

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

**REAÇÃO DE 16 PORTA-ENXERTOS SOB LARANJEIRA
'VALÊNCIA' AO AGENTE CAUSAL, *Candidatus Liberibacter
asiaticus***

Mário dos Santos

Engenheiro Agrônomo

Fevereiro 2013

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

**REAÇÃO DE 16 PORTA-ENXERTOS SOB LARANJEIRA
'VALÊNCIA' AO AGENTE CAUSAL, *Candidatus Liberibacter
asiaticus***

Mário dos Santos

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Sanches Stuchi

Co-orientador: Dr. Helvécio Della Coletta Filho

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, para a obtenção do título de Mestre em Agronomia. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas.

2013

Santos, Mário dos
S231r Reação de 16 porta-enxertos sob laranjeira 'Valência' ao agente causal, *Candidatus* Liberibacter asiaticus/ Mário dos Santos. Jaboticabal, 2013
xvii, 52 p. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013
Orientador: Eduardo Sanches Stuchi
Banca examinadora: Antonio Baldo Geraldo Martins, Simone Rodrigues da Silva

Bibliografia

1. HLB. 2. Citrus, 3. Greening. 4. q-PCR. I. Título. II. Jaboticabal - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.52:634.31



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: REAÇÃO DE 16 PORTA-ENXERTOS SOB LARANJEIRA 'VALÊNCIA' AO AGENTE CAUSAL, *Candidatus Liberibacter asiaticus*

AUTOR: MÁRIO DOS SANTOS

ORIENTADOR: Prof. Dr. EDUARDO SANCHES STUCHI

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. HELVÉCIO DELLA COLETTA FILHO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM AGRONOMIA (GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. EDUARDO SANCHES STUCHI
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária / Bebedouro/SP

Prof. Dr. ANTONIO BALDO GERALDO MARTINS
Departamento de Produção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Profa. Dña. SIMONE RODRIGUES DA SILVA
Universidade de São Paulo / Piracicaba/SP

Data da realização: 22 de fevereiro de 2013.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Mário dos Santos, nascido em 12 de agosto de 1987, em Goiânia, GO. Filho de Sérgio Santos da Silva e Deisy Teixeira Borges da Silva. Iniciou seus estudos em Agronomia pela Universidade Estadual de Goiás (UEG), sediada em Palmeiras de Goiás, onde se graduou em Engenharia Agrônômica, no mês de dezembro de 2010. Foi bolsista de iniciação científica (IC) de 2008 a 2010 na própria instituição de ensino e desenvolveu pesquisas relacionadas ao melhoramento genético de culturas anuais, apoiadas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Arroz e Feijão) localizada em Santo Antônio de Goiás, GO. Em 2011, ingressou como aluno regular no curso de Mestrado do programa de Pós-graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” (UNESP) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) de Jaboticabal, na qual foi contemplado com bolsa do programa - CAPES. Seus atuais trabalhos de pesquisa contam com o apoio do Centro de Citricultura "Sylvio Moreira" do Instituto Agrônômico, em Cordeirópolis e da Estação Experimental de Citricultura de Bebedouro (EECB).

“Nos SONHOS como no AMOR, não há IMPOSSIBILIDADES.”

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo livre arbítrio.

Aos meus pais, Sérgio Santos da Silva e Deisy Teixeira Borges da Silva, pelo amor incondicional.

À minha noiva, Andressa Padilha Mangile, pela compreensão.

À minha família, especialmente, as minhas afilhadas Maria Eduarda e Camilly, pequenas crianças e amores.

Aos Pesquisadores Dr. Eduardo Sanches Stuchi e Dr. Helvécio Della Coletta Filho, pela orientação.

À UNESP - Jaboticabal, por todas as oportunidades que me proporcionou.

À cidade de Jaboticabal, por ter me acolhido tão bem durante minha estadia.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado.

Aos funcionários do Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC de Cordeirópolis e da Estação Experimental de Citricultura de Bebedouro, que permitiram o desenvolvimento da pesquisa e deram todo apoio para que esta pudesse ser realizada.

Muito obrigado!

SUMÁRIO

RESUMO	xv
SUMMARY	xvii
I. INTRODUÇÃO	1
II. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Aspectos gerais e melhoramento do gênero <i>Citrus</i>	4
2.2. Importância e histórico da utilização de porta-enxerto.....	5
2.3. Laranjeira ‘Valência’.....	7
2.4. Bactérias associadas ao HLB.....	7
2.5. Sintomatologia e controle da doença.....	8
2.6. PCR quantitativo.....	11
III. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1. Inoculações com <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> ; eficiência e quantificação.....	14
3.1.1. Material vegetal e fonte de inóculo.....	14
3.1.2. Amostragem e extração de DNA.....	15
3.1.3. Reações de q-PCR e quantificação Las nas amostras.....	16
3.2. Respostas biométricas.....	16
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
4.1 Avaliação de Las nas plantas; copa e porta-enxerto.....	18
4.2 Respostas biométricas.....	23
V. CONCLUSÕES	44
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

REAÇÃO DE 16 PORTA-ENXERTOS SOB LARANJEIRA 'VALÊNCIA' AO AGENTE CAUSAL, *Candidatus Liberibacter asiaticus*

RESUMO – O Huanglongbing (HLB ou greening) é uma doença altamente destrutiva que ataca a maioria das espécies de citros. Trabalhos e observações recentes sugerem que os porta-enxertos podem ter influência na incidência e severidade da doença. O presente projeto teve como objetivo monitorar a reação de 16 variedades de porta-enxertos sob laranjeira 'Valencia' frente ao *Candidatus Liberibacter asiaticus* por meio da técnica de q-PCR, e suas respostas biométricas, tais como: diâmetro 2 cm a baixo e a cima da linha da enxertia, altura do colo da planta ao enxerto e do enxerto a poda, comprimento do lançamento, peso fresco da parte aérea e do sistema radicular, volume do sistema radicular, e análise foliar de macro e micronutrientes. Os porta-enxertos empregados foram os principais em uso comercial: trifoliato 'Flying Dragon', limoeiro 'Cravo', '*Poncirus trifoliata*', tangerineira 'Sunki' e citrumelo 'Swingle', testados experimentalmente com bons resultados: citrangeiros 'Troyer' e 'Carrizo' tetraplóides, HRS 643, HRS 702, HRS 849 e HRS 812, em fase de experimentação: 'Clementina x trifoliata' (1615), 'Cleópatra x Swingle' (1614), 'Cleópatra x Rubidoux' (1600) e 'Changsha x English Large', além de um híbrido 'Rhode Red + Volkameriano', também em fase experimental. O experimento foi conduzido no Centro de Citricultura Sylvio Moreira, em Cordeirópolis. Cada associação copa e porta-enxerto apresentaram sete plantas, cinco delas foram inoculadas e duas não inoculadas. Para analisar a evolução da bactéria nas plantas foram realizadas três amostragens (8, 12, 16 meses após a inoculação), de pecíolos e nervuras centrais das folhas visualmente infectadas e fragmentos de aproximadamente 2 cm² da casca dos porta-enxertos. Ao final do experimento foi realizado as avaliações biométricas na Estação Experimental de Citricultura de Bebedouro (SP), e coletados fragmentos da casca das raízes dos porta-enxertos para verificar a presença da bactéria no sistema radicular por meio de q-PCR. As plantas enxertadas em 'Carrizo' tetraplóide mostram-se tolerantes ao HLB, e as variáveis biométricas parecem não serem adequadas para a avaliação da reação ao *Ca. Liberibacter asiaticus* de variedades porta-enxerto quando se utiliza plantas enxertadas.

Termos para indexação: HLB, citrus, greening, q-PCR.

REACTION OF 16 PORTA-ENXE RTOS IN ORANGE 'VALÊNCIA' THE AGENT CAUSAL, *Candidatus Liberibacter asiaticus*

ABSTRACT – The Huanglongbing (HLB or greening) is a highly destructive disease that affects most citrus cultivars, species and hybrids. Recent works and researches suggest that rootstock variety influenced disease severity and incidence. This work aimed to characterize variation in the reaction of 16 cultivars of rootstocks grafted with a sweet orange 'Valência' scion in response to *Candidatus Liberibacter asiaticus* by q-PCR and biometric characteristics such as: stem diameter 2 cm above and below the grafting, collar height of the plant to the graft, collar height of the graft to the pruning, length of the first bud after pruning, fresh weight of aerial part of the plant, fresh weight of root system, root volume and leaf analysis of macro and micronutrients. The rootstocks used in the work were the major commercial cultivars: trifoliolate orange 'Flying Dragon', Rangpur lime, 'Poncirus trifoliata', mandarin 'Sunki' and citrumelo 'Swingle', tested experimentally with good results, citrange 'Troyer' and 'Carrizo' tetraploid, HRS 643, HRS 702, HRS 849 and HRS 812, in experimental stage, 'Clementina x trifoliata' (1615), 'Cleópatra x Swingle' (1614), 'Cleópatra x Rubidoux' (1600) and 'Changsha x English Large', plus a hybrid 'Rhode Red + Volkameriano'. The experiment was conducted at Centro de Citricultura Sylvio Moreira in Cordeirópolis. Each cultivar had seven plants, five were inoculated and two were used as control plants. To evaluate the growth of bacteria in plants, three samplings were done at (8, 12, 16 months after inoculation) by visually infected leaves and fragments of approximately 2 square centimeter of bark from rootstock. At the end of the experiment, biometric evaluations was conducted in Estação Experimental de Citricultura de Bebedouro by collecting bark fragments from the roots of rootstocks and confirming the presence of bacteria in the root system by q-PCR. In conclusion, plants grafted on citrange 'Carrizo' showed to be tolerant to HLB and the biometric variables used in this work were not effective to evaluate the response of cultivars of rootstock to *Ca. Liberibacter asiaticus* on grafted plants.

Keywords: HLB, citrus, greening, q-PCR.

I. INTRODUÇÃO

O setor agroindustrial cítrico brasileiro apresenta números que impressionam. Em nenhum outro produto de exportação do agronegócio o país tem expressividade semelhante. De cada cinco copos de suco de laranja consumidos no mundo, três são produzidos nas fábricas brasileiras. O país detém atualmente mais da metade da produção de suco de laranja sendo 98% destinados a exportação. Em 2010 foram quase 165 milhões de árvores produzindo e na Flórida, seu principal concorrente, 60 milhões. Flórida e São Paulo detêm 81% da produção mundial de suco. Só o estado de São Paulo, 53% do total. Perto de 400 municípios paulistas se dedicam ao cultivo da laranja, de onde saem 80% da produção nacional (NEVES et al., 2010).

A maioria dos países cítricos cultiva a laranja Valência e, em muitos deles, ela representa a principal variedade comercial, havendo diversos estudos, nesses países, com o objetivo de selecionar material superior (PIO et al., 2005).

Atualmente o huanglongbing (HLB) ou greening é a doença mais importante e destrutiva da citricultura mundial. Observações de pomares afetados em diferentes regiões cítricas do mundo, inclusive no Estado de São Paulo, revelam que pomares inteiros podem tornar-se inviáveis economicamente entre sete e dez anos após o aparecimento da primeira planta sintomática, se medidas de controle não forem adotadas. Esse tempo pode ser menor para pomares jovens, de até quatro anos, os quais se tornam economicamente inviáveis em até cinco anos (GOTTWALD et al., 2007).

Em 2004, o HLB foi detectado nos pomares paulistas na região de Araraquara (COLETTA-FILHO et al., 2004). Sabe-se que três espécies de bactérias, conhecidas como *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Ca. L. africanus* e *Ca. L. americanus*, têm sido associadas ao HLB (BOVÉ et al., 2008), sendo que em São Paulo ocorrem as espécies americana e asiática, sendo esta última prevalente nas plantas com sintomas de HLB atualmente no referido Estado. Essas bactérias são capazes de habitar o interior dos vasos de floema, portanto são intracelulares, e causam expressivos distúrbios no metabolismo de seus hospedeiros levando ao quadro de sintomatologia conhecido com HLB (BELASQUE JUNIOR et al., 2009).

A doença é de difícil manejo devido à natureza não-específica dos sintomas

que causa, prolongada latência no campo, distribuição irregular do patógeno na planta, efeitos do ambiente (em especial da temperatura) sobre a expressão dos sintomas e possivelmente sobre a multiplicação da bactéria, variações potenciais de resistência à bactéria tanto pelas espécies cítricas quanto pelo inseto vetor *Diaphorina citri* Kuwayama, e, finalmente, pela natureza fastidiosa da bactéria (BOVÉ, 2006; MANJUNATH et al., 2008).

Não existem métodos de controle curativos para o HLB que possam ser usados em pomares comerciais. Desta forma, prevenir a infecção das plantas é fundamental no controle da doença. O controle preconizado envolve o plantio de mudas saudáveis, a eliminação de plantas doentes e o controle do inseto vetor, *D. citri*. Assim, o manejo do HLB tem como fundamento a prevenção de novas infecções em plantas ainda saudáveis, ou seja, baseia-se na redução do inóculo presente em plantas e insetos vetores (BELASQUE JUNIOR et al., 2010).

Segundo Terssi (2010), a manutenção de plantas com HLB em propriedades de produção de citros que não aplicam ao menos quatro inspeções anuais seguindo-se de erradicação das plantas com a doença, tal como regulamentadas pela IN-53, poderá dificultar ou mesmo inviabilizar a produção econômica de citros em propriedades vizinhas ou próximas, mesmo que estas apliquem a metodologia de inspeção e erradicação previstas na legislação.

O patossistema HLB (planta-patógeno-vetor-ambiente) ainda é muito pouco conhecido, porém se sabe que as laranjas doces [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck], as tangerinas (*C. reticulata* Blanco), e híbridos de tangerinas são os mais severamente afetados. Os pomelos (*Citrus paradisi* Macfad.), laranjas azedas (*C. aurantium* L.), e limões (*C. limon* L.) são moderadamente afetados. A lima ácida 'Galego' (*C. aurantifolia* Christm. Swingle), as toranjas (*Citrus grandis* Osbeck) e os trifoliatas (*P. trifoliata* Raf.), incluindo seus híbridos, são considerados mais tolerantes (GARNIER, 1984).

Estudos de variedades copa e porta-enxerto podem superar fatores abióticos e bióticos e obter ganhos de produtividade. Com a técnica de enxertia foi possível à obtenção de combinações copa-cavalo tolerantes que mantiveram sob controle o efeito algumas doenças graves para a citricultura como gomose de *Phytophthora* spp., tristeza dos citros e exocorte (POMPEU JÚNIOR, 2005).

A verificação de quaisquer níveis de tolerância ao HLB em laranjeira 'Valência' em combinação com qualquer porta-enxerto contribuiria para o avanço

significativo no manejo do HLB, que em curto a médio tempo ainda estará baseado na supressão de inóculo e do vetor associado.

O presente projeto teve como objetivo monitorar a reação de 16 variedades de porta-enxertos sob laranjeira 'Valencia' frente ao *Candidatus Liberibacter asiaticus* por meio da técnica de q-PCR, e suas respostas biométricas.

II. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aspectos gerais e melhoramento do gênero *Citrus*

Um dos sistemas de classificação mais utilizado, proposto por Swingle (1943), reconheceu 16 espécies para *Citrus* (ARAÚJO; ROQUE, 2005) e, dentre elas, estão as espécies de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck), tangerinas (*C. reticulata* Blanco, *C. clementina* hort. ex Tan., *C. tangerina* hort. ex Tan.) e limões (*C. limon* L. Burm. f.) (SWINGLE; REECE, 1967).

O gênero *Citrus* pertence à família Rutaceae, subfamília Aurantioideae, tribo Citreae e subtribo Citrinae e é originado da região sudeste do continente asiático (SWINGLE; REECE, 1967). Os citros apresentam uma grande diversidade espécies, variedades e clones. No entanto, um número relativamente pequeno é utilizado nos atuais plantios comerciais. Como espécies de propagação comercial exclusivamente vegetativa, os citros tiveram na seleção massal a via mais rápida de melhoramento, principalmente, por apresentarem elevadas taxas de mutações somáticas, promovendo, com frequência, o surgimento de novas seleções que se tornaram variedades comerciais (MACHADO et al., 2005).

