

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**MULTIPLICAÇÃO DE *Diaphorina citri* E TRANSMISSÃO DE  
*Candidatus LIBERIBACTER ASIATICUS* ENTRE  
LARANJEIRA DOCE E LIMEIRA ÁCIDA 'TAHITI'**

**Jeane Dayse Veloso dos Santos Pulici  
Engenheira agrônoma**

**2018**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**MULTIPLICAÇÃO DE *Diaphorina citri* E TRANSMISSÃO DE  
*Candidatus LIBERIBACTER ASIATICUS* ENTRE  
LARANJEIRA DOCE E LIMEIRA ÁCIDA 'TAHITI'**

**Jeane Dayse Veloso dos Santos Pulici**

**Orientador: Prof. Dr. Silvio Aparecido Lopes**

**Tese apresentada à Faculdade de Ciências  
Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de  
Jaboticabal, como parte das exigências para  
a obtenção do título de Doutor em  
Agronomia (Produção Vegetal)**

**2018**

P981m Pulici, Jeane Dayse Veloso dos Santos  
Multiplicação de *Diaphorina citri* e transmissão de *Candidatus*  
*Liberibacter asiaticus* entre laranjeira doce e limeira ácida 'Tahiti' /  
Jeane Dayse Veloso dos Santos Pulici. -- Jaboticabal, 2018  
vii, 75 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade  
de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2018

Orientador: Silvio Aparecido Lopes

Banca examinadora: Fabrício Eustáquio Lanza, Nelson Arno  
Wulff, Antonio de Góes, Eduardo Augusto Girard.

Bibliografia

1. *Citrus latifolia*. 2. *Citrus sinensis*. 3. Huanglongbing. 4.  
inoculação cruzada. 5. Psilídeo. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade  
de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 632.35:634.3



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA TESE: MULTIPLICAÇÃO DE Diaphorina citri E TRANSMISSÃO DE Candidatus LIBERIBACTER ASIATICUS ENTRE LARANJEIRA DOCE E LIMEIRA ÁCIDA TAHITI

**AUTORA: JEANE DAYSE VELOSO DOS SANTOS PULICI**

**ORIENTADOR: SILVIO APARECIDO LOPES**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL), pela Comissão Examinadora:

Pesquisador Dr. SILVIO APARECIDO LOPES  
Departamento de Fitossanidade / FUNDECITRUS - Araraquara/SP

Pesquisador Dr. FABRÍCIO EUSTÁQUIO LANZA  
Departamento de Fitossanidade / FUNDECITRUS - Araraquara, SP

Pesquisador Dr. NELSON ARNO WULFF  
Fundo de Defesa da Citricultura / FUNDECITRUS - Araraquara/SP

Prof. Dr. ANTONIO DE GÓES  
Departamento de Fitossanidade / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Pesquisador Dr. EDUARDO AUGUSTO GIRARDI  
Cruz das Almas - Bahia / Embrapa Mandioca & Fruticultura

Jaboticabal, 18 de maio de 2018

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**JEANE DAYSE VELOSO DOS SANTOS PULICI** – Filha de João Assunção dos Santos e Maria Margarida Carvalho Veloso, natural de Belém, PA, nascida no dia 28 de fevereiro de 1990. Formada no Curso de Engenharia Agrônômica pela Universidade Federal Rural da Amazônia-UFRA, PA, no ano de 2012. Em 2013, iniciou o curso de mestrado junto ao Programa de Pós-Graduação Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, atuando em pesquisas de resistência de plantas a insetos pragas, sendo bolsista CNPq, com término em fevereiro de 2015. Aprovada na seleção de Doutorado na mesma instituição, com início em março de 2015, atuando na linha de pesquisa manejo e controle de pragas e doenças, onde teve a oportunidade de fazer parte do programa de doutorado sanduíche no exterior, realizado no centro de pesquisa Citrus Research and Education Center, Lake Alfred, Flórida, sendo bolsista Capes.

## “ CONFIE SEMPRE

Não percas a tua fé entre as sombras do mundo. Ainda que os teus pés estejam sangrando, segue para frente, erguendo-a por luz celeste, acima de ti mesmo. Crê e trabalha. Esforça-te no bem e espera com paciência. Tudo passa e tudo se renova na terra, mas o que vem do céu permanecerá. De todos os infelizes os mais desditosos são os que perderam a confiança em Deus e em si mesmo, porque o maior infortúnio é sofrer a privação da fé e prosseguir vivendo. Eleva, pois, o teu olhar e caminha. Luta e serve. Aprende e adianta-te. Brilha a alvorada além da noite. Hoje, é possível que a tempestade te amarfane o coração e te atormente o ideal, aguilhoando-te com a aflição ou ameaçando-te com a morte. Não te esqueças, porém, de que amanhã será outro dia.”

Chico Xavier

## Dedico

Aos meus pais João Assunção e Margarida Veloso, por todo amor, carinho, atenção, apoio e todas as outras formas de afeto que recebi ao longo de minha vida.

Em memória ao meu tio Pedro Nascimento, minha avó Honória Carvalho Veloso e meu avô João Veloso, que apesar de não estarem mais presentes, foram e sempre serão pessoas importantes na minha vida.

## Ofereço

Aos meus irmãos João Henrique, Angela Suelem e Roberto Rivelino, e tia Liduina Veloso por sempre me apoiarem e incentivarem nos meus sonhos e ao marido Elvis Pulici por estar sempre presente sendo amigo e companheiro, me apoiando em todas as decisões da minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por estar presente em todos os momentos da minha vida, sendo meu porto seguro e de onde tiro forças nos momentos mais difíceis.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, pela oportunidade de realizar o curso de Doutorado em Agronomia (Produção Vegetal).

Ao Fundo de Defesa da Citricultura (FUNDECITRUS) pela oportunidade de conduzir parte dos experimentos realizados durante este curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela concessão da bolsa de doutorado e doutorado sanduíche no exterior.

Ao Prof. Dr. Silvio Aparecido Lopes, pela orientação, paciência, compreensão e atenção, necessárias para a elaboração desse e demais trabalhos.

Ao Prof. Dr. Evan G. Johnson e toda sua equipe por me receberem tão bem em seu laboratório.

Aos Professores do programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal) pelos conhecimentos transmitidos.

Aos colegas e parceiros de trabalho Laudecir Lemos, Juan Cifuentes, Fernanda Marcel, Everton Carvalho, Priscila, Luiz e Hermes.

A técnica de laboratório e amiga Rosângela Souza, pelo apoio e ajuda durante a execução dessa pesquisa.

A todos os funcionários do Departamento de Fitossanidade, em especial ao Sr. Wanderlei, pela amizade e colaboração.

As minhas amigas Juliana Barroso, Tayana Silva, Izabela Merêncio e Larissa Nogueira pelo companheirismo, amizade, apoio e aprendizado que levarei pelo resto da vida.



Ao meu marido Elvis Pulici e sua família por sempre estarem presentes, incentivando-me em todos os momentos.

E a todos que direta e indiretamente contribuíram para o desenvolvimento desta pesquisa.

**MUITO OBRIGADA!**

## SUMÁRIO

RESUMO.....	iv
ABSTRACT .....	vi
CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS .....	1
1. REVISÃO DE LITERATURA .....	1
1.1. Aspectos gerais da citricultura no Brasil .....	1
1.2. Limeira ácida ‘Tahiti’ .....	2
1.3. <i>Phytophthora</i> spp.....	4
1.4. Huanglongbing (HLB).....	4
1.5. Processo infeccioso e efeitos na planta .....	6
1.6. Morfologia e bioecologia de <i>Diaphorina citri</i> .....	7
1.7. Manejo do HLB .....	8
2. REFERÊNCIAS.....	10
CAPÍTULO 2- Reprodução e desenvolvimento de <i>Diaphorina citri</i> Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) em limeira ácida ‘Tahiti’ ( <i>Citrus latifolia</i> Tanaka) .....	20
RESUMO.....	20
ABSTRACT .....	21
1. INTRODUÇÃO .....	22
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	24
2.1. Preparo das plantas .....	24
2.2. Criação dos insetos.....	25
2.3. Experimento de capacidade de oviposição.....	25
2.4. Experimentos de sobrevivência ninfal.....	26
2.5. Análise estatística .....	26

3. RESULTADOS .....	27
3.1. Experimento de capacidade de oviposição .....	27
3.2. Experimentos de sobrevivência ninfal.....	29
4. DISCUSSÃO .....	33
5. AGRADECIMENTOS .....	35
6. REFERÊNCIAS.....	36
CAPÍTULO 3- Limeira ácida ‘Tahiti’ como fonte de <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> para laranjeiras e vice-versa .....	42
RESUMO .....	42
ABSTRACT .....	43
1. INTRODUÇÃO.....	44
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	45
2.1. Desenvolvimento de escala fotográfica de sintomas foliares .....	46
2.2. Inoculações cruzadas de <i>Ca. L. asiaticus</i> por <i>Diaphorina citri</i> .....	46
2.3. Inoculação de <i>Ca. L. asiaticus</i> por enxertia de borbulha.....	48
2.4. Extração de DNA e qPCR .....	49
2.5. Avaliações.....	50
2.5.1. Quantificação de sintomas foliares .....	50
2.5.2. Quantificação da bactéria nas folhas .....	51
2.5.3. Quantificação de danos em raízes.....	52
2.5.4. Quantificação da bactéria nas raízes e provável presença de <i>Phytophthora</i> spp.....	52
2.6. Análises estatísticas.....	53
3. RESULTADOS .....	54
3.1. Desenvolvimento de escala fotográfica.....	54
3.2. Inoculações cruzadas de <i>Ca. L. asiaticus</i> .....	56

3.2.1. Influência do método de inoculação sobre <i>Ca. L. asiaticus</i> em plantas com e sem <i>Phytophthora</i> spp. ....	57
3.2.2. Influência das combinações planta inoculada/origem do inóculo na incidência de <i>Ca. L. asiaticus</i> em plantas com e sem <i>Phytophthora</i> spp. ....	58
3.2.3. Influência da fonte de inóculo na incidência de <i>Ca. L. asiaticus</i> em plantas com e sem <i>Phytophthora</i> spp. ....	59
3.2.4. Incidência de <i>Ca. L. asiaticus</i> na parte aérea das plantas .....	59
3.2.5. Incidência de <i>Ca. L. asiaticus</i> no sistema radicular das plantas .....	63
3.2.6. Influência da <i>Phytophthora</i> spp. sobre danos nas raízes .....	64
4. DISCUSSÃO .....	67
5. REFERÊNCIAS .....	71

**MULTIPLICAÇÃO DE *Diaphorina citri* E TRANSMISSÃO DE *Candidatus Liberibacter asiaticus* ENTRE LARANJEIRA DOCE E LIMEIRA ÁCIDA 'TAHITI'**

**RESUMO** – Huanglongbing (HLB) é considerada a mais importante doença da citricultura mundial. No Brasil, está associada principalmente a bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las), transmitida pelo inseto *Diaphorina citri*. Apesar da grande importância comercial, poucas são as informações sobre vários aspectos desta doença em laranjeiras, inclusive o potencial que esta representa como fonte de inóculo para as laranjeiras. O objetivo do presente trabalho foi (i) avaliar a favorabilidade da limeira ácida 'Tahiti' à reprodução de *D. citri* e multiplicação de Las, (ii) caracterizar sintomas foliares e danos em raízes de plantas afetadas e (iii) avaliar, por meio de inoculações cruzadas, seu potencial como fonte de inóculo para a laranjeira 'Valência' e vice-versa. Ambos os hospedeiros estavam enxertados em limoeiro 'Cravo', com 2 anos de idade. O capítulo I contém revisão de literatura, o II estudo comparativo de plantas das duas hospedeiras como criadouro de *D. citri* e o III caracterização de sintomas foliares, danos em raízes e resultados das inoculações cruzadas, usando como inóculo borbulhas doentes e insetos infectivos. A 'Tahiti' foi menos favorável que a 'Valência' ao desenvolvimento do inseto. Nela as taxas de oviposição e sobrevivência de ninfas foram menores, ou seja, 59,7 e 48,5%, respectivamente, em relação à 'Valência' no primeiro experimento, e de 75,4 e 33,4% no segundo experimento. Em 'Tahiti' as manchas amarelas foliares foram mais intensas, porém os danos nas raízes similares aos observados em 'Valência'. Uma escala fotográfica foi desenvolvida e mostrou-se útil na avaliação dos experimentos. Inesperadamente, diversas plantas experimentais estavam infectadas com *Phytophthora* spp., o que nos permitiu, embora em caráter preliminar, também avaliar possível influência deste patógeno na interação Las-citros. Na parte aérea, *Phytophthora* promoveu maiores títulos nas plantas inoculadas por enxertia, assim como estimulou a planta a exibir sintomas foliares mais cedo. No sistema radicular, este patógeno não favoreceu a colonização por Las, com exceção de 'Tahiti' inoculada com inóculo oriundo de 'Tahiti', independente do método de inoculação.

*Phytophthora* não contribuiu para aumento dos danos em plantas com Las. De forma geral, plantas de 'Valência' foram colonizadas por Las, independente da fonte de inóculo e método de inoculação. A 'Tahiti', por sua vez, foi colonizada por Las oriunda de ambos os hospedeiros, porém somente quando inoculada por enxertia. A 'Tahiti' pode atuar como fonte de inóculo para si mesma e para laranjeiras.

**Palavras-chave:** *Citrus latifolia*, *Citrus sinensis*, Huanglongbing, inoculação cruzada, psílideo.

## MULTIPLICATION OF *Diaphorina citri* AND TRANSMISSION OF *Candidatus LIBERIBACTER ASIATICUS* BETWEEN SWEET ORANGE AND 'TAHITI' ACID LIME

**ABSTRACT** – Huanglongbing (HLB) is considered the most important disease of citrus worldwide. In Brazil, the bacterium most commonly associated with the disease is *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las) transmitted by the insect *Diaphorina citri*. Despite the great commercial importance, little is known about the disease on acid limes. The objectives of this study were (i) to evaluate the favorability of the 'Tahiti' acid lime for the reproduction of *D. citri* and multiplication of Las, (ii) characterize foliar symptoms and root damage on infected plants and (iii) to evaluate, through cross inoculations, the potential that diseased 'Tahiti' represents as source of inoculum to sweet orange 'Valencia' and vice versa. Both hosts were two-year-old and growing on 'Cravo' Rangpur lime rootstock. Chapter I contains literature review, II a comparative study of the favorability of the two hosts for *D. citri* reproduction, and III a characterization of foliar symptoms, root damage and the results of cross inoculation experiments, using as inoculum diseased budsticks and infective insects. 'Tahiti' was less favorable than 'Valencia' to insect development. On these plants oviposition rates and nymph survival were, respectively, 59.7 and 48.5% of those on 'Valencia' in the first experiment, and 75.4 e 33.4 % in the second experiment. On 'Tahiti' the yellow leaf spots were more intense, but root damage like those on 'Valencia'. Unexpectedly, several experimental plants were infected with *Phytophthora* spp., which allowed us to assess the influence of this pathogen on Las-citrus interaction. On *Phytophthora*-infected plants inoculated by grafting, higher bacterium titers were detected on leaves, and the symptoms expressed earlier. This pathogen did not favor root colonization by Las, excepting 'Tahiti' that received inoculum of Las from 'Tahiti', nor contributed to increase root damage. Overall, 'Valencia' was infected by Las, independently of the citrus variety source inoculum and method of inoculation. 'Tahiti', in turn, was infected by Las originated from both hosts, but only when inoculated by grafting. When exposed to infective insects, 'Tahiti' became infected only when the source of inoculum was another 'Tahiti'.

Removal of diseased trees of 'Tahiti' (as of any other citrus) from commercial or noncommercial areas should be reinforced as crucial to the success of HLB control.

**Keywords:** *Citrus latifolia*, *Citrus sinensis*, cross inoculation, Huanglongbing, psyllid.



## CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

### 1. REVISÃO DE LITERATURA

#### 1.1. Aspectos gerais da citricultura no Brasil

A cultura dos citros é uma das principais atividades do agronegócio brasileiro (NEVES; TROMBIN, 2017), com destaque para o cultivo da laranja. O Brasil é o maior produtor mundial desta fruta, responsável por 38% dos frutos e 64% do suco concentrado consumido no mundo (AGRIANUAL, 2018). Apesar da atividade citrícola estar presente em quase todas as regiões do país, esta se concentra na região Sudeste, no chamado cinturão citrícola, que engloba diversos municípios do estado de São Paulo e alguns do estado de Minas Gerais, situados nas regiões do Triângulo Mineiro e Sudoeste deste estado. Neste ano de 2018, dos 465 mil hectares plantados com citros nesta região, 414 mil estão destinados ao cultivo de laranjas doces, o que representa 89% do total de área plantada (FUNDECITRUS, 2018). Apesar do indiscutível predomínio das laranjeiras, a área representada com com esta fruteira caiu de 92% em 2015 para 89% em 2018. Por outro lado, a representatividade das limeiras ácidas e limoeiros, subindo de 6% em 2015 para 8% em 2018 e o mesmo também aconteceu com as áreas produtoras de tangerinas, que passaram de 2% para 3%. (FUNDECITRUS, 2018).

Os citros pertencem à família Rutaceae, subfamília Aurantioideae, com a maioria das espécies de importância econômica pertencendo ao gênero *Citrus* e algumas aos gêneros afins *Fortunella* e *Poncirus* (DAVIES; ALBRIGO, 1994). Os citros têm origem no continente asiático, exceto pomelo (*Citrus maxima* [Burm.] Merrill), nativo da Ilha de Barbados, no Caribe (DONADIO; MOURÃO FILHO; MOREIRA, 2005). Da Ásia os citros foram levados para outros continentes adaptando-se bem principalmente em regiões tropicais e subtropicais do globo (DAVIES; ALBRIGO, 1994). Estas espécies foram trazidas para o Brasil no início do

século XVI, pelos portugueses, onde se expandiram por todo o país (HASSE, 1987 apud DONADIO; MOURÃO FILHO; MOREIRA, 2005).

No Brasil, as espécies cítricas são cultivadas em diversas combinações de variedade de copa e porta-enxerto. As variedades copa de laranjeiras diferem entre si principalmente pela qualidade de seus frutos e épocas de floração e colheita (PIO et al., 2005), e as de porta-enxerto pelo vigor e produtividade das copas (SAEED; DODD; SOHAIL, 2010), tolerância a diversas condições de estresse abiótico, especialmente excesso ou déficit hídrico (TREEBY et al., 2007; ALLARIO et al., 2013; TRAMONTINI et al., 2013; ARGAMASILLA; GÓMEZ-CADENAS; ARBONA, 2014), e resistência ou tolerância a pragas e doenças, especialmente as que afetam as raízes (LAPOINTE; BOWMAN, 2002; AGUT et al., 2014). Neste ano de 2018, no parque citrícola, as principais variedades copa de laranjeiras são as precoces 'Hamlin', 'Westin', 'Rubi', 'Seleta', 'Pineapple' e 'Valência Americana', a de meia estação 'Pêra Rio', e as tardias 'Valência', 'Folha Murcha' e 'Natal' (FUNDECITRUS, 2018). Dentre os porta-enxertos, os mais utilizados são o citrumeleiro 'Swingle', o limoeiro 'Cravo' e as tangerineiras 'Sunki' e 'Cleópatra' (IAC, 2014).

## 1.2. Limeira ácida 'Tahiti'

A limeira ácida 'Tahiti', *Citrus latifolia* (Yu. Tanaka) Tanaka, a ser referida neste trabalho apenas como 'Tahiti', pertence a um grupo de citros chamado de limas ácidas. É também conhecida como limão 'Tahiti' no Brasil, 'limon Persa' no México, 'Bearss lime' na Califórnia, 'Tahiti acid lime' na Flórida (CRUZ et al., 1994) e como 'lima ácida de fruto grueso' na Espanha (GONZALEZ-MARTINEZ; GARCIA-LEGAZ, 1990). Dentre as espécies cítricas, a 'Tahiti' é a de maior precocidade, com produção significativa a partir do terceiro ano. Entretanto, somente a partir do quinto ano é que a planta começa a expressar rendimentos econômicos (BARBOZA, 2007). Os frutos são grandes, ovais, oblongos ou levemente elípticos e praticamente desprovidos de semente. A ausência de sementes ocorre pelo fato da 'Tahiti' ser um híbrido triploide ( $3n = 27$ ) com inviabilidade de pólen e óvulo formando, assim, frutos

partenocárpicos (MATTOS JUNIOR et al., 2005). Seus frutos são consumidos *in natura* como fruta fresca ou, assim como as laranjas, na forma de suco concentrado após processamento pela indústria. Da casca da ‘Tahiti’ também se extraem óleos essenciais e pectina com os resíduos usados na produção de ração animal (AMARO; CASER; NEGRI, 2003).

Embora não esteja definitivamente esclarecida a origem filogenética da ‘Tahiti’ acredita-se que seus parentais sejam uma lima ácida com semente (possivelmente a ‘Galego’ - *Citrus Aurantifolia* Swingle) e provavelmente uma cidra (*Citrus maxima* L.) ou um limão (*Citrus Limon* (L.) Burm. f.) (REECE; CHILDS, 1962; PINTO; SOUSA; RAMOS, 2004).

O Brasil destaca-se na produção mundial de limas ácidas e limões. Na safra de 2016/2017 produziu cerca de 1,2 mil toneladas de frutos (AGRIANUAL, 2018). No cinturão cintrícola, os pomares destas fruteiras ocupam, em 2018, 39 mil hectares, sendo 90% com ‘Tahiti’. As maiores concentrações de plantios de ‘Tahiti’ estão localizados no estado de São Paulo, onde o clima favorece a ocorrência de sucessivos fluxos de brotos reprodutivos, principalmente nas microrregiões de Bebedouro, Matão, Limeira e Votuporanga, regiões estas que também se destacam na produção de laranjas doce (VIEIRA, 1988; FUNDECITRUS, 2018). Segundo a CEAGESP (Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo) a ‘Tahiti’ ocupa o 8º lugar dentre todas as frutas comercializadas no estado de São Paulo (CEAGESP, 2018). Neste Estado, os clones mais plantados são o ‘IAC-5’ ou ‘Peruano’ e o ‘Quebra-galho’. O ‘Peruano’ apresenta boa produtividade, tolerância ao vírus da tristeza, ausência de fissuras na casca do tronco e ramos, e menor incidência de hipertrofia do cálice das flores (FIGUEIREDO, 1991). O clone ‘Quebra-galho’ é o mesmo ‘Peruano’, porém, infectado com o complexo de viróides dos citros (CVd), inclusive o da exocorte (CEVd), que confere à planta porte médio, maior número de floradas, favorecendo colheitas frequentes e ampliação do período de comercialização (PINTO; SOUSA; RAMOS, 2004). Por este motivo o ‘Quebra-galho’ é o mais encontrado nos pomares comerciais no estado de São Paulo. Diferente do que ocorre com as laranjeiras, poucos porta-enxertos são utilizados com a ‘Tahiti’, predominando o limoeiro ‘Cravo’, principalmente por este conferir à planta boa produtividade, resistência a déficit hídrico e tolerância ao vírus da tristeza. Sua maior

limitação é a suscetibilidade ao oomicetos *Phytophthora nicotianae* e *P. citrophthora*, agentes causais de podridões de colo e raíz, também conhecidas como gomose (FIGUEIREDO et al., 1996; TRUCOM, 2009).

