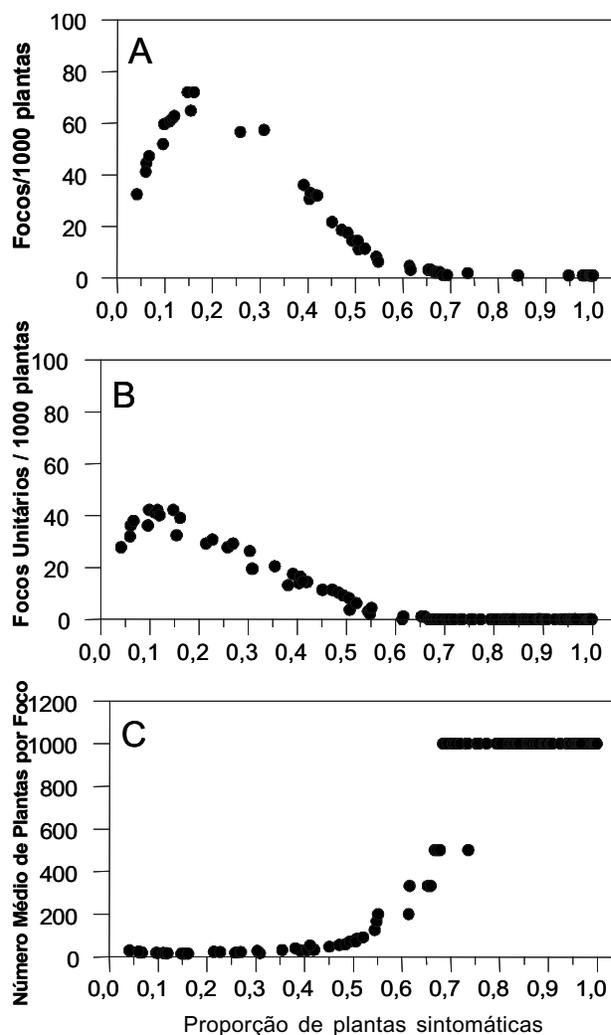


FIG. 3 - Evolução, em função da incidência, do número de focos por mil plantas (A), número de focos unitários por 1.000 plantas (B) e número médio de plantas por foco (C) para os dados das três regiões em conjunto.

de *quadrat*, a maioria das avaliações significativas ficou entre 80% e 90% de incidência, já no final da epidemia.

Também para a região Centro os valores de ID seguiram padrão parecido em todos os tamanhos de *quadrat*. A redução generalizada nos valores de ID entra em acordo com os resultados da análise de seqüências, que apontou uma tendência à regularidade no final da epidemia. Isso pode ter acontecido simplesmente por causa de um início agregado da epidemia. O aparecimento de novas plantas doentes não deve ter ocorrido muito próximo a esses possíveis focos, o que diminuiu o ID. Embora o *quadrat* 4x4 tenha tido o maior número de avaliações com agregação e os maiores valores de ID, outros tamanhos como o 2x2 apresentaram número de avaliações agregadas da mesma magnitude. Pelo cálculo do ID não foi possível avaliar o tamanho provável dos focos.

A região Sul foi a que apresentou menor coincidência

no padrão evolutivo do ID. Essa região, assim como a Centro, não teve um predomínio de um tamanho de *quadrat* quanto ao número de avaliações agregadas. Pelo menos para os três *quadrats* de maior tamanho, a maioria das avaliações consideradas agregadas ocorreu no início da epidemia.

Em seu trabalho com 11 talhões da região Norte de São Paulo, Laranjeira (1997) observou uma tendência a valores de ID estatisticamente superiores a 1. No entanto, tal qual aqui, não observou padrões de evolução do ID em função da incidência. Considerou, porém, que o índice de dispersão apresentava maior potencial que a aplicação da lei de Taylor, por apresentar resultados mais detalhados. Todavia, embora pelo ID seja realmente possível indicar se em uma dada avaliação as plantas doentes estavam agregadas ou não, a ausência de padrões biologicamente relevantes – como os resultados aqui indicaram – torna esse detalhamento de uso limitado.