Os representantes desse gênero apresentam um conjunto básico cromossômico $x = 9$, sendo relatados poucos indivíduos triplóides e tetraplóides (ARAÚJO; ROQUE, 2005). A condição mais frequente do gênero é a diploidia ($2n = 2x = 18$) (MOREIRA; PIO, 1991).

O Estado da Flórida foi pioneiro no programa de melhoramento de citros. Iniciou se em 1893 por Swingle e Webber, e desde então, vários programas com objetivos diversos foram desenvolvidos em todo o mundo nesta área (DAVIES; ALBRIGO, 1994). O melhoramento genético de citros pode ser dividido em duas categorias: o melhoramento para variedades copa e o melhoramento para variedades porta-enxerto, cada um com seus objetivos específicos (POMPEU JUNIOR, 2005).

2.2. Importância e histórico da utilização de porta-enxerto

O porta-enxerto induz à copa alterações no crescimento, tamanho, precocidade de produção, produção, maturação e peso dos frutos, coloração da casca e do suco, teor de açúcares, de ácidos e de outros componentes do suco, permanência dos frutos na planta e sua conservação após a colheita, fertilidade do pólen, absorção, síntese e utilização de nutrientes, transpiração e composição química das folhas, resposta a produtos de abscisão dos frutos e folhas, tolerância à salinidade, à seca, ao frio, a doenças e pragas. As influências da copa sobre o porta-enxerto são menos visíveis, mas ocorrem no desenvolvimento do sistema radicular, resistência ao frio, à seca e a doenças e pragas (POMPEU JÚNIOR, 2005).

Para entender o conceito de resistência ou suscetibilidade a determinado fator é necessário considerar que muitas doenças de citros são doenças exclusivas da copa, ou do porta-enxerto, ou resultante da interação entre eles. Assim, qualquer estratégia de melhoramento deve levar em consideração a natureza da interação planta-patógeno e copa-porta-enxerto (MARENCO, 2009).

Uma alternativa racional frente ao usual controle químico das doenças ou de seus vetores é a obtenção de genótipos com maior resistência aos principais patógenos. Sendo assim, os objetivos de programas de melhoramento genético e seleção dos citros focam a obtenção de novos porta-enxertos e variedades copa que sejam resistentes as doenças e pragas, e mais adaptados a condições abióticas adversas (CRISTOFANI et al., 1999).

A partir do início do século, quando as vantagens da utilização de plantas enxertadas ficaram claras, até a década de 20, a laranja 'Caipira' foi o principal porta-enxerto para citros no Brasil. Devido a sua baixa tolerância à seca e à gomose de *Phytophthora*, foi substituída pela laranja 'Azeda' que predominou até a década de 40. Com o advento da tristeza, foi necessária a mudança de porta-enxertos, abandonando-se a laranja Azeda e implementando o uso de cavalos tolerantes. Estendeu-se o uso do '*Poncirus trifoliata*' e seus híbridos, principalmente os citranges 'Troyer' e 'Carrizo', bem como o limoeiro 'Cravo' que passou a ser o principal porta-enxerto utilizado no Brasil (CARLOS et al., 1997).

Por várias décadas o limoeiro 'Cravo' liderou significativamente a lista dos porta-enxertos utilizados na citricultura, e dados coletados em viveiros apontaram que este cavalo chegou a representar de 70 a 80% dos porta-enxertos comerciais. Com o novo estreitamento da base genética das cultivares de citros novos problemas surgiram, o limoeiro 'Cravo' se mostrou suscetível à gomose de *Phytophthora*, e posteriormente estudos comprovaram sua fragilidade frente ao declínio. Doença essa que causou sérios prejuízos à citricultura seja pelos danos diretos (perda de produção e morte de plantas) ou pelas dificuldades de manejo. Com o impacto do declínio estimulou a continuidade da busca por outros porta-enxertos, já que além do Cravo outros cavalos tolerantes à tristeza, como os limões 'Volkameriano' e 'Rugoso', os citranges 'Troyer' e 'Carrizo' e o '*Poncirus trifoliata*', mostraram-se intolerantes ao declínio. Porém, as excepcionais características do limoeiro 'Cravo', compatibilidade com todas as variedades copa, produção precoce, altas produções de frutos de boa qualidade e grande resistência à seca, além da tolerância à tristeza, fizeram com que ele continuasse a predominar nos novos plantios, sendo até o final da década de 90 do século passado, o porta-enxerto de maior utilização das plantas cítricas comerciais no Estado de São Paulo (POMPEU JÚNIOR, 1991).

Recentemente, devido à morte súbita dos citros (MSC), a citricultura paulista voltou a diversificar os porta-enxertos e a participação do limoeiro 'Cravo' passou a ser de 39,8 % das mudas produzidas no ano de 2003. A tangerineira 'Cleópatra' no ano de 2003 chegou a 32,6 % das plantas, sendo o segundo porta-enxerto mais utilizado, ficando o citrumeleiro 'Swingle' na terceira posição com 13,7 % das mudas (POMPEU JÚNIOR et al, 2004; POMPEU JÚNIOR, 2005).

Com o surgimento do HLB diversos trabalhos estão sendo realizados para amenizar o efeito da doença nas espécies cítricas, sendo que o conhecimento e a utilização da interação copa e porta-enxerto poderá ser mais uma vez a alternativa para minimizar o impacto dessa doença.

2.3. Laranjeira ‘Valência’

De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação, (FAO/ONU), em 2010, os países que se destacaram como os maiores produtores de laranja foram o Brasil, EUA, Índia, México e China, responsáveis por aproximadamente 31,84%, 12,54%, 7,27%, 7,24% e 5,41% da produção mundial, respectivamente (FAO, 2011).

O Brasil é o maior produtor mundial de laranjas, cuja produção, em 2011, foi de aproximadamente 18,5 milhões de toneladas, com um valor de aproximadamente 3,3 bilhões de dólares (FAO, 2012).

A maior parte da laranja brasileira é destinada à produção e à exportação de FCOJ, sendo a maior fração deste suco exportada para a União Européia (MENDES, 2009).

As laranjas doces predominam na maioria dos países citrícolas com, aproximadamente, dois terços dos plantios, ficando o restante para as demais espécies. A laranja ‘Valência’ ocupa lugar de destaque entre os produtores, pela boa produtividade e adequado tamanho de frutos que se prestam ao consumo fresco e à industrialização (PIO et al., 2005). De maturação tardia a laranja ‘Valência’ apresenta elevado teor de suco, excelente sabor, aparência e coloração atraentes. Sob o ponto de vista industrial, representa um dos suportes da agroindústria em todo o mundo (COELHO, 2002).

2.4. Bactérias associadas ao HLB

A história da citricultura brasileira sempre apresentou desafios fitossanitários para o sistema de produção, e atualmente o HLB é a maior ameaça aos pomares de citros do país (TERSI, 2010).

O agente causal dessa doença, *Ca. Liberibacter spp.* é uma bactéria Gram-negativa pertencente à subunidade alpha das Proteobacteria, sendo restrita ao floema (JAGOUEIX et al., 1994). Aceita-se que o HLB seja causado por estas bactérias endocelulares descritas acima e que são limitadas aos vasos do floema de

plantas hospedeiras, muito embora os postulados de Koch ainda não tenham sido cumpridos devido ao não completo domínio do cultivo de *Liberibacter* em meio de cultivo artificial. Estudos de microscopia eletrônica indicam que se trata de bactérias pleomórficas, com parede celular de tripla camada, e corpos esféricos e filamentosos, assim como reprodução por cissiparidade (LARANJEIRA et al., 2005; GARNIER et al, 1984).

Entre as três bactérias associadas ao HLB, a *Ca. L. asiaticus* é a mais disseminada e prevalecente espécie associada às epidemias de HLB nos países das Américas do Sul, Central e do Norte (BASSANEZI et al., 2010). De acordo com Bové (2006), a doença afeta seriamente os pomares de vários países da Ásia, África, Oceania, América do Sul, América do Norte e do Oriente Médio.

Ca. L. asiaticus é mais facilmente transmitida via enxertia de tecidos infectados para plantas cítricas do que *Ca. L. americanus*, e tolera temperaturas acima de 32°C enquanto a população de *Ca. L. americanus* diminui, podendo até desaparecer, nestas condições (LOPES et al., 2009).

Ca. Liberibacter spp. pode se multiplicar em todos os genótipos de citros e gêneros próximos, porém a resposta desses genótipos, representada pelos sintomas da doença, é extremamente variável, assim como o título da bactéria. A presença dessas bactérias no interior do seu hospedeiro provoca a doença ao interferir provavelmente nos mecanismos de transporte no floema, seja por bloquear as placas crivadas ou por desbalanço no metabolismo de açúcar (MACHADO et al., 2010).

As três espécies de *Ca. Liberibacter* que ocorrem nos citros podem ser transmitidas através de material vegetal infectado via enxertia, através de cuscuta (*Cuscuta* spp.) e naturalmente, planta a planta, através de psílídeos (BOVÉ, 2006).

2.5. Sintomatologia e controle da doença

O número de plantas com sintomas de HLB é variável ao longo dos meses do ano, porém os sintomas são mais facilmente vistos nos períodos secos do ano (TERSI, 2010). Também, o efeito de borda, ou seja, uma maior concentração de plantas sintomáticas nas primeiras plantas da periferia das propriedades e talhões, é

uma característica marcante do HLB (GOTTWALD; IREY, 2008). Segundo Bové (2006), as plantas jovens infectadas com a doença apresentam acentuada limitação ao desenvolvimento e produção, enquanto que as adultas apresentam ao longo do tempo um grave definhamento vegetativo, com conseqüente perda de produção, porém muito mais lentamente que as plantas jovens.

Os primeiros sintomas do HLB aparecem inicialmente nos ramos que se apresentam com folhas amareladas em contraste com a coloração verde das folhas dos ramos não afetados, e são visíveis à distância. Geralmente, no ramo onde está folhas amareladas são observadas também folhas com coloração assimétrica do limbo foliar, onde 'ilhas' de coloração verde normal contrapõe as de coloração verde pálido ou amarelo, estado ambas delimitadas pela nervura central. Este tipo de sintomas é denominado em inglês como "blotchy motlle", sendo este o tipo mais comum de sintomas do HLB. Com a evolução da doença, há intensa desfolha dos ramos afetados e os sintomas começam a aparecer em outros ramos da planta, tomando toda a copa, inclusive com a seca e morte de ponteiros. Já nos frutos os sintomas externos são pequenas manchas circulares verde-claras que contrastam com o verde normal, e há a redução no tamanho dos mesmos que se tornam deformados ou murchos. Frutos de ramos doentes, quando pressionados, podem apresentar uma coloração acinzentada e fosca no local onde se fez a pressão. Internamente, os frutos apresentam uma assimetria entre os lados, o albedo em alguns casos, apresenta uma espessura maior do que o normal e as sementes podem estar abortadas (BARBOSA et al., 2009).

Os sintomas de HLB são percepções visuais das respostas fisiológicas das plantas afetadas, e se manifestam no limbo foliar, na brotação de ramos, no crescimento e amadurecimento dos frutos e no próprio desenvolvimento geral da planta. Em plantas doentes, o floema e o sistema fotossintético são afetados, desencadeando inúmeras alterações na planta. Sem dúvida que observações visuais em busca de sintomas característicos da doença é o modo mais prático, barato, rápido, e conveniente para a diagnose de HLB e de qualquer outra doença, especialmente em condições de campo (COLETTA-FILHO; CARLOS, 2010). Embora em brotações novas seja muito comum o amarelecimento geral do ramo doente, esse sintoma de clorose generalizada nos ponteiros não é específico para o HLB. Outros problemas também podem causar os mesmos sintomas, e, portanto, esses não devem ser usados isoladamente em diagnósticos confirmativos do HLB.

Portanto, é necessário nesses casos análises molecular para o diagnóstico, como as baseadas na reação em cadeia da DNA polimerase (COLETTA-FILHO; CARLOS, 2010).

Pesquisas realizadas com laranja 'Valencia' por Bassanezi et al. (2009), mostraram que houve diferenças marcantes entre frutos de ramos sintomáticos com HLB e frutos normais de ramos assintomáticos em relação à redução do tamanho dos frutos, peso, teor de sólidos solúveis totais, relação SST/ caixa, SST / frutos, e ratio. O bloqueio do floema pelo efeito da infecção da bactéria do HLB provoca uma diminuição no transporte de água e acúmulo de amido, fatores que podem explicar a depreciação dos frutos pelo o aumento da acidez. Assim, o efeito do HLB seria menor em cultivares precoces que apresentam mecanismos mais eficientes de transporte de água e matéria seca. No início dos sintomas foliares, frutos de cultivares precoces estão quase prontos para serem colhidos no final do outono e inverno (a partir de junho), enquanto fruto de cultivares tardias colhidas na primavera e no início do verão, tornarão-se mais afetados pela doença.

O controle do HLB exige a utilização de mudas sadias, tratamentos químicos para diminuir a população do inseto vetor, e inspeções periódicas, com intervalos de no máximo quatro meses, para detecção e eliminação de todas as plantas identificadas com sintomas. A eficácia na detecção de plantas depende de vários fatores: acuidade visual dos inspetores, conhecimento e prática dos mesmos na detecção de plantas sintomáticas, genótipo e altura das plantas, severidade na copa das árvores, presença de outros sintomas nas folhas e frutos, época do ano, presença de frutos nas árvores, incidência de raios solares nas plantas e no rosto do inspetor, entre outros (BELASQUE JUNIOR et al., 2009).

Para as inspeções deve-se sempre empregar inspetores continuamente treinados e capacitados para a identificação de plantas doentes com sintomas. Também se deve permitir que os mesmos inspecionem as plantas com o máximo de concentração e motivados para a atividade. Em razão da inexistência de qualquer outra estratégia efetiva de controle, a eliminação imediata de plantas sintomáticas é primordial para o efetivo controle da doença. Mas para isso as plantas doentes precisam ser detectadas, o que depende da eficácia da inspeção e dos inspetores. Trata-se de uma atividade fundamental na "nova" citricultura paulista e que, brevemente, deverá ser adotada por toda citricultura brasileira onde HLB estiver presente (BELASQUE JUNIOR et al., 2010).

Mesmo em pomares nos quais ainda não foi constatada a presença de plantas com HLB é recomendada a prática de inspeções constantes, pois o sucesso do manejo desta doença está em adotar o controle no início da epidemia. Neste caso, as inspeções podem ser concentradas nas plantas das primeiras ruas da periferia da propriedade (divisas com outros pomares) e da periferia dos pomares, onde há maiores concentrações de plantas com HLB. Assim que detectada a ocorrência das primeiras plantas sintomáticas, a inspeção deve ser feita em todas as plantas da propriedade, planta a planta, uma vez que a distribuição das plantas doentes no pomar varia de levemente agregada à aleatória, o que inviabiliza uma inspeção amostral para fins de controle da doença (GOTTWALD et al., 2007).

2.6. PCR quantitativo

Um dos principais métodos para se detectar fitopatógenos em plantas é o PCR ("Polymerase Chain Reaction"). Baseado na amplificação exponencial da sequência de um DNA por meio de ciclos repetitivos de síntese de DNA, esta reação produz grandes quantidades de um fragmento de tamanho conhecido. Após a reação, esses podem ser visualizados sob luz ultravioleta em gel de agarose corado com brometo de etídio (MILLER; JOAQUIM, 1993).