### **1.3. *Phytophthora* spp.**

O gênero *Phytophthora*, do Grego Phyton = planta e phthora = destruidor (destruidor de plantas), pertence ao Reino Straminipila, filo Oomycota, classe Oomycetes, ordem Pythiales e família Pythiaceae (DICK, 2001). A presença de hifas diplóides e cenocíticas, parede celular composta principalmente de celulose e  $\beta$ -glucanas são as principais características que os distinguem dos fungos, reino Fungi (ALEXOPOULOS, et al., 1996; DICK, 2001). Em nível mundial, são citadas 12 espécies ocorrendo em citros. No Brasil *P. nicotianae* e *P. citrophthora* são os principais patógenos, sendo *P. Nicotianae* a espécie predominante (LARANJEIRA et al., 2005; FEICHTENBERGER et al., 2005). Estes organismos vivem no solo e atacam as plantas em condições de viveiro, telado e campo. Esta doença se manifesta de diferentes maneiras sendo as mais comuns podridão do pé, raízes e radículas, com exudação de goma em lesões de tronco e colo da planta, daí o termo gomose (FEICHTENBERGER et al., 2005). Esses danos resultam em sintomas reflexos na parte aérea caracterizados por clorose uniforme e progressiva, murcha e pequeno desenvolvimento e queda das folhas e, finalmente, morte da planta (FUNDECITRUS, 2017). O desenvolvimento da doença é mais intenso sob altas temperaturas e alta umidade do solo e ar (FEICHTENBERGER et al., 2005).

### **1.4. Huanglongbing (HLB)**

'Huanglongbing' é a doença mais destrutiva da cultura dos citros descrita na Ásia há mais de cem anos (DA GRAÇA, 1991, BOVÉ, 2006). A palavra provém do

chinês e significa "doença do ramo amarelo", em referência ao sintoma mais comum observado nas copas de plantas afetadas (VAN VUUREN, 1996). Fora da Ásia, doença similar em sintomas porém causada por uma outra espécie de *Liberibacter* foi descrita inicialmente na África do Sul, no ano de 1920, onde recebeu o nome de "Greening" (VAN DER MERWE; ANDERSEN, 1937; OBERHOLZER; VON STADEN; BASSON, 1965). Nas Américas, a doença foi descrita primeiramente no Brasil, em 2004 (COLETTA-FILHO et al., 2004), e no ano seguinte nos Estados Unidos da América (HALBERT, 2005). No continente americano o HLB já se espalhou por praticamente todos os países da região central e Caribe. Também está presente na Argentina, Paraguai e Colômbia (SENASA, 2009; SENAWE, 2013; ICA, 2015).

O HLB está associado a três espécies de bactérias de floema transmitidas por insetos e denominadas *Candidatus Liberibacter africanus* (Laf), *Ca. L. asiaticus* (Las) e *Ca. L. americanus* (Lam) (BOVÉ 2006; DAVIS et al., 2008; SECHLER et al., 2009). São bactérias Gram-negativas pertencentes à subdivisão alfa das proteobactérias e família Rhizobiaceae. Por não ser possível seu cultivo em meios artificiais, a identificação e classificação taxonômica se baseia na sequência de nucleotídeos da região 16S do DNA ribossomal (JAGOUEIX; BOVE; GARNIER, 1994). Recentemente, na Colômbia, foi descrita uma quarta espécie (*Ca. L. caribbeanus*), detectada apenas no inseto *Diaphorina citri* e sobre a qual pouco se sabe. Na África do Sul, também foram descritas recentemente variantes de Laf (quatro subespécies), restritas, aparentemente, às rutáceas nativas *Calodendrum capensis* (L. f.) Thunb. (GARNIER et al., 2000), *Clausena anisata* (Will) Hook, *Zanthoxylum capense* Thunb. e *Vepris lanceolata* (Lam.) G. Don (ROBERTS et al., 2015; PHAHLADIRA; VILJOEN; PIETERSEN, 2012). Além de *Liberibacter*, foram encontrados no Brasil e na China, em plantas de laranjeiras com sintomas de HLB, duas espécies de fitoplasmias limitadas ao floema de plantas com sintomas muito similares aos de HLB (TEIXEIRA et al., 2008; CHEN et al., 2009).

De todas as espécies e variantes de *Liberibacter* responsáveis pelo HLB, os mais conhecidos são Las, Lam (ambos presentes no Brasil) e Laf (restrita à África). Las é a espécie mais disseminada e a que mais danos têm causado. Esta espécie tolera altas temperaturas e atinge mais altos títulos em citros (LOPES et al. 2009, 2013 e 2017a). Lam e Laf, por sua vez, não toleram altas temperaturas. Ademais,

Lam é menos apta a multiplicar-se em citros quando comparada a Las. Provavelmente por estes motivos, em pouco tempo Las suplantou Lam no Brasil, hoje presente em menos de 0,5% das plantas afetadas. Menores títulos da bactéria na planta reduzem suas chances de ser transmitida pelo psílídeo (LOPES et al., 2013, 2017b).

### **1.5. Processo infeccioso e efeitos na planta**

Dentre as Liberibacters, Las é a mais conhecida. Sua aquisição na planta doente ocorre durante a alimentação do psílídeo em brotos de ramos de plantas doentes e sua transmissão acontece durante a alimentação na planta sadia (HUNG et al., 2004). A aquisição é mais eficiente quando o inseto se encontra no estágio de ninfa e a partir do 2º ínstar. A transmissão acontece a partir desta fase até a fase adulta (XU et al., 1988; HUNG et al., 2004; INOUE et al., 2009). No entanto, a taxa de aquisição por ninfas ou adultos também pode variar de acordo com a população bacteriana presente nos brotos (LOPES et al., 2017a). A bactéria também se multiplica no sistema circulatório do inseto, estando este apto a disseminá-la após um período de latência de 10 a 18 dias, (ROGERS; STANSLY, 2012) que perdura por toda sua vida (XU et al., 1988; HUNG et al., 2004), que pode variar de 80 a 90 dias dependendo das condições ambientais (AUBERT, 1987; YANG, et. al., 2006).

Logo após a infecção na planta, Las movimenta-se mais rapidamente para as partes que estão servindo de dreno dos fotoassimilados, ou seja, meristemas em desenvolvimento nas extremidades das raízes ou ramos (RAIOL JÚNIOR; CIFUENTES-ARENAS; LOPES, 2017). Las já foi detectada em todos os tecidos da planta (folhas, raízes, caules, flores, frutos, tegumento da semente) exceto no endocarpo (TATINENI et al., 2008), porém sua distribuição é irregular (TATINENI et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2008; FOLIMONOVA et al., 2009; LI; LEVY; HARTUNG, 2009), com os títulos variando com as estações do ano (LOPES et al., 2017; GOTTWALD et al., 2012). Durante a colonização da planta pela bactéria ocorre obstrução dos vasos do floema impedindo a translocação de substâncias

fotossintetizadas nos ramos infectados e dos ramos infectados para o restante da planta (BOVÉ, 2006; ETXEBERRIA et al., 2009; ACHOR et al., 2010). Essa obstrução induz a expressão de sintomas reflexos em folhas, frutos e raízes. Os primeiros sintomas visíveis ocorrem em folhas, que começam a amarelecer e tornar-se “mosqueadas” (sem delimitação clara entre a parte verde e amarela). Com o progresso da infecção surgem, nas folhas, sintomas similares aos induzidos por deficiência de zinco e ferro. Em ramos sintomáticos os frutos crescem de forma irregular e se tornam deformados, com sementes abortadas, menor produção de etileno, maiores níveis de ácido abscísico e indol-acético, maturação invertida (iniciando-se do pedúnculo) e, assim como as folhas, caem prematuramente (MCCLEAN; SCHWARZ, 1970, DA GRAÇA, 1991, DA GRAÇA et al., 2016). Além disso, há progressiva perda de massa de raízes, que ocorre antes mesmo dos sintomas serem observados na copa, limitando a capacidade de absorção de nutrientes (GRAHAM et al., 2013; JOHNSON et al., 2014).

Os variados genótipos de citros reagem diferentemente à infecção por *Las*. Apesar da bactéria conseguir se estabelecer e, geralmente, atingir altas concentrações em alguns genótipos, os sintomas foliares são menos intensos (FOLIMONOVA et al., 2009). Também há variação nos níveis de expressão de genes de defesa e na velocidade com que as mudanças anatômicas acontecem após a infecção (ALBRECHT; BOWMAN, 2012; FAN et al., 2013).

Assim como as laranjeiras, limeira ácida ‘Tahiti’ afetada por HLB tem sido encontrada tanto em áreas comerciais como em fundos de quintal em áreas urbanas. O rápido avanço da ocorrência de HLB em citros já era esperado visto não haver nenhuma espécie comercial de copa ou porta-enxerto resistente à doença (FUNDECITRUS, 2018).

## **1.6. Morfologia e bioecologia de *Diaphorina citri***

Embora experimentalmente todas as espécies de *Ca. Liberibacter* que infectam citros possam ser transmitidas por enxertia (LOPES; FRARE, 2008), a

disseminação no campo ocorre por insetos sugadores de floema. Las e Lam são transmitidas naturalmente pelo psílídeo *D. citri* (Hemiptera: Liviidae) e Laf pelo psílídeo *Trioza eritreae* (Hemiptera: Psillidae). Esta revisão se limitará a *D. citri*, o único vetor presente no Brasil.

*D. citri* oviposita preferencialmente em brotos novos e tenros com folhas em desenvolvimento e as margens ainda fechadas (CIFUENTES-ARENAS et al., 2018). Os ovos medem 0,3 mm de comprimento e são periformes. Quando recém ovipositados são brancos, mas tornam-se amarelos e finalmente alaranjados no momento da eclosão das ninfas. As ninfas passam por cinco ínstares com tamanho variando entre 0,25 e 1,25 mm. Sua coloração é amarela-alaranjada com manchas abdominais e longos filamentos na placa apical do abdômen. Os adultos medem de 2,8 a 3,2 mm de comprimento. Quando recém emergidos são brancos com as asas cristalinas e enrugadas, evoluindo para a cor preta no dorso e branco, esverdeado ou alaranjado no ventre. Distingue-se das outras espécies do gênero pelo padrão de manchas na asa anterior e pelo formato das genitálias (BLACKWELL, 2005; HALL, 2008). Aparentemente, há diferenças no tempo de emergência de adultos. Machos emergem antes das fêmeas, evidenciando protandria ou protogenia (CIFUENTES-ARENAS et al., 2018).

Os adultos podem se acasalar logo após a emergência. As fêmeas colocam ovos 8 h depois (PANDE, 1971). O acasalamento precoce nem sempre resulta em ovos férteis. O macho precisa de mais tempo para amadurecer sexualmente (WENNINGER; HALL, 2007). O tempo de desenvolvimento de ovo à fase adulta varia de acordo com a temperatura, sendo de 49,3 dias a 15°C a 14,1 dias à 28°C (TSAI e LIU, 2000).

### **1.7. Manejo do HLB**

Conforme mencionado, HLB é considerada a doença mais devastadora dos citros, isto porque se dissemina muito rápido dentro e entre pomares e propriedades. Os prejuízos diretos estão associados à rápida progressão da incidência de plantas



infectadas no pomar assim como de sintomas na copa, o que diminui notoriamente a quantidade e qualidade dos frutos (BALDWIN et al., 2010; BASSANEZI et al., 2011). Já os prejuízos indiretos estão associados aos altos custos do manejo ocasionando aumento considerável no custo total de produção (DA GRAÇA, 1991; BOVÉ, 2006; GOTTWALD, 2010).

Conter o avanço do HLB é tarefa árdua e custosa. Não existem variedades comerciais resistentes ou cura para a planta doente. Portanto, seu controle é baseado exclusivamente em ações preventivas, as quais requerem eliminação de plantas sintomáticas para reduzir fontes de inóculo (ação pouco aceita por muitos produtores) e constantes aplicações de inseticidas para reduzir a população do inseto vetor. Ademais, ações isoladas e pouco rigorosas têm pouca valia, razão pela qual a incidência da doença aumentou no parque citrícola brasileiro, de 0,6% em 2008 para 17% em 2017 (FUNDECITRUS, 2017), e praticamente dizimou a citricultura da Florida, hoje com a maioria das plantas afetadas pela doença.

Um dos principais desafios do manejo do HLB é a dificuldade de se proteger brotos novos do acesso de psíldeos, principalmente daqueles oriundos de plantas doentes de pomares abandonados ou de fundos de quintal, que não são alvo de controle. No cinturão citrícola a área total de pomares abandonados era de 6.050 hectares em 2018, sendo 4.401 de laranjeiras doce e 506 de limas ácida e limões (FUNDECITRUS, 2018). Para minimizar este problema, muitos produtores vêm fazendo um trabalho de conscientização de seus vizinhos, negociando a erradicação das plantas sintomáticas, ou solicitando autorização para pulverizá-las regularmente. Quando não permitem a eliminação dessas plantas ou a aplicação de produtos químicos, solicitam autorização para liberar *Tamarixia radiata*, uma pequena vespa que parasita as ninfas de *D. citri*, e usada no controle biológico deste inseto. Essas ações em conjunto têm reduzido a pressão de inóculo externo e auxiliado no controle da doença dentro das propriedades comerciais (MONTEIRO, 2013; MICHIGAMI, 2015).

## 2. REFERÊNCIAS

ACHOR, D. S.; ETXEBERRIA, E.; WANG, N.; FOLIMONOVA, S. Y.; CHUNG, K. R.; ALBRIGO, L. G. Sequence of anatomical symptom observations in citrus affected with huanglongbing disease. **Plant Pathology Journal**, v.9, n. 2, p. 56–64, 2010.

AGRIANUAL 2018: **anúário da agricultura brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, 2018. 233–262 p.

AGUT, B.; GAMIR, J.; JACAS, J. A.; HURTADO, M.; FLORS, V. Different metabolic and genetic responses in citrus may explain relative susceptibility to *Tetranychus urticae*. **Pest Management Science**, v. 70, n. 11, p. 1728–1741, 2014.

ALBRECHT, U.; BOWMAN, K. D. Transcriptional response of susceptible and tolerant citrus to infection with *Candidatus Liberibacter asiaticus*. **Plant Science**, v. 185–186, p. 118–130, 2012. Disponível em: < Doi: 10.1016/j.plantsci.2011.09.008 >.

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. B. **Introductory mycology**. 4. Ed. New York: J. Wiley, 1986. 869 p.

ALLARIO, T.; BRUMOS, J.; COLMENERO-FLORES, J. M.; IGLESIAS, D. J.; PINA, J. A.; NAVARRO, L.; TALON, M.; OLLITRAULT, P.; MORILLON, R. Tetraploid Rangpur lime rootstock increases drought tolerance via enhanced constitutive root abscisic acid production. **Plant, Cell and Environment**, v. 36, n. 4, p. 856–868, 2013.

AMARO, A. A.; CASER, D. V.; NEGRI, J. D. Tendências na Produção e Comércio de Limão. **Informações Econômicas**, v. 33, n. 4, p. 37-47, 2003.

ARGAMASILLA, R.; GÓMEZ-CADENAS, A.; ARBONA, V. Metabolic and regulatory responses in citrus rootstocks in response to adverse environmental conditions. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 33, n. 2, p. 169–180, 2014.

AUBERT, B. *Trioza erytrae* (Del-Guercio) and *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera, Psylloidea), the two vectors of citrus greening disease: biological aspects and possible control strategies. **Fruits**, v. 42, n. 3, p. 149–162, 1987.

BALDWIN, E.; PLOTTO, A.; MANTHEY, J.; MCCOLLUM, G.; BAI, J.; IREY, M.; CAMERON, R.; LUZIO, G. Effect of Liberibacter infection (Huanglongbing disease) of citrus on orange fruit physiology and fruit/fruit juice quality: chemical and physical analyses. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 2, p. 1247–62, 2010. Disponível em: <Doi: 10.1021/jf9031958>.

BARBOZA, C. R. A. **Evapotranspiração da lima ácida ‘Tahiti (*Citrus latifolia* Tan.) determinada por lisimetria de pesagem**. 2007. 66 p. Dissertação (Mestrado em Irrigação e Drenagem) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 2007.

BASSANEZI, R. B.; MONTESINO, L. H.; GASPAROTO, M. C. G.; BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. Yield loss caused by huanglongbing in different sweet orange cultivars in São Paulo, Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, v. 130, n. 4, p. 577–586, 2011.

BLACKWELL, P. *Diaphorina citri*. **EPPO Bulletin**, v.35, n.2, p.331-3, 2005.

BOVÉ, J. M. Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. **Plant Pathology Journal**, v. 88, n. 1, p. 7–37, 2006.

CEAGESP – COMPANHIA DE ENTREPÓSITOS E ARMAZÉNS GERAIS DE SÃO PAULO. **Classificação do limão (lima ácida ‘Tahiti’) *Citrus latifolia* Tanaka**. Programa brasileiro para a melhoria dos padrões comerciais e embalagens de hortigranjeiros. Disponível em:< <http://www.ceagesp.gov.br>>. Acesso em: 22/05/2018.

CHEN, J.; PU, X.; DENG, X.; LIU, S.; LI, H.; CIVEROLO, E. A phytoplasma related to ‘*Candidatus Phytoplasma asteri*’ detected in citrus showing huanglongbing (yellow shoot disease) symptoms in Guangdong, P. R. China. **Phytopathology**, v. 99, p. 236-242, 2009.

CIFUENTES-ARENAS, J. C.; GOES, A.; MIRANDA, M. P.; BEATTIE, G. A. C.; LOPES, S. A. Citrus flush shoot ontogeny modulates biotic potential of *Diaphorina citri*. **PLoS ONE**, v. 13, n. 1, 2018. Disponível em: <Doi: e0190563>.

COLETTA-FILHO, H. D., TARGON, M. L. P. N., TAKITA, M. A., DE NEGRI, J. D., POMPEU, J., MACHADO, M. A. First report of the causal agent of huanglongbing (“*Candidatus Liberibacter asiaticus*”) in Brazil. **Plant Disease**, v. 88, n. 12, p. 1382–1382, 2004.

CRUZ, M. A. G.; RINDERMANN, R. S.; GONZÁLEZ, A. B. **El limón persa en México**. 1ªed. Chapingo: Universidad Autónoma Chapingo, 1994. p. 202.

DA GRAÇA, J. V. Citrus Greening Disease. **Annual Review of Phytopathology**, v. 29, n. 1, p. 109–136, 1991.

DA GRAÇA, J. V.; DOUHAN, G. W.; HALBERT, S. E.; KEREMANE, M. L.; LEE, R. F.; VIDALAKIS, G.; ZHAO, H. Huanglongbing: An overview of a complex pathosystem ravaging the world’s citrus. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 58, n. 4, p. 373– 387, 2016.

DAVIES, F.; ALBRIGO, L. **Citrus**. Wallingford: CAB International, 254 p., 1994.

DAVIS, M. J.; MONDAL, S. N.; CHEN, H.; ROGERS, M. E.; BRLANSKY, R. H. Co-cultivation of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” with Actinobacteria from Citrus with Huanglongbing. **Plant Disease**, v. 92, n. 11, p.1547–1550, 2008.

DICK, M. W. **Straminipilous fungi**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2001. 670 p.

DONADIO, L. C.; MOURÃO FILHO, F. A. A.; MOREIRA, C. S. Centros de origem, distribuição geográfica das plantas cítricas e histórico da citricultura no Brasil. In: Mattos Júnior, D.; DE Negri, J.D.; Pio, R.M.; Pompeu Júnior, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico e Fundag, 2005. p.1-18.

ETXEBERRIA, E.; GONZALEZ, P.; ACHOR, D.; ALBRIGO, G. Anatomical distribution of abnormally high levels of starch in HLB-affected Valencia orange trees. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 74, n. 1, p.76–83, 2009.

FAN, J.; Chunxian, C.; Diann, S. A.; Ron, H. B.; Zheng, G.; Fred, G. G. Differential anatomical responses of tolerant and susceptible citrus species to the infection of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*”. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 83, p. 69–74, 2013. Disponível em: <Doi: org/10.1016/j.pmpp.2013.05.002>

FEICHTENBERGER, E.; BASSANEZI, R. B.; SPÓSITO, M. B.; BELASQUE JUNIOR, J. Doenças dos citros (Citrus spp.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. P. 239-269.

FIGUEIREDO et al. Comportamento de 11 porta-enxertos para ‘Tahiti’ na região de Bebedouro, SP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.18, n.1, 1996.

FIGUEIREDO, J.O. Variedades copas. In: ODY RODRIGUEZ; JORGINO POMPEU JUNIOR; FLAVIO PINTO VIEGAS eds. **Citricultura brasileira**, Campinas: Fundação Cargill, 1991. v.1, p.380-394.7

FOLIMONOVA, S. Y. S.; ROBERTSON, C. C. J.; GARNSEY, S. M.; GOWDA, S.; DAWSON, W. O. Examination of the responses of different genotypes of citrus to huanglongbing (citrus greening) under different conditions. **Phytopathology**, v. 99, n.12, p.1346– 1354, 2009. Disponível em: <Doi: 10.1094/PHYTO-99-12-1346.>

FUNDECITRUS 2017: **Tree inventory and orange production forecast for the 20172018 season of the São Paulo and west-southwest of Minas Gerais citrus belt**. Araraquara - SP, Brazil:Fundecitrus, 2017.

FUNDECITRUS 2018: **Inventário de árvores e estimativa da safra de laranja 2018/19 do cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro**. Araraquara - SP, Brazil:Fundecitrus, 2018.

GARNIER, M.; JAGOUEIX-EVEILLARD, S.; CRONJE, P. R.; LE ROUX, H. F.; BOVÉ, J. M. Genomic characterization of a *Liberibacter* present in an ornamental rutaceous tree, *Calodendrum capense*, in the Western Cape province of South Africa. Proposal of “*Candidatus Liberibacter africanus* subsp. *capensis*”.