Aplicação da lei de Taylor modificada (LTM)

Os valores de b obtidos para a regressão conjunta de todos os talhões, para todos os tamanhos de *quadrat*, denotam agregação, indicando que plantas afetadas pela CVC tendem a se localizar próximas a outras também doentes. Os valores de A , sempre maiores que zero, reforçam essa conclusão (Madden & Hughes, 1995). Assim, de maneira geral, fica caracterizada aquela tendência para as plantas afetadas por CVC. Por outro lado, o valor de b não pode ser considerado alto [$1,029 < b < 1,088$] (Madden & Hughes, 1995), indicando que a agregação, embora existente, foi fraca, independentemente do tamanho de *quadrat* considerado. Resultados muito parecidos, levando a conclusões idênticas, foram apresentados por Laranjeira (1997) para pomares da região Norte de São Paulo; no entanto, esse autor trabalhou com apenas um tamanho de *quadrat*, 3x5, e em apenas uma região. Os *quadrats* que apresentaram maiores valores de b (plantas doentes mais agregadas) foram o 3x5 e o 4x4, indicando um tamanho de foco bem similar ao encontrado por Laranjeira (1997).

Os resultados da aplicação da LTM (quando considerados os talhões individualmente) refletiram a situação da doença como um todo, ao longo das avaliações em cada região. Não foi encontrado um padrão de agregação dependente da área avaliada: os parâmetros b foram maiores para uma ou outra região a depender do tamanho do *quadrat*. Isso implica que o tamanho dos focos não encontra correlação com a posição geográfica em que a epidemia se desenvolve.

Apenas para o *quadrat* 3x3 a LTM não indicou agregação no talhão da região Noroeste. Houve diferença estatística entre os b_s de cada *quadrat*; o maior valor ocorreu para o tamanho 3x5. O valor encontrado foi bem próximo ao obtido por Laranjeira (1997) para análise em conjunto de talhões da região Norte de São Paulo. No entanto, esse autor usou apenas um tamanho de *quadrat*, o que não permite comparação com outros tamanhos usados neste trabalho.

Considerando a região Centro, somente o *quadrat* 4x4 não apresentou indicativo de agregação. Embora o parâmetro b para o *quadrat* 3x5 não tenha sido diferente de 1 pela análise

estatística, o A foi superior a zero, o que, segundo Madden & Hughes (1995), indica agregação. Nos demais *quadrats* tanto A quanto b foram significativos. A comparação entre b_s mostrou valor maior para o *quadrat* 5x3.

No talhão da região Sul todos os *quadrats* apresentaram A_s e b_s significativos, indicando agregação. Na comparação entre os b_s , o *quadrat* 3x5 apresentou o maior valor que os demais, com exceção do 4x4. Também nesse caso o valor obtido foi muito parecido com o obtido por Laranjeira (1997).

É interessante notar que, embora com variações quanto ao tamanho de *quadrat* com maior valor do parâmetro b , para as três regiões o resultado sempre apontou os maiores *quadrats* usados, sempre com 15 ou 16 plantas, o que entra em acordo com os resultados obtidos por Laranjeira (1997) para a região Norte de São Paulo.

Outro aspecto a ser notado é a diferença entre a direção dos *quadrats*. Para testar esse ponto, foram incluídos os *quadrats* 3x5 e 5x3, de mesmos tamanho e forma, mas posicionados em direções perpendiculares. Apenas na região Centro o 5x3 foi superior ao 3x5. O 5x3 emergiu de uma disposição perpendicular às linhas de plantio. Embora no início a evolução da epidemia nesse talhão tenha tendido a ocorrer ao longo das linhas de plantio (ver análise de seqüências ordinárias), isso não se manteve para todas as avaliações (ver análise de áreas isópatas), sendo claramente apontado pela comparação entre aqueles dois tipos de *quadrat*.