A difusão do emprego da PCR na diagnose de patógenos é consequência da praticidade e robustez da técnica, aliados ao relativo baixo custo obtido ao longo da última década. Especificamente para patógenos fastidiosos, cultiváveis ou não, bactérias intracelulares, e vírus, a PCR representa uma ferramenta indispensável na detecção dos mesmos (HOORFAR et al., 2004).

A técnica de PCR convencional reside na capacidade que esta tem em amplificar uma sequência precisa de DNA aliada à sua simplicidade, rigor, elevada sensibilidade, especificidade e versatilidade. Desta forma, não é necessário isolar o DNA que se pretende amplificar (mesmo que este se encontre misturado com o DNA de outras espécies), uma vez que a especificidade da PCR é dada pelos primers. Esta é uma técnica rápida, barata, segura e não requer muito espaço em laboratório. Em termos de equipamento requer simplesmente um termociclador (MACKAY et al., 2007).

A técnica de PCR em tempo real apresenta como principais vantagens: simplicidade, especificidade, elevada sensibilidade no que se refere à utilização de uma sonda ou de um corante apropriado, rapidez, redução do risco de contaminação pós amplificação, elevado potencial de produção, introdução contínua de novos químicos, detecção de quantidades relativamente pequenas de DNA alvo, facilidade de quantificação, utilização de uma instrumentação de maior fiabilidade e uma melhoria nos protocolos tem feito com que a tecnologia de PCR em tempo real seja a tecnologia de referência para a detecção de DNA (PELT-VERKUIL et al., 2008).

Atualmente, a diagnose das bactérias causadoras do HLB é efetuada em larga escala pelo emprego de reação em cadeia da polimerase seja por meio da PCR tradicional ou em tempo real - qPCR (TEIXEIRA et al., 2010), sendo esta última mais sensível (possibilita a detecção do patógeno em menor concentração na amostra) assim como possibilita a quantificação do mesmo (LI et al., 2007).

O qPCR é realizado com o uso de um termociclador conectado a um computador, que monitora a reação de amplificação. O computador é equipado com um software que gera gráficos, valores quantitativos para as amostras e analisa a qualidade da reação (HIGUCHI et al., 1993; GIBSON; HEID; WILLIAMS, 1996).

O qPCR baseado na tecnologia TaqMan® utiliza, além dos primers, uma sonda específica para a sequência alvo. A sonda apresenta na extremidade 3' uma molécula que aceita a energia da molécula repórter e a dissipa na forma de luz ou calor, designada na literatura como *quencher* e na extremidade 5' um fluorocromo repórter (PELT-VERKUIL et al., 2008). A proximidade física da molécula repórter e do *quencher* no princípio da análise suprime a detecção da fluorescência daquele pela transferência de energia Förster. Na fase de hibridação do PCR, as sondas vão-se ligar à sequência alvo com a qual apresentam uma total complementaridade. Posteriormente, as sondas TaqMan® hibridizam e são detectadas pela enzima Taq DNA polimerase que a hidrolisa pela sua actividade exonucleotídica 5'- 3'. Este processo conduz à separação do *quencher* da molécula repórter, durante a extensão resultando num aumento exponencial da intensidade de fluorescência até um ponto onde pode ser detectado, ultrapassando o limiar Ct ("threshold cycle values"). É possível então estabelecer uma relação inversa entre o número de moléculas de DNA iniciais na reação e o valor de Ct, que é a base para os cálculos na PCR em tempo real (ALONSO et al., 2003).

O qPCR quando empregado para fins de diagnóstico tem a grande vantagem de poder quantificar o organismo alvo. Este é diretamente proporcional à quantidade presente na amostra na fase exponencial da reação. Ao final da amplificação, que normalmente envolve 40 ciclos entre desnaturação do DNA, anelamento de primers e sonda, e extensão, o software gera valores numéricos os Ct. Estes representam o número do ciclo em que dada amostra iniciou a geração de fluorescência ao cruzar com a linha do limiar de qualidade da reação. Este valor é inversamente proporcional à quantidade do DNA alvo na amostra (TICHOPAD et al., 2003).

A quantificação pode ser absoluta ou relativa. A primeira relaciona o Ct obtido da amostra com uma curva de calibração pré-estabelecida (curva padrão), idealizada com diluições sequenciais (normalmente 10X) de DNA extraído de colônias puras do agente, quando cultivado in vitro, ou da diluição da sequência alvo de amplificação clonado em um plasmídeo. Relaciona-se o valor de Ct obtido com a quantidade conhecida do organismo alvo adicionada à reação, obtendo-se uma equação de regressão linear do tipo $y = a+bx$ (DHANASEKARAN et al., 2010). Com uma curva padrão bem elaborada é possível obter quantificações precisas (SOUAZE et al., 1996). A quantificação relativa normalmente é utilizada para expressão gênica, sendo necessário o uso de um controle interno baseado num gene constitutivo (PFAFFL, 2004).

III. MATERIAL E MÉTODOS

A condução do experimento foi realizado em casa de vegetação e as análises envolvendo qPCR realizadas, no Centro APTA Citros “Sylvio Moreira” do Instituto Agrônomo (IAC), em Cordeirópolis (SP). As avaliações biométricas da laranja ‘Valência’ ao HLB sobre 16 porta-enxertos foram executadas na Estação Experimental de Citricultura de Bebedouro-EECB.

Os porta-enxertos empregados são indutores de porte baixo às plantas e boa produção de frutos de boa qualidade (BLUMER; POMPEU JÚNIOR, 2005; CANTUÁRIAS-AVILÉS, 2009) e os principais em uso comercial, além de um híbrido somático em fase experimental, a saber: 1) ‘Clementina x trifoliata’ (1615), 2) HRS 643 [(‘Cleópatra x Swingle’ (715)], 3) ‘Cleópatra x Swingle’ (1614), 4) ‘Cleópatra x Rubidoux’ (1600), 5) HRS 702 [(‘Cleópatra x Christian’ (712)], 6) HRS 849 [‘SFS x trifoliata Argentina’ (1708)], 7 e 8) citrangeiros ‘Troyer’ e ‘Carrizo’ tetraplóides, 9) trifoliato ‘Flying Dragon’, 10) HRS 812 (‘Sunki x Benecke’) , 11) ‘Changsha x English Large’, 12) limoeiro ‘Cravo’, 13) ‘Rhode Red + Volkameriano’ (híbrido somático), 14) ‘*Poncirus trifoliata*’, 15) tangerineira ‘Sunki’ e 16) citrumelo ‘Swingle’.

3.1. Inoculações com *Candidatus Liberibacter asiaticus*; eficiência e quantificação

3.1.1. Material vegetal e fonte de inóculo

As plantas utilizadas no experimento foram formadas em sacos de plástico com capacidade de 4 litros, contendo substrato Plantmax Citrus (Eucatex) e mantidas em casa de vegetação com temperaturas não superiores a 30 ° C, durante todo o experimento. As plantas foram irrigadas automaticamente todos os dias e fertilizadas, conforme o estabelecido pelo viveiro para casa de vegetação experimental. A composição da fertirrigação no experimento era a seguinte: sulfato de potássio (0,270 kg), nitrato de potássio (2,0 kg), MAP (0,540 kg), sulfato de magnésio (0,820 kg), nitrato de amônio (0,970 kg), sulfato de zinco (0,040 kg),

sulfato de cobre (0,040 kg) e sulfato de manganês (0,040 kg), diluídos em 5000 L. A inoculação das plantas por enxertia foi realizada quando as mesmas estavam com 16 meses.

Para a infecção de *Ca. Liberibacter asiaticus* (Las) as plantas foram inoculadas cinco centímetros acima da linha de enxertia, com duas borbulhas infectadas (2 a 3 cm de comprimento), as quais foram enxertadas em lados opostos do tronco. A inoculação da bactéria ocorreu no dia 27/05/2011, e as avaliações para a presença e quantificação de Las nas folhas e caules foram realizadas a 8, 12 e 16 meses após a inoculação (M.A.I.) das plantas. Análises objetivando monitorar a migração de Las para as raízes foram analisadas aos 17 meses, ao final do experimento. Um total de 10 plantas de cada tratamento (entende-se como tratamento a combinação da copa de 'Valência' enxertada em 16 porta-enxertos) foram utilizadas. Destas, oito receberam material vegetal infectado com Las e duas material sadio. Das oito plantas infectadas com Las, cinco foram selecionadas para as análises subsequentes. Portanto, cada tratamento foi composto por 5 plantas que receberam Las via enxertia e duas que receberam apenas enxertia de material sadio.

3.1.2. Amostragem e extração de DNA

Para uma melhor amostragem da bactéria no dossel da planta, foram coletadas seis folhas, direcionando aquelas que apresentavam algum tipo de sintomas que poderiam estar associados à doença. Destas folhas foram selecionados o pecíolo e quando necessário parte da nervura central. Para o monitoramento de Las no porta-enxerto foram coletados fragmentos de casca com aproximadamente 2 cm², sempre abaixo da linha de enxertia (8, 12 e 16 meses após a inoculação), assim como da casca das raízes, aos 17 meses, uma vez que nesse caso as amostragens eram destrutivas. Todos os tecidos foram finamente cortados com auxílio de um bisturi e o peso fresco padronizado para 200 mg, sendo então adicionados a tubos plásticos de 2 mL contendo 2 esferas de aço de 5 mm. Estes tecidos foram macerados por meio de agitação dos tubos no sistema Tissuelyser (Quiagen) a 30 hertz por 2 min. O DNA total foi extraído de acordo com o

método CTAB de Murray & Thompson (1980) e eluído em 100 µl de solução tampão de eluição (0,1 vol de Tris-EDTA, 20 µgµl⁻¹ de RNA). A concentração do DNA obtido foi verificada por meio de espectrofotômetro (OD 260/280) através do sistema Nanodrop (Thermo Scientific). Todos os DNA foram padronizados para a concentração de cerca de 100 ngµl⁻¹.

3.1.3. Reações de q-PCR e quantificação Las nas amostras

As reações de q-PCR foram realizadas no sistema ABI 7500 (Life Technology) utilizando-se a tecnologia TaqMan e o default do aparelho para a clicagem, num total de 40 ciclos. Todas as reações foram conduzidas num volume de 13,5 µL contendo 6,75 µL do tampão master mix Maxima Probe/Rox (Fermentas), 0,8 µM de cada um dos primers, 0,2 µM da probe (IDT Integrated DNA technology) e 300 ng do DNA total. As sequências dos primers e probe foram baseadas no gene “fator de alongação Ts” de Las (HONG et. al., 2010) gerando um amplicon de 170 pares de base (pb). Todas as reações foram realizadas em duplicatas estimando-se o desvio padrão dentro das amostras como um método de se monitorar a acuidade na condução experimental. A curva padrão e as estratégias de análise para se estimar a concentração de Las nas amostras foram baseadas nas condições descritas por Coletta-Filho et al., 2010.

Com base nos resultados da curva padrão adotou-se o limite de aceitação para amostras positivas aquelas que apresentaram valores de Ct inferiores a 37. Amostras com valores de Ct maiores que 37 (Ct>37) foram considerados como negativas. Os resultados de Ct foram submetidos à análise de variância, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

3.2. Respostas biométricas

As avaliações biométricas foram realizadas a 17 meses após a infecção das plantas, e o desenvolvimento das mesmas frente ao HLB foi estudado, registrando-se: diâmetro do tronco a 2 cm abaixo e acima da linha da enxertia, altura do colo da

planta ao enxerto e do enxerto a poda de formação, comprimento do lançamento a partir da poda de formação, massa fresca da parte aérea e sistema radicular, volume do sistema radicular, e análise foliar de macro e micronutrientes.

Os diâmetros dos caules (mm) de cada planta foram determinados utilizando-se um paquímetro digital e as outras características morfométricas como altura do colo da planta ao enxerto, do enxerto a poda de formação e comprimento do lançamento a partir da poda de formação através de uma trena graduada, expressos em cm.

Para a obtenção da massa fresca da parte aérea e sistema radicular, ocorreu separação de ambas as partes com corte na região do colo. As raízes foram lavadas em água corrente com auxílio de uma peneira até conseguir eliminar todo o substrato, evitando-se ao máximo a perda de raízes, que foram secas com papel absorvente. As partes aéreas pesadas diretamente por meio de uma balança digital (precisão 0,01 g), expresso em g.planta^{-1} .

O volume do sistema radicular foi determinado pelo método de deslocamento de água (BERNARDI; CARMELLO; CARVALHO, 2000). Com a utilização de uma proveta graduada com um volume de água conhecido, onde as raízes após serem lavadas, eram mergulhadas, sendo o volume de raiz correspondente ao volume de água deslocado, expresso em cm^3 .

Para realização da análise foliar foram coletadas 25 folhas de cada planta, e determinados os macronutrientes Nitrogênio (N), Fósforo (P), Potássio (K), Cálcio (Ca), Magnésio (Mg) e Enxofre (S), e micronutrientes Boro (B), Cobre (Cu), Ferro (Fe), Manganês (Mn) e Zinco (Zn).

O delineamento experimental para as respostas biométricas foi inteiramente casualizados em esquema de fatorial 16×2 , com 5 repetições para as plantas inoculadas e 2 não inoculadas. Os resultados foram submetidos à análise de variância, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação de Las nas plantas; copa e porta-enxerto

As avaliações de q-PCR nos pecíolos das folhas (Tabela 1) e na casca do caule dos porta-enxertos (Tabela 2) seguiram a ordem: 8 meses, 12 meses e 16 meses após a inoculação (M.A.I).

O número de células de Las na copa é dado pela fórmula, $(Ct - 47,028) / - 3,1561$.

Considerando que os valores de Ct (“threshold cycle values”) são inversamente proporcionais à quantidade do DNA alvo na amostra, observa-se na Tabela 1, resposta diferencial da copa de ‘Valência’ infectada quanto a concentração de Las sobre os 16 porta-enxertos. Vale destacar o tratamento ‘Valência’ sobre ‘Carrizo’ tetraplóide que apresentou a menor concentração de bactéria ao longo de todo o experimento. Embora estatisticamente este tratamento não tenha diferido significativamente de alguns outros (Tabela 1), o número de células de Las na copa de ‘Valência’ sobre o referido porta-enxerto não ultrapassou 5,15, enquanto que para os demais esteve ao redor de 7,00.

Em trabalhos de Folimonova et al., (2009) e Albrecht e Bowman (2011), as plantas sobre ‘Carrizo’ comum também foram consideradas tolerantes ao HLB, provavelmente, este porta-enxerto confere alguns benefícios à copa como a translocação de substâncias como ácidos nucleicos, proteínas ou outros compostos orgânicos, embora os mecanismos, em particular para a resistência, é em geral desconhecidos (HAROLDSEN et al., 2012)

Plantas de ‘Valência’ sobre os porta-enxertos ‘Clementina x trifoliata’ (1615) e HRS 643 foram as que apresentaram as maiores títulos da bactéria nas três avaliações das folhas (Tabela 1).

‘Valencia’ sobre HRS 812 foi à única combinação em que houve alteração da concentração da bactéria ao longo estudo. Observou-se, que ao décimo segundo mês após a inoculação, a concentração de *Ca. Liberibacter asiaticus* foi maior quando comparado com a primeira e terceira avaliação (Tabela 1).

Com relação ao limoeiro 'Cravo', o principal porta-enxerto utilizado na citricultura brasileira, às plantas de 'Valência' sobre esse porta-enxerto, ao longo das avaliações apresentaram concentrações intermediárias da bactéria *Ca. Liberibacter asiaticus* dentre os porta-enxertos estudados (Tabela 1).

Segundo Boscariol-Camargo et al., (2010), na avaliação da multiplicação da bactéria e no desenvolvimento de sintomas em seis espécies e variedades de citros, constatou-se que após a infecção por borbulhas infectadas foi possível detectar a bactéria em todos os genótipos avaliados, embora com variação na quantidade de bactéria ao longo do tempo, o que não se observou no presente trabalho para o '*Poncirus trifoliata*'.