**International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, n. 6, p. 2119–2125, 2000.

GONZALEZ-MARTINEZ, D.; GARCIA-LEGAZ VERA, M. F. **Lima ácida de fruto grueso**. Murcia: Consejería de Agricultura, Ganadería y Pesca, 1990. 16p.

GOTTWALD, T. R. Current Epidemiological Understanding on Citrus Huanglongbing. **Annual Review of Phytopathology**, v. 48, p. 119–139, 2010. Disponível em:< DOI:10.1146/annurev-phyto-073009-114418>.

GOTTWALD, T. R.; GRAHAM, J. H.; IREY, M. S.; MCCOLLUM, T. G.; WOOD, B. W. Inconsequential effect of nutritional treatments on huanglongbing control, fruit quality, bacterial titer and disease progress. **Crop Protection**, v. 36, p. 73-82, 2012. Disponível em: < doi.org/10.1016/j.cropro.2012.01.004>

GRAHAM, J. H.; JOHNSON, E. G.; GOTTWALD, T. R.; IREY, M. S. Presymptomatic fibrous root decline in citrus trees caused by huanglongbing and potential interaction with *Phytophthora* spp. **Plant Disease**, v. 97, n. 9, p. 1195–1199, 2013.

HALBERT, S. E. **The discovery of huanglongbing in Florida**. In 2nd International Citrus Canker and Huanglongbing Workshop, St. Paul, MN USA: Plant Management Network, p. 50, 2005.

HALL, D. G. Biology, **History and word status of *Diaphorina citri***. Fort Pierce: USDA-ARS, 2008. p. 11.

HUNG, T. H.; HUNG, S. C.; CHEN, C. N.; HSU, M. H.; SU, H. J. Detection by PCR of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the bacterium causing citrus huanglongbing in vector psyllids: application to the study of vector–pathogen relationships. **Plant Pathology**, v. 53, p. 96–102, 2004. Disponível em:<Doi:/10.1111/j.1365-3059.2004.00948.x >.

IAC. Instituto Biológico de Campinas, 2014. Disponível em: <<http://www.iac.sp.gov.br/>>. Acesso em: 2 abr. 2018.

ICA. Resolución No. 00002390. Bogotá, Colombia: Instituto Colombiano Agropecuario, 2015. Disponível em: <<http://www.ica.gov.co/getattachment/814e6823aa26-49ee-a2c0a814e2e61967/2015R2390.aspx>>.

INOUE, H.; OHNISHI, J.; ITO, T.; TOMIMURA, K.; MIYATA, S.; IWANAMI, T.; ASHIHARA, W. Enhanced proliferation and efficient transmission of *Candidatus Liberibacter asiaticus* by adult *Diaphorina citri* after acquisition feeding in the nymphal stage. **Annals of Applied Biology**, v. 155, n. 1, p. 29–36, 2009.

JAGOUÉIX, S.; BOVE, J. M.; GARNIER, M. The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the a subdivision of the proteobacteria. **Int J Syst Bacteriol**, n. 44, v. 3, p. 397–486, 1994.

JOHNSON, E. G.; WU, J.; BRIGHT, D. B.; GRAHAM, J. H. Association of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” root infection, but not phloem plugging with root loss on huanglongbing-affected trees prior to appearance of foliar symptoms. **Plant Pathology**, v. 63, p. 290–298, 2014.

LAPOINTE, S. L.; BOWMAN, K. D. Is there meaningful plant resistance to *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) in citrus rootstock germplasm? **Journal of Economic Entomology**, v. 95, n. 5, p. 1059-1065. 2002.

LARANJEIRA, F.F.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; AGUILAR VILDOSO, C.A.; COLLETA FILHO, H.D. Fungos procariotos e doenças abióticas. In: MATTOS JÚNIOR, D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; PONPEU JÚNIOR, J. **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico e Fundag. Centro APTA Citros Sylvio Moreira, p.509-566, 2005.

LI, W.; LEVY, L.; HARTUNG, J. S. Quantitative distribution of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” in citrus plants with citrus huanglongbing. **Phytopathology**, v. 99, n. 2, p.139–144, 2009.

LOPES, S. A.; FRARE, G. F. Graft Transmission and Cultivar Reaction of Citrus to “*Candidatus Liberibacter americanus*.” **Plant Disease**, v. 92, n. 1, p. 21–24, 2008.

LOPES, S. A.; FRARE, G. F.; BERTOLINI, E.; CAMBRA, M.; FERNANDES, N. G.; AYRES, A. J.; MARIN, D. R.; BOVÉ, J. M. Liberibacters associated with citrus Huanglongbing in Brazil: “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” is heat tolerant, “*Ca. L. americanus*” is heat sensitive. **Plant Disease**, v. 93, n. 3, p. 257–262, 2009.

LOPES, S. A.; LUIZ, F. Q. B. F.; OLIVEIRA, H. T.; CIFUENTES-ARENAS, J. C.; RAIOL-JUNIOR, L. L. Seasonal variation of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” titers in new shoots of citrus in distinct environments. **Plant Disease**, v. 101, n. 4, p. 583–590, 2017b.

LOPES, S. A.; LUIZ, F. Q. B. F.; MARTINS, E. C.; FASSINI, C. G.; SOUSA, M. C.; BARBOSA, J. C.; BEATTIE, G. A. C. “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” titers in citrus and acquisition rates by *Diaphorina citri* are decreased by higher temperature. **Plant Disease**, v. 97, n. 12, p. 1563–1570, 2013.

LOPES, S. et al. Additional evidence that the environment may be impacting HLB spread in Brazil. **Journal of Citrus Pathology**, v. 4, n. 1, p. 25, 2017a.

MATTOS JUNIOR, D.; DE NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JUNIOR, J. **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico e Fundag, 2005. p. 929.

McCLEAN, A. P. D., SCHWARTZ, R. E. Greening of blotchy-mottle disease of citrus. **Phytophylactica**, v. 2, n. 3, p. 177-194, 1970.

MICHIGAMI, F. A. B. **Benefícios das medidas de manejo adotadas interna e externamente a uma propriedade comercial de citros na redução do progresso do Huanglongbing**. Araraquara - SP, Brazil: Fundo de Defesa da Citricultura, 2015.

MONTEIRO, A. B. **Efeito de um pomar sem manejo de Huanglongbing sobre a ocorrência de *Diaphorina citri* e incidência de plantas doentes em uma área vizinha com manejo da doença**. Araraquara - SP, Brasil: Fundo de Defesa da Citricultura, 2013.

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G. **Anuário da citricultura 2017**. São Paulo: CitrusBR, 2017, p. 60.



OBERHOLZER, P. C. J.; VON STADEN, D. F. A.; BASSON, W. J. Greening disease of sweet orange in South Africa. Proceedings of the 3rd Conference of the IOCV. **Anais...**South Africa: 1965.

PANDE, Y. D. Biology of citrus psylla, *Diaphorina citri* Kuw. (Hemiptera: Psyllidae). **Israel Journal of Entomology**, v. 6, n. 2, p. 307–311, 1971.

PHAHLADIRA, M. N. B.; VILJOEN, R.; PIETERSEN, G. Widespread occurrence of “*Candidatus liberibacter africanus* subspecies *capensis*” in *Calodendrum capense* in South Africa. **European Journal of Plant Pathology**, v. 134, n. 1, p. 39–47, 2012.

PINTO, A. C. Q.; SOUSA, E. S.; RAMOS, V. H. V. **Tecnologia de produção e comercialização de Lima ácida tahiti, da goiaba e do maracujá- azedo para o cerrado**. Brasília. DF: Embrapa Informação e Tecnologia, 2004. 69 p.: il. – ( Documentos, 111).

PIO, R. M. et al. Variedades copas. In: MATTOS JÚNIOR, D. DE et al. (Eds.). . **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico e Fundag, 2005. p. 37–60.

RAIOL-JÚNIOR, L. L.; CIFUENTES-ARENAS, J. C.; LOPES, S. A. Speed of *Candidatus Liberibacter asiaticus* movement in citrus plants. **Journal of Citrus Pathology**, v. 4, n. 1, p. 45, 2017.

REECE, P. C.; CHILDS. J. F. L. Character differences among seedlings of the Persian lime. **Proceedings of Florida State Horticultural Society**, v. 75, p. 110-116, 1962.

ROBERTS, R.; STEENKAMP, E. T.; PIETERSEN, G. Three novel lineages of “*Candidatus Liberibacter africanus*” associated with native rutaceous hosts of *Trioza erytreae* in South Africa. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, n. 2, p. 723–731, 2015.

ROGERS, M.E.; STANSLY, P.A. **Biology and management of the Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama, in Florida Citrus**. Gainesville: University of Florida, (IFAS Extension, ENY-739), 2012. 6 p.

SAEED, M.; DODD, P. B.; SOHAIL, L. Anatomical studies of stems, roots and leaves of selected rootstock varieties in relation to their vigour. **Journal of Horticulture and Forestry**, v. 2, n. 4, p. 87–94, 2010.

SECHLER, A.; SCHUENZEL, E. L.; COOKE, P.; DONNUA, S.; THAVEECHAI, N.; POSTNIKOVA, E.; STONE, A. L.; SCHNEIDER, W. L.; DAMSTEEGT, V. D.; SCHAAD, N. W. Cultivation of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*”, “*Ca. L. africanus*”, and “*Ca. L. americanus*” associated with huanglongbing. **Phytopathology**, n. 99, v. 5, p.480–486, 2009.

SENASA. Resolución 959/2009: Declara la emergencia fitosanitaria con respecto al Huanglongbing (HLB) en todo el Territorio Nacional. Argentina: [s.n.]. Disponible em: <<http://www.senasa.gov.ar/contenido.php?to=n&in=1402&io=11771>>.

SENAVE. Resolución No 80 de 2013: “Por la cual se declara la emergência fitossanitária por la presencia de la plaga denominada huanglongbing (HLB) de los cítricos, en todo el territorio nacional”. Paraguay: [s.n.]. Disponible em: <<http://www.senave.gov.py/docs/resoluciones/senave/Res80-13.pdf>>.

TATINENI, S.; SAGARAM, U. S.; GOWDA, S.; ROBERTSON, C. J.; DAWSON, W. O.; IWANAMI, T. Planta Distribution of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” as Revealed by Polymerase Chain Reaction (PCR) and Real-Time PCR. **Phytopathology**, v. 98, p. 592–599, 2008.

TEIXEIRA, D. C.; SAILLARD, C.; COUTURE, C.; MARTINS, E. C.; WULFF, N. A.; EVEILLARD-JAGOUÉIX, S.; YAMAMOTO, P. T.; AYRES, A. J.; BOVÉ, J. M. Distribution and quantification of ‘*Candidatus Liberibacter americanus*’, agent of huanglongbing disease of citrus in São Paulo State, Brasil, in leaves of an affected sweet orange tree as determined by PCR. **Molecular and Cellular Probes**, v. 22, n. 3, p.139–150, 2008.

TRAMONTINI, S.; VITALI, M.; CENTIONI, L.; SCHUBERT, A.; LOVISOLO, C. Rootstock control of scion response to water stress in grapevine. **Environmental and Experimental Botany**, v. 93, p. 20–26, 2013.

TREEBY, M. T.; HENRIOD, R. E.; BEVINGTON, K. B.; MILNE, D. J.; STOREY, R.. Irrigation management and rootstock effects on navel orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] fruit quality. **Agricultural Water Management**, v. 91, n. 1–3, p. 24–32, 2007.

TRUCOM, C. **Doce Limão**. 2009. Disponível em: <[www.decelimao.com.br/limao-origem-variedades](http://www.decelimao.com.br/limao-origem-variedades)>.

TSAI, J. H.; LIU, Y. H. Biology of *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) on four host plants. **Journal of Economic Entomology**, v. 93, n. 6, p. 1721–1725, 2000.

VAN DER MERWE, A. J.; ANDERSEN, F. G. Chromium and manganese toxicity: Is it important in Transvaal citrus greening. **Farming South Africa**, v. 12, p.439–440, 1937.

VAN VUUREN, S. P. Huanglongbing. The oficial name for greening disease of citrus. Inligtingsbulletin Instituut vir Tropiese en Subtropiese Gewasse. **Nelspruit**, South Afric, p. 5-6, 1996.

VIEIRA, D. B. Fertirrigação e manejo de irrigação em citros. **Laranja**, v. 2, n. 9, p. 369-376, 1988.

WENNINGER, E. J.; HALL, D. G. Daily timing of mating and age at reproductive maturity in *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). **Florida Entomologist**, v. 90, n. 4, p. 715–722, 2007.

XU, C.; XIA, Y.; LI, K; KE, C. Further study of the transmtion of citrus huanglongbing by a psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 10., 1988, Riverside. **Proceedings...** Riverside: IOC, 1988. p. 178-181.

YANG, Y.; MINGDU H.; ANDREW, G.; BEATTIE, C.; YULU, X., OUYANG, G.; XIONG, J. Distribution, biology, ecology and control of the psyllid *Diaphorina citri* Kuwayama, a major pest of citrus: A status report for China. **International Journal of Pest Management**, v. 52, n. 4, p. 343–352, 2006.

## **CAPÍTULO 2- Reprodução e desenvolvimento de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) em limeira ácida 'Tahiti' (*Citrus latifolia* Tanaka)**

**RESUMO-** Objetivou-se com este estudo comparar o potencial reprodutivo de *Diaphorina citri* em brotações de limeira ácida 'Tahiti' e de laranjeira doce 'Valência'. Foram conduzidos dois experimentos em estufas com plantas de dois anos de idade tendo o limoeiro 'Cravo' como porta-enxerto. No primeiro avaliou-se a capacidade de oviposição, e no segundo sobrevivência ninfal. Para ambos, as plantas foram podadas 15 cm acima do ponto de enxertia e selecionou-se um broto tenro em pleno desenvolvimento. Os insetos foram criados em plantas de murta sadias. No primeiro experimento foram confinados, em dois ambientes (câmara climatizada e telado) dois casais virgens de psílideo, os quais foram mantidos por mais 48 horas após o início da oviposição. No segundo experimento, repetido duas vezes em telado, 30 ninfas recém-eclodidas foram transferidas para brotos. Na câmara climatizada, o número e viabilidade dos ovos foram maiores em 'Valência' (115,3 ovos e 84,93%, respectivamente) do que em 'Tahiti' (68,8 ovos e 64,84%). No telado, o hospedeiro influenciou apenas o número de ovos, resultando em 195 ovos em 'Valência' e 147 em 'Tahiti'. No segundo experimento, o período de desenvolvimento de ninfas mantidas em 'Tahiti' foi em média 5 dias mais longo do que ninfas mantidas em 'Valência' (19,20 contra 14,02 dias, respectivamente). Essa diferença foi ainda maior na repetição do experimento, com 28,30 e 20,10 dias, respectivamente. *D. citri* apresentou menor potencial reprodutivo em 'Tahiti' do que em 'Valência'.

**Palavras-chave:** citros, hospedeiro, huanglongbing, psílideo

## CHAPTER 2- Reproduction and development of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) on 'Tahiti' acid lime (*Citrus latifolia* Tanaka)

**ABSTRACT** – The objective of this study was to compare the suitability of 'Tahiti' acid lime and 'Valencia' sweet orange as reproduction host of *Diaphorina citri*. Two experiments were carried out in greenhouse with two-yr-old plants growing on 'Cravo' Rangpur lime as rootstock. In the first experiment, two unmated couples of adult insects, reared on healthy orange jasmine plants, were confined on one newly developed young shoot per plant of 'Tahiti' or 'Valencia', which were maintained in acclimatized room or greenhouse. After 48 hours from the onset of oviposition, the insects were removed and egg, eclosed nymphs, and adults were counted. In the second experiment, repeated twice in greenhouse, 30 newly hatched individual nymphs were transferred to the new shoot. In the acclimatized room the number and viability of eggs were higher on 'Valencia' (115.3 eggs and 84.93% survivals) than on 'Tahiti' (68.8 and 64.84%). In greenhouse, only the number of eggs was impacted by the host, which was higher in 'Valencia' (195) than in 'Tahiti' (147). Nymphs maintained on 'Tahiti' required on average additional 5 and 8.2 days (19.20 in the first and 28,30 in the second experiment) to become adults than those maintained on 'Valencia' (14.02 and 20,10). For a better assessment of role of the lower suitability of 'Tahiti' as a rearing place of *D. citri* and, consequently, for *Ca. L. asiaticus* dissemination, additional studies on new shoot dynamics are needed.

**Keywords:** citrus, host, huanglongbing, psyllid.

## 1. INTRODUÇÃO

*Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) é um inseto altamente prolífico sobre plantas cítricas e em plantas de murta (*Murraya* spp.). Por tolerar extremos de temperatura (HALL et al., 2013), encontra-se disseminado em praticamente todas as regiões citrícolas do Brasil e do mundo. No Brasil, o inseto foi reportado pela primeira vez em 1942, no Estado do Rio de Janeiro (COSTA LIMA, 1942). Este inseto sobrevive e se reproduz, preferencialmente, em brotos jovens onde alimenta-se da seiva do floema. Intensa alimentação de ninfas e adultos pode ocasionar má formação dos brotos, ocorrência de fungos oportunistas, morte da gema apical e queda de folhas e botões florais (TSAI et al., 2002, MICHAUD, 2004).

O maior dano de *D. citri* pode causar às plantas cítricas resulta, no entanto, da transmissão de *Candidatus* (*Ca.*) *Liberibacter asiaticus* (Las) e *Ca.* *Liberibacter americanus* (Lam), bactérias restritas ao floema e associadas ao huanglongbing (HLB), doença incurável, que afeta todas as espécies cítricas comerciais. Os processos de aquisição e transmissão da bactéria ocorrem em pouco tempo, promovendo rápida disseminação do patógeno nos pomares (ROISTACHER, 1991; ROGERS; STANSKY, 2012). Este aspecto, associado à rápida progressão dos sintomas na planta que levam a perda de massa radicular e da quantidade e qualidade dos frutos, e à necessidade de sua eliminação visando redução de fontes de inóculo, faz do HLB uma doença altamente destrutiva (HALBERT; MANJUNATH, 2004; BOVÉ, 2006; QURESHI; STANSKY, 2009; GRAFTON-CARDWELL; STELINSKI; STANSKY, 2013, HALL et al., 2013).

O HLB está presente nas principais áreas produtoras de citros do mundo (TIWARI et al., 2011). No Brasil, foi detectado primeiramente no Estado de São Paulo em 2004 e, em seguida, nos estados de Minas Gerais e Paraná (TEIXEIRA et al., 2008, PARRA et al., 2010, FUNDECITRUS, 2018). Estima-se que somente em São Paulo 46,2 milhões de laranjeiras doentes foram eliminadas até 2016 (CDA, 2018).

A lima ácida 'Tahiti' (*Citrus latifolia* Tanaka), conhecida popularmente como limão 'Tahiti', destaca-se como uma das frutas cítricas desprovidas de sementes de

maior valor comercial. A fruta é consumida *in natura* ou, assim como as laranjas, processada pela indústria para produção de suco concentrado, óleos essenciais e pectina (AMARO et al., 2003). Resíduos da casca também são empregados na produção de ração animal. O Brasil destaca-se na produção mundial de limas ácidas e limões, produzindo, na safra de 2016/2017, cerca de 1,2 mil toneladas de frutos (AGRIANUAL, 2018). A maior parte foi produzida no estado de São Paulo onde o clima favorece a ocorrência de sucessivos fluxos de brotos reprodutivos, resultando em diversas colheitas ao longo do ano (VIEIRA, 1988). Em 2018, a ‘Tahiti’ foi a 8ª fruta mais comercializada pela CEAGESP (CEAGESP, 2018).

Assim como as laranjeiras doce, a ‘Tahiti’ vem sendo afetada pelo HLB, tanto no campo, em áreas comerciais, como em fundos de quintal, em áreas urbanas. O rápido avanço da incidência de HLB em citros já era esperado visto não haver nenhuma espécie comercial de copa ou porta-enxerto resistente à doença (FUNDECITRUS, 2018). Em ‘Tahiti’, até o momento, não existem dados sobre a progressão da doença na copa, assim como a progressão na incidência de plantas sintomáticas.

Variação na capacidade das plantas em atrair, servir como fonte de alimento ou em propiciar a reprodução para *D. citri* têm sido observadas em outros citros e demais rutáceas. Tanto a oviposição como a viabilidade de ovos e ninfas foi menor na tangerineira ‘Cleópatra’ do que na laranjeira ‘Azeda’ (TSAGKARAKIS; ROGERS, 2010). Em outros estudos, maior número de ovos foi encontrado na tangerineira ‘Ponkan’ e laranjeira ‘Valência’ que na laranjeira ‘Hamlin’ (ALVES et al., 2014) e em murta e limoeiro ‘Cravo’ do que na tangerineira ‘Sunki’ (NAVA et al., 2007).

Embora de grande relevância econômica, não tem sido encontrado na literatura informações sobre a importância da limeira ácida ‘Tahiti’ como hospedeira de *D. citri*. O entendimento do potencial desta planta em reproduzir o inseto deverá contribuir para melhoria dos métodos de controle. Diante do exposto, objetivou-se com este estudo comparar o potencial reprodutivo e desenvolvimento de *D. citri* em brotações de limeira ácida ‘Tahiti’ e de laranjeira doce ‘Valência’.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos em telados anti-afídeos do Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (FCAV/UNESP), Câmpus de Jaboticabal, SP, localizada a 615 m de altitude, 21°14'05" latitude sul e 48°17'09" longitude oeste.

### 2.1. Preparo das plantas

Foram utilizadas plantas de dois anos de idade de laranjeiras doce 'Valência' (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) e de limeira ácida 'Tahiti' cultivar 'Quebra-Galho', ambas enxertadas em limoeiro 'Cravo' (*Citrus limonia* Osbeck). As plantas foram obtidas de viveiros comerciais certificados e mantidas em vasos de 5 L com substrato comercial Plantmax Citrus®. As plantas foram irrigadas de acordo com as necessidades e fertirrigadas quinzenalmente com 50 mL por planta de solução nutritiva de Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, MAP, MgSO<sub>4</sub>, Cu, Zn, Mn-EDTA, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, e FeEDTA, em concentrações de 1,35; 0,111; 0,4; 0,015; 0,01; 7,5x10<sup>-3</sup>; 4,5x10<sup>-4</sup>; 0,075 g/L, respectivamente.

Foram conduzidos dois experimentos. Em ambos, as plantas foram podadas cortando-se o caule 15 cm acima do ponto de enxertia, seguido de remoção das folhas mais próximas do ponto de poda. Após o surgimento de novos brotos, removeu-se a maioria e selecionou-se um que se apresentava em estágio inicial de alongamento com clara separação entre pecíolos e folhas. Brotos nestas condições são classificados como V2 ou V3 por Cifuentes-Arenas (2018) e os mais preferidos pelo inseto para oviposição e sobrevivência das ninfas (Cifuentes-Arenas *et al* 2018).