Como sumário dessa técnica, e também da análise do ID, deve-se considerar que não foram por si só suficientes para apontar diferenças inequívocas entre as três regiões estudadas. A lei de Taylor fornece parâmetros que seriam atributos típicos de cada entidade biológica (Taylor, 1961). Entretanto, não fornece informação a respeito da dinâmica da epidemia, não guarda detalhes a respeito das características espaciais de cada ponto dos talhões, mas resume o modo como a epidemia se comportou espacialmente. Apesar das limitações, o uso da LTM ainda é essencial, pelo menos para o estudo de epidemias cuja incidência é o dado mais importante.

Determinação de áreas isópatas

Ao contrário de Laranjeira (1997), que trabalhou com áreas vizinhas a pomares antigos contaminados, ou vizinhos a pastos e matas, optou-se por usar talhões isolados (região Noroeste) ou segmentos de talhões maiores (regiões Centro e Sul). Assim, pôde-se isolar o fator “fonte de inóculo externa”, já bem caracterizado por aquele autor.

Como era de se esperar, baseado nos resultados de Laranjeira (1997) e na escolha de áreas livres de fonte de inóculo externa, de maneira geral a incidência no talhão da região Noroeste apresentou-se relativamente uniforme em toda a área. O setor desse talhão que inicialmente apresentou maior incidência localizava-se próximo a uma baixada, mas não fazia fronteira com nenhuma fonte de inóculo detectável. O talhão continuava por mais algumas linhas de plantas cítricas de mesma composição varietal. Talvez, e apenas talvez, por não haver evidências, essa área de maior incidência possa ter sido gerada a partir de mudas contaminadas, fato comum e já registrado

por Laranjeira (1997).

No talhão da região Centro a existência de focos foi mais conspícua. Esses focos, no entanto, podem ter se originado a partir de mudas infetadas, ou serem a expressão de sub-áreas que favoreceriam o aparecimento de sintomas. Porém, não há evidências fortes para qualquer das duas hipóteses. Essa maior quantidade de focos entra em acordo com os maiores valores do parâmetro *b* para esse talhão obtidos na LTM (*quadrat* 5x3). Em contraste, na região Sul, não foram detectadas áreas de maior incidência que o restante do talhão. Todo esse quadro está de acordo com os demais resultados de análise espacial, e também corroboram as afirmações de Laranjeira (1997) no sentido de que as epidemias de CVC são, via de regra, levemente agregadas.

Em todas glebas, mesmo tendo sido observada a existência de áreas com maior concentração de plantas doentes, pôde-se notar que o aparecimento dessas plantas não se deu de maneira organizada. De forma geral não foram observadas áreas delimitadas dentro de cada pomar a partir das quais a doença tenha se disseminado. Por isso mesmo, e por não terem sido verificadas direções preferenciais de disseminação, pode-se reforçar o resultado obtido por Laranjeira (1997), que constatou a não-influência dos ventos dominantes na disseminação da CVC. A uniformidade no aparecimento de novas plantas doentes não permite, por um lado, defender a proposta de Laranjeira (1997) de que plantas daninhas hospedeiras não seriam fonte de inóculo importante. Porém, tal uniformidade não é evidência da participação daquelas plantas na estrutura do patossistema, mesmo porque são desconhecidos seu status fitopatológico e seu padrão espacial nas áreas estudadas. De qualquer forma, também a análise das áreas isópatas demonstra a pouca diferença entre os pomares das três regiões.

Com exceção do presente estudo e do realizado por Laranjeira (1997), a análise de áreas isópatas não fez parte de nenhum trabalho com doenças causadas por *X. fastidiosa* e, assim, não há como fazer comparações de resultados.