Tabela 1. Valores médios de Ct obtidos aos 8, 12 e 16 meses em pecíolo de folhas após a inoculação de *Ca. Liberibacter asiaticus* em laranjeira 'Valência' enxertadas em 16 porta-enxertos. IAC – Cordeirópolis, 2012

Porta_Enxerto	Ct (pecíolo das folhas) aos			Teste F	C.V. (%)
	8 M.A.I.	12 M.A.I.	16 M.A.I.		
Clementina x trifoliata (1615)	21,26 c A	20,57 b A	22,43 b A	2,14 ns	9,50
HRS 643	21,69 c A	20,55 b A	21,43 b A	0,63 ns	11,21
Cleópatra x Swingle (1614)	26,69 abc A	26,60 ab A	25,73 ab A	0,06 ns	25,14
Cleópatra x Rubidoux (1600)	27,64 abc A	27,92 ab A	27,25 ab A	0,02 ns	26,48
HRS 702	24,29 abc A	23,56 ab A	24,59 ab A	0,09 ns	22,64
HRS 849	25,55 abc A	24,83 ab A	23,92 ab A	0,17 ns	25,12
Troyer tetraplóide	24,43 abc A	24,95 ab A	24,74 ab A	0,01 ns	25,43
Carrizo tetraplóide	31,37 a A	30,74 a A	31,42 a A	0,02 ns	26,76
Flying Dragon	22,87 bc A	22,51 ab A	23,43 b A	0,14 ns	16,51
HRS 812	22,82 bc AB	20,89 b B	23,86 ab A	3,25 *	11,73
Changsha x English Large	27,81 abc A	27,39 ab A	23,73 b A	1,64 ns	21,02
Limoeiro Cravo	27,80 abc A	27,67 ab A	27,86 ab A	0,01 ns	18,50
Rhode Red + Volkameriano	28,74 abc A	27,31 ab A	25,75 ab A	2,12 ns	11,89
Poncirus trifoliata	27,08 abc A	25,63 ab A	24,22 ab A	1,75 ns	13,32
Sunki	30,86 ab A	28,71 ab A	27,27 ab A	1,11 ns	18,71
Citrumelo Swingle	23,77 abc A	23,91 ab A	23,72 b A	0,01 ns	11,12
Teste F	3,54 **	3,33 **	2,46 **	-	-
DMS	8,07	8,28	7,64	-	-
C.V. (%)	19,97	21,06	19,54	-	-

Médias seguidas das mesmas letras minúsculas (coluna) e maiúsculas (linha) não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. ns = não significativo; * = significativo a 5% ; ** = significativo a 1%

Quanto aos valores médios de Ct a partir de fragmentos da casca do caule dos porta-enxertos (Tabela 2), observou-se diferença significativa entre os porta-enxertos nas três amostragens. Os tratamentos que apresentaram o menor número de bactéria nas três avaliações foram 'Cleópatra x Rubidoux' (1600) e 'Carrizo' tetraplóide, porém na primeira e segunda avaliações, significativamente, diferiram apenas do 'Flying Dragon'. Aos 16° meses após a inoculação, o maior número de bactérias foi encontrado nos porta-enxertos 'Clementina x trifoliata' (1615) e HRS 643.

Ao longo das três amostragens os valores médios de Ct apresentaram significância em quatro porta-enxerto, a saber: HRS 812, 'Changsha x English Large', 'Cleópatra x Swingle' (1614) e HRS 643. Nos dois primeiros porta-enxertos citados, a concentração de bactéria diminuiu ao passar do tempo, resultado diferente ao encontrado para 'Cleópatra x Swingle' (1614) e HRS 643.

Tabela 2. Valores médios de Ct obtidos aos 8, 12 e 16 meses no caule de plantas após a inoculação de *Ca. Liberibacter asiaticus* em laranja 'Valência' enxertadas em 16 porta-enxertos. IAC – Cordeirópolis, 2012

Porta_Enxerto	Ct (caule)			Teste F	C.V. (%)
	8 M.A.I.	12 M.A.I.	16 M.A.I.		
Clementina x trifoliata (1615)	34,28 ab A	34,28 ab A	29,35 bc A	3,80 ns	14,15
HRS 643	31,95 ab A	32,46 ab A	28,37 c B	18,18 *	5,34
Cleópatra x Swingle (1614)	35,20 ab A	34,80 ab A	31,83 abc B	6,91 *	6,52
Cleópatra x Rubidoux (1600)	37,28 a A	36,42 a A	36,05 a A	0,38 ns	8,79
HRS 702	34,51 ab A	34,67 ab A	33,54 ab A	0,33 ns	9,82
HRS 849	34,17 ab A	34,72 ab A	31,91 abc A	1,42 ns	11,74
Troyer tetraplóide	33,25 ab A	34,39 ab A	33,50 abc A	0,34 ns	9,52
Carrizo tetraplóide	37,36 a A	37,36 a A	36,14 a A	0,45 ns	8,89
Flying Dragon	30,11 b A	30,53 b A	31,29 abc A	0,62 ns	9,31
HRS 812	31,96 ab B	32,91 ab AB	34,46 ab A	6,92 **	4,57
Changsha x English Large	32,43 ab B	33,27 ab AB	34,66 a A	3,68 *	5,55
Limoeiro Cravo	34,91 ab A	34,95 ab A	34,38 ab A	0,03 ns	14,59
Rhode Red + Volkameriano	34,94 ab A	34,65 ab A	33,48 abc A	0,23 ns	14,80
Poncirus trifoliata	32,93 ab A	33,44 ab A	33,46 abc A	0,61 ns	5,14
Sunki	34,66 ab A	34,05 ab A	33,42 abc A	0,14 ns	15,23
Citrumelo Swingle	33,82 ab A	33,46 ab A	31,54 abc A	0,64 ns	14,61
Teste F	2,46 **	1,77 *	4,25 **	-	-
DMS	5,93	5,77	5,14	-	-
C.V. (%)	11,20	10,85	10,01	-	-

Médias seguidas das mesmas letras minúsculas (coluna) e maiúsculas (linha) não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

ns = não significativo; * = significativo a 5% ; ** = significativo a 1%

Para os valores médios de Ct a partir da raiz dos porta-enxertos (Tabela 3), observou-se diferença significativa entre os porta-enxertos. Os tratamentos 'Sunki', 'Flying Dragon' e citrumelo 'Swingle' foram os apresentaram a maior concentração da bactéria. Na análise para Cleópatra x Rubidoux (1600) não foi possível determinar o nível de bactéria nas células radiculares.

Em estudos realizados por Albrecht e Bowman (2011), mudas de US-897 [híbrido de trifoliata e tangerina 'Cleópatra' (*C. reticulata* Blanco)] demonstraram tolerância a *Liberibacter asiaticus* devido a um aumento mais lento da bactéria quando comparado com outros porta-enxertos.

Shokrollah et al., (2010), não observaram sintomas de HLB após seis meses de inoculação nas combinações *C. grandis* como porta-enxerto, com *C. hystrix* como interenxerto e *C. reticulata* como enxerto; e *C. hystrix* como porta-enxerto, *C. Grandis* como interenxerto e *C. reticulata* como enxerto. Contudo, a bactéria foi detectada no enxerto por análise de PCR.

Folimonova et al. (2009) não observaram a multiplicação substancial de *Ca. L. asiaticus* em copas que apresentavam citrange 'Carrizo' comum como porta-enxerto.

Tabela 3. Valores médios de Ct obtidos aos 17° meses na raiz após a inoculação de *Ca. Liberibacter asiaticus* em laranja 'Valência' enxertadas em 16 porta-enxertos. IAC – Cordeirópolis, 2012

Porta_Enxerto	Ct (raiz do porta-enxerto)
	17 M.A.I.
Clementina x trifoliata (1615)	32,71 abc
HRS 643	33,50 abc
Cleópatra x Swingle (1614)	33,77 abc
Cleópatra x Rubidoux (1600)	ND
HRS 702	35,01 abc
HRS 849	34,77 abc
Troyer tetraplóide	34,64 abc
Carrizo tetraplóide	35,06 ab
Flying Dragon	31,43 bc
HRS 812	35,65 a
Changsha x English Large	35,31 ab
Limoeiro Cravo	32,83 abc
Rhode Red + Volkameriano	32,36 abc
Poncirus trifoliata	33,02 abc
Sunki	29,04 c
Citrumelo Swingle	31,82 bc
Teste F	4,17 **
DMS	7,49
C.V. (%)	6,45

Médias seguidas das mesmas letras minúsculas (coluna) e maiúsculas (linha) não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

ND = não determinado na célula; ** = significativo a 1%

4.2. Respostas biométricas

Para os valores médios do diâmetro acima da linha da enxertia não houve diferença significativa dentro da mesma combinação (porta-enxerto x 'Valência') em relação às plantas infectadas das não infectadas. Diferenças entre os porta-enxertos foram observadas apenas quando houve infecção das mudas com HLB, destacando limoeiro 'Cravo' por ter apresentado o maior diâmetro em relação aos outros porta-enxertos apesar de estatisticamente ser considerado semelhante ao 'Carrizo' tetraplóide, 'Flying Dragon', HRS 812, 'Rhode Red + Volkameriano' (híbrido somático), '*Poncirus trifoliata*' e 'Sunki' (Tabela 4).

Tabela 4. Valores médios do diâmetro do tronco (mm), acima da linha da enxertia, de laranjeira 'Valência' sobre 16 porta-enxertos, infectados e não com *Ca. Liberibacter asiaticus*. EECB, 2012

Porta_Enxerto	Infectado	Não Infectado	Média	Teste F	C.V.(%)
Clementina x trifoliata (1615)	12,67 b A	14,56 a A	13,21	1,95 ns	11,93
HRS 643	12,79 b A	14,37 a A	13,24	1,35 ns	7,97
Cleópatra x Swingle (1614)	13,93 b A	13,19 a A	13,72	0,30 ns	13,72
Cleópatra x Rubidoux (1600)	13,17 b A	14,07 a A	13,43	0,45 ns	8,16
HRS 702	13,19 b A	12,92 a A	13,12	0,04 ns	12,56
HRS 849	13,34 b A	12,96 a A	13,23	0,08 ns	8,20
Troyer tetraplóide	13,57 b A	14,11 a A	13,72	0,16 ns	19,92
Carrizo tetraplóide	15,04 ab A	15,78 a A	15,16	0,17 ns	9,83
Flying Dragon	14,46 ab A	15,68 a A	14,81	0,80 ns	11,37
HRS 812	14,37 ab A	14,45 a A	14,39	0,00 ns	4,69
Changsha x English Large	12,22 b A	11,60 a A	12,04	0,21 ns	13,25
Limoeiro Cravo	17,91 a A	15,59 a A	17,25	2,95 ns	6,28
Rhode Red + Volkameriano	15,19 ab A	16,24 a A	15,49	0,60 ns	10,21
Poncirus trifoliata	14,42 ab A	14,82 a A	14,53	0,09 ns	16,15
Sunki	15,03 ab A	13,65 a A	14,63	1,04 ns	8,60
Citrumelo Swingle	13,57 b A	12,06 a A	13,14	1,25 ns	12,67
Média	14,05	14,07	-	-	-
Teste F	3,56 **	1,31 ns	-	-	-
C.V. (%)	11,58	12,20	-	-	-

Médias seguidas das mesmas letras minúsculas (coluna) e maiúsculas (linha) não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

ns = não significativo; ** = significativo a 1%

Quanto aos valores do diâmetro de caule abaixo da linha da enxertia (Tabela 5), não houve diferença significativa entre as plantas que foram infectadas das não infectadas, porém pode-se observar que os valores médios dos diâmetros das plantas, não infectadas, foram em sua maioria, superiores ao das plantas que receberam a bactéria dentro do mesmo porta-enxerto. Entre os porta-enxertos foi observado diferença significativa apenas para as plantas que foram infectadas, sendo o 'Rhode Red + Volkameriano' (híbrido somático) o que apresentou o maior

valor médio de diâmetro, diferindo estatisticamente somente do HRS 849.

Em experimentos realizados por Albrecht e Bowman (2011), mudas de tangerinas 'Cleópatra' apresentaram uma forte expressão foliar dos sintomas de HLB após a inoculação com *Ca. L. asiaticus*, e o crescimento médio no diâmetro de sua haste foram significativamente inferiores em relação às mudas não infectadas. No mesmo estudo plantas de US-897 (híbrido de trifoliata e tangerineira 'Cleópatra') também apresentaram certa redução no diâmetro, porém menos grave e não significativa.

Tabela 5. Valores médios do diâmetro do tronco (mm), abaixo da linha da enxertia, de 16 porta-enxertos sob laranjeira 'Valência', infectados e não com *Ca. Liberibacter asiaticus*. EECB, 2012

Porta_Enxerto	Infectado	Não Infectado	Média	Teste F	C.V. (%)
Clementina x trifoliata (1615)	16,89 ab A	19,94 a A	17,76	2,42 ns	13,55
HRS 643	16,60 ab A	20,22 a A	17,64	3,39 ns	8,59
Cleópatra x Swingle (1614)	18,03 ab A	17,48 a A	17,87	0,08 ns	11,27
Cleópatra x Rubidoux (1600)	16,24 ab A	18,97 a A	17,02	1,93 ns	7,20
HRS 702	16,81 ab A	17,03 a A	16,87	0,01 ns	12,72
HRS 849	15,97 b A	15,72 a A	15,89	0,02 ns	7,39
Troyer tetraplóide	16,69 ab A	17,78 a A	17,00	0,31 ns	19,02
Carrizo tetraplóide	18,01 ab A	21,43 a A	18,58	1,77 ns	4,51
Flying Dragon	17,28 ab A	19,50 a A	17,91	1,28 ns	12,50
HRS 812	20,03 ab A	19,37 a A	19,84	0,11 ns	8,41
Changsha x English Large	16,93 ab A	18,48 a A	17,37	0,62 ns	10,84
Limoeiro Cravo	19,85 ab A	19,89 a A	19,86	0,00 ns	4,87
Rhode Red + Volkameriano	20,56 a A	21,47 a A	20,82	0,21 ns	16,94
Poncirus trifoliata	19,15 ab A	19,91 a A	19,37	0,15 ns	15,81
Sunki	17,14 ab A	15,68 a A	16,72	0,56 ns	15,56
Citrumelo Swingle	19,59 ab A	19,65 a A	19,60	0,00 ns	19,92
Média	17,86	18,82	-	-	-
Teste F	2,03 *	1,05 ns	-	-	-
C.V. (%)	12,83	13,19	-	-	-

Médias seguidas das mesmas letras minúsculas (coluna) e maiúsculas (linha) não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

ns = não significativo; * = significativo a 5%

Em relação à altura do colo da planta ao enxerto (Tabela 6), nenhuma diferença significativa foi encontrada, independente, se a comparação foi realizada entre ou dentro dos porta-enxertos decorrente da infecção ou não.