## 2.2. Criação dos insetos

Insetos livres de *Ca. Liberibacter* spp. foram criados em telado ( $24^{\circ}\text{C} \pm 2$ ,  $60\% \pm 5$  UR), seguindo os procedimentos descritos por Gómez-Torres (2009), confinando-se sobre brotações de plantas de murta (*Murraya exotica* L.) saudáveis, 50 indivíduos adultos oriundos de uma colônia original. Após a eclosão, ninfas recém eclodidas foram transferidas para novos brotos (experimento de sobrevivência ninfal) ou mantidas na planta original até completarem seu desenvolvimento (experimento de capacidade de oviposição). Visando se assegurar que os indivíduos não haviam ainda se acasalado, para os experimentos de capacidade de oviposição, os adultos foram separados por sexo a cada 24 h (WENNINGER; HALL, 2007) e postos em novas plantas de murta, onde permaneceram por mais 15 dias antes de serem utilizados nos experimentos.

## 2.3. Experimento de capacidade de oviposição

Dois casais virgens de *D. citri* foram confinados sobre broto V2 de 'Valência' e 'Tahiti', utilizando-se gaiolas de tule de 20 cm por 30 cm. Foram feitas observações diárias. Quando os primeiros ovos foram detectados, os insetos permaneceram confinados por mais 48 h, totalizando 72 h de oviposição. Após esse período, com o auxílio de um sugador plástico, os casais foram retirados e, utilizando uma lupa manual com lente de aumento de 30x, os ovos foram contados. O tempo de desenvolvimento dos insetos foi avaliado por meio de contagens diárias de ninfas recém eclodidas. A viabilidade dos ovos foi determinada por meio de contagens do número de ninfas eclodidas e número de ovos abortados. Nesse experimento, durante o confinamento dos casais, também se avaliou, a cada 12 h, a frequência em que os insetos se encontravam sobre o broto (frequência de ocorrência no broto), sobre outras partes da planta excluindo-se o broto, e parede do voal. Este experimento foi realizado duas vezes em dois ambientes distintos. O

primeiro foi conduzido no mês de agosto de 2016 em câmara climatizada ( $24 \pm 5$  °C,  $70 \pm 5\%$  UR, 14 h fotoperíodo PAR =  $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). O segundo foi realizado no mês de setembro de 2016 em telado ( $22 \pm 13$  °C,  $60\% \pm 17$  UR). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com dez repetições e de blocos casualizados, com três blocos e cinco parcelas por bloco, respectivamente.

#### **2.4. Experimentos de sobrevivência ninfal**

Após a eclosão, com o auxílio de pincel fino (no. 0) com ponta de pelos naturais e lupa manual de aumento 30x, um total de 30 ninfas recém-eclodidas foram transferidas individualmente para brotos V3 de 'Valência' e 'Tahiti' para que completassem seu ciclo de vida. Optou-se por este método de transferência de ninfas para se evitar ou minimizar a competição por alimento e espaço entre os indivíduos, evidenciado em observações anteriores. Foram realizadas observações diárias das plantas, a fim de avaliar o tempo de desenvolvimento e viabilidade das ninfas. Em cada avaliação eram contados os adultos emergidos. Esse experimento foi repetido duas vezes em ambiente de telado, com dados de temperatura e umidade relativa do ar registrados por meio de data logger (Instrutherm, São Paulo, SP). O primeiro experimento foi realizado nos meses de janeiro e fevereiro de 2017 ( $26^\circ\text{C} \pm 10$ ,  $75\% \pm 12$  UR) e o segundo nos meses de abril e maio de 2017 ( $22^\circ\text{C} \pm 10$ ,  $80\% \pm 15$  UR). O delineamento experimental foi de blocos casualizados com quatro blocos no primeiro e três no segundo experimento, ambos com cinco parcelas.

#### **2.5. Análise estatística**

Os dados de viabilidade de ovos e ninfas foram transformados seguindo-se a fórmula  $y' = \text{asin}(\sqrt{y/100})$ , em que  $y$  = dado original e  $y'$  = dado transformado

(ZAR, 2010). A porcentagem de adultos emergidos foi analisada pelo teste Chi-quadrado. Os dados de presença do inseto sobre o broto, tempo para início de oviposição, número de ovos, e de duração do período de ovos e de ninfas foram comparados pelo teste  $t$  para amostras independentes, ou pelo teste  $t$  de Welch quando as variâncias foram desiguais (WELCH, 1947). Todos os testes foram analisados a nível de 5% de probabilidade. Foi realizada análise de regressão logística  $[y = (e^{\beta_0 + \beta_1 * dia}) / (1 + e^{\beta_0 + \beta_1 * dia})]$  para se descrever a emergência dos adultos (proporção acumulada) criados sobre plantas de 'Valência' e 'Tahiti'.

### **3. RESULTADOS**

#### **3.1. Experimento de capacidade de oviposição**

No primeiro experimento, realizado na câmara climatizada, o hospedeiro influenciou o número e a viabilidade dos ovos, sendo ambos os parâmetros maiores em 'Valência' (115,3 ovos e 84,9% viáveis, respectivamente) do que em 'Tahiti' (68,8 ovos e 64,8% viáveis). Não houve influência do hospedeiro no tempo necessário para início de oviposição e na duração do período de ovo (Tabela 1), assim como na frequência de ocorrência do inseto sobre o broto (Fig. 1).

Tabela 1. Média ( $\pm$  erro padrão) da presença do inseto no broto, tempo para início de oviposição, número e viabilidade de ovos e duração do período de ovo de *Diaphorina citri* em brotos de laranjeira doce 'Valência' e limeira ácida 'Tahiti'.

Planta hospedeira	Tempo para início de oviposição (dias) <sup>1</sup>	Número de ovos <sup>1</sup>	Viabilidade de ovo (%) <sup>2</sup>	Duração do período de ovo (dias) <sup>1</sup>
<b>Experimento 1 (Câmara Climatizada, n: 10)</b>				
'Tahiti'	4,7 $\pm$ 0,65	68,8 $\pm$ 13,50	64,8 $\pm$ 6,47	6,2 $\pm$ 0,20
'Valência'	4,1 $\pm$ 0,31	115,3 $\pm$ 17,09	84,9 $\pm$ 4,15	6,3 $\pm$ 0,21
<i>p</i>	0,42 <sup>ns</sup>	0,04*	0,03*	0,74 <sup>ns</sup>
<i>t</i>	0,83	-2,13	-2,39	-0,34
<b>Experimento 2 (Telado, n:15)</b>				
'Tahiti'	3,0 $\pm$ 0,25	147,0 $\pm$ 13,27	92,4 $\pm$ 2,64	4,8 $\pm$ 0,16
'Valência'	3,6 $\pm$ 0,28	195,0 $\pm$ 11,12	96,7 $\pm$ 1,25	4,9 $\pm$ 0,21
<i>p</i>	0,12 <sup>ns</sup>	0,01*	0,23 <sup>ns</sup>	0,57 <sup>ns</sup>
<i>t</i>	-1,60	-2,77	-1,23	-0,57

<sup>1</sup> Os dados amostrados foram os valores reais;

<sup>2</sup> Os valores foram transformados seguindo a fórmula  $y' = \text{asin}(\sqrt{y/100})$ , em que  $y$  = dado original e  $y'$  = dado transformado (Zar 2010);

<sup>ns</sup>: não significativo; \*significativo a 5% de probabilidade;

n: número de repetições.

No segundo experimento, realizado no telado, o hospedeiro influenciou apenas a capacidade de oviposição do inseto, o qual foi maior em 'Valência' (195,0 ovos) do que em 'Tahiti' (147,0 ovos). No ambiente de telado, as condições foram aparentemente mais favoráveis à reprodução do inseto. Em ambos os hospedeiros, tanto o tempo necessário para início de oviposição, como a duração do período de ovo foram menores no telado. Por outro lado, neste ambiente foi observado maior número de ovos que também apresentaram maior viabilidade (Tabela 1), além de também ter sido maior a frequência de ocorrência do inseto sobre o broto. Quando se compara hospedeiros, análise estatística indicou não haver influência dos hospedeiros quanto a preferência dos insetos pelo broto, nos dois ambientes (Fig. 1).

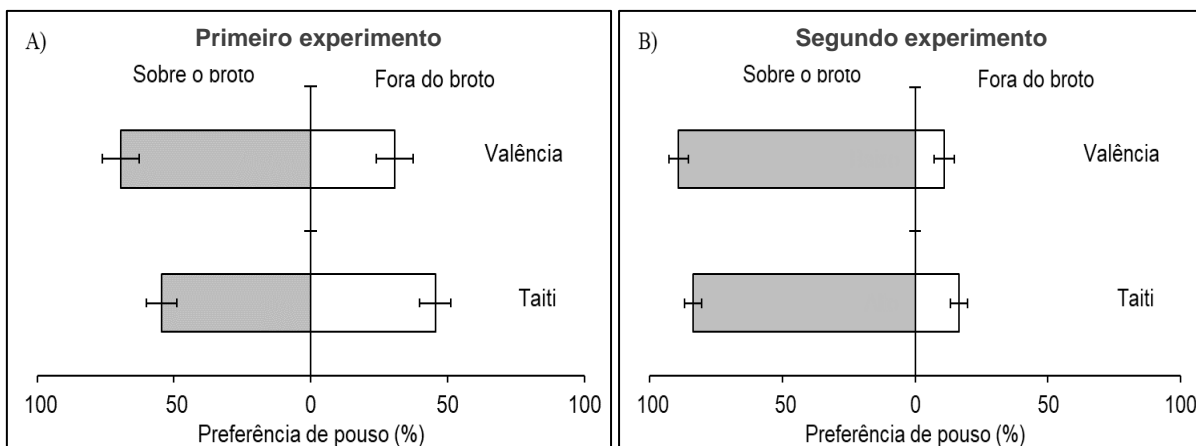


Figura 1. Frequência de ocorrência de *Diaphorina citri* sobre o broto V2 de limeira ácida 'Tahiti' e laranjeira 'Valência'. A= câmara climatizada ( $p= 0,092^{ns}$ ); B= telado ( $p= 0,28^{ns}$ ). <sup>ns</sup>: não significativo.

### 3.2. Experimentos de sobrevivência ninfal

A limeira ácida 'Tahiti' influenciou negativamente no desenvolvimento de *D. citri*, causando prolongamento da duração da fase de ninfa (Fig. 2). No primeiro experimento, ninfas mantidas em brotos de 'Tahiti' (média de 19,8 dias) demoraram 5 dias a mais para completar seu desenvolvimento do que ninfas mantidas em brotos de 'Valência' (14,0 dias). Essa diferença foi ainda maior no segundo experimento, com duração de 28,3 dias em 'Tahiti' e 20,1 em 'Valência' (Tabela 2).

Quanto à sobrevivência, 31% e 21% das ninfas tornaram-se adultos no primeiro e segundo experimento, quando mantidos em brotos de 'Tahiti', respectivamente. Por outro lado, 60% das ninfas sobreviveram e atingiram a fase adulta quando confinados em brotos de 'Valência', em ambos experimentos. Proporções estatisticamente similares de machos e fêmeas foram encontradas na população de insetos sobreviventes (Tabela 2).

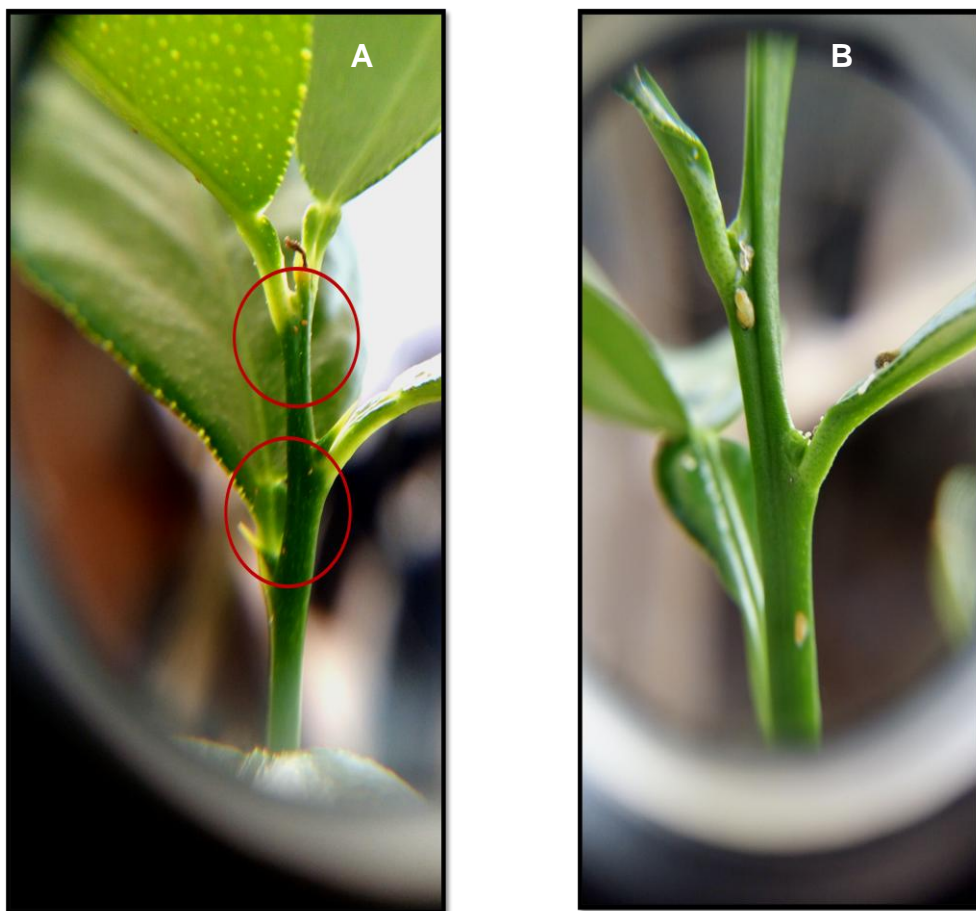


Figura 2: Influência do hospedeiro no desenvolvimento de ninfas de *Diaphorina citri* quando mantidas em brotos V3 de limeira ácida 'Tahiti' (A) e laranjeira 'Valência' (B), 13 dias após implantação do experimento.

Tabela 2. Média ( $\pm$  erro padrão) do período ninfal, viabilidade de ninfas e porcentagem de emergência de adultos de *Diaphorina citri* em brotos de laranjeira ‘Valência’ e limeira ácida ‘Tahiti’.

Hospedeiro	Período ninfal (dias) <sup>1</sup>	Viabilidade de ninfas (%) <sup>2</sup>	Emergência de machos (%)	Emergência de fêmeas (%)
<b>Experimento 1 (n:20)</b>				
‘Tahiti’	19,8 $\pm$ 0,88	31,2 $\pm$ 3,51	55,6	44,4
‘Valência’	14,0 $\pm$ 0,17	64,3 $\pm$ 3,22	49,5	50,5
<i>p</i>	2,40x10 <sup>-06</sup> *	6,21x10 <sup>-8</sup> *	0,1977 <sup>ns</sup>	
<i>t</i>	-6,40	-6,70		
<b>Experimento 2 (n:15)</b>				
‘Tahiti’	28,3 $\pm$ 2,14	21,7 $\pm$ 4,79	53,8	46,1
‘Valência’	20,1 $\pm$ 0,64	65,0 $\pm$ 2,90	55,4	44,6
<i>p</i>	0,004*	4,03x10 <sup>-7</sup> *	0,83 <sup>ns</sup>	
<i>t</i>	-3,67	-7,72		

<sup>1</sup> Os dados amostrados foram os valores reais;

<sup>2</sup> Os valores foram transformados seguindo a fórmula  $y' = \text{asin}(\sqrt{y/100})$ , em que  $y$ = dado original e  $y'$ = dado transformado (Zar 2010);

<sup>3</sup> porcentagem de machos e fêmeas avaliada pelo teste Chi-quadrado ( $X^2$ );

<sup>ns</sup>: não significativo; \*significativo a 5% de probabilidade;

n: número de repetições.

Em ‘Tahiti’ houve atraso no período de desenvolvimento das ninfas quando comparados com insetos mantidos em ‘Valência’ (Tabela 3; Fig. 3).

Tabela 3. Parâmetros da regressão logística feita sobre a frequência de emergência de adultos de *Diaphorina citri* que completaram seu ciclo de vida em plantas de laranjeira 'Valência' e limeira ácida 'Tahiti'.

Hospedeiro	Parâmetros da regressão							
	$\beta_0$	EP <sup>x</sup>	$\beta_1$	EP	Desv. (%) <sup>y</sup>	$\chi^2$	GL <sup>z</sup>	p
<b>Experimento 1</b>								
'Valência'	-2,86	0,10	0,79	0,02	97,38	4064,39	1	<0,0001
'Tahiti'	-2,64	0,10	0,32	0,01	89,21	1093,68	1	<0,0001
<b>Experimento 2</b>								
'Valência'	-2,75	0,11	0,52	0,02	98,55	3028,85	1	<0,0001
'Tahiti'	-2,11	0,13	0,20	0,01	85,66	589,29	1	<0,0001

<sup>x</sup> erro padrão; <sup>y</sup> percentagem dos desvios representados no modelo; <sup>z</sup> graus de liberdade.

No primeiro experimento (Fig. 3 A), para que todos os adultos emergissem foram necessários 15 dias em 'Tahiti' e 9 em 'Valência'. Esse comportamento se repetiu no segundo experimento (Fig. 3 B). Foram necessários 24 dias em 'Tahiti' e 14 em 'Valência'.

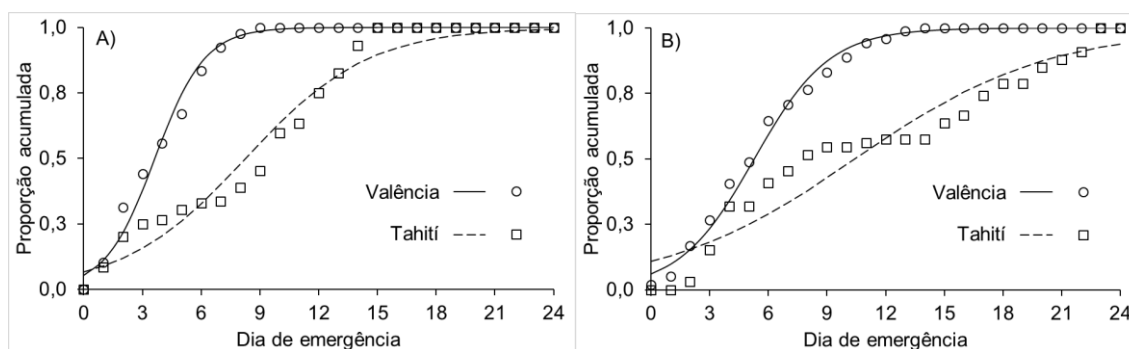


Figura 3. Emergência acumulada de adultos de *Diaphorina citri* alimentados em brotos de laranjeira doce 'Valência' e limeira ácida 'Tahiti' sob condição de telado. A= Bioensaio 1 ('Tahiti' = 187 e 'Valência' = 386 adultos); B= Bioensaio 2 ('Tahiti' = 97 e 'Valência' = 292 adultos). As linhas contínuas e pontilhadas correspondem ao modelo logístico ajustado, ver tabela 3 para os parâmetros).



#### 4. DISCUSSÃO

Houve influência do hospedeiro na reprodução e desenvolvimento de *D. citri*, com menores taxas verificadas em limeira ácida 'Tahiti'. No telado, que apresentou maior variabilidade em termos de temperatura e umidade relativa e, portanto, mais parecido com as condições naturais às quais o inseto é exposto, os períodos necessários para início de oviposição e eclosão das ninfas foram menores, além de resultar em maior quantidade e viabilidade dos ovos. Maior taxa de reprodução em ambientes mais oscilantes já foi relatado para outros insetos (GULLAN; CRANSTON, 2012). Para *Edessa mediatubunda* (F.), maiores taxas de fertilidade foram observadas sob condições ambientais não controladas (GONÇALVES; ALMEIDA; MOTA, 2008). Impacto da temperatura na oviposição e viabilidade de ovos de *D. citri* também já havia sido reportado por Liu e Tsai (2000) e Nava et al. (2007), que observaram aumento dessas variáveis com o acréscimo da temperatura.

Insetos sugadores são diretamente influenciados pela fonte de luz à qual estão expostos (GULLAN; CRANSTON, 2012), o que pode ser uma segunda causa das diferenças observadas entre os ambientes utilizados, visto que lâmpadas fluorescentes e incandescentes (usadas na sala climatizada) possuem menor radiação fotossinteticamente ativa (PAR) que a radiação solar natural incidente, mesmo filtrada pelo telado (CIFUENTES-ARENAS et al., 2017). Já se sabe que a quantidade de luz refletida pela planta indica ao inseto a qualidade de seu hospedeiro (BOIÇA-JÚNIOR et al., 2016), conforme observado para o pulgão *Sitobion avenae* (ALKHEDIR et al., 2010). Neste caso, maiores intensidades de luz resultaram em maiores taxas de fecundidade e de peso fresco do afídeo.

Variação entre espécies cítricas quanto à capacidade de multiplicar *D. citri* vêm sendo relatada na literatura há tempos. Catling (1970) e Nava et al. (2007) encontraram maior número de ovos em murta (348,4) e limoeiro 'Cravo' (265,1) do que na tangerineira 'Sunki' (166,2). Tsagkarakis e Rogers (2010) encontraram maior número de ovos na laranjeira 'Azeda' (80,2) do que na tangerineira 'Cleópatra' (24,1), e Alves et al. (2014) encontraram maior número de ovos em murta, tangerineira 'Ponkan' e laranjeira 'Valência' do que na laranjeira 'Hamlin'.

Nos dois experimentos aqui relatados, plantas de 'Tahiti' proporcionaram prolongamento da fase de ninfa de *D. citri* e menor número de ninfas tornaram-se adultos. Ademais, em brotos de 'Tahiti', o período de emergência dos adultos foi maior e irregular do que em brotos de 'Valência'. Esse prolongamento do período em que o inseto permanece na fase de ninfa torna-o mais suscetível à ação de inseticidas, independente do modo de ação, sistêmico ou contato. Outros estudos também mostram diferenças na viabilidade ninfal de *D. citri* quando criada em diferentes hospedeiros. Maior viabilidade ocorreu nos insetos que se alimentaram em *C. paradisi* do que em *C. aurantium* (LIU; TSAI, 2000). Nava et al. (2007) observaram que maior viabilidade do ciclo biológico dos insetos que se alimentaram em murta e limoeiro 'Cravo' do que em *C. Sunki*.