Análise de dinâmica e estrutura de focos (ADEF)

Na análise conjunta das três regiões, obtiveram-se resultados similares aos relatados por Laranjeira *et al.* (1998): curvas de número de focos por mil plantas com fase inicial ascendente, pico em baixas incidências e posterior fase descendente. No entanto, duas características dos resultados aqui apresentados diferiram dos daquele trabalho. O pico ocorreu ao redor de 15% de incidência, muito antes do indicado por Laranjeira *et al.* (1998) [25%]. Além disso, a curva de número de focos unitários não apresentou fases ascendente e descendente acentuadas como as obtidas por aquele autor; por outro lado, seu pico foi coincidente, ao redor de 10% de incidência. A ausência de fase ascendente acentuada indica que o aparecimento de novas plantas doentes não ocorreu de maneira aleatória, com grande número de focos unitários, o que reforça os resultados obtidos com a lei de Taylor, em que a maioria dos parâmetros *A* foi significativa, indicando agregação no início da epidemia (pelo menos na sub-região

delimitada pelo tamanho do *quadrat*). Em adição, um pico “precoce” na curva de número de focos *versus* incidência indica que a coalescência de focos, normal em função da finitude das áreas e já relatada anteriormente (Laranjeira *et al.*, 1998), ocorreu antes do “previsto”, o que explica a tendência observada na análise de áreas isópatas para uma uniformidade na incidência. Como os valores dos picos foram semelhantes entre esse estudo e o de Laranjeira e colaboradores, a coalescência deve ser atribuída a maiores tamanhos de foco, o que de fato ocorreu.

É notável também que os valores para os picos, quer de focos totais (~70) ou de focos unitários (~40), tenham sido muito parecidos com os obtidos por Laranjeira *et al.* (1998). Como ainda não há um estudo aprofundado das características desse tipo de técnica, é prematuro dizer se esses valores de pico e seu formato são típicos do patossistema ou se são artefatos da técnica. Porém, em trabalho com cancro cítrico Bergamin Filho *et al.* (2001) mostraram que a dinâmica de focos dessa doença difere substancialmente da relatada para a CVC (Laranjeira *et al.*, 1997).

De maneira geral não foram encontradas diferenças marcantes no padrão espacial de plantas afetadas pela CVC nos três pomares estudados. Essa conclusão permite inferir que a estrutura e o funcionamento desse patossistema não difere substancialmente entre distintas regiões. Mesmo que haja diferenças na população de vetores ou de haplótipos da bactéria, elas não se refletem no arranjo espacial das plantas sintomáticas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao técnico Genésio S. da Silva (APTA Citros-IAC) a ajuda na coleta dos dados, ao Centro APTA Citros – IAC por ter permitido uso de sua estrutura e ao Fundecitrus e à FAPESP pelo auxílio financeiro para execução desse trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AYRES, A.J. Intensidade da clorose variegada dos citros em pomares comerciais de laranja do Estado de São Paulo e sul do Triângulo Mineiro. (Dissertação de Mestrado). Jaboticabal. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/Universidade Estadual Paulista. 2000.
- BERGAMIN FILHO, A., AMORIM, L., GOTTWALD, T.R. & LARANJEIRA, F.F. Spatial distribution of citrus canker in São Paulo - Brazil. Understanding epidemics for better disease management. 8^o International Workshop on Plant Disease Epidemiology, Ouro Preto, MG. 2001. p.29.
- CHANG, C.J., GARNIER, M., ZREIK, L., ROSSETI, V. & BOVÉ, J.M. Culture and serological detection of the xylem-limited bacterium causing citrus variegated chlorosis and its identification as a strain of *Xylella fastidiosa*. *Current Microbiology* 27:137-142. 1993.
- FUNDECITRUS. Estatísticas CVC: incidência da CVC por região - 2001. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/escvcb.html>> Acesso em: 16 ago. 2003.
- GOTTWALD, T.R., AUBERT, B. & LONG, H.K. Spatial pattern analysis of citrus greening in Shantou, China. *Proceedings. 11th IOCV*