Tabela 6. Valores médios da altura (cm) do colo da planta a região de enxertia de laranjeira 'Valência' sobre 16 porta-enxertos, infectados e não com *Ca. Liberibacter asiaticus*. EECB, 2012

Porta_Enxerto	Infectado	Não Infectado	Média	Teste F	C.V. (%)
Clementina x trifoliata (1615)	15,20 a A	16,00 a A	15,42	0,22 ns	11,15
HRS 643	16,00 a A	13,50 a A	15,28	2,14 ns	21,2
Cleópatra x Swingle (1614)	15,20 a A	15,00 a A	15,14	0,01 ns	13,47
Cleópatra x Rubidoux (1600)	17,00 a A	15,50 a A	16,57	0,77 ns	8,74
HRS 702	16,00 a A	16,00 a A	16,00	0,00 ns	8,84
HRS 849	15,80 a A	16,00 a A	15,85	0,01 ns	15,65
Troyer tetraplóide	15,40 a A	16,50 a A	15,71	0,41 ns	13,26
Carrizo tetraplóide	16,40 a A	16,00 a A	16,33	0,03 ns	3,01
Flying Dragon	16,00 a A	17,00 a A	16,28	0,34 ns	12,28
HRS 812	16,00 a A	18,50 a A	16,71	2,14 ns	7,80
Changsha x English Large	14,40 a A	16,00 a A	14,85	0,88 ns	16,27
Limoeiro Cravo	16,80 a A	15,50 a A	16,42	0,58 ns	12,56
Rhode Red + Volkameriano	18,00 a A	16,50 a A	17,57	0,77 ns	12,07
Poncirus trifoliata	16,00 a A	15,50 a A	15,85	0,09 ns	12,13
Sunki	15,00 a A	14,00 a A	14,71	0,34 ns	12,89
Citrumelo Swingle	16,40 a A	18,50 a A	17,00	1,51 ns	14,34
Média	15,97	16,00	-	-	-
Teste F	0,89 ns	0,83 ns	-	-	-
C.V. (%)	12,42	13,01	-	-	-

Médias seguidas das mesmas letras minúsculas (coluna) e maiúsculas (linha) não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

ns = não significativo

Quanto aos valores médios da altura do enxerto a poda (Tabela 7), observou-se que a única diferença significativa para a infecção dentro do mesmo tratamento ocorreu na tangerineira 'Sunki', já entre os porta-enxertos houve diferenças significativas tanto nas plantas infectadas quanto nas não infectadas. Nas

plantas infectadas, os maiores valores médios para essa característica entre os porta-enxertos foram observados em HRS 643 e 'Changsha x English Large', diferindo se do limoeiro 'Cravo', tangerineira 'Sunki' e citrumelo 'Swingle'. Enquanto que nas plantas não infectadas, o maior valor médio foi da HRS 643, diferindo estatisticamente da tangerineira 'Sunki' e citrumelo 'Swingle'.

Tabela 7. Valores médios da altura (cm) da região de enxertia a poda de laranjeira 'Valência' sobre 16 porta-enxertos, infectados e não com *Ca. Liberibacter asiaticus*. EECB, 2012

Porta_Enxerto	Infectado	Não Infectado	Média	Teste F	C.V. (%)
Clementina x trifoliata (1615)	34,00 ab A	35,00 ab A	34,28	0,34 ns	4,12
HRS 643	36,00 a A	37,00 a A	36,28	0,34 ns	3,02
Cleópatra x Swingle (1614)	32,60 ab A	34,00 ab A	33,00	0,66 ns	3,64
Cleópatra x Rubidoux (1600)	33,40 ab A	34,00 ab A	33,57	0,12 ns	4,84
HRS 702	32,80 ab A	32,50 abc A	32,71	0,03 ns	5,69
HRS 849	35,40 ab A	35,00 ab A	35,28	0,05 ns	5,84
Troyer tetraplóide	34,40 ab A	35,00 ab A	34,57	0,12 ns	4,33
Carrizo tetraplóide	32,80 ab A	35,00 ab A	33,16	0,95 ns	4,83
Flying Dragon	33,60 ab A	33,50 abc A	33,57	0,00 ns	6,21
HRS 812	34,00 ab A	34,00 ab A	34,00	0,00 ns	4,16
Changsha x English Large	35,60 a A	34,50 ab A	35,28	0,41 ns	3,95
Limoeiro Cravo	31,00 b A	34,00 ab A	31,85	3,04 ns	6,28
Rhode Red + Volkameriano	33,20 ab A	34,00 ab A	33,42	0,22 ns	4,40
Poncirus trifoliata	33,40 ab A	33,50 abc A	33,42	0,00 ns	10,34
Sunki	24,00 c B	28,00 bc A	25,14	5,41 *	16,49
Citrumelo Swingle	25,40 c A	25,00 c A	25,28	0,05 ns	7,75
Média	32,60	33,32	-	-	-
Teste F	13,14 **	3,95 **	-	-	-
C.V. (%)	6,18	9,87	-	-	-

Médias seguidas das mesmas letras minúsculas (coluna) e maiúsculas (linha) não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

ns = não significativo; * = significativo a 5%; ** = significativo a 1%

De acordo com a tabela 8, nenhuma diferença significativa, entre e dentro dos porta-enxertos infectados ou não, foi observada para os valores médios em relação ao comprimento do lançamento.

Tabela 8. Valores médios do comprimento (cm) do lançamento de laranja 'Valência' sobre 16 porta-enxertos, infectados e não com *Ca. Liberibacter asiaticus*. EECB, 2012

Porta_Enxerto	Infectado	Não Infectado	Média	Teste F	C.V. (%)
Clementina x trifoliata (1615)	74,60 a A	68,50 a A	72,85	0,14 ns	18,96
HRS 643	65,20 a A	75,50 a A	68,14	0,40 ns	4,79
Cleópatra x Swingle (1614)	74,40 a A	58,00 a A	69,71	1,01 ns	40,68
Cleópatra x Rubidoux (1600)	74,80 a A	93,00 a A	80,00	1,24 ns	12,48
HRS 702	76,80 a A	92,50 a A	81,28	0,93 ns	27,48
HRS 849	67,40 a A	75,50 a A	69,71	0,25 ns	18,63
Troyer tetraplóide	68,80 a A	64,50 a A	67,57	0,07 ns	36,65
Carrizo tetraplóide	81,80 a A	88,00 a A	82,83	0,08 ns	15,54
Flying Dragon	59,40 a A	78,00 a A	64,71	1,30 ns	26,63
HRS 812	87,40 a A	64,50 a A	80,85	1,97 ns	11,09
Changsha x English Large	65,40 a A	77,00 a A	68,71	0,51 ns	26,35
Limoeiro Cravo	79,40 a A	83,00 a A	80,42	0,05 ns	28,76
Rhode Red + Volkameriano	86,00 a A	83,50 a A	85,28	0,02 ns	19,28
Poncirus trifoliata	72,80 a A	68,50 a A	71,57	0,07 ns	25,82
Sunki	80,40 a A	81,50 a A	80,71	0,00 ns	41,34
Citrumelo Swingle	85,60 a A	61,00 a A	78,57	2,27 ns	28,15
Média	75,01	75,38	-	-	-
Teste F	0,89 ns	0,59 ns	-	-	-
C.V. (%)	24,25	26,82	-	-	-

Médias seguidas das mesmas letras minúsculas (coluna) e maiúsculas (linha) não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

ns = não significativo

Os resultados dos valores médios da massa fresca da parte aérea da laranja 'Valência' (Tabela 9), apresentaram significância apenas entre os porta-enxertos para as plantas que foram infectadas. O limoeiro 'Cravo' foi o que apresentou o maior valor médio para essa variável, diferindo apenas do HRS 643.

Apesar de o limoeiro 'Cravo' ter sido superior a 'Clementina x trifoliata' (1615), em aproximadamente 99 g/planta, em relação a massa fresca da parte aérea, não houve diferença significativa entre os mesmos.

Observou-se que as plantas que apresentavam em seu dossel uma maior distribuição de sintomas de HLB foram extremamente prejudicadas quanto sua massa fresca da parte aérea, pois as folhas sintomáticas caem facilmente além de serem menores e curvadas. Sintomas esses também observados por Bové (2006), onde as folhas de ramos sintomáticos apresentam-se curvadas, de tamanho reduzido, com nervuras mais grossas e escurecidas, e em estádios mais avançados da doença podem ocorrer desfolha e morte de ponteiros.

Tabela 9. Valores médios da massa fresca (g.planta⁻¹) da parte aérea de plantas de 'Valência' sobre 16 porta-enxertos, infectados e não com *Ca. Liberibacter asiaticus*. EECB, 2012

Porta_Enxerto	Infectado	Não Infectado	Média	Teste F	C.V. (%)
Clementina x trifoliata (1615)	131,40 ab A	203,00 a A	151,85	3,37 ns	26,29
HRS 643	123,80 b A	169,50 a A	136,85	1,37 ns	16,72
Cleópatra x Swingle (1614)	152,40 ab A	156,00 a A	153,42	0,01 ns	45,24
Cleópatra x Rubidoux (1600)	151,60 ab A	159,00 a A	153,71	0,04 ns	19,48
HRS 702	141,20 ab A	164,50 a A	147,85	0,36 ns	29,76
HRS 849	142,20 ab A	154,00 a A	145,57	0,09 ns	22,02
Troyer tetraplóide	170,00 ab A	138,00 a A	160,85	0,67 ns	40,09
Carrizo tetraplóide	208,60 ab A	248,00 a A	215,16	0,60 ns	20,09
Flying Dragon	165,60 ab A	224,50 a A	182,42	2,28 ns	36,98
HRS 812	200,60 ab A	178,00 a A	194,14	0,34 ns	11,90
Changsha x English Large	140,40 ab A	151,50 a A	143,57	0,08 ns	24,69
Limoeiro Cravo	230,60 a A	178,00 a A	215,57	1,82 ns	25,89
Rhode Red + Volkameriano	173,80 ab A	250,00 a A	195,57	3,82 ns	26,49
Poncirus trifoliata	175,80 ab A	163,50 a A	172,28	0,10 ns	18,32
Sunki	173,40 ab A	130,50 a A	161,14	1,21 ns	34,41
Citrumelo Swingle	158,80 ab A	120,00 a A	147,71	0,99 ns	23,23
Média	165,01	171,87	-	-	-
Teste F	1,94 *	1,21 ns	-	-	-
C.V. (%)	28,32	28,31	-	-	-

Médias seguidas das mesmas letras minúsculas (coluna) e maiúsculas (linha) não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

ns = não significativo; * = significativo a 5%

Os valores da massa fresca do sistema radicular (Tabela 10) apresentaram diferenças significativas entre os porta-enxertos apenas nas plantas infectadas, podendo ser destacado o desempenho do 'Carrizo' tetraplóide que apresentou o maior valor médio para essa característica biométrica diferindo significativamente da HRS 643. Vale ressaltar, que de maneira geral, a presença da bactéria *Ca. Liberibacter asiaticus* nas plantas reduziu a massa fresca do sistema radicular, porém esse resultado só ficou comprovado para 'Clementina x trifoliata' (1615) e HRS 643.

Albrecht e Bowman (2012), avaliando a resposta de oito porta-enxertos (híbridos de '*Poncirus trifoliata*' US-802, US-812, US-897, e US-942, citrange 'Carrizo', trifoliata 'Benecke', 'Volkameriano', e 'Cleópatra'), observaram que aos 12 meses de inoculação, sintomas foliares da doença foram variáveis em extensão, sendo destaque na maioria dos genótipos, exceto US-897. Os autores sugerem nesse estudo a classificação de 'Carrizo', US-897, e US-942 como tolerantes, US-802, US-812, e 'Volkameriano' como moderadamente tolerantes, e 'Cleópatra' suscetível ao *Ca. Liberibacter asiaticus*. Apesar da irregularidade no crescimento, as baixas taxas de infecção e números de bactéria indicam alguma tolerância de 'Benecke'.

Tolerância ao HLB tem sido relatada para algumas cultivares comumente utilizadas como porta-enxertos, particularmente '*Poncirus trifoliata*' L. Raf. e alguns de seus híbridos. Na África do Sul, McClean e Schwarz (1970) não encontrou qualquer sintoma bem definido da doença em '*P. trifoliata*' após a inoculação com borbulhas infectadas. Resultado semelhante foi relatado em Taiwan por Miyakawa (1980), e recentemente por Albrecht et. al. (2012), que identificaram um híbrido de trifoliata, o US-897 ('*C. reticulata* x *P. trifoliata*') tolerante a doença. No mesmo estudo, plantas sobre 'Carrizo' foram classificadas como tolerante ao HLB com base na ausência de sintomas foliares e crescimento saudável das plantas infectadas. Folimonova et al. (2009), analisando a resposta de 30 cultivares de porta-enxertos em relação a *Ca. L. asiaticus*, também observaram pouco ou nenhum sintoma foliar e redução de crescimento em plantas cítricas sobre 'Carrizo'.

Tabela 10. Valores médios da massa fresca (g.planta⁻¹) do sistema radicular dos 16 porta-enxertos sob laranjeira 'Valência', infectados e não com *Ca. Liberibacter asiaticus*. EECB, 2012

Porta_Enxerto	Infectado	Não Infectado	Média	Teste F	C.V. (%)
Clementina x trifoliata (1615)	106,40 ab B	210,00 a A	136,00	5,67 *	39,26
HRS 643	93,00 b B	208,00 a A	125,85	6,98 **	14,56
Cleópatra x Swingle (1614)	127,20 ab A	134,00 a A	129,14	0,02 ns	53,60
Cleópatra x Rubidoux (1600)	139,60 ab A	215,50 a A	161,28	3,04 ns	19,59
HRS 702	128,00 ab A	148,00 a A	133,71	0,21 ns	24,33
HRS 849	190,40 ab A	194,00 a A	191,42	0,01 ns	33,28
Troyer tetraplóide	143,40 ab A	134,50 a A	140,85	0,04 ns	50,19
Carrizo tetraplóide	205,20 a A	236,00 a A	210,33	0,29 ns	6,32
Flying Dragon	138,80 ab A	206,50 a A	158,14	2,42 ns	42,32
HRS 812	142,20 ab A	170,00 a A	150,14	0,41 ns	16,14
Changsha x English Large	160,00 ab A	192,00 a A	169,14	0,54 ns	53,22
Limoeiro Cravo	181,00 ab A	178,00 a A	180,14	0,00 ns	31,24
Rhode Red + Volkameriano	144,80 ab A	216,00 a A	165,14	2,68 ns	29,88
Poncirus trifoliata	161,60 ab A	180,00 a A	166,85	0,18 ns	24,15
Sunki	117,00 ab A	86,00 a A	108,14	0,51 ns	34,19
Citrumelo Swingle	113,20 ab A	147,00 a A	122,85	0,60 ns	33,79
Média	143,23	176,61	-	-	-
Teste F	2,03 *	1,08 ns	-	-	-
C.V. (%)	33,59	34,20	-	-	-

Médias seguidas das mesmas letras minúsculas (coluna) e maiúsculas (linha) não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

ns = não significativo; * = significativo a 5% ; ** = significativo a 1%

Quanto os valores médios do volume do sistema radicular dos porta-enxertos sob laranjeira 'Valência' (Tabela 11), observou-se que todos os porta-enxertos, quando infectados com o HLB reduziram o volume de suas raízes, apesar de que as diferenças significativas das plantas infectadas em relação as não infectadas só foi encontrada dentro dos tratamentos 'Clementina x trifoliata' (1615), HRS 643 e 'Cleópatra x Rubidoux' (1600). Entre os 16 porta-enxertos não se

observaram diferenças significativas com relação ao sistema radicular nas plantas infectadas ou não.

Os porta-enxertos, HRS 643 e 'Cleópatra x Rubidoux' (1600) com exceção do 'Clementina x trifoliata' (1615), foram os que tiveram maior redução de volume radicular, e os dois primeiro apresentam a tangerina 'Cleópatra' como um dos genitores. No entanto, para HRS 702, apesar da redução de 25%, o efeito não foi significativo. Dados que confirmam o relatado por Lopes e Frare (2008), que ao avaliarem a reação dos porta-enxertos ao *Ca. L. americanus*, observaram que a tangerina 'Cleópatra' é o porta-enxerto mais afetado.

A diminuição do volume e morte das raízes pela infecção da planta com HLB foi demonstrada por Etxeberria et. al. (2009), onde constataram que o amido localizado nas raízes das árvores afetadas vai sendo esgotado com o passar do tempo já que os mesmos são consumidos para manter as atividades metabólicas da raiz.

Tabela 11. Valores médios do volume (cm³) do sistema radicular dos 16 porta-enxertos sob laranjeira 'Valência', infectados e não com *Ca. Liberibacter asiaticus*. EECB, 2012.