Diferenças entre hospedeiros também podem estar relacionadas à qualidade nutricional da seiva (TECK; FATIMAH; BEATTIE, 2011) ou presença de compostos tóxicos (VENDRAMIM et al., 2012) características intrínsecas de cada espécie vegetal. Quanto maiores os teores de aminoácidos disponíveis na seiva do floema de *Acer pseudoplatanus*, maior foi o tamanho e nível de fertilidade do pulgão *Drepanosiphum platanoidis* (Schr.) (AWMACK; LEATHER, 2002). Para *D. citri*, Souza et al. (2012) destacaram o nitrato. Maiores teores deste composto foram encontrados na seiva da variedade 'Hamlin' do que na de 'Valência', impactando negativamente o tempo de desenvolvimento do inseto.

A taxa de consumo e qualidade do alimento ingerido pelos insetos também impactam seu desenvolvimento e reprodução (PARRA; PANIZZI; HADDAD, 2009), o que pode refletir até na próxima geração do inseto (PANIZZI; PARRA, 2009). Baixa nutrição pode resultar na morte de imaturos, deformação e menores taxas de crescimento e fecundidade. Neste estudo, a 'Valência' apresentou, no geral, potencial reprodutivo de *D. citri* 3,5 vezes maior do que a 'Tahiti'.

Apesar de não haver diferenças significativas nas proporções de machos e fêmeas emergidos na população de insetos sobreviventes, houve tendência de os machos emergirem antes que as fêmeas, evidenciando protandria ou protogenia (CIFUENTES-ARENAS et al., 2018).

Não foi possível determinar no presente estudo as causas das diferenças entre as espécies cítricas quanto a reprodução e desenvolvimento de *D. citri*. No

entanto, independentemente das causas, as diferenças podem ter consequências epidemiológicas em relação à disseminação do HLB.

No presente estudo, foi avaliado o potencial reprodutivo de *D. citri* alimentada em plantas saudias, o que pode ser diferente dos insetos alimentados em plantas doentes. Além disso, avaliaram-se brotos individuais de um único fluxo vegetativo. Já é sabido que plantas de 'Tahiti' apresentam ao longo do ano maior número de fluxos vegetativos que plantas de 'Valência' (VIEIRA, 1988). Se nenhuma ação de controle do inseto é tomada, maior número de fluxos pode oferecer ao inseto, ao longo do tempo, oportunidade de completar maior número de gerações em 'Tahiti' do que em 'Valência' e, conseqüentemente, compensar o menor potencial reprodutivo nesta limeira.

Em suma, *D. citri* apresentou menor potencial reprodutivo em brotos de 'Tahiti' do que em 'Valência'. Entretanto, melhor apreciação da importância deste achado sobre a disseminação do HLB só será obtida com estudos que envolvam também dinâmica de brotações.

## **5. AGRADECIMENTOS**

Agradecemos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

## 6. REFERÊNCIAS

AGRIANUAL. **Citros**. In Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo: FNP, Consultoria e Comércio, 2018. p. 233–262.

ALKHEDIR, H.; KY, P. K.; VIDAL, S. Effect of light intensity on colour morph formation and performance of the grain aphid *Sitobion avenae* F. (Homoptera: Aphididae). **Journal of Insect Physiology**, v. 56, n. 12, p. 1999-2005, 2010.

ALVES, G. R.; DINIZ, A.; PARRA, J. Biology of the Huanglongbing vector *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) on different host plants. **Journal of Economic Entomology**, v. 107, n. 2, p. 691–696, 2014.

AMARO, A. A.; CASER, D. V.; NEGRI, J. D. Tendências na Produção e Comércio de Limão. **Informações Econômicas**, v. 33, n. 4, p. 37-47, 2003.

AWMACK, C. S.; LEATHER, S. R. Host plant quality and fecundity in herbivorous insects. **Annual Review Entomology**, v. 47, p. 817-44, 2002.

BOIÇA-JUNIOR, A. L.; SOUZA, B. H. S.; RIBEIRO, Z. A.; EDUARDO, W. I.; NOGUEIRA, L.; DI BELLO, M. M. Resistência de plantas: explorando o potencial de defesa aos insetos, p. 73-94. In Castilho RC, Busoli AC, Andrade DJ, Rossi GD, Di Bello MM, Brenha JAM Multipress: **Tópicos em entomologia agrícola – IX**. Jaboticabal, 2016, 310p.

BOVÉ, J. M. Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. **Journal of Plant Pathology**, v. 88, n. 1, p. 7–37, 2006.

CATLING, H. D. Distribution of the psyllid vectors of citrus greening disease, with notes on the biology and bionomics of *Diaphorina citri*. **FAO Plant Protection Bulletin**, v. 18, n. 1, p. 8–15, 1970.

CEAGESP – COMPAINHA DE ENTREPÓSITOS E ARMAZÉNS GERAIS DE SÃO PAULO. **Classificação do limão (lima ácida ‘Tahiti’) *Citrus latifolia* Tanaka.** Programa brasileiro para a melhoria dos padrões comerciais e embalagens de hortigranjeiros. Disponível em:< <http://www.ceagesp.gov.br>>. Acesso em: 22/05/2018.

CDA (2018) Compilação dos dados dos relatórios semestrais do greening enviados para a coordenadoria de Defesa Agropecuária do Estado de São Paulo. In Dados da Citricultura Paulista [Internet]. [visualizado 26 de janeiro]. < <https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/www/gdsv/index.php?action=dadosCitriculturaPaulista>>

CIFUENTES-ARENAS, J. C.; GOES, A.; MIRANDA, M. P.; BEATTIE, G. A. C.; LOPES, S. A. Citrus flush shoot ontogeny modulates biotic potential of *Diaphorina citri*. **PLoS ONE**, v. 13, n. 1, e0190563, 2018.

CIFUENTES-ARENAS, J. C.; RAIOL JÚNIOR, L. L.; LOPES, S. A. Growing degree-day model for assessing flush shoot ontogeny in citrus. **Journal of Citrus Pathology**, v. 4, n. 1, p. 7, 2017.

COSTA-LIMA, A. M. Insetos do Brasil. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Agronomia v. 3, 1942, 327 p.

FUNDECITRUS 2017: **Tree inventory and orange production forecast for the 2017-2018 season of the São Paulo and west-southwest of Minas Gerais citrus belt.** Araraquara - SP, Brazil: Fundecitrus, 2017.

FUNDECITRUS 2018: **Inventário de árvores e estimativa da safra de laranja 2018/19 do cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro.** Araraquara - SP, Brazil:Fundecitrus, 2018.

GOMES-TORRES, M. L. (2009) Estudos bioecológicos de *Tamarixia radiata* (Waterston, 1922) (Hymenoptera: Eulophidae) para o controle de *Diaphorina citri* Kuwayama, 1907 (Hemiptera: Psyllidae). 138f. Tese (Doutorado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

GONÇALVES, L.; ALMEIDA, F. S.; MOTA, F. M. Effects of temperature on the development and reproduction of *Edessa meditabunda* (Fabricius, 1794) (Hemiptera: Pentatomidae). **Acta Biológica Paranaense**, v. 37, n. 1, 2, p. 111-121, 2008.

GRAFTON-CARDWELL, E. E.; STELINSKI, L. L.; STANSLY, P. A. Biology and management of asian citrus psyllid, vector of the huanglongbing pathogens. **Annual Review of Entomology**, v. 58, n. 1, p. 413–432, 2013.

GULLAN, P. J.; CRANSTON, P. S. **Os insetos: um resumo de entomologia**. 4 ed. São Paulo: Roca, 2012, 480 p.

HALBERT, S. E.; MANJUNATH, K. L. Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: A literature review and assessment of risk in Florida. **Florida Entomologist**, v. 87, n. 3, p. 330–353, 2004.

HALL, D. G.; RICHARDSON, M. L.; AMMAR, E. D.; HALBERT, S. E. Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, vector of citrus huanglongbing disease. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 146, n. 2, p. 207–223, 2013.

LIU, Y. H.; TSAI, J. H. Effects of temperature on biology and life table parameters of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae). **Annals of Applied Biology**, v. 137, n. 3, p. 201–206, 2000.

MICHAUD, J. P. Natural mortality of Asian citrus psyllid (Homoptera: Psyllidae) in central Florida. **Biological Control**, v. 29, n. 2, p. 260–269, 2004.

NAVA, D. E.; TORRES, M. L. G.; RODRIGUES, M. D. L.; BENTO, J. M. S.; PARRA, J. R. P. Biology of *Diaphorina citri* (Hem., Psyllidae) on different hosts and at different temperatures. **Journal of Applied Entomology**, v. 131, n. 9–10, p. 709–715, 2007.

PANIZZI, A. R.; PARRA, J. R. P. A bioecologia e nutrição de insetos como base para o manejo integrado de pragas, p. 1107-1139 In Panizzi AR, Parra JRP (Eds.) Bioecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas. Brasília, Embrapa Informação Tecnológica, 2009

PARRA, J. R. P.; LOPES, J. R. S.; GOMEZ-TORRES, M. L.; NAVA, D. E.; PAIVA, P. E. B. Bioecologia do vetor *Diaphorina citri* e transmissão de bactérias associadas ao Huanglongbing. **Citrus Research and Technology**, v. 31, n. 1, p. 37- 51, 2010.

PARRA, J. R. P.; PANIZZI, A. R.; HADDAD, M. L. Índices nutricionais para medir consume e utilização de alimentos por insetos, p. 37-91. In: Panizzi AR, Parra JRP (Eds.) **Bioecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas**. Brasília, Embrapa Informação Tecnológica, 2009.

QURESHI, J. A.; STANSLY, P. A. Exclusion techniques reveal significant biotic mortality suffered by Asian citrus psyllid *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) populations in Florida citrus. **Biological Control**, v. 50, n. 2, p. 129–136, 2009.

ROGERS, M. E.; STANSLY, P. A. **Biology and management of the Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama, in Florida Citrus**. Gainesville: University of Florida, (IFAS Extension, ENY-739), 2012.

ROISTACHER, C. N. Techniques for biological detection of specific citrus graft transmissible diseases, pages 35-45 (Greening). FAO, Rome. 1991.

SOUZA, T. R.; BÔAS, R. L. V.; QUAGGIO, J. A.; SALOMÃO, L. C. Nutrientes na seiva de plantas cítricas fertirrigadas. **Revista Brasileira**, v. 34, n. 2, p. 482-492, 2012.

TECK, S.; FATIMAH, A.; BEATTIE, A. Influence of host plant species and flush growth stage on the asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama. **American Journal of Agricultural and Biological Sciences**, v. 6, p. 536-543, 2011.

TEIXEIRA, D. C.; SAILLARD, C.; COUTURE, C.; MARTINS, E.; WULFF, N. EVEILLARJAGOUÉIX, S. YAMAMOTO, P. T.; AYRES, A.; BOVE, J. Distribution and quantification of *Candidatus Liberibacter americanus*, agent of huanglongbing disease of citrus in São Paulo State, Brasil, in leaves of an affected sweet orange tree as determined by PCR. **Mol Cell Probe**, v. 22, p. 139-150, 2008.

TIWARI, S.; MANN, R. S.; ROGERSAND, M. E.; STELINSKI, L. L. Insecticide resistance in field populations of Asian citrus psyllid in Florida. **Pest Management Sci**, v. 67, p. 1258–126, 2011.

TSAGKARAKIS, A. E.; ROGERS, M. E. Suitability of “Cleopatra” mandarin as a host plant for *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). **Florida Entomologist**, v. 93, n. 3, p. 451–453, 2010.

TSAI, J. H.; WANG, J. J.; LIU, Y. H. Seasonal abundance of the asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) in Southern Florida. **Florida Entomologist**, v. 85, n. 3, p. 446–451, 2002.

VENDRAMIM, J. D.; GUZZO, E. C. Plant resistance and insect bioecology and nutrition, p. 657–686 In Panizzi AR, Parra JRP (eds.), **Insect bioecology and nutrition for integrated pest management**. CRC, Boca Raton, FL, 2012.

VIEIRA, D. B. Fertirrigação e manejo de irrigação em citros. **Irrigação e Tecnologia Moderna**, v. 33, p. 35-36, 1988.



WENNINGER, E. J.; HALL, D. G. Daily timing of mating and age at reproductive maturity in *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). **Florida Entomologist**, v. 90, n. 4, p. 715–722, 2007.

WELCH, B. L. The generalization of 'Student's' problem when several different population variances are involved. **Biometrika**, v. 34, n. 1/2, p. 28, 1947.

ZAR, J. H. *Biostatistical Analysis*. 5th. ed. Upper Saddle River, New Jersey: Pearson, 2010.

### **CAPÍTULO 3- Limeira ácida ‘Tahiti’ como fonte de *Candidatus Liberibacter asiaticus* para laranjeiras e vice-versa**

**RESUMO** - Huanglongbing (HLB) é a doença mais destrutiva dos citros. Apesar da grande dispersão e da doença ocorrer em todas as variedades comerciais de citros, as pesquisas e as recomendações de manejo têm tido como foco principal as laranjeiras doces. Poucas são as informações sobre o patossistema HLB em limeiras ácidas ‘Tahiti’. Com este trabalho objetivou-se (i) caracterizar sintomas foliares de HLB em ‘Tahiti’ e construir uma escala fotográfica para uso em avaliações no campo e em pesquisas; (ii) avaliar, por meio de inoculações cruzadas, o potencial que a ‘Tahiti’ representa como fonte de inóculo para a própria limeira ácida e para laranjeiras; e (iii) caracterizar danos em raízes provocados por HLB. O trabalho foi conduzido em laboratório, telado e sala climatizada. Para caracterização dos sintomas, foram coletadas folhas sintomáticas e assintomáticas em campo, separadas em categorias quanto à similaridade de mosqueado, e analisadas por qPCR. Para determinar o potencial de inóculo, foram usadas borbulhas doentes e insetos infectivos, em combinações homólogas e heterólogas, com 15 a 20 plantas por tratamento. A escala de sintomas foliares foi formada por cinco níveis de mosqueado. Diversas plantas experimentais estavam afetadas pelo oomiceto *Phytophthora* spp., permitindo também verificar se a presença deste fitopatógeno influenciaria no desenvolvimento de Las e nos danos às plantas provocados por HLB. Houve transmissão de Las para ‘Valência’ independentemente da fonte do inóculo e método de inoculação. Na ‘Tahiti’, por sua vez, houve transmissão de Las oriunda de ambos os hospedeiros, mas somente quando inoculada por enxertia. Em ‘Tahiti’ o amarelo foliar foi mais intenso do que em ‘Valência’. A ‘Tahiti’ pode atuar como fonte de inóculo para si mesma e para laranjeiras. Os danos nas raízes foram similares aos encontrados em ‘Valência’.

**Palavras-chave:** Citros, huanglongbing, transmissão cruzada, qPCR.

### CHAPTER 3 – ‘Tahiti’ acid lime as source of *Candidatus Liberibacter asiaticus* for orange trees and vice versa

**ABSTRACT-** Huanglongbing (HLB) associated with *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las) is the most destructive disease of citrus. Research and management recommendations have so far focused on sweet oranges. This work involved sweet orange and the acid lime ‘Tahiti’, and was carried out (i) to better characterize HLB symptoms on ‘Tahiti’, (ii) to determine the potential that ‘Tahiti’ represents as source of inoculum for itself and for ‘Valencia’ sweet orange, and (iii) to assess root damages. For symptom characterization, leaves were collected from Las-positive trees in the field and separated into categories based on the size of the yellow areas on leaf blade, and later analyzed by qPCR. To determine the potential as inoculum healthy plants were inoculated through grafting of diseased budstick or infective psyllids, in homologous or heterologous host combinations. The scale of leaf symptoms contained five levels of mottling and were useful in experiment evaluations. Several inoculated plants were unexpectedly affected by *Phytophthora*, which allowed to assess its impact on Las-citrus interaction. On *Phytophthora*-infected plants, inoculated by grafting, higher bacterium titers were detected on leaves, and the symptoms expressed earlier. This pathogen did not favor root colonization by Las, excepting ‘Tahiti’ that received inoculum of Las from ‘Tahiti’, nor contributed to increase root damage. Overall, ‘Valencia’ was infected by Las, independently of the citrus variety source inoculum and method of inoculation. ‘Tahiti’, in turn, was infected by Las originated from both hosts, but only when inoculated by grafting. When exposed to infective insects, ‘Tahiti’ became infected only when the source of inoculum was another ‘Tahiti’. Removal of diseased trees of ‘Tahiti’ (as of any other citrus) from commercial or noncommercial areas should be reinforced as crucial to the success of HLB control.

**Keywords:** citrus, cross-inoculation, huanglongbing, qPCR.

## 1. INTRODUÇÃO

Huanglongbing (HLB) é a doença mais destrutiva dos citros. A alta incidência de HLB nos pomares causa grandes perdas econômicas para o citricultor e para a indústria de suco (BOVÉ, 2006; TIWARI et al., 2011). O HLB está associado a três  $\alpha$ -proteobactérias Gram-negativas transmitidas por insetos e que colonizam o floema de plantas cítricas e de algumas outras rutáceas como a *Murraya exotica* L. [sinônimo de *Murraya paniculata* (L.) Jack]. As espécies *Candidatus* (*Ca.*) *Liberibacter asiaticus* (Las) e *Ca. L. americanus* (Lam) são transmitidas pelo psíldeo *Diaphorina citri* Kuwayama (Liviidae) (CAPOOR et al., 1967; YAMAMOTO et al., 2006) e a espécie *Ca. L. africanus* (Laf) é transmitida por *Trioza erytrae* Del Guercio (Psillidae) (McCLEAN et al., 1965). No Brasil a doença foi relatada em 2004, associada às espécies Las e Lam (COLETTA-FILHO et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2005). O HLB associado a Las já foi reportado na maioria dos países do continente americano (MATOS; HILF; CAMEJO, 2009; LUIS et al., 2009; HALL et al., 2013; SENASA, 2009; SENAIVE, 2013; WANG; TRIVEDI, 2013; ICA, 2015) incluindo o Brasil e os Estados Unidos, maiores produtores de suco de laranja do mundo.

Até o presente momento, as pesquisas sobre o HLB tiveram como foco principal as laranjeiras doces que, dentre as frutas cítricas, comercializadas na forma de suco ou *in natura*, são as mais cultivadas em todo mundo. Neste hospedeiro, após a bactéria ser transmitida por *D. citri*, o que ocorre quando este inseto se alimenta dos tecidos jovens, Las coloniza os vasos do floema espalhando-se por toda a planta de forma irregular (TATINENI et al., 2008; LI; LEVY; HARTUNG, 2009; TEIXEIRA et al., 2008). A velocidade de colonização é afetada principalmente pela alternância nos fluxos de crescimento vegetativo, que muda o sentido de translocação de seiva nos vasos condutores do floema para os novos tecidos em formação (RAIOL JUNIOR et al., 2017). Ao colonizar a planta, a bactéria provoca alterações fisiológicas, anatômicas e morfológicas resultando em perdas de massa radicular (JOHNSON et al., 2014), amarelecimento das nervuras e mosqueado foliar, além de frutos pequenos, deformados, com altas taxas de sementes abortadas e de qualidade de suco imprópria para o consumo. Tanto as folhas como os frutos

sintomáticos caem prematuramente provocando perdas na produção e definhamento da planta (BOVÉ, 2006). O tempo necessário para manifestação dos sintomas em laranjeiras pode variar de quatro meses a um ano dependendo da idade das plantas, das condições ambientais e da variedade (HUNG et al., 2004; LOPES; FRARE, 2008).

Com relação às limeiras ácidas, em particular a 'Tahiti' (*Citrus latifolia* Tan), apesar de sua grande importância comercial, sendo o 8º produto mais comercializado no estado de São Paulo (CEAGESP, 2018), poucas são as informações sobre o patossistema HLB. Por exemplo, ainda existem dúvidas sobre os danos e sintomas foliares que Las induz em plantas, e também se sua taxa de multiplicação em 'Tahiti' é similar à verificada em laranjeiras doces, o que pode ter consequências epidemiológicas. O entendimento destes aspectos poderá ajudar a melhorar o manejo da doença. Deste modo, este estudo objetivou (i) caracterizar sintomas foliares de HLB em 'Tahiti' visando a construção de uma escala fotográfica para uso no campo e em pesquisas, (ii) avaliar, por meio de inoculações cruzadas, o potencial que uma planta doente de 'Tahiti' representa como fonte de inóculo para si mesma e para laranjeiras doces, e (iii) caracterizar danos em raízes provocados por HLB.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

Os experimentos foram conduzidos em laboratório e casa de vegetação do Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (FCAV/UNESP), Câmpus de Jaboticabal, e no Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento do Fundo de Defesa da Citricultura – FUNDECITRUS, Araraquara-SP.

## 2.1. Desenvolvimento de escala fotográfica de sintomas foliares

Em agosto de 2016, foram coletadas aproximadamente 500 folhas maduras de ramos sintomáticos de HLB e assintomáticos de diversas plantas adultas. As plantas foram selecionadas em pomar localizado em Severínia, SP, 20°46'1,45" latitude sul e 48°48'42,66" longitude oeste. As folhas foram lavadas e, com base na similaridade dos padrões de amarelecimento do limbo foliar, foram visualmente separadas em categorias. Amostras de quatro grupos, cada grupo composto por cinco folhas de cada categoria, foram processadas para extração de DNA e análise por PCR quantitativo (qPCR) (LI; HARTUNG; LEVY, 2006). Cada grupo de folhas foi considerada uma repetição, totalizando quatro repetições por categoria.

## 2.2. Inoculações cruzadas de *Ca. L. asiaticus* por *Diaphorina citri*

Para este experimento, plantas de 'Valência' e 'Tahiti' doentes serviram de fonte de inóculo em combinações homólogas e heterólogas. Para 'Tahiti' (cultivar 'Quebra galho'/ porta-enxerto Cravo, 3 anos de idade) foi necessária a remoção de plantas do campo (Severínia-SP) e transplantá-las em vasos de 50 L. Para laranjeira (cultivar 'Valência'/ porta-enxerto Cravo, 2 anos de idade) usaram-se plantas mantidas em vasos, as quais haviam sido previamente inoculadas por enxertia de segmentos de ramos doentes, conforme descrito por Lopes e Frare (2008). Para a produção dos psilídeos infectivos, as plantas foram podadas para emissão de novos brotos. Quando os brotos atingiram estágio V2 de desenvolvimento (CIFUENTES-ARENAS et al., 2018), oito insetos adultos foram confinados utilizando-se gaiolas de tule de 40 cm por 35 cm para oviposição. Após oito dias, os adultos foram removidos e aguardou-se a eclosão das ninfas e emergência da nova geração de adultos a serem utilizados no experimento. Após a emergência, lotes de cinco indivíduos foram testados por qPCR para confirmação da presença e estimativa dos títulos de Las. A criação foi realizada em sala climatizada, com temperatura média diária do ar

de 24,5°C, com médias das máximas e mínimas de 26 e 23°C, umidade relativa média de 59%, com médias das máximas e mínimas de 65 e 53%, e fotoperíodo de 14 horas.