- Conference, Riverside. 1991a. pp.421-427.
- GOTTWALD, T.R., CAMBRA, M., MORENO, P., CAMARASA, E. & PIQUER, J. Spatial and temporal analyses of citrus tristeza virus in eastern Spain. *Phytopathology* 86:45-55. 1996.
- GOTTWALD, T.R., GIDTTI, F.B., SANTOS, J.M. & CARVALHO, A.C. Preliminary spatial and temporal analysis of citrus variegated chlorosis in Brazil. *Proceedings. 12th IOCV Conference, Riverside. 1993. pp.327-335.*
- GOTTWALD, T.R., GONZALES, C.I. & MERCADO, B.G. Analysis of the distribution of citrus greening in groves in the Philippines. *Proceedings. 11th IOCV Conference, Riverside. 1991b. pp.414-420.*
- HEADY, S.E. & NAULT, L.R. Escape behaviour of *Dalbulus* and *Balbulus* leafhoppers (Homoptera: Cicadellidae). *Environmental Entomology* 14:154-158. 1985.
- HUGHES, G. & MADDEN, L.V. Aggregation and incidence of disease. *Plant Pathology* 41:657-660. 1992.
- LARANJEIRA, F.F. Dinâmica Espacial e Temporal da Clorose Variegada dos Citros. (Dissertação de Mestrado). Piracicaba. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/Universidade de São Paulo. 1997.
- LARANJEIRA, F.F. Epidemiologia da clorose variegada dos citros no Estado de São Paulo. (Tese de Doutorado). Piracicaba. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/Universidade de São Paulo. 2002.
- LARANJEIRA, F.F., BERGAMIN FILHO, A. & AMORIM, L. Dinâmica e estrutura de focos da clorose variegada dos citros (CVC). *Fitopatologia Brasileira* 23:36-41. 1998
- LOPES, J.R.S., BERETTA, M.J.G., HAKAKAWA, R., ALMEIDA, R.P.P., KRÜGNER, R. & GARCIA JR., A. Confirmação da transmissão por cigarrinhas do agente causal da clorose variegada dos citros, *Xylella fastidiosa*. *Fitopatologia Brasileira* 21:343. 1996.
- MADDEN, L.V. & HUGHES, G. Plant disease incidence: distributions, heterogeneity and temporal analysis. *Annual Review of Phytopathology* 33:529-564. 1995.
- MADDEN, L.V., HUGHES, G. & ELLIS, M.A. Spatial heterogeneity of the incidence of grape downy mildew. *Phytopathology* 85: 269-275. 1995.
- MADDEN, L.V., LOUIE, R., ABT, J.J. & KNOKE, J.K. Evaluation of tests of randomness of infected plants. *Phytopathology* 72: 195-198. 1982.
- MARTINS, M.L., CEOTTO, G., ALVES, S.G., BUFON, C.C.B., SILVA, J.M. & LARANJEIRA, F.F. A cellular automata model for citrus variegated chlorosis. *Physical Review E* 62:7024-7030. 2000.
- NELSON, S.C. A simple analysis of disease foci. *Phytopathology* 86:332-339. 1996.
- NUNES, W.M.C. Epidemiologia da clorose variegada dos citros (CVC) avaliada por sintomas e diagnóstico serológico e molecular de *Xylella fastidiosa*. (Tese de Doutorado). Botucatu. Faculdade de Ciências Agrárias/Universidade Estadual Paulista. 1999.
- PREJUÍZOS com a CVC. Informativo CCSM. Setembro, 2001.
- ROSSETTI, V., GARNIER, M., BOVÉ, J.M. BERETTA, M.J.G., TEIXEIRA, A.R., QUAGGIO, J.A. & DE NEGRI, J.D. Présence de bactéries dans le xylème d'orangers atteints de chlorose variégée, une nouvelle maladie des agrumes au Brésil. *Comptes Rendus Académie des Sciences de Paris*, t.310, serie III, 1990. pp.345-349.
- SIMPSON, A.J.G., REINACH, F.C. & ARRUDA, P. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Nature* 406:151-157. 2000.
- TAYLOR, L.R. Aggregation, variance and the mean. *Nature* 189:732-735. 1961.
- ZAR, J.H. *Biostatistical analysis*. 3rd ed. New Jersey. Prentice Hall. 1996.