Porta_Enxerto	Infectado	Não Infectado	Média	Teste F	C.V. (%)
Clementina x trifoliata (1615)	114,00 a B	212,50 a A	142,14	3,98 *	23,92
HRS 643	110,00 a B	222,50 a A	142,14	5,19 *	19,93
Cleópatra x Swingle (1614)	146,00 a A	170,00 a A	152,85	0,24 ns	58,75
Cleópatra x Rubidoux (1600)	148,00 a B	270,00 a A	182,85	6,10 *	19,38
HRS 702	152,00 a A	202,50 a A	166,42	1,05 ns	26,66
HRS 849	184,00 a A	210,00 a A	191,42	0,28 ns	27,16
Troyer tetraplóide	154,00 a A	160,00 a A	155,71	0,01 ns	50,83
Carrizo tetraplóide	214,00 a A	280,00 a A	225,00	1,04 ns	5,83
Flying Dragon	145,00 a A	222,50 a A	167,14	2,46 ns	46,43
HRS 812	160,00 a A	180,00 a A	165,71	0,16 ns	14,78
Changsha x English Large	174,00 a A	205,00 a A	182,85	0,39 ns	51,05
Limoeiro Cravo	200,00 a A	212,50 a A	203,57	0,06 ns	32,00
Rhode Red + Volkameriano	170,00 a A	250,00 a A	192,85	2,62 ns	30,41
Poncirus trifoliata	189,00 a A	195,00 a A	187,85	0,01 ns	28,14
Sunki	137,00 a A	140,00 a A	126,42	0,56 ns	38,06
Citrumelo Swingle	154,00 a A	215,00 a A	171,42	1,52 ns	39,37
Média	159,43	203,70	-	-	-
Teste F	1,15 ns	0,96 ns	-	-	-
C.V. (%)	33,43	34,01	-	-	-

Médias seguidas das mesmas letras minúsculas (coluna) e maiúsculas (linha) não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

ns = não significativo; * = significativo a 5%

Plantas cítricas infectadas com HLB desenvolvem sintomas gerais de deficiência nutricional na folha, ramos e frutos (GRAÇA, 1991; FUNDECITRUS, 2009). Alguns sintomas foliares da doença se assemelham a deficiência intensa de nutrientes como ferro e zinco (BOVÉ, 2006, LOPES & FRARE, 2008), e podem apresentar de maneira geral concentrações foliares de nitrogênio, potássio, cálcio, e enxofre inferiores às plantas sadias (MALAVOLTA et al, 2005).

Malavolta et al. (2005), em estudos com plantas de Valência e Westin sob Cravo com 6 anos de idade e Taiti com 2 anos e meio infectadas com HLB,

definiram as tendências na variação de teores dos elementos com o avanço da doença, e os mesmos concluíram que há uma diminuição nos teores de N, K, Ca, Mg, S e Zn, aumento na concentração de P, Cu e Fe, e Mn e B não apresentaram uma tendência clara em comparação com folhas sem sintomas. Segundo os mesmos autores, quando se comparam essas informações vêem-se variações em função das variedades e o nível de severidade da doença.

Os resultados dos valores médios da análise foliar da laranjeira 'Valência' entre os porta-enxertos para o nitrogênio (Tabela 12), apresentaram significância tanto nas plantas infectadas quanto nas não infectadas. Nas plantas infectadas de 'Valência', o teor médio de N das mudas sobre HRS 702 foi o que apresentou menor valor para esse macronutriente, sendo semelhante ao HRS 849, 'Troyer' tetraplóide e HRS 643. Para as plantas não infectadas, 'Cleópatra x Swingle' (1614) apresentou o maior valor médio para o teor de nitrogênio diferindo estatisticamente de 'Clementina x trifoliata' (1615), 'Carrizo' tetraplóide, 'Flying Dragon', limoeiro 'Cravo', 'Rhode Red + Volkameriano', '*Poncirus trifoliata*', tangerineira 'Sunki' e citrumelo 'Swingle'. Dentro do mesmo tratamento, a maioria das plantas infectadas apresentou uma concentração de N superior em relação às mudas não infectadas. As diferenças significativas foram observadas para as plantas enxertadas nos porta-enxertos 'Clementina x trifoliata' (1615), 'Carrizo' tetraplóide, 'Flying Dragon', HRS 812, limoeiro 'Cravo', 'Rhode Red + Volkameriano', '*Poncirus trifoliata*', tangerineira 'Sunki' e citrumelo 'Swingle'.

Os resultados de N nas folhas de 'Valência' sobre a maioria dos porta-enxertos na comparação dentro do mesmo tratamento, onde as plantas infectadas apresentaram teores maiores em relação as não infectadas, foi contrário aos encontrados em plantas a campo por Malavolta et al., (2005), Bové, (2006), Lopes e Frare, (2008). O resultado encontrado no experimento pode ser explicado por uma maior mobilização de reservas de N das raízes para a copa, e o fato que a análise foliar das plantas infectadas foi realizada com a mistura de folhas sintomáticas e não sintomáticas.

Os valores médios de fósforo (P) na laranjeira 'Valência' (Tabela 12), apresentaram diferenças estatísticas entre os porta-enxertos apenas nas plantas não infectadas, e no 'Troyer' tetraplóide observou-se o maior valor médio para esse nutriente diferindo significativamente de 'Clementina x trifoliata' (1615), HRS 643, 'Cleópatra x Swingle' (1614), HRS 702, HRS 849 e tangerineira 'Sunki'. Dentro do

mesmo porta-enxerto a diferença ficou para citrangeiros 'Troyer' e 'Carrizo' tetraplóides, 'Changsha x English Large' e 'Rhode Red + Volkameriano', sendo que nesses os teores de P nas plantas não infectadas foram sempre superiores em relação às mudas infectadas.

Quanto aos valores médios de potássio (K) entre os porta-enxertos, foi observado diferença significativa tanto nas plantas infectadas e não infectadas, e nas duas situações o 'Rhode Red + Volkameriano' apresentou a maior média do teor de K em relação aos demais porta-enxertos, porém esse tratamento na presença da bactéria é semelhante estatisticamente a HRS 702, 'Troyer' tetraplóide, 'Changsha x English Large', limoeiro 'Cravo', *Poncirus trifoliata* e citrumelo 'Swingle'. Para as plantas não infectadas, o híbrido somático diferiu dos HRS 643, 'Cleópatra x Rubidoux' (1600), HRS 702, HRS 849, citrangeiros 'Troyer' e 'Carrizo' tetraplóides e HRS 812. Dentro do mesmo porta-enxerto a diferença significativa foi observada em 'Rhode Red + Volkameriano' e tangerineira 'Sunki', sendo que nesses os valores médios de potássio nas plantas não infectadas foram superiores ao das plantas que receberam a bactéria (Tabela 12).

Em relação aos valores médios de cálcio (Ca), observaram-se duas diferenças significativas para a infecção dentro do mesmo tratamento, 'Clementina x trifoliata' (1615) e HRS 849. Entre os porta-enxertos houve diferenças significativas tanto nas plantas infectadas quanto nas não infectadas. Nas plantas infectadas, os maiores valores encontrados para o Ca foram no 'Carrizo' tetraplóide, limoeiro 'Cravo', HRS 849 e 'Sunki'. Nas plantas não infectadas, o 'Carrizo' também teve as maiores concentrações de cálcio e os menores valores para esse macronutriente foi observado em *Poncirus trifoliata* (Tabela 12).

Houve diferença significativa tanto entre as plantas infectadas e não infectadas para os valores médios de magnésio (Mg). Nas mudas infectadas os maiores teores foram apresentados em tangerineira 'Sunki', que diferiu dos demais porta-enxertos. Para as não infectadas, as maiores concentrações de Mg foram da própria tangerineira 'Sunki' e *Poncirus trifoliata*, diferindo estatisticamente apenas do limoeiro 'Cravo'. Dentro do mesmo tratamento observou-se que todas as mudas, quando infectadas com o HLB reduziram o teor desse nutriente, apesar de que a diferença estatística das plantas infectadas em relação às não infectadas só foi encontrada em 'Clementina x trifoliata' (1615), 'Cleópatra x Rubidoux' (1600), HRS 702, HRS 849, 'Troyer' tetraplóide, 'Flying Dragon' e citrumelo 'Swingle' (Tabela 12).

Os valores médios de enxofre (S) apresentaram diferenças estatísticas entre tratamentos apenas nas plantas infectadas, sendo que as mudas sob 'Changsha x English Large' apresentaram os maiores teores desse macronutriente diferindo de HRS 812, HRS 702, 'Cleópatra x Swingle' (1614), 'Cleópatra x Rubidoux' (1600) e 'Clementina x trifoliata' (1615). Dentro do mesmo tratamento apenas o '*Poncirus trifoliata*', apresentou significância entre plantas infectadas e não infectadas (Tabela 12).

Tabela 12. Valores médios da análise foliar dos teores de macronutrientes (g.Kg⁻¹) de laranja 'Valência' sobre 16 porta-enxertos, infectados e não com *Ca. Liberibacter asiaticus*. EECB, 2012

Porta_Enxerto	N		Média	Teste F	C.V. (%)	P		Média	Teste F	C.V. (%)	K		Média	Teste F	C.V. (%)
	Infectado	Não Infectado				Infectado	Não Infectado				Infectado	Não Infectado			
Clementina x trifoliata (1615)	29,44 a A	22,00 b B	27,31	10,48**	12,10	1,73 a A	1,75 c A	1,74	0,00 ns	6,44	15,68 b A	17,20 ab A	16,11	1,02 ns	9,62
HRS 643	28,48 ab A	24,40 ab A	27,31	3,15 ns	10,45	1,77 a A	1,89 bc A	1,81	0,07 ns	16,88	15,46 b A	14,95 b A	15,31	0,12 ns	9,62
Cleopatra x Swingle (1614)	30,40 a A	30,80 a A	30,51	0,03 ns	16,68	2,01 a A	1,85 bc A	1,97	0,15 ns	15,18	15,68 b A	16,30 ab A	15,85	0,12 ns	15,78
Cleopatra x Rubidoux (1600)	29,60 a A	26,40 ab A	28,68	1,94 ns	15,68	2,01 a A	2,13 abc A	2,05	0,08 ns	19,51	12,72 c A	13,90 b A	13,05	0,62 ns	10,00
HRS 702	23,52 b A	24,00 ab A	23,65	0,04 ns	8,17	1,98 a A	1,99 bc A	1,99	0,00 ns	13,69	16,30 ab A	15,00 b A	15,92	0,75 ns	12,86
HRS 849	28,00 ab A	23,60 ab A	26,74	3,66 ns	6,35	2,11 a A	2,03 bc A	2,09	0,04 ns	13,63	14,06 bc A	15,00 b A	14,32	0,39 ns	9,31
Troyer tetraplóide	25,92 ab A	30,40 a A	27,20	3,80 ns	13,75	2,40 a B	3,78 a A	2,80	11,00**	19,79	17,68 ab A	14,85 b A	16,87	3,55 ns	10,91
Carrizo tetraplóide	30,88 a A	19,20 b B	28,93	15,06**	2,96	2,22 a B	3,50 ab A	2,43	5,53*	8,27	14,20 bc A	12,90 b A	13,98	0,44 ns	11,95
Flying Dragon	30,08 a A	21,60 b B	27,65	15,06**	9,61	2,15 a A	2,38 abc A	2,22	0,29 ns	0,80	14,12 bc A	15,35 ab A	14,47	0,67 ns	6,64
HRS 812	30,24 a A	24,00 ab B	28,45	7,37**	4,13	1,83 a A	2,52 abc A	2,03	2,75 ns	12,22	14,00 bc A	13,85 b A	13,95	0,01 ns	14,02
Changsha x English Large	30,88 a A	26,40 ab A	29,60	3,80 ns	12,28	2,22 a B	3,08 abc A	2,47	4,26*	9,21	16,80 ab A	18,20 ab A	17,20	0,87 ns	7,58
Limoeiro Cravo	29,60 a A	22,40 b B	27,54	9,81**	3,18	2,18 a A	2,10 abc A	2,16	0,04 ns	10,73	16,98 ab A	17,65 ab A	17,17	0,20 ns	5,18
Rhode Red + Volkameriano	30,24 a A	17,60 b B	26,62	30,25**	5,17	2,03 a B	2,97 abc A	2,30	5,22*	20,48	19,12 a B	22,20 a A	20,00	4,21*	8,47
Poncirus trifoliata	30,40 a A	18,80 b B	27,08	25,47**	5,03	2,05 a A	2,13 abc A	2,08	0,03 ns	20,62	16,72 ab A	16,35 ab A	16,61	0,06 ns	15,38
Sunki	30,08 a A	21,20 b B	27,54	25,47**	8,78	1,86 a A	1,89 bc A	1,87	0,00 ns	10,48	12,58 c B	16,35 ab A	13,65	6,30*	11,01
Citrumelo Swingle	30,08 a A	18,00 b B	26,62	27,62**	3,21	2,94 a A	2,20 abc A	2,73	3,16 ns	15,55	18,58 a A	19,65 ab A	18,88	0,51 ns	14,36
Média	29,24	23,30	-	-	-	2,09	2,35	-	-	-	15,66	16,33	-	-	-
Teste F	2,58**	2,58**	-	-	-	1,69 ns	4,32**	-	-	-	5,91**	3,23**	-	-	-
C.V. (%)	8,68	14,63	-	-	-	24,19	17,60	-	-	-	12,28	6,44	-	-	-

Continua...

Continuação Tabela 12.

Porta_Enxerto	Ca		Média	Teste F	C.V. (%)	Mg		Média	Teste F	C.V. (%)	S		Média	Teste F	C.V. (%)
	Infectado	Não Infectado				Infectado	Não Infectado				Infectado	Não Infectado			
Clementina x trifoliata (1615)	15,48 cd B	23,15 ab A	17,67	4,33*	23,31	2,38 bc B	3,50 ab A	2,70	8,33**	17,75	1,70 bc A	1,50 a A	1,64	0,35 ns	10,29
HRS 643	14,68 d A	20,00 b A	16,20	2,08 ns	9,03	2,28 bc A	3,05 ab A	2,50	3,94 ns	12,81	2,00 abc A	1,36 a A	1,82	3,58 ns	21,47
Cleópatra x Swingle (1614)	20,06 cd A	23,30 ab A	20,98	0,77 ns	12,72	2,26 bc A	2,70 ab A	2,38	1,29 ns	32,21	1,71 bc A	1,88 a A	1,76	0,24 ns	12,48
Cleópatra x Rubidoux (1600)	24,72 bc A	20,60 b A	23,54	1,25 ns	22,65	2,42 bc B	3,35 ab A	2,68	5,74*	15,38	1,92 bc A	1,56 a A	1,81	1,10 ns	19,59
HRS 702	21,96 bc A	20,10 b A	21,42	0,25 ns	21,53	2,08 c B	3,25 ab A	2,41	9,09**	24,80	1,63 c A	1,26 a A	1,52	1,18 ns	11,68
HRS 849	25,72 abc B	35,70 a A	28,57	7,33**	17,43	2,40 bc B	3,45 ab A	2,70	7,32**	21,88	2,15 abc A	2,30 a A	2,19	0,19 ns	19,45
Troyer tetraplóide	21,48 bc A	20,55 b A	21,21	0,06 ns	21,76	2,00 c B	3,05 ab A	2,30	7,32**	15,62	2,33 abc A	2,48 a A	2,37	0,18 ns	18,17
Carrizo tetraplóide	34,62 a A	40,00 a A	36,15	1,24 ns	18,77	2,98 b A	3,60 ab A	3,08	1,49 ns	7,60	2,60 ab A	2,20 a A	2,53	0,79 ns	18,08
Flying Dragon	21,60 bc A	26,45 ab A	22,98	1,73 ns	15,21	2,52 bc B	3,50 ab A	2,80	6,38*	14,00	2,44 abc A	2,34 a A	2,41	0,09 ns	15,18
HRS 812	23,24 bc A	27,75 ab A	24,52	1,50 ns	8,51	2,78 bc A	3,20 ab A	2,90	1,17 ns	14,03	1,80 bc A	2,44 a A	1,98	3,40 ns	13,77
Changsha x English Large	21,84 bc A	28,20 ab A	23,65	2,98 ns	9,27	2,66 bc A	3,35 ab A	2,85	3,16 ns	12,49	2,84 a A	2,82 a A	2,83	0,00 ns	16,73
Limoeiro Cravo	30,60 ab A	33,25 a A	31,35	0,52 ns	22,37	1,92 c A	2,05 b A	1,95	0,11 ns	18,46	2,32 abc A	2,32 a	2,32	0,00 ns	16,14
Rhode Red + Volkameriano	19,12 cd A	23,15 ab A	20,27	1,19 ns	15,46	2,62 bc A	2,80 ab A	2,67	0,22 ns	9,88	2,10 abc A	2,48 a A	2,21	1,20 ns	17,82
Poncirus trifoliata	20,02 cd A	15,95 c A	18,85	1,22 ns	16,37	3,24 b A	3,95 a A	3,44	3,35 ns	9,16	2,56 ab A	1,36 a B	2,22	12,43**	11,33
Sunki	25,34 abc A	19,15 b A	23,57	2,82 ns	11,41	4,52 a A	4,05 a A	4,38	1,47 ns	12,71	2,09 abc A	1,68 a A	1,97	1,47 ns	13,58
Citrumelo Swingle	22,70 bc A	24,10 ab A	23,10	0,14 ns	17,91	2,58 bc B	3,45 ab A	2,82	5,03*	21,05	1,96 abc A	1,92 a A	1,94	0,01 ns	10,06
Média	22,69	24,60	-	-	-	2,60	3,25	-	-	-	2,13	1,98	-	-	-
Teste F	6,39**	3,62**	-	-	-	8,86**	2,13*	-	-	-	3,75**	2,78 ns	-	-	-
C.V. (%)	20,36	12,87	-	-	-	17,70	14,12	-	-	-	18,94	20,88	-	-	-