Para inoculação foram utilizadas plantas de 'Tahiti' (cultivar 'Quebra galho'/porta-enxerto Cravo) e de laranjeira (cultivar 'Valência'/ porta-enxerto Cravo) com dois anos de idade, obtidas de viveiros comerciais certificados e mantidas em vasos de 5 L com substrato a base de casca de pinus (MultiPlant Citrus, Terra do Paraíso, Holambra, SP). Visando estimular a emissão de novos brotos, as plantas foram podadas a uma altura de 15 cm acima do ponto de enxertia, seguido de remoção das folhas mais próximas do ponto de poda. Quando os brotos atingiram o estágio V3 de desenvolvimento (CIFUENTES-ARENAS et al., 2018), foi selecionado um único broto onde foram confinados, em gaiolas de tule de 15 x 20 cm, 5 insetos adultos oriundos das plantas doentes. Ao todo 20 plantas de cada tipo ('Tahiti' e 'Valência') receberam insetos criados em plantas de 'Tahiti' doente, e 15 plantas de cada tipo receberam insetos criados em 'Valência' doente. Os insetos foram confinados nos brotos destas plantas por sete dias para acesso à inoculação, e posteriormente retirados, sendo em seguida pulverizadas com inseticida. Os controles consistiram de cinco plantas de cada tipo, que receberam insetos criados em plantas sadias em combinações homólogas.

As plantas permaneceram durante dois meses em sala climatizada, nas condições descritas para criação dos insetos, e posteriormente transferidas para casa de vegetação, onde permaneceram por mais dez meses. O experimento foi instalado em setembro de 2016, em delineamento inteiramente casualizado, com 15 e 20 repetições (plantas com insetos oriundos de 'Valência' e 'Tahiti', respectivamente) por tratamento, sendo cada planta considerada uma repetição. Dados de temperatura do ar e umidade relativa foram registrados de hora em hora. As plantas foram irrigadas de acordo com as necessidades e fertirrigadas quinzenalmente com 50 mL por planta de solução nutritiva de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , MAP,  $\text{MgSO}_4$ , Cu, Zn, Mn-EDTA,  $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ , e FeEDTA, às concentrações de 1,35, 0,111, 0,4, 0,015, 0,01,  $7,5 \times 10^{-3}$ ,  $4,5 \times 10^{-4}$ , 0,075 g/L, respectivamente.

### 2.3. Inoculação de *Ca. L. asiaticus* por enxertia de borbulha

As fontes de inóculo consistiram de ramos sintomáticos retirados de plantas de 'Valência' e/ou 'Tahiti', infectadas naturalmente, de pomares comerciais localizados nas cidades de Rincão-SP e Severínia-SP, respectivamente. A comprovação da infecção por Las foi feita previamente pela observação de sintomas típicos de HLB e confirmação da presença da bactéria por meio de análise por qPCR (LI; HARTUNG; LEVY, 2006) de cinco folhas de cada um dos ramos usados como fonte de inóculo. Foram coletados ramos de aproximadamente 30 cm de comprimento, 24 h antes da inoculação.

Para o experimento, plantas de 'Valência' e 'Tahiti', ambas enxertadas em limoeiro 'Cravo', foram podadas a uma altura de 15 cm acima do ponto de enxertia para emissão de novos fluxos de crescimento. Foram conduzidas duas hastes, opostas uma à outra. Quando estas atingiram aproximadamente 1 cm de diâmetro, foram enxertadas, em apenas uma das hastes, duas borbulhas de dois a três cm de comprimento (adaptado de LOPES; FRARE, 2008). Ao todo, 20 plantas de cada tipo ('Tahiti' e 'Valência') receberam borbulhas oriundas de plantas de 'Tahiti' doentes e 20 plantas de cada tipo receberam borbulhas de 'Valência' doente. Os controles consistiram de cinco plantas de 'Tahiti' e de 'Valência' enxertadas com borbulhas retiradas de plantas saudáveis, em combinações homólogas.

A implantação do experimento deu-se em julho de 2016, com as plantas avaliadas durante 12 meses. O delineamento experimental foi de blocos casualizados, com quatro blocos e cinco parcelas de cada planta por bloco. As plantas inoculadas foram mantidas em casa de vegetação. Dados de temperatura do ar e umidade relativa foram registrados de hora em hora, com temperatura média diária do ar de 22°C, com médias das máximas e mínimas de 26,8 e 17,8°C, umidade relativa média de 61%, com médias das máximas e mínimas de 87 e 34,5%. As plantas foram irrigadas e fertirrigadas conforme descrito para as inoculações com psilídeos.



## 2.4. Extração de DNA e qPCR

Para extração de DNA total de amostras de folhas, foram selecionadas folhas totalmente expandidas e sintomáticas emitidas em fluxos vegetativos posteriores às inoculações ou, no caso de não haver folhas sintomáticas, foram coletadas folhas assintomáticas próximas ao ponto de inoculação. Alíquota de 0,5 g da nervura central de cada folha da amostra foi picada sobre papel toalha e colocada em sacos plásticos, nos quais foram adicionados 2 mL de solução de extração (MURRAY; THOMPSON, 1980). O material foi em seguida macerado com homogeneizador Homex 6. Para extração de DNA total de raízes fibrosas, foram selecionadas as raízes mais novas e com coloração esbranquiçada, as mesmas foram picadas sobre papel toalha 0,3 g de material vegetal de cada amostra e colocadas em tubo eppendorf de 2 mL. Foi adicionado 1,5 mL de solução de extração. O material vegetal (raiz) foi incubado em banho maria a 65°C por duas horas e homogeneizado por inversão dos tubos eppendorf a cada 30 min. Para a extração do DNA de *D. citri*, os insetos foram agrupados em lotes contendo cinco indivíduos. Os insetos foram macerados com pistilo em tubos eppendoff de 1,5 mL contendo 400 µL de tampão de extração CTAB (MURRAY; THOMPSON, 1980). As amostras foram incubadas por 30 min em banho maria a 65°C e centrifugadas a 956 x g por 5 min.

Em seguida, a extração do DNA de folhas, raízes e insetos foi conduzida como descrito por Li, Hartung e Levy, (2006). O DNA total extraído foi quantificado e ajustado à concentração de 100 ng µL<sup>-1</sup>. Para análise do DNA de folhas e raízes por qPCR, foi utilizado o volume final de 2 mL, contendo 6 µL de master mix (Invitrogen, Carlsbad, CA), 3 µL de DNA e 150 nM dos primers e sonda HLBaspr (LI; HARTUNG; LEVY, 2006). A PCR foi realizada no termociclador StepOne Plus (Applied Biosystems). Os valores de Cq (*quantification cycle*) foram ajustados automaticamente usando o software StepOne. Foram consideradas positivas somente amostras que apresentaram Ct menor ou igual a 34,0. Os valores de Ct encontrados nas amostras de folhas e raízes foram convertidos a log<sub>10</sub> do número de cópias de amplicons por grama de tecido, usando a equação  $y = -0,2998x +$

11,042 (LOPES et al., 2013). Para os insetos, os valores de Ct foram convertidos em títulos de Las usando a equação  $y = - 0.2904x + 11.085$  como descrito por Lopes et al. (2013).

## **2.5. Avaliações**

### **2.5.1. Quantificação de sintomas foliares**

A cada dois meses todas as plantas dos dois experimentos foram observadas detalhadamente anotando-se a presença/ausência de clorose, mosqueado ou sintomas de deficiência mineral. A escala fotográfica desenvolvida neste trabalho foi utilizada na avaliação das plantas de 'Tahiti' e a escala desenvolvida por Mendonça (2015) e descrita na Figura 1, foi utilizada para avaliação das plantas de 'Valência'. A cada avaliação foram anotados os tipos de sintomas observados e, ao final, calculada a porcentagem de folhas com base na categoria de sintomas.

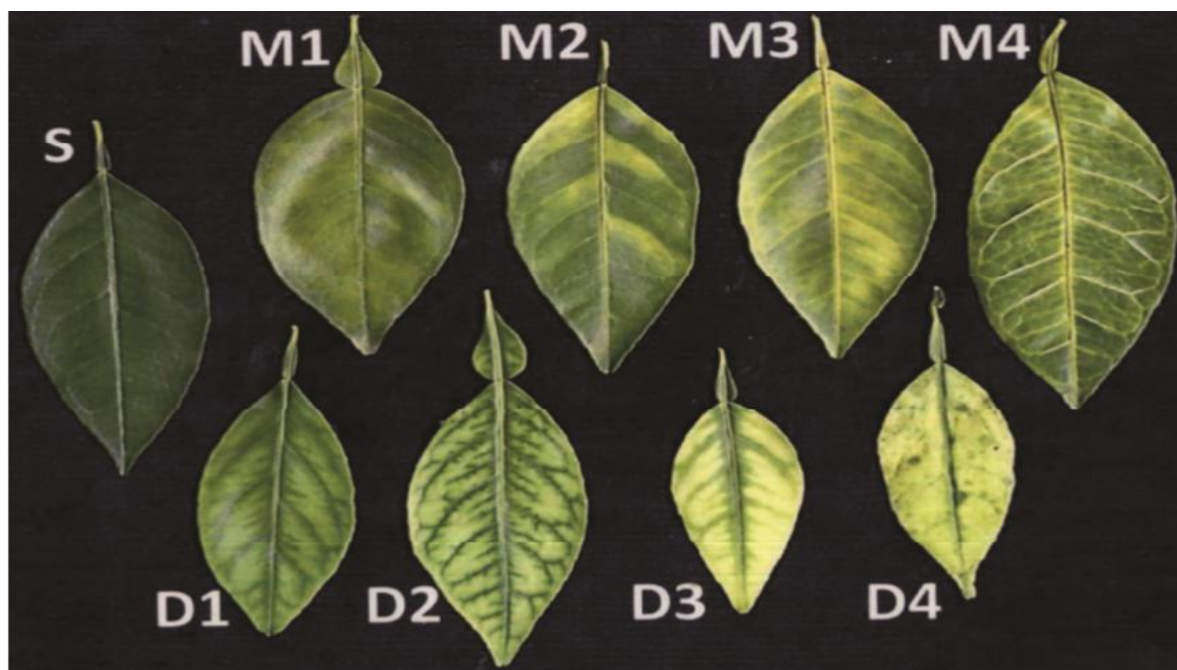


Figura 1. Escala fotográfica de severidade de sintomas de HLB em laranja doce. Com relação ao mosqueado: (M1) folha predominando a cor verde com leve mosqueado, (M2) folha com contraste marcante entre o verde e o amarelo, (M3) folha com limbo e nervura predominando a cor amarela e (M4) folha predominando a cor amarela com nervuras salientes amareladas e/ou amarronzadas. Com relação à deficiência mineral: (D1) deficiência de zinco pouco intensa, (D2) deficiência de zinco com a cor amarela bem delimitada pelas nervuras secundárias, (D3) deficiência de zinco com amarelo mais intenso com menor delimitação das nervuras secundárias, e (D4) folha amarelada com círculos de cor verde.

### 2.5.2. Quantificação da bactéria nas folhas

A partir do quinto mês após inoculação, amostras de folhas jovens, porém totalmente expandidas, em estágio vegetativo V4 (CIFUENTES-ARENAS et al., 2018), três por planta, foram coletadas das duas hastes das plantas inoculadas por enxertia. As mesmas foram processadas para extração de DNA e quantificação de *Liberibacter* por qPCR (LI; HARTUNG; LEVY, 2006). O objetivo foi determinar o estado da planta quanto à infecção por Las. As plantas inoculadas por insetos também foram avaliadas por qPCR por meio de amostragem de folhas que se desenvolveram na mesma haste inoculada.

### 2.5.3. Quantificação de danos em raízes

No sexto mês após as inoculações, as plantas foram removidas dos vasos, as raízes separadas do substrato e lavadas em reservatório de 50 L seguido de água corrente de torneira. Em seguida, cada planta foi colocada em uma cabine com fundo escuro e fotografada três vezes em diferentes ângulos (de cima, de lado e de frente). Para avaliação de perda de massa radicular, as fotografias foram analisadas por meio do software ImageJ® de acordo com as instruções do fabricante (National Institutes of Health, Bethesda, USA). Para confirmação de presença de Las e quantificação da bactéria, as amostras foram processadas para extração de DNA e análise por PCR quantitativo (qPCR) (LI; HARTUNG; LEVY, 2006).

### 2.5.4. Quantificação da bactéria nas raízes e provável presença de *Phytophthora* spp.

No sexto mês após a inoculação foram coletados 5 g de radículas para confirmação da presença e quantificação de Las por qPCR (LI; HARTUNG; LEVY, 2006). Em seguida as plantas foram replantadas e mantidas em casa de vegetação onde permaneceram por mais seis meses, quando novamente foram reavaliadas por qPCR e em seguida descartadas. No 12º mês, 5 g de raiz e solo também foram coletados para a análise de presença de *Phytophthora* spp. Esta análise foi realizada devido ao surgimento de sintomas típicos produzidos pela infecção deste oomiceto.

Para verificação de presença de *Phytophthora* spp., empregou-se a metodologia proposta por Matherom e Matejka (1991) com algumas modificações. Dentro de 48 horas após a amostragem, aproximadamente 5 g de cada amostra (solo+raízes) foram colocados em potes de poliestireno liso de 75 mL de volume e completados com água destilada-esterilizada, seguido de suave homogeneização. Em seguida, pedaços de pétalas de rosas foram usados como isca. As pétalas

foram lavadas em água corrente e desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio a 1,0 % durante 1 min. e secas usando papel absorvente. As pétalas foram picadas e em seguida mergulhadas na suspensão. Os potes foram cobertos com uma tela de “nylon” de malha fina para permitir aeração e evitar a invasão de insetos. Todo o material foi mantido em sala climatizada, com temperatura média do ar de  $25^{\circ}\text{C}\pm 2$ , sob luz fluorescente contínua. Após três a cinco dias, quando se observou o aparecimento de manchas necróticas nas pétalas e o desenvolvimento de colônias sobre a superfície da solução, fragmentos de micélio juntamente com pedaços de pétala foram transferidos para uma lâmina e recobertos com lamínula. Por meio de microscópio estereoscópio (Olympus Optical<sup>®</sup>, modelo SZ-40/SZ-ST) foi feita a observação e identificação de hifas e esporos do patógeno.

## 2.6. Análises estatísticas

Os dados referentes aos títulos de Las em folhas de ‘Tahiti’ com diferentes intensidades de sintoma foram comparados por meio de análise de variância ANOVA e comparação das médias por meio do teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), utilizando o programa Statgraphics Centurion VXII (Statpoint Technologies Inc.). Para determinar a relação entre título bacteriano (log do número de células bacterianas por grama de tecido vegetal) e área sintomática, foi realizada análise de regressão não linear, com o melhor modelo [ $\text{Log} = \sqrt{a + b * \sqrt{\text{sintoma} (\%)}$ )] escolhido com base no valor do coeficiente de regressão ( $R^2$ ). Devido ao pequeno número de plantas por repetição, os dados referentes ao experimento de inoculações cruzadas não foram submetidos a análise estatística.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Desenvolvimento de escala fotográfica

As 500 folhas trazidas do campo foram separadas em cinco categorias distintas, denominadas M0 (M de mosqueado) a M4. M0 continha folhas totalmente verdes; M1 folhas com predomínio da cor verde, mas exibindo pequena área de verde mais claro e amarelo (cerca de 5% da área foliar); M2 folhas ainda com predomínio da cor verde, mas já exibindo contraste marcante entre o verde e o amarelo, este ocupando 20 a 30% do limbo; M3 folhas com áreas proporcionais de cor verde e amarela; e M4 folhas com predomínio da cor amarela (+75%) além de nervuras salientes (Fig. 2).



Figura 2: Escala fotográfica da progressão na intensidade de sintomas de HLB em folhas de limeira ácida 'Tahiti'. M- mosqueado, 0 a 4 – aumento progressivo na área com manchas, verde amarelo ou amarelo no limbo foliar.

A intensidade de amarelo nas folhas se correlacionou com o título de Las. Quanto maior a área amarela maior o título (Fig. 3), alcançando maiores valores em M4, com valor médio de log 5,76 células por grama de tecido.

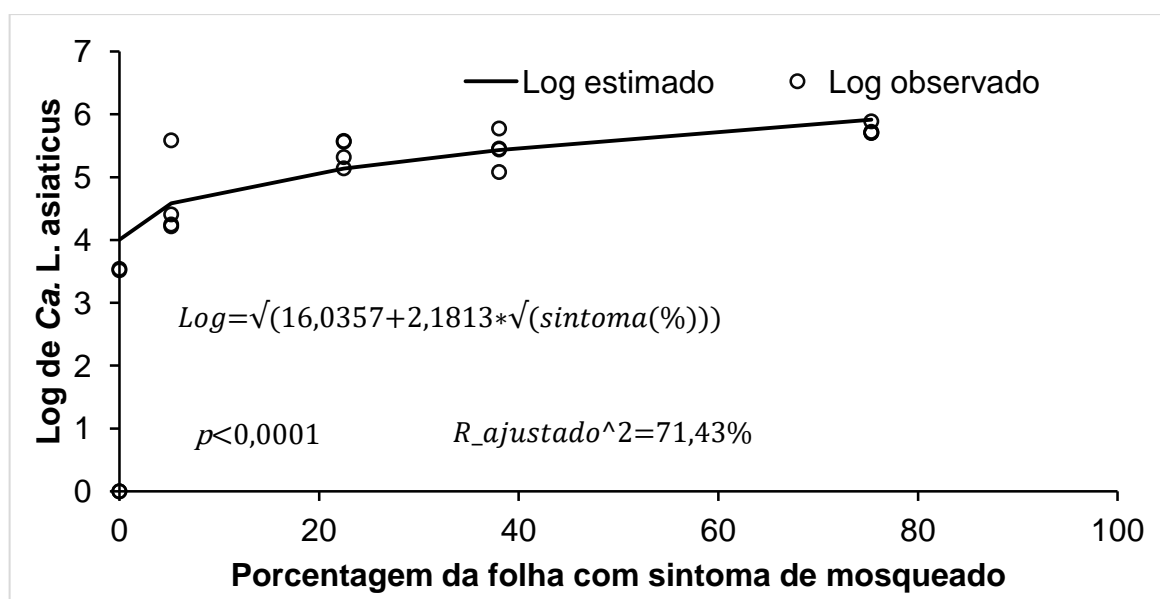


Figura 3. Regressão não linear do título de *Candidatus Liberibacter asiaticus* e da porcentagem de área com mosqueado da escala fotográfica de folhas de limeira ácida 'Tahiti'.

A bactéria foi detectada, embora menos frequente, em apenas duas das quatro repetições do M0, e em menor título também nas folhas assintomáticas (log de 3,53 células por grama de tecido) (Tabela 1).

Tabela 1. Variação do título de *Candidatus Liberibacter asiaticus* em folhas removidas de ramos sintomáticos e assintomáticos de plantas de limeira ácida 'Tahiti' infectadas naturalmente no campo.

Grupo	Área foliar verde-amarela ou amarela (%) <sup>x</sup>	Folhas qPCR+ sobre o total	Log células/g tecido ± erro padrão <sup>y</sup>
M0	0	2/4	3,53 ± 0,01 c
M1	Até 5	4/4	4,62 ± 0,33 b
M2	20 a 30	4/4	5,40 ± 0,10 ba
M3	31 a 60	4/4	5,44 ± 0,14 a
M4	Mais de 60	4/4	5,76 ± 0,04 a

Médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste Tukey com  $p < 0,05$ .

<sup>x</sup> vide Figura 2 <sup>y</sup> Log10 de genomas de título de 'Ca. L. asiaticus' por grama de tecido ( $y = -0,2998x + 11,042$  (LOPES et al., 2013), ± erro padrão.

### 3.2. Inoculações cruzadas de *Ca. L. asiaticus*

Para facilidade de leitura e compreensão dos resultados desta parte do trabalho, para as combinações 'planta inoculada/ fonte de inóculo' serão usadas as siglas V/Vb, V/Vi, V/Tb, V/Ti, T/Vb, T/Vi, T/Tb e T/Ti, sendo a primeira vogal maiúscula a variedade de planta que recebeu o inóculo e a segunda a variedade que da qual o inóculo originou, sendo 'V' para laranjeira 'Valência' e 'T' para limeira ácida 'Tahiti'. As vogais minúsculas indicam o tipo de inóculo sendo 'b' para borbulha doente e 'i' para inseto infectivo.

No sexto mês notou-se que mesmo no tratamento controle (plantas não submetidas a inoculação com Las) havia dano no volume e necrose de radículas em plantas das duas variedades estudadas. Suspeitou-se tratar de infecção causada pelo oomiceto *Phytophthora* spp. A suspeita se confirmou quando amostras de raízes e solo foram avaliadas. No 12º mês, no total, 39 e 62% das 72 e 71 plantas de 'Valência' e 'Tahiti', respectivamente, estavam infectadas. Deste modo, as plantas foram avaliadas separadamente em dois lotes: plantas não infectadas e plantas infectadas pelo oomiceto (Tabela 2).



Tabela 2. Influência do método de inoculação e fonte de inóculo sobre as partes aérea e radicular de plantas de limeira ácida 'Tahiti' e laranjeira 'Valência', em interações homólogas e heterólogas, sem e com a presença de *Phytophthora* sp.