Médias seguidas das mesmas letras minúsculas (coluna) e maiúsculas (linha) não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

ns = não significativo; * = significativo a 5%; ** = significativo a 1%

Para os valores médios de boro (B), observou-se diferença significativa entre as plantas infectadas e não. Mudanças sobre 'Changsha x English Large' continham os maiores teores de B nas duas situações, diferindo significativamente nas plantas infectadas de 'Clementina x trifoliata' (1615), HRS 643, citrange 'Troyer', 'Rhode Red + Volkameriano', tangerineira 'Sunki' e citrumelo 'Swingle'. Nas não infectadas apresentou-se semelhante a HRS 643, 'Carrizo', HRS 812 e 'Rhode Red + Volkameriano'. Quatro tratamentos diferiram na comparação entre as plantas infectadas e não infectadas: HRS 643, 'Rhode Red + Volkameriano', HRS 702 e '*Poncirus trifoliata*', entretanto nos dois primeiros porta-enxertos citados, as médias dos teores de boro nas plantas infectadas foram menores do que nas não infectadas, resultado diferente ao encontrado para os outros dois (Tabela 13).

Em relação aos valores médios dos micronutrientes cobre (Cu) e ferro (Fe), nenhuma diferença significativa foi encontrada, independente, se a comparação foi realizada entre ou dentro dos porta-enxertos decorrente da infecção ou não (Tabela 13).

Quanto aos valores médios de manganês (Mn), não houve diferença significativa dentro do mesmo porta-enxerto. Entre os porta-enxertos foi observado diferença significativa tanto nas plantas infectadas e não infectadas. Nas plantas com a presença da bactéria, 'Changsha x English Large' apresentou o maior valor médio, mas estatisticamente é semelhante a 'Cleópatra x Swingle' (1614), 'Cleópatra x Rubidoux' (1600), HRS 849, citrangeiros 'Troyer' e 'Carrizo' tetraplóides e 'Flying Dragon'. Para as mudas não infectadas, observou-se que o 'Troyer' tetraplóide apresentou os maiores valores médios de Mn, e diferiu de 'Clementina x trifoliata' (1615), HRS 643, '*Poncirus trifoliata*', 'Sunki' e citrumelo 'Swingle' (Tabela 13).

Para os valores médios de zinco (Zn), diferenças estatísticas entre os tratamentos houve apenas nas plantas infectadas, sendo 'Rhode Red + Volkameriano' o que apresentou a maior concentração desse nutriente, porém estatisticamente diferiu apenas de HRS 643. Dentro do mesmo porta-enxerto, 'Cleópatra x Swingle' (1614) e 'Flying Dragon', foram os únicos que diferiram as plantas infectadas das não infectadas. No entanto, vale ressaltar que a concentração de Zn nas folhas das plantas não infectadas sob todos os porta-enxertos foi superior à das mudas infectadas (Tabela 13).

A média geral dos teores de K, Ca, Mg e Zn das plantas infectadas foram inferiores em relação as não infectadas. Resultados semelhantes encontrados por Lopes e Frare, (2008). Os micronutrientes Mn e B não apresentaram uma tendência clara na comparação entre plantas infectadas e não do mesmo tratamento, resultados semelhantes também encontrados por Malavolta et al, (2005).

Os valores médios para citros dos macronutrientes, em g.Kg^{-1} , N = 31,8; P = 2,3 ; K = 26,7 ; Ca = 19,0 ; Mg = 3,8 ; S = 2,4 ; e micronutrientes (mg.Kg^{-1}), B = 52, Cu = 13 , Fe = 120 , Mn = 21 e Z = 36, determinados por Girardi, et al., (2005) em mudas de laranjeira 'Valência' sobre citrumeleiro 'Swingle' apresentam grandes variações em relação aos valores encontrados na análise foliar do experimento, seja na comparação com as plantas infectadas ou não. Segundo Mattos Junior et al., (2005), os teores foliares dos nutrientes não dependem unicamente da disponibilidade do elemento no solo, pois sofrem influência de outros fatores, como taxa de crescimento da planta, idade da folha, combinações copa e porta-enxerto, e interações com outros nutrientes.

Tabela 13. Valores médios da análise foliar dos teores de micronutrientes (mg.Kg⁻¹) de laranja 'Valência' sobre 16 porta-enxertos, infectados e não com *Ca. Liberibacter asiaticus*. EECB, 2012

Porta_Enxerto	B		Média	Teste F	C.V. (%)	Cu		Média	Teste F	C.V. (%)	Fe		Média	Teste F	C.V. (%)
	Infectado	Não Infectado				Infectado	Não Infectado				Infectado	Não Infectado			
Clementina x trifoliata (1615)	52,60 bc A	77,50 bc A	59,71	1,73 ns	13,82	6,80 a A	4,50 a A	6,14	1,58 ns	16,55	135,20 a A	109,00 a A	127,71	0,15 ns	17,21
HRS 643	67,60 b B	127,00 a A	84,57	9,83**	19,51	6,40 a A	5,00 a A	6,00	0,58 ns	22,61	140,80 a A	106,00 a A	130,85	0,26 ns	17,68
Cleópatra x Swingle (1614)	83,40 ab A	82,50 b A	83,14	0,00 ns	17,26	5,60 a A	5,00 a A	5,42	0,11 ns	19,93	143,20 a A	125,00 a A	138,00	0,07 ns	16,37
Cleópatra x Rubidoux (1600)	87,40 ab A	60,00 bc A	79,57	2,09 ns	12,38	6,00 a A	5,00 a A	5,71	0,30 ns	15,00	154,20 a A	109,50 a A	141,42	0,43 ns	15,27
HRS 702	83,60 ab A	40,50 c B	71,28	5,18*	15,20	5,60 a A	5,00 a A	5,42	0,11 ns	22,11	138,20 a A	96,00 a A	126,14	0,39 ns	13,83
HRS 849	91,20 ab A	90,00 b A	90,85	0,00 ns	11,45	5,20 a A	5,50 a A	5,28	0,03 ns	15,80	167,40 a A	141,50 a A	160,00	0,15 ns	19,22
Troyer tetraplóide	65,20 b A	88,00 b A	71,71	1,45 ns	11,98	5,80 a A	6,50 a A	6,00	0,15 ns	20,14	137,20 a A	140,50 a A	138,14	0,00 ns	17,45
Carrizo tetraplóide	82,80 ab A	106,00 ab A	86,66	0,87 ns	9,20	5,60 a A	6,00 a A	5,66	0,03 ns	21,00	143,60 a A	134,00 a A	142,00	0,01 ns	11,68
Flying Dragon	82,00 ab A	67,00 bc A	77,71	0,63 ns	13,23	5,80 a A	5,00 a A	5,57	0,19 ns	13,43	197,20 a A	250,00 a A	212,28	0,60 ns	26,53
HRS 812	82,60 ab A	102,50 ab A	88,28	1,10 ns	17,81	5,40 a A	7,00 a A	5,85	0,76 ns	13,66	227,60 a A	203,00 a A	220,57	0,13 ns	27,85
Changsha x English Large	115,40 a A	137,00 a A	121,57	1,30 ns	13,70	6,40 a A	6,00 a A	6,28	0,05 ns	16,22	199,20 a A	293,50 a A	226,14	1,92 ns	16,12
Limoeiro Cravo	89,00 ab A	58,50 bc A	80,28	2,59 ns	23,74	5,80 a A	5,00 a A	5,57	0,19 ns	20,93	138,00 a A	131,50 a A	136,14	0,01 ns	14,93
Rhode Red + Volkameriano	47,40 c B	101,50 ab A	62,85	8,15**	13,96	6,00 a A	8,00 a A	6,57	0,19 ns	11,92	109,00 a A	125,00 a A	113,57	3,12 ns	18,17
Poncirus trifoliata	81,60 ab A	39,50 c B	59,57	4,94*	15,24	6,40 a A	5,50 a A	7,57	2,51 ns	18,74	136,80 a A	90,50 a A	123,57	0,46 ns	11,54
Sunki	54,00 bc A	66,00 bc A	48,85	0,90 ns	16,84	7,20 a A	5,50 a A	6,71	0,86 ns	16,77	123,20 a A	103,50 a A	117,57	0,08 ns	16,10
Citrumelo Swingle	64,40 b A	61,00 bc A	63,42	0,03 ns	17,72	9,20 a A	7,00 a A	8,57	1,44 ns	15,98	133,60 a A	148,50 a A	137,85	0,05 ns	19,25
Média	76,88	78,80	-	-	-	6,32	6,32	-	-	-	160,02	144,51	-	-	-
Teste F	2,93**	3,50**	-	-	-	1,27 ns	0,39 ns	-	-	-	1,03 ns	0,98 ns	-	-	-
C.V. (%)	27,47	22,58	-	-	-	26,87	24,14	-	-	-	32,40	26,31	-	-	-

Continua...

Continuação Tabela 13.

Porta_Enxerto	Mn		Média	Teste F	C.V. (%)	Zn		Média	Teste F	C.V. (%)
	Infetado	Não Infetado				Infetado	Não Infetado			
Clementina x trifoliata (1615)	45,40 b A	18,50 c A	37,71	1,21 ns	14,37	19,00 ab A	24,50 a A	20,57	0,87 ns	21,58
HRS 643	62,80 b A	18,00 c A	50,00	3,36 ns	22,68	17,40 b A	18,00 a A	17,57	0,01 ns	17,11
Cleópatra x Swingle (1614)	78,80 ab A	80,50 a A	79,28	0,00 ns	13,14	21,60 ab B	33,50 a A	25,00	4,09*	21,44
Cleópatra x Rubidoux (1600)	93,80 a A	48,00 ab A	80,71	3,51 ns	12,52	24,00 ab A	28,50 a A	25,28	0,58 ns	15,04
HRS 702	56,60 b A	39,00 ab A	51,57	0,52 ns	15,85	22,80 ab A	29,50 a A	24,71	1,30 ns	15,24
HRS 849	94,20 a A	82,50 a A	90,85	0,23 ns	24,56	22,20 ab A	30,50 a A	24,57	1,99 ns	19,20
Troyer tetraplóide	72,00 ab A	96,50 a A	79,00	0,23 ns	19,25	19,60 ab A	24,50 a A	23,14	1,99 ns	18,30
Carrizo tetraplóide	84,80 ab A	51,00 ab A	79,16	1,12 ns	20,02	30,00 ab A	33,00 a A	30,50	1,99 ns	23,10
Flying Dragon	91,40 a A	71,00 ab A	85,57	0,70 ns	16,91	22,80 ab A	35,50 a A	26,42	4,65*	16,39
HRS 812	66,20 b A	71,50 ab A	67,71	0,05 ns	19,72	24,60 ab A	30,00 a A	26,14	0,84 ns	13,60
Changsha x English Large	118,00 a A	73,50 ab A	97,71	2,81 ns	21,58	28,20 ab A	32,00 a A	29,28	0,42 ns	13,56
Limoeiro Cravo	51,20 b A	71,00 ab A	56,85	0,66 ns	14,93	25,00 ab A	31,00 a A	26,71	1,04 ns	24,49
Rhode Red + Volkameriano	33,40 bc A	43,50 ab A	36,28	0,17 ns	11,31	30,00 a A	35,00 a A	33,00	1,41 ns	14,21
Poncirus trifoliata	17,20 c A	13,00 c A	16,00	0,03 ns	11,72	20,80 ab A	26,00 a A	22,28	0,78 ns	16,40
Sunki	29,40 bc A	23,00 bc A	27,57	0,07 ns	16,91	23,20 ab A	31,50 a A	25,57	1,99 ns	23,81
Citrumelo Swingle	28,60 bc A	20,50 bc A	26,28	0,11 ns	17,23	21,40 ab A	28,00 a A	23,28	1,26 ns	22,50
Média	63,98	56,83	-	-	-	23,91	28,54	-	-	-
Teste F	4,82**	3,56**	-	-	-	1,85*	0,90 ns	-	-	-
C.V. (%)	37,78	39,84	-	-	-	30,30	20,44	-	-	-

Médias seguidas das mesmas letras minúsculas (coluna) e maiúsculas (linha) não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

ns = não significativo; * = significativo a 5% ; ** = significativo a 1%

V. CONCLUSÕES

Os níveis de bactéria encontrados em plantas de laranjeira 'Valencia' sobre 'Carrizo' tetraplóide, apresentaram-se inferiores em relação aos porta-enxertos estudados, que mostram este genótipo como 'diferencial' ao HLB.

Variáveis biométricas não são adequadas para a avaliação da reação ao *Ca. Liberibacter asiaticus* de variedades porta-enxerto quando se utiliza plantas enxertadas.

Os valores médios de macro e micronutrientes da análise foliar encontrados no experimento nas plantas infectadas ou não, apresentaram grandes variações quando comparados aos valores médios para citros.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBRECHT, U.; K.D. BOWMAN. Tolerance of the Trifoliolate Citrus Hybrid US-897 (*Citrus reticulata* Blanco x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) to Huanglongbing. **Scientia Horticulturae**, v. 46 (1), p.16–22, 2011.

ALBRECHT, U.; K.D. BOWMAN. Tolerance of trifoliolate citrus rootstock hybrids to *Candidatus Liberibacter asiaticus*. **Scientia Horticulturae**, v.147, p. 71–80, 2012.

ALBRECHT, U.; MCCOLLUM, G.; BOWMAN, K. D. Influence of rootstock variety on Huanglongbing disease development in field-grown sweet orange (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck) trees. **Scientia Horticulturae**, v. 138, p. 210–220, 2012.

ALONSO, A.; MARTÍN, P.; ALBARRÁN, C.; GARCÍA, P.; PRIMORAC, D.; GARCÍA, O.; SIMÓN, L. F.; GARCÍA-HIRSCHFELD, J.; SANCHO, M.; FERNÁNDEZ-PIQUERAS, J. Specific quantification of human genomes from low copy number DNA samples in forensic and ancient DNA studies. **Croatian Medical Journal**, v. 44, p. 273-280, 2003.