Status das plantas e parâmetros avaliados	Inoculadas por enxertia <sup>1</sup>				Inoculadas por <i>D. citri</i> <sup>2</sup>			
	Valência <sup>3</sup>		Tahiti		Valência		Tahiti	
	Valência <sup>4</sup>	Tahiti	Valência	Tahiti	Valência	Tahiti	Valência	Tahiti
<b>Plantas sem <i>Phytophthora</i></b>								
Total	10	13	9	5	11	10	6	7
<b>Parte aérea das plantas Las+:</b>								
Com Liberibacter (%)	10 (100)	3 (23)	9 (100)	4 (80)	9 (82)	7 (70)	0	0
Título em folhas <sup>5</sup>	5,3 ± 0,41	3,2 ± 0,41	5,3 ± 0,08	4,9 ± 0,23	5,9 ± 0,08	4,9 ± 0,65	---	---
Período latente (mês) <sup>6</sup>	6,2 ± 0,49	6,3 ± 0,88	5,3 ± 0,33	5,8 ± 0,75	5,0	5,0	---	---
Período de incubação (mês) <sup>7</sup>	6,3	11,5	6,1	6,1	8,0	9,0	---	---
<b>Raiz das plantas Las+:</b>								
Incidência (% plantas)	10 (100)	0	9 (100)	2 (40)	10 (91)	6 (60)	0	1 (14)
Título no 6° mês	3,3 ± 0,21	---	3,7 ± 0,12	3,3 ± 0,0	3,6 ± 0,26	3,5 ± 0,62	---	---
Danos no 6° mês (%) <sup>8</sup>	-16,6 ± 2,44	---	-7,7 ± 3,33	-23,7 ± 7,91	-24,0 ± 4,73	-14,7 ± 2,40	---	---
Título no 12° mês	3,6 ± 0,19	---	3,8 ± 0,14	3,2 ± 0,49	5,0 ± 0,83	3,9 ± 0,67	---	2,5
Danos no 12° mês (%)	-19,7 ± 3,24	---	-21,9 ± 4,53	-38,3 ± 5,61	-36,1 ± 3,99	-30,3 ± 6,09	---	-0,5
<b>Plantas com <i>Phytophthora</i></b>								
Total	10	6	7	15	4	8	9	13
<b>Parte aérea das plantas Las+:</b>								
Com Liberibacter (%)	10 (100)	2 (33)	7 (100)	9 (60)	3 (75)	3 (38)	0	4 (31)
Título em folhas	5,7 ± 0,14	2,4 ± 0,20	5,3 ± 0,06	5,3 ± 0,10	5,8 ± 0,08	6,0 ± 1,74	---	5,4 ± 0,10
Período latente (mês)	5,6 ± 0,40	5,5 ± 0,50	5,0	5,3 ± 0,33	5,0	5,0	---	5,0
Período de incubação (mês)	8,0	8,8	5,2	5,8	7,5	9,0	---	10,0
<b>Raiz das plantas Las+:</b>								
Incidência (% plantas)	9 (90)	0	6 (86)	11 (73)	3 (75)	4 (50)	0	4 (31)
Título no 6° mês	3,5 ± 0,20	---	3,4 ± 0,24	3,0 ± 0,44	4,1 ± 0,26	4,1 ± 0,97	---	3,7 ± 0,19
Danos no 6° mês (%)	-10,9 ± 2,19	---	-12,5 ± 4,48	-14,1 ± 3,78	-8,4 ± 5,00	-22,6 ± 8,53	---	-16,3 ± 8,08
Título no 12° mês	3,8 ± 0,20	---	3,5 ± 0,16	3,5 ± 0,19	4,1 ± 0,19	3,6 ± 0,47	---	3,4 ± 0,58
Danos no 12° mês (%)	-22,4 ± 3,35	---	-18,3 ± 7,51	-32,4 ± 5,48	-34,2 ± 12,71	-38,3 ± 9,71	---	-20,1 ± 5,39

<sup>1</sup> Segmento de ~4 cm de ramo Las+ enxertado no caule das plantas experimentais.

<sup>2</sup> Lotes de 5 adultos reproduzidos em plantas Las+ aprisionados em 1 broto por planta experimental por 7 dias para acesso a inoculação.

<sup>3</sup> Variedade da planta experimental submetida à inoculação.

<sup>4</sup> Variedade usada como fonte de inóculo.

<sup>5</sup> Log médio do número de amplicons de *Ca. L. asiaticus* por grama de tecido.

<sup>6</sup> Tempo médio entre a data de inoculação e detecção da bactéria nos tecidos da planta.

<sup>7</sup> Tempo médio entre a data de inoculação e aparecimento dos sintomas foliares em 50% das plantas inoculadas, determinada por regressão.

<sup>8</sup> Volume médio de raiz nas plantas Las+ em relação em relação à média dos controles (plantas Las-)

<sup>9</sup> Não houve a presença de *Ca. L. asiaticus*.

### 3.2.1. Influência do método de inoculação sobre *Ca. L. asiaticus* em plantas com e sem *Phytophthora* spp.

Em ambos os grupos, com e sem *Phytophthora*, a incidência de Las foi maior no lote inoculado por borbulha, com as maiores diferenças observadas na

parte aérea das plantas, que continham o dobro da incidência da observada no lote inoculado por inseto (Tabela 2).

Nas plantas sem *Phytophthora* a inoculação por inseto resultou em menor período latente e menor período de incubação, ou seja, Las foi detectada em média dois meses antes e os sintomas se manifestaram mais lentamente do que nas plantas inoculadas por borbulha. Não houve diferenças marcantes entre os métodos de inoculação no que diz respeito a danos e aspecto do sistema radicular, para ambos os grupos de plantas.

### **3.2.2. Influência das combinações planta inoculada/origem do inóculo na incidência de *Ca. L. asiaticus* em plantas com e sem *Phytophthora* spp.**

A incidência de Las foi dependente da combinação, com maiores valores nas combinações V/Vb e T/Vb. Na combinação V/V, não foram observadas diferenças marcantes entre V/Vb e V/Vi, dentro dos dois grupos de plantas (com e sem *Phytophthora*), com exceção dos danos em raízes no 12º mês, com tendência de maior dano radicular em plantas inoculadas por *D. citri*, em ambos os grupos.

Em V/T o método de inoculação afetou consideravelmente os parâmetros avaliados. Em V/Tb e V/Ti sem a presença de *Phytophthora*, as taxas de infecção foram, respectivamente, de 23% e 70%; os títulos na parte aérea de 3,2 e 4,9 log por grama de tecido; o período latente de 6,3 e 5,0 meses; e o período de incubação de 11,5 e 9 meses. Além de menor título na parte aérea, a bactéria não colonizou o sistema radicular das plantas enxertadas, ao contrário do que aconteceu nas inoculadas por insetos. Nas plantas com *Phytophthora*, similar ao ocorrido no grupo sem o oomiceto, em V/Tb, Las colonizou somente a parte aérea das plantas, enquanto que em V/Ti a bactéria colonizou a planta por completo (folhas e raízes).

Em T/V só houve transmissão e colonização da bactéria nas plantas inoculadas por borbulha. Na combinação T/T, houve variação tanto entre o método de inoculação como entre o grupo de plantas (com e sem *Phytophthora*). Enquanto que as plantas inoculadas por enxertia foram totalmente colonizadas pela bactéria,

nos dois grupos, nas plantas inoculadas por insetos infectivos a colonização de toda a planta somente ocorreu no grupo com *Phytophthora*.

### **3.2.3. Influência da fonte de inóculo na incidência de *Ca. L. asiaticus* em plantas com e sem *Phytophthora* spp.**

A fonte de inóculo afetou consideravelmente os resultados. Em 'Valência', as plantas foram colonizadas por Las oriundas tanto da própria laranjeira como da limeira 'Tahiti', independente do método de inoculação. As plantas de 'Tahiti', por sua vez, foram intensamente colonizadas por Las oriundas de ambos os hospedeiros, mas somente quando inoculadas por enxertia. Quando inoculadas por inseto, a infecção e colonização ocorreu com mais intensidade somente no grupo de plantas com *Phytophthora* e quando oriundos da própria 'Tahiti', com a incidência atingindo 31%.

### **3.2.4. Incidência de *Ca. L. asiaticus* na parte aérea das plantas**

Quanto à incidência de Las na parte aérea, apesar do pequeno número de plantas não permitir uma análise precisa, não observaram-se diferenças marcantes, tanto nas plantas inoculadas por enxertia quanto nas inoculadas por inseto, com exceção da 'Tahiti' que recebeu insetos infectivos oriundos da própria 'Tahiti' (T/Ti), nas quais somente as plantas do grupo com *Phytophthora* se tornaram infectadas, com incidência de Las de 31% contra 0% nas plantas sem o oomiceto (Fig. 4).

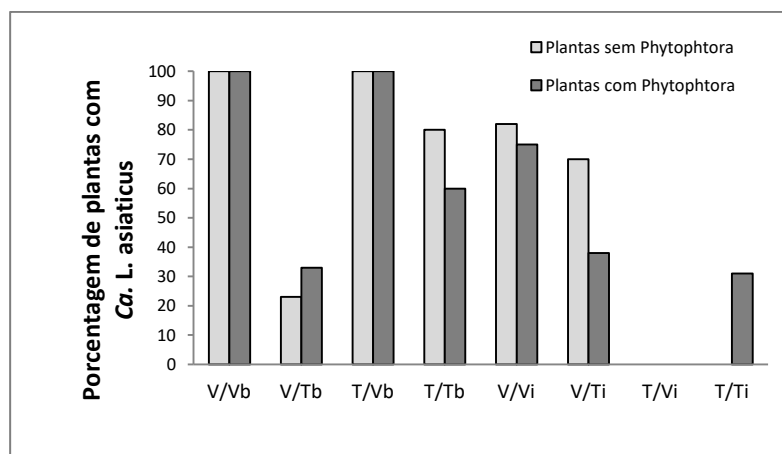


Figura 4. Porcentagem de plantas de limeira ácida ‘Tahiti’ (T) e de laranjeira ‘Valência’ (V), naturalmente infectadas ou não por *Phytophthora* spp., com a presença de *Ca. L. asiaticus* na parte aérea, 12 meses após inoculações cruzadas por meio de enxertia de borbulha doente ou de exposição a psilídeos infectivos (sete dias de acesso a inoculação), com borbulha (b) e psilídeos (i) oriundos de plantas de limeira ácida ‘Tahiti’ ou laranjeira ‘Valência’ doente. A primeira vogal maiúscula indica a planta inoculada e a segunda a planta origem do inóculo, a vogal minúscula indica o método de inoculação.

*Phytophthora* aparentemente influenciou a capacidade de multiplicação de Las na parte aérea, mas somente em plantas de ‘Valência’ inoculadas com borbulhas doentes oriundas de ‘Tahiti’. Houve uma tendência de menores títulos em plantas infectadas pelo oomiceto (log 2,4 por células/g tecido) do que em plantas sem a presença deste fitopatógeno (log 3,2) (Fig. 5).

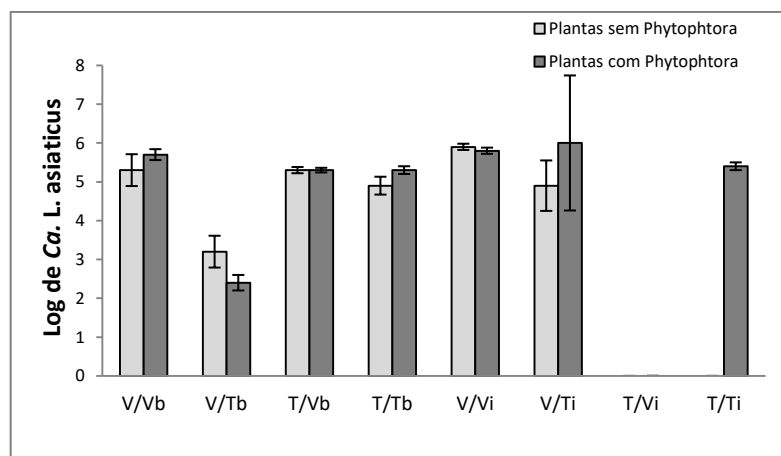


Figura 5. Título médio ( $\pm$  erro padrão) do número de amplicons de *Ca. L. asiaticus* por grama de tecido foliar de plantas de lima ácida 'Tahiti' (T) e de laranjeira 'Valência' (V), naturalmente infectadas ou não por *Phytophthora* spp., após inoculações cruzadas por meio de enxertia de borbulha doente ou de exposição a psilídeos infectivos (sete dias de acesso a inoculação), com borbulha (b) e psilídeos (i) oriundos de plantas de limeira ácida 'Tahiti' ou laranjeira 'Valência' doente. A primeira vogal maiúscula indica a planta inoculada e a segunda a planta origem do inóculo, a vogal minúscula indica o método de inoculação.

No que diz respeito ao período latente, ou seja, tempo médio necessário para a detecção de Las nas plantas, de maneira geral, não houve influência da *Phytophthora* (Fig. 6).

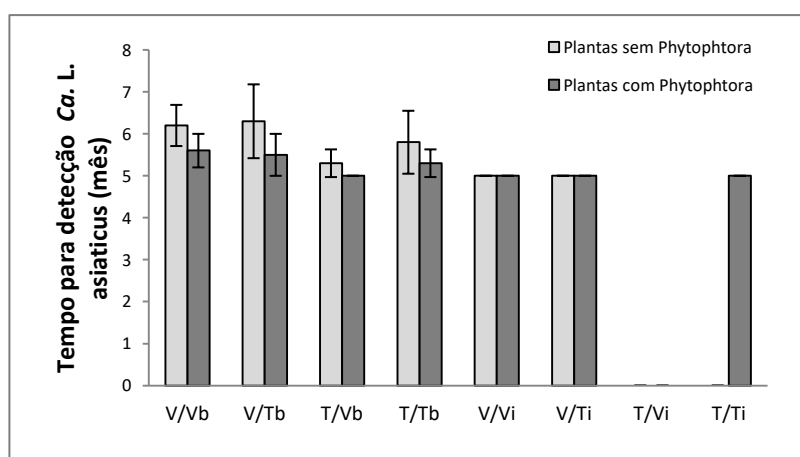


Figura 6. Tempo médio (meses) ( $\pm$  erro padrão) entre a data de inoculação e detecção da bactéria nos tecidos foliares de plantas de limeira ácida 'Tahiti' (T) e laranjeira 'Valência' (V), naturalmente infectadas ou não por *Phytophthora* spp., com a presença de *Ca. L. asiaticus* na parte aérea, após

inoculações cruzadas por meio de enxertia de borbulha doente ou de exposição a psilídeos infectivos (sete dias de acesso a inoculação), com borbulha (b) e psilídeos (i) oriundos de plantas de Tahiti ou 'Valência' doente. A primeira vogal maiúscula indica a planta inoculada e a segunda a planta origem do inóculo, a vogal minúscula indica o método de inoculação.

Infecção por *Phytophthora* resultou em aumento no tempo necessário para aparecimento dos sintomas, mas somente em uma combinação (V/Vb) (Fig. 7). Para a maioria das demais combinações houve redução no tempo.

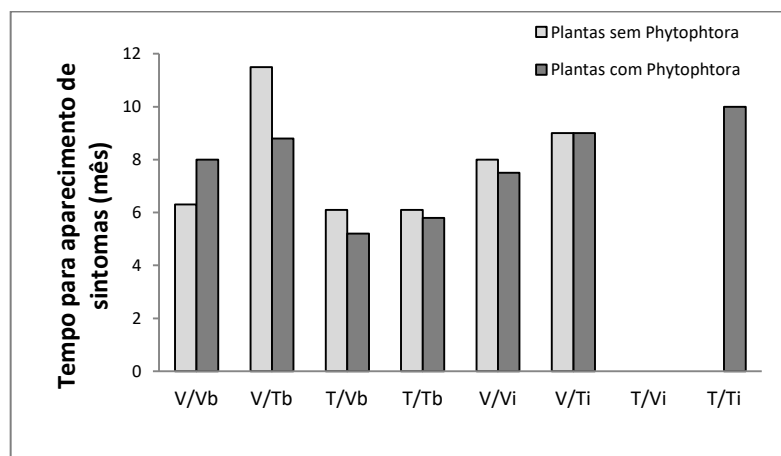


Figura 7. Tempo médio (mês) entre a data de inoculação e aparecimento dos sintomas foliares em 50% das plantas de laranja 'Valência' (V) e limoeira 'Tahiti' (T), naturalmente infectadas ou não por *Phytophthora* spp., com a presença de *Ca. L. asiaticus* na parte aérea, após inoculações cruzadas por meio de enxertia de borbulha doente ou de exposição a psilídeos infectivos (sete dias de acesso a inoculação), com borbulha (b) e psilídeos (i) oriundos de plantas de 'Tahiti' ou 'Valência' doente. A primeira vogal maiúscula indica a planta inoculada e a segunda a planta origem do inóculo, a vogal minúscula indica o método de inoculação.

De forma geral, em 'Valência' o mosquiteo foi similar ao mostrado na Figura 1, com intensidades máximas não ultrapassando o M2. Da mesma forma, em 'Tahiti' os sintomas seguiram o padrão mostrado na Figura 2, com as intensidades máximas não ultrapassando o M3.

### 3.2.5. Incidência de *Ca. L. asiaticus* no sistema radicular das plantas

Quanto à incidência de Las nas raízes, somente na combinação T/T, independente do método de inoculação, foram observadas maiores porcentagens de plantas com Las no grupo com a presença de *Phytophthora*. Em T/Ti sem a presença do oomiceto, Las foi detectada em apenas uma planta (14%), subindo para quatro (31%) no grupo de plantas com o oomiceto. Em T/Tb este aumento foi de duas (40%) para 11 (73%). Nas demais combinações, houve redução da infecção de Las em plantas com o oomiceto (Fig. 8).

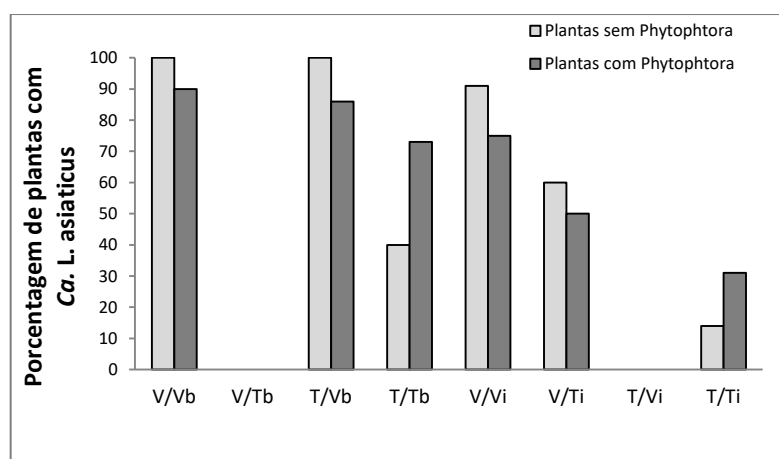


Figura 8. Porcentagem de plantas de lima ácida ‘Tahiti’ (T) e de laranja ‘Valência’ (V), naturalmente infectadas ou não por *Phytophthora* spp., com a presença de *Ca. L. asiaticus* na parte radicular, 12 meses após inoculações cruzadas por meio de enxertia de borbulha doente ou de exposição a psilídeos infectivos (sete dias de acesso a inoculação), com borbulha e psilídeos oriundos de plantas de lima ácida ‘Tahiti’ ou laranjeira ‘Valência’ doente. A primeira vogal maiúscula indica a planta inoculada e a segunda a planta origem do inóculo, a vogal minúscula indica o método de inoculação.

*Phytophthora* spp. não afetou a capacidade da bactéria em se multiplicar nas raízes. Títulos similares foram encontrados em plantas com e sem o oomiceto, tanto no 6<sup>o</sup> como no 12<sup>o</sup> mês após as inoculações (Fig. 9)

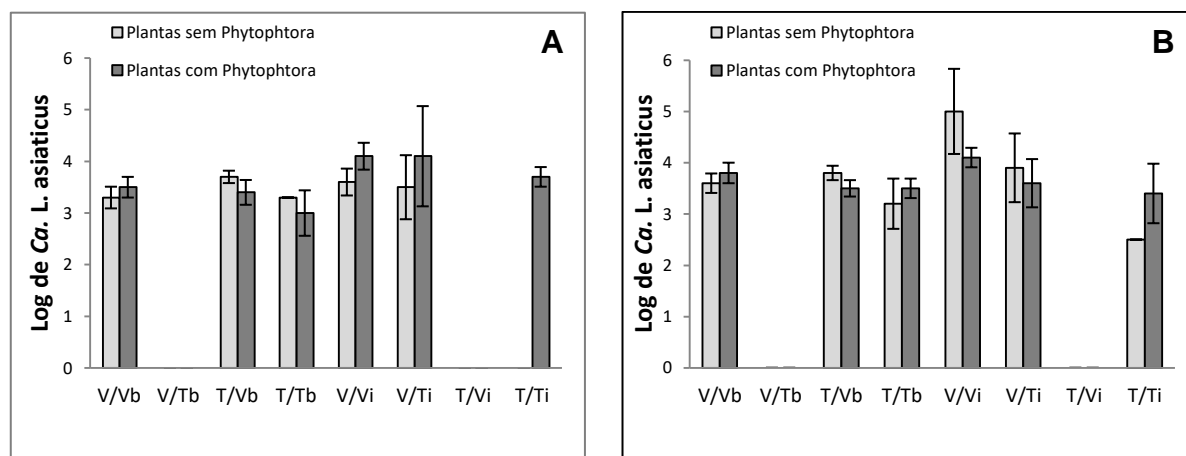


Figura 9. Título médio ( $\pm$  erro padrão) do número de amplicons de *Ca. L. asiaticus* por grama de tecido radicular de plantas de lima ácida 'Tahiti' (T) e de laranja 'Valência' (V), naturalmente infectadas ou não por *Phytophthora* spp., aos seis meses (A) e aos 12 meses (B) após inoculações cruzadas por meio de enxertia de borbulha doente ou de exposição a psilídeos infectivos (sete dias de acesso a inoculação), com borbulha (b) e psilídeos (i) oriundos de plantas de limeira ácida 'Tahiti' ou laranjeira 'Valência' doente. A primeira vogal maiúscula indica a planta inoculada e a segunda a planta origem do inóculo, a vogal minúscula indica o método de inoculação.

### 3.2.6. Influência da *Phytophthora* spp. sobre danos nas raízes

Tanto *Phytophthora* spp. como Las provocaram danos nas raízes, que, de forma geral, puderam ser mais facilmente separados entre si em limeira ácida 'Tahiti'. A Figura 10 mostra aspectos de raízes de limoeiro 'Cravo' com copa de 'Tahiti', sadias e afetadas por ambos os patógenos, isoladamente ou em conjunto. Nota-se redução do volume radicular e predomínio de radículas mais escuras em plantas com o oomiceto e apenas redução do volume radicular em plantas com Las, ou com Las + *Phytophthora* spp.



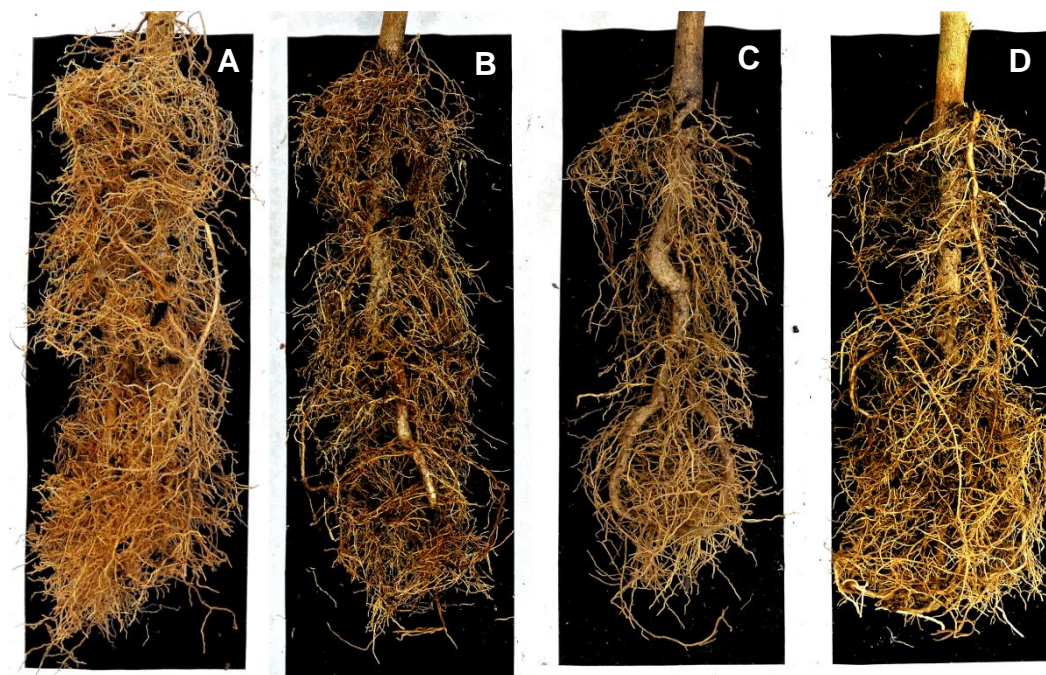


Figura 10. Raízes de limoeiro 'Cravo' com copa de limeira ácida 'Tahiti', sadia (A); infectada por *Phytophthora* spp. (B); infectada por *Candidatus Liberibacter asiaticus* (C); e com a interação das duas doenças (oomiceto + Las) (D).

A Figura 11 mostra o aspecto de raízes de limoeiro 'Cravo', com copa de laranjeira 'Valência', onde observou-se redução do volume radicular, porém as diferenças de coloração das radículas afetadas por *Phytophthora* spp. foram menos marcantes quando comparadas as raízes com copa de limeira ácida 'Tahiti'.



Figura 11. Raízes de limoeiro 'Cravo' com copa de laranjeira 'Valência', sadia (A); infectada por *Phytophthora* spp. (B); infectada por *Candidatus Liberibacter asiaticus* (C); e com os dois patógenos (oomiceto + Las) (D).

O impacto de ambas as infecções foi quantificado no 6º e 12º mês após a inoculação. Independentemente da origem do patógeno, combinação e forma de inoculação, houve aumento dos danos do 6º para o 12º mês. Entretanto, no 6º mês após inoculação, houve tendência de redução dos danos provocados por Las no grupo de plantas com *Phytophthora*, de forma mais aparente em 'Valência', inoculada por borbulhas doente ou por inseto infectivo, e quando a origem do inóculo foi a própria laranjeira (Fig. 12).

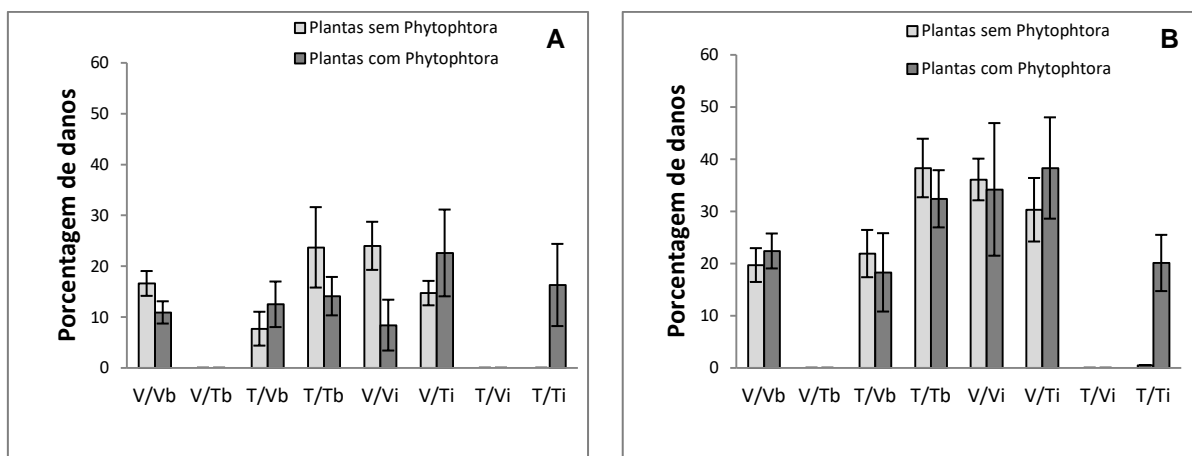


Figura 12. Porcentagem de redução do volume médio de raiz de plantas de limeira ácida ‘Tahiti’ (T) e de laranjeira ‘Valência’ (V) em relação à média dos controles, naturalmente infectadas ou não por *Phytophthora* spp., com a presença de *Ca. L. asiaticus* na parte radicular, aos seis (A) e 12 (B) meses após inoculações cruzadas por meio de enxertia de borbulha doente ou de exposição a psilídeos infectivos (sete dias de acesso a inoculação), com borbulha (b) e psilídeos (i) oriundos de plantas de limeira ácida ‘Tahiti’ ou laranjeira ‘Valência’ doente. A primeira vogal maiúscula indica a planta inoculada e a segunda a planta origem do inóculo, a vogal minúscula indica o método de inoculação.

#### 4. DISCUSSÃO

Nesse estudo, plantas jovens de limeira ácida ‘Tahiti’, cultivar ‘Quebragallo’, e laranjeira doce ‘Valência’ foram comparadas quanto aos sintomas foliares e danos em raízes induzidos pela bactéria *Ca. L. asiaticus*. Também foi avaliado o potencial da ‘Tahiti’ em servir como fonte de inóculo para si própria e para ‘Valência’, por meio da inoculação da bactéria por enxertia ou por insetos infectivos. Inesperadamente, diversas plantas experimentais foram infectadas por *Phytophthora* spp., oomiceto causador de podridão de raízes. Embora não se saiba o momento em que ocorreu a infecção por este oomiceto, sua presença permitiu avaliar, mesmo que de forma preliminar, o seu papel na interação entre Las e a planta cítrica. Vale lembrar que co-infecções desses patógenos não são incomuns no campo. Não se observou amarelecimento de folhas em plantas com o oomiceto, porém sem Las,

contrário do que se observa no campo (LARANJEIRA et al., 2005). Os sintomas foliares de HLB também não foram afetados por *Phytophthora*.

Em 'Tahiti', os sintomas foliares de HLB tiveram padrões distintos dos observados em laranjeiras. Em 'Tahiti' o amarelo foi mais intenso, com maior contraste entre esse amarelo com o verde normal, facilitando a visualização. Além disso, as nervuras salientes continuaram com coloração verde, enquanto que em laranjeiras as nervuras salientes tornam-se amareladas e/ou amarronzadas (BOVÉ, 2006). O mosqueado foliar é atribuído principalmente ao rompimento da membrana dos tilacóides pela pressão do acúmulo de amido que, por sua vez, é causado pelo bloqueio do fluxo da seiva do floema (ACHOR et al., 2010). As causas das diferenças no padrão de sintomas entre essas plantas não são conhecidas. Poderiam estar associadas as diferenças no número de cloroplastos, com as laranjeiras possuindo menor quantidade, ou no nível de dano causado pelo acúmulo de amido, neste caso menor em laranjeiras. Em 'Tahiti' a ocorrência de sintomas induzidos pela anomalia genética conhecida como *Wood Pocket*, caracterizados por mosaico nas folhas, com tecido esverdeado contrastando com o limbo amarelado, confunde-se também com o mosqueado de HLB. Entretanto, essa anomalia manifesta-se de modo diferente na cultivar 'Quebra-galho'. Neste caso, não ocorrem sintomas típicos nas folhas, os sintomas são rupturas da casca dos ramos, com o desenvolvimento de tecido clorofilado próximo ao lenho, visível após a remoção da casca do ramo. (FUNDECITRUS, 2017).

Nas plantas experimentais, foram observadas baixas intensidades de sintomas foliares em todas as plantas infectadas por Las, nas quais a severidade não ultrapassou o M2 em 'Valência', ou o M3 em 'Tahiti', em escala onde o máximo era M4. Este fato pode ser devido ao forte esquema de fertilização e adequada irrigação das plantas. Redução na intensidade de sintomas foliares de HLB por meio de fertilizações foi demonstrada no campo por Zhao et al. (2013).

Neste estudo a área amarela do limbo foliar também se correlacionou com título de Las. Além disso, Las foi detectada em 'Tahiti' também em folhas assintomáticas, o que é justificável pois se tratava de folhas removidas de plantas doentes no campo, embora da parte não afetada pela doença. Presença de

bactérias em partes assintomáticas de plantas infectadas também foram observadas em laranjeiras (LOPES et al. 2013).

No que diz respeito às inoculações cruzadas, a presença de *Phytophthora* afetou diversos aspectos da interação Las-citros. Na parte aérea, o oomiceto aparentemente estimulou a planta a exibir sintomas foliares mais cedo. No sistema radicular, embora *Phytophthora* tenha causado necrose das radículas, resultando na morte das raízes e conseqüentemente redução da biomassa radicular, como observado por Tarnowski et al. (2013), este patógeno não causou nenhum impacto extra na redução de volume, avaliado 12 meses após as inoculações. Esses resultados contradizem os encontrados por Ann, Ko e Su (2004) onde, em laranjeira 'Azeda', a combinação dos dois patógenos causou maior redução na biomassa do que cada um sozinho. Las por si só reduz a quantidade de raízes (JOHNSON et al., 2014), como verificado neste estudo. A não observação de efeito aditivo ou sinérgico dos dois patógenos pode ser devido ao forte esquema de fertilização, como já comentado.

A eficiência de inoculação de Las foi dependente da combinação de variedades. Nas plantas de 'Valência' inoculadas por borbulhas oriundas de 'Tahiti' doente, Las foi detectada em folhas de ramos opostos ao inoculado sem mesmo ser detectada nas raízes. Estes resultados são contrários aos encontrados por Johnson et al. (2014) que encontraram Las nas raízes de plantas infectadas antes mesmo que na copa, sugerindo que a bactéria acompanha passivamente o fluxo da seiva do floema, seguindo sempre a sazonalidade dos fluxos de crescimento, tanto na parte aérea como na de raiz, mais recentemente comprovado por Raiol Júnior et al. (2017).

Observou-se também neste estudo, que as plantas de 'Tahiti' não foram colonizadas quando inoculadas por insetos infectivos vindos de laranjeira 'Valência' doente. Isto pode estar associado à baixa preferência de *D. citri* por este hospedeiro. Embora os insetos estivessem altamente infectivos (conforme demonstrado pela alta taxa de infecção em 'Valência' inoculada por insetos oriundos da própria 'Valência'), eles podem não ter se alimentado ativamente quando aprisionados em plantas de 'Tahiti', ou o tempo necessário para transmissão da bactéria em 'Tahiti' pode ser

maior que em 'Valência'. Evidência da menor preferência de *D. citri* por 'Tahiti' é apresentada no segundo capítulo desta tese.

Em suma, este estudo mostrou que o mosqueado de HLB presente em folhas de limeira ácida 'Tahiti' é mais intenso do que o observado em folhas de laranjeira 'Valência'. Os danos nas raízes em limoeiro 'Cravo' tendo a 'Tahiti' como copa foram similares aos encontrados em limoeiro 'Cravo' tendo como copa a laranjeira 'Valência'. Plantas de limeira ácida 'Tahiti' podem atuar como fonte de inóculo para si mesmas e para laranjeiras. A demonstração de que plantas de 'Tahiti' podem atuar como fontes de Las indica que plantas de pomares abandonados e em fundo de quintal, sem qualquer ação de controle do inseto vetor, devem estar contribuindo para a disseminação de Las de forma mais intensa do que se imagina. Devem, portanto, ser eliminadas para, desta forma, contribuir para o sucesso do manejo da doença.

## 5. REFERÊNCIAS

ACHOR, D. S.; ETXEBERRIA, E.; WANG, N.; FOLIMONOVA, S. Y.; CHUNG, K. R., ALBRIGO, L. G. Sequence of anatomical symptom observations in citrus affected with huanglongbing disease. **Plant Pathology Journal**, v. 9, n. 2, p. 56-64, 2010.

ANN, P. J., KO, W. H., SU, H.J. Interaction between Likubin bacterium and *Phytophthora parasitica* in citrus hosts. **European Journal of Plant Pathology**, v. 110, n. 1, p. 1-6, 2004.

BOVÉ, J. M. Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. **Journal of Plant Pathology**, v. 88, n. 1, p.7–37, 2006.

CAPOOR, S.; RAO, D.; VISWANATH, S. *Diaphorina citri* Kuway., a vector of the greening disease of citrus in India. **Indian Journal of Agricultural Science**, v. 37, p.572–579, 1967.

CEAGESP – COMPAINHA DE ENTREPÓSITOS E ARMAZÉNS GERAIS DE SÃO PAULO. **Classificação do limão (lima ácida ‘Tahiti’) *Citrus latifolia* Tanaka**. Programa brasileiro para a melhoria dos padrões comerciais e embalagens de hortigranjeiros. Disponível em:< <http://www.ceagesp.gov.br>>. Acesso em: 22/05/2018.

CIFUENTES-ARENAS, J. C.; GOES, A.; MIRANDA, M. P.; BEATTIE, G. A. C.; LOPES, S. A. Citrus flush shoot ontogeny modulates biotic potential of *Diaphorina citri*. **PLoS ONE**, v. 13, n. 1, 2018. Disponível em: <Doi: e0190563>.

COLETTA-FILHO, H. D.; TARGON, M. L. P. N.; TAKITA, M. A.; DE NEGRI, J. D.; POMPEU, J.; MACHADO, M. A.; AMARAL, A. M.; MULLER, G. W. First Report of



the Causal Agent of Huanglongbing (“*Candidatus Liberibacter asiaticus*”) in Brazil. **Plant Disease**, v. 88, n. 12, p.1382–1382, 2004.

FUNDECITRUS 2017: **Identificação de HLB em limão é mais difícil**. Araraquara - SP, Brazil: Fundecitrus, 2017.

HALL, D. G.; RICHARDSON, M. L.; AMMAR, E. D.; HALBERT, S. E. Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, vector of citrus huanglongbing disease. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 146, n. 2, p. 207–223. 2013.

HUNG, T. H.; HUNG, S. C.; CHEN, C. N.; HSU, M. H.; SU, H. J. Detection by PCR of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the bacterium causing citrus huanglongbing in vector psyllids: application to the study of vector–pathogen relationships. **Plant Pathology**, v. 53, p. 96–102, 2004. Disponível em:<Doi:/10.1111/j.1365-3059.2004.00948.x>.

ICA. Resolución No. 00002390. Bogotá, Colombia: Instituto Colombiano Agropecuario, 2015. Disponível em: <<http://www.ica.gov.co/getattachment/814e6823aa26-49ee-a2c0a814e2e61967/2015R2390.aspx>>.

JOHNSON, E. G.; WU, J.; BRIGHT, D. B.; GRAHAM, J. H. Association of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” root infection, but not phloem plugging with root loss on huanglongbing-affected trees prior to appearance of foliar symptoms. **Plant Pathology**, v. 63, p. 290–298, 2014. Disponível em:<Doi: 10.1111 /ppa.12109>.

LARANJEIRA, F.F.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; AGUILAR VILDOSO, C.A.; COLLETA FILHO, H.D. Fungos procariotos e doenças abióticas. In: MATTOS JÚNIOR, D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; PONPEU JÚNIOR, J. **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico e Fundag. Centro APTA Citros Sylvio Moreira, p.509-566, 2005.



LI, W.; HARTUNG, J. S.; LEVY, L. Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus huanglongbing. **Journal of Microbiological Methods**, v. 66, n.1, p. 104–115, 2006.

LI, W.; LEVY, L.; HARTUNG, J. S. Quantitative distribution of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” in citrus plants with citrus huanglongbing. **Phytopathology**, v. 99, n. 2, p.139–144, 2009.

LOPES, S. A.; FRARE, G. F. Graft Transmission and Cultivar Reaction of Citrus to “*Candidatus Liberibacter americanus*.” **Plant Disease**, v. 92, n. 1, p. 21–24, 2008.

LOPES, S. A.; LUIZ, F. Q. B. F.; MARTINS, E. C.; FASSINI, C. G.; SOUSA, M. C.; BARBOSA, J. C; BEATTIE, G. A. C. “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” titers in citrus and acquisition rates by *Diaphorina citri* are decreased by higher temperature. **Plant Disease**, v. 97, n. 12, p. 1563–1570, 2013.

LUIS, M.; COLLAZO, C.; LLAUGER, R.; BLANCO, E.; PEÑA, I.; LÓPEZ, D.; TANAKA, F. A. O. Occurrence of citrus Huanglongbing in Cuba and association of the disease with *Candidatus liberibacter asiaticus*. **Journal of Plant Pathology**, v. 91, p. 709-712, 2009.

MATHERON, M. E.; MATEJKA, J. C. Effect of sodium tetrathiocarbonate, metalaxyl and fosetyl-Al on development and control of *Phytophthora* root rot of citrus. **Plant Disease**, v.75, p.264-268, 1991.

MATOS, L.; HILF, M. E.; CAMEJO, J. First report of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ associated with citrus Huanglongbing in the Dominican Republic. **Plant Disease**, Disease Notes, v. 93, n. 6, p. 668, 2009.

McCLEAN, A. P. D.; OBERHOLZER, P. C. J. Citrus psyllid, a vector of the greening disease of sweet orange. **African Journal of Agricultural Science**, v. 8, p. 297-298, 1965.

MENDONÇA, W. J. Q. F. **Evolução da infecção por *Candidatus Liberibacter asiaticus* e dos sintomas de Huanglongbing em plantas cítricas no sul do Triângulo Mineiro e região central do Estado de São Paulo**. 2015. 54 f. Dissertação (Mestrado profissional em Controle de doenças e pragas dos citrus) - Fundo de Defesa da Citricultura, Araraquara, 2015.

MURRAY, M. G.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 8, n. 19, p. 4321–4326, 1980.

RAIOL-JÚNIOR, L. L.; CIFUENTES-ARENAS, J. C.; LOPES, S. A. Speed of *Candidatus Liberibacter asiaticus* movement in citrus plants. **Journal of Citrus Pathology**, v. 4, n. 1, p. 45, 2017.

SENASA. Resolución 959/2009: Declara la emergencia fitosanitaria con respecto al Huanglongbing (HLB) en todo el Territorio Nacional. Argentina: [s.n.]. Disponível em: <<http://www.senasa.gov.ar/contenido.php?to=n&in=1402&io=11771>>.

SENAVE. Resolución No 80 de 2013: “Por la cual se declara la emergencia fitossanitária por la presencia de la plaga denominada Huanglongbing (HLB) de los cítricos, en todo el territorio nacional”. Paraguay: [s.n.]. Disponível em: <<http://www.senave.gov.py/docs/resoluciones/senave/Res80-13.pdf>>.

TARNOWSKI, T.; PALMATEER, A. J., MAGUIRE, I.; CRANE, J. H. Florida Plant Disease Management Guide: ‘Tahiti’ Lime (*Citrus latifolia*), 2013. Disponível em <[https://www.researchgate.net/publication/237573837\\_Florida\\_Plant\\_Disease\\_Management\\_Guide\\_'Tahiti'\\_Lime\\_Citrus\\_latifolia](https://www.researchgate.net/publication/237573837_Florida_Plant_Disease_Management_Guide_'Tahiti'_Lime_Citrus_latifolia)>.

TATINENI, S.; SAGARAM, U. S.; GOWDA, S.; ROBERTSON, C. J.; DAWSON, W. O.; IWANAMI, T. Planta Distribution of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” as Revealed by Polymerase Chain Reaction (PCR) and Real-Time PCR. **Phytopathology**, v. 98, p. 592–599, 2008.

TEIXEIRA, D. C.; DANET, J. L.; EVEILLARD, S.; MARTINS, E. C.; JESUS JUNIOR, W. C.; YAMAMOTO, P. T.; LOPES, S. A.; Bassanezi, B. R.; Ayres J. A., Saillard C, Bové J. M. Citrus huanglongbing in São Paulo State, Brazil: PCR detection of the “*Candidatus*” Liberibacter species associated with the disease. **Molecular and Cellular Probes**, v. 19, n.3, p. 173–179, 2005.

TEIXEIRA, D. C.; SAILLARD, C.; COUTURE, C.; MARTINS, E. C.; WULFF, N. A.; EVEILLARD-JAGOUEIX, S.; YAMAMOTO, P. T.; AYRES, A. J.; BOVÉ, J. M. Distribution and quantification of ‘*Candidatus* Liberibacter americanus’, agent of huanglongbing disease of citrus in São Paulo State, Brasil, in leaves of an affected sweet orange tree as determined by PCR. **Molecular and Cellular Probes**, v. 22, n. 3, p.139–150, 2008.

TIWARI, S.; MANN R. S.; ROGERS M. E.; STELINSKI, L. L. Insecticide resistance in field populations of Asian citrus psyllid in Florida. **Pest Management Science**, v. 67, n. 10, p. 1258-1268, 2011.

WANG, N.; TRIVEDI, P. Citrus huanglongbing: a newly relevant disease presents unprecedented challenges. **Phytopathology**, v. 103, n. 7, p. 652–65, 2013.

YAMAMOTO, P. T.; FELIPPE, M. R.; GARBIM, L. F.; COELHO, J. H. C.; XIMENES, N. L.; MARTINS, E. C. *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera: Psyllidae): vector of the bacterium *Candidatus* Liberibacter americanus. In Proceedings of the Huanglongbing — Greening International Workshop, Ribeirão Preto, SP, p. 96, 2006.

ZHAO H.; SUN, R.; ALBRECHT, U.; PADMANABHAN, C.; WANG, A.; COFFEY, M. D.; GIRKE, T.; WANG, Z.; CLOSE, T. J.; ROOSE, M.; YOKOMI, R. K. Small RNA profiling reveals phosphorus deficiency as a contributing factor in symptom expression for citrus Huanglongbing disease. **Molecular Plant Advance**, v. 6, n. 2. p. 1-11, 2013.