ARAÚJO, E. F.; ROQUE, N. Taxonomia dos citros. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R. M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: IAC; Fundag, cap. 6, p. 127- 143, 2005.

BARBOSA, F. F. L.; NASCIMENTO, A. S.; FILHO, H. P. S. **Greening, a mais Grave e Destrutiva Doença dos Citros: Nova Ameaça à Citricultura**. EMBRAPA Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas, v. 1, n. 31, p. 2, 2009.

BASSANEZI, R. B.; LOPES, S. A.; BELASQUE JÚNIOR, J.; SPÓSITO, M. B.; YAMAMOTO, P. T.; MIRANDA, M. P.; TEIXEIRA, D. C.; WULFF, N. A. Epidemiologia do huanglongbing e suas implicações para o manejo da doença. **Revista Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v.31, n.1, p.11-23, 2010.

BASSANEZI, R. B.; MONTESINO, L. H.; STUCHI, E. S. Effects of huanglongbing on fruit quality of sweet orange cultivars in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, v. 125, p. 565-572, 2009.

BELASQUE JÚNIOR, J.; BERGAMIN FILHO, A.; BASSANEZI, R. B.; BARBOSA, J. C.; GIMENES, F. N.; YAMAINOTO, P. T.; LOPES, A. S.; MACHADO, M. A.; LEITE, I. R. R. P.; AYRES, A. I.; MASSARI, C. A. Base científica para a erradicação de plantas sintomáticas e assintomáticas de huanglongbing (HLB, greening) visando o controle efetivo da doença. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, p.137-145, 2009.

BELASQUE JÚNIOR, J.; YAMAMOTO, P. T.; MIRANDA, M. P.; BASSANEZI, R. B.; AYRES, A. J.; BOVÉ, J. M. Controle do Huanglongbing no estado de São Paulo, Brasil. **Revista Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v.31, n.1, p.53-64, 2010.

BERNARDI, A. C. C.; CARMELLO, Q. A. C.; CARVALHO, S. A. Development of citrus nursery trees grown in pots in response to NPK fertilization. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, n. 4, p. 733-738, 2000.

BOSCARIOL-CAMARGO, R. L.; CRISTOFANI-YALY, M.; MALOSSO, A.; COLETTA-FILHO, H. D.; MACHADO, M. A. Avaliação de diferentes genótipos de citros à infecção por *Candidatus Liberibacter asiaticus*. **Revista Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v. 31, n. 1, p.85-90, 2010.

BOSCO, D.; GALETTO, L.; LEONCINI, P.; SARACCO, P.; RACCAH, B.; MARZACHÌ, C. Interrelationships between “*Candidatus Phytoplasma asteris*” and its leafhopper vectors (Homoptera: Cicadellidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 100, p. 1504-1511, 2007.

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.

BOVÉ, J. M.; TEIXEIRA, D. C.; WULFF, N. A.; EVEILLARD, S.; SAILLARD, C.; BASSANEZI, R. B.; LOPES, S. A.; YAMAMOTO, P. T.; AYRES, A. J. Several *Liberibacter* and *Phytoplasma* species are individually associated with HLB. **Proceedings of the International Research Conference on Huanglongbing**, Orlando, p.152-155, 2008.

BLUMER, S.; POMPEU JÚNIOR, J. Avaliação de citrandarins e outros híbridos de trifoliata como porta-enxertos para citros em São Paulo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 27, n. 2, p. 264-267, 2005.

CANTUARIAS-AVILÉS, T. E. Avaliação horticultural da laranjeira ‘Folha Murcha’, tangerineira ‘Satsuma’ e limeira ácida ‘Tahiti’ sobre doze portaenxertos. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, p. 129, 2009.

CARLOS, E.F.; STUCHI, E.S.; DONADIO, L.C. **Porta-enxertos para a citricultura paulista**. Jaboticabal: Funep, (Boletim Citrícola, 1), p. 47, 1997.

COELHO, Y. S. Frutas cítricas importadas no mercado de Salvador, Bahia. **Bahia Agrícola**, Salvador, v. 5, n. 2, p. 29-33, 2002.

COLETTA-FILHO, H. D.; CARLOS, E. F. Ferramentas para diagnóstico de Huanglongbing e detecção de agentes associados: dos sintomas aos ensaios de laboratórios. **Revista Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v.31, n.2, p.129-143, 2010.

COLETTA-FILHO, H. D.; CARLOS, E. F.; ALVES, K. C. S.; PEREIRA, M. A. R.; BOSCARIOL- CAMARGO, R. L.; SOUZA, A. A.; MACHADO, M. A. In planta multiplication and graft transmission of 'Candidatus Liberibacter asiaticus' revealed by Real-Time PCR. **European Journal of Plant Pathology**, v. 126, p. 53–60, 2010.

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

COSTA LIMA, A. M. **Insetos do Brasil, Homoptera**. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Agronomia, v. 3 p. 101, 1942.

CRISTOFANI, M.; MACHADO, M. A.; GRATTAPAGLIA, D. Genetic linkage maps of *Citrus sunki* Hort. ex. Tan. and *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. and mapping of Citrus tristeza virus resistance gene. **Euphytica**, v.109, p.25-32, 1999.

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

DHANASEKARAN, S.; DOHERTY, T. M.; KENNETH, J.; TRIALS STUDY GROUP, T. B. Comparison of different standards for real-time PCR-based absolute quantification. **Journal of Immunological Methods**, v. 354, p. 34-39, 2010.

ETXEBERRIA, E. D.; GONZALEZ, P.; ARCHOR, 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.

FAO. **FAOSTAT- Estatística database**. Disponível em: <<http://www.fao.org>> Acesso em: 10 jun 2011.

FAO. **FAOSTAT**. Database results. Rome. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>> Acesso em: 22 fev. 2012.

FOLIMONOVA, S. Y.; ROBERTSON, 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. **Citrus Research and Education Center**, University of Florida, v. 99, n° 12, p. 1346-1354, 2009.

FUNDECITRUS. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br>>. Acesso em: 10 nov. 2012.

GALETTO, L.; BOSCO, D.; MARZACHÌ, C. Universal and group-specific real-time PCR diagnosis of flavescence dorée (16Sr-V), bois noir (16Sr-XII) and apple proliferation (16Sr-X) phytoplasmas from field-collected plant hosts and insect vectors. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 147, p. 191-201, 2005.

GARNIER, M.; DANIEL, N.; BOVÉ, J.M. The greening organism is a Gram negative bacterium. **Proceedings of 9th Conference of International Organization of Citrus Virologists**, Riverside, p. 115-124, 1984.

GIBSON, U.E.; HEID, C.A.; WILLIAMS, P.M. A novel method for real-time quantitative RT-PCR. **Genetical Research**, Cambridge, v. 6, p. 1095-2001, 1996.

GIMENES, N. F.; BASSANEZI, R. B. Doença de causa desconhecida afeta pomares cítricos no norte de São Paulo e sul do Triângulo Mineiro. **Summa Phytopathology**, v.27, p. 93, 2001.

GIRARDI, E. A.; 2, MOURÃO FILHO, F. A. A.; ALVES, A. S. R. Mudanças de laranjeira 'Valência' sobre dois porta-enxertos e sob diferentes manejos de adubação. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, v. 32, 2010.

GOTTWALD, T. R.; DA GRAÇA, J. V.; BASSANEZI, R. B. Citrus Huanglongbing: the pathogen and its impact. **Plant Health Progress**, 2007.

GOTTWALD, T. R.; IREY, M. The plantation edge effect of HLB: a geostatistical analysis. **Proceedings of the International Research Conference on Huanglongbing**, Orlando, p. 305-308, 2008.

GRAÇA, J.V. Citrus greening disease. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 29, p. 109-136, 1991.

HAROLDSEN, V. M.; SZCZERBA¹, M. W.; AKTAS, H.; LOPEZ-BALTAZAR, J.; ODIAS, M. J.; CHI-HAM, C. L.; LABAVITCH, J. M.; BENNETT, A. B.; POWELL, A. L. T. Mobility of transgenic nucleic acids and proteins within grafted rootstocks for agricultural improvement. **Frontiers in Plant Science**, v. 3, p. 39, 2012.

HIGUCHI, R.; FOCKLER, C.; DOLLINGER, G.; WATSON, R. Kinetic PCR analysis: Real-Time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology**, Weinheim, v.11, n. 9, p.1026-1030, 1993.

HONG, L.; CHUANWU, C.; HARSHAVARDHAN, D.; YONGPING, D.; EDWIN, L. C.; XIANJIN, B.; XIAOLONG, Z. A new diagnostic system for ultra-sensitive and specific detection and quantification of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the bacterium associated with citrus Huanglongbing. **Journal of Immunological Methods**, v. 354, p. 39-45, 2010.

HOORFAR, J.; WOLFFS, P.; RADSTROM, P. Diagnostic PCR: validation and sample preparation are two sides of the same coin. **APMIS**, v. 14, p.112, 2004.

JAGOUÉIX, S.; BOVÉ, J. M.; GARNIER, M. The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the alpha subdivision of the Proteobacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 44, p. 379-386, 1994.

LARANJEIRA, F. F.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; AGUILAR-VILDOSO, C.A; COLETTA FILHO Fungos, procariotos, e doenças abióticas. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JÚNIOR, P. **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico de Campinas; Fundag, p. 509-566, 2005.

LI, W.; HARTUNG, J. S.; LEVY, L. Evaluation of DNA amplification methods for improved detection of 'Candidatus Liberibacter species' associated with citrus Huanglongbing. **Plant Disease**, v. 91, p.51-58, 2007.

LOPES, S. A., FRARE, G. F. Graft transmission and cultivar reaction of citrus to 'Candidatus Liberibacter americanus'. **Plant Disease**, v. 92, p. 21–24, 2008.

LOPES, S. A.; BERTOLINI, E.; FRARE, G. F.; MARTINS, E. C.; WULFF, N. A.; TEIXEIRA, D. C.; FERNANDES, N. G.; CAMBRA, M. Graft transmission efficiencies and multiplication of "Candidatus Liberibacter americanus" and "Ca. Liberibacter asiaticus" in citrus plants. **Phytopathology** v. 99, p. 301-306, 2009.

MACHADO, M. A. Detecção do agente causal do greening do citros (Candidatus Liberibacter asiaticus) no estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, v.30, p. 510, 2004.

MACHADO, M. A.; CRISTOFANI, M.; AMARAL, A. M.; OLIVEIRA, A.C. Genética, melhoramento e biotecnologia de citros. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: IAC; Fundag, cap. 9, p. 223-277, 2005.

MACHADO, M. A.; LOCALI-FABRIS, E. C.; COLLETA-FILHO, H. D. *Candidatus Liberibacter* spp., agentes do huanglongbing dos citros. **Revista Citrus Research & Technology**, Cordeiropolis, v.31, n.1, p. 25-35, 2010.

MACKAY, I. M.; MACKAY, J. F.; NISSEN, M. D.; SLOOTS, T. P. Real-time PCR: History and Fluorogenic Chemistries in Mackay. (ED.) Real-Time PCR in Microbiology, From Diagnosis to Characterization. Caister Academic Press Norfolk (UK), p.1-40, 2007.

MALAVOLTA, E.; CABRAL, C. P.; PRATES, H.S.; OLIVEIRA, S.C.; LAVRES JUNIOR, J.; MALAVOLTA, M.; MORAES, M.F. Composição mineral de folhas de citros afetadas por declínio amarelino (CVC), morte súbita e huanglongbing (HLB). Piracicaba: IPNI (Informações agronômicas, 110), p. 3-6, 2005.

MANJUNATH, K. L.; HALBERT, S. E.; RAMADUGU, C.; WEBB, S.; LEE, R. F. Detection of 'Candidatus Liberibacter asiaticus' in *Diaphorina citri* and its importance in the management of citrus huanglongbing in Florida. **Phytopathology**, v. 98, p. 387-396, 2008.

MARENGO, S. **Mapeamento genético de tangerina Sunki e *Poncirus trifoliata* para resistência ao huanglongbing (greening) dos citros**. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) – Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, p. 86, 2009.

MARZACHÌ, C.; BOSCO, D. Relative quantification of chrysanthemum yellows (16Sr I) phytoplasma in its plant and insect host using Real Time PCR. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v. 30, p. 117-127, 2005.

MATTOS JUNIOR, D.; BATAGLIA, O. C.; QUAGGIO, J. A. Nutrição de citros. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R. M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: IAC; Fundag, cap. 8, p. 197- 219, 2005.

MENDES, M. XXI Semana da Citricultura: Mercado de Sucos, 2009.

MILLER, S. A.; JOAQUIM, T. R. Diagnostic techniques for plant pathogens. In: CHET, I. (Ed.). **Biotechnology in plant disease control**. New York: Wiley-Liss. p. 321-339, 1993.

MIYAKAWA, T. Experimentally-induced symptoms and host range of citrus likubin (greening disease). **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, v. 46, p. 224 –230,1980.

MOREIRA, C. S.; PIO, R. M. Melhoramento de citros. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JUNIOR, J.; AMARO, A.A. **Citricultura brasileira**. Campinas: Fundação Cargill, 2.ed., v.1, p.116-144, 1991

MULLER. G. W.; NEGRI, J. D.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; MATTOS JR. D.; POMPEU JR. J., et al. QUICK BLIGHT of sweet orange: a new citrus disease in Brazil. In: **Programme & Abstracts of XV Conference of the International Organization of Citrus Virologists**, p.100, 2001.

MURRAY, M.; THOMPSON,W. F. Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 8, p. 4321-4325, 1980.

MCCLEAN, A. P. D.; SCHWARZ, R. E. Greening or blotchy-mottle disease of citrus. **Phytophylactica** 2, p. 177–194, 1970.

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; MILAN, P.; LOPES, F. F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. **Retrato da Citricultura Brasileira**. MARKESTRAT: Centro de Pesquisa e Projetos em Marketing e Estratégia, FEA-USP, Ribeirão Preto, 2010.

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

PELT-VERKUIL, E.; VAN BELKUM, A.; HAYS, J. P. Principles and technical aspects of PCR amplification, **Springer**, p. 332, 2008.

PFAFFL, M.W. Quantification strategies in real-time PCR. In: BUSTIN, S.A. (Ed.). **A-Z of quantitative PCR**. La Jolla: University Line (IUL), cap. 3, p 87-112, 2004.

POMPEU JÚNIOR, J. Porta-enxertos. In: RODRIGUEZ, O. **Citricultura brasileira**, 2.ed. Campinas: Fundação Cargill, v.1, p.265-80, 1991.

POMPEU JÚNIOR, J. Porta - enxertos. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JÚNIOR, P. **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico de Campinas; Fundag, p. 61-104, 2005.

POMPEU JÚNIOR, J.; SALVA, R. & BLUMER, S. Copas e porta-enxertos nos viveiros de mudas cítricas do Estado de São Paulo. **Laranja**, Cordeirópolis, v.25, n.2, p.413-422, 2004.

PIO, R. M.; FIGUEIREDO, J. O.; STUCHI, E. S.; CARDOSO, S. A. B. Variedades copas. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JÚNIOR, P. **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico de Campinas; Fundag, p. 37- 60, 2005.

ROSSETTI, V.; GARNIER, M.; BERETTA, M. J. G.; TEIXEIRA, A. R. R.; QUAGGIO, J. A.; BATTAGLIA, O. C.; GOMES, M. P.; DE NEGRI, J. D.; BOVE, J. M. Resultados preliminares de estudos sobre uma nova anormalidade dos citros observada nos Estados de São Paulo e Minas Gerais. Congresso Paulista de fitopatologia, São Paulo, **Summa Phytopathologica**, v.16, p.1, 1990.

SCHAAD N, W.; FREDERICK R. D. Real-time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics. **Journal of Plant Pathology**, v. 24. p. 250-258, 2002.

SHOKROLLAH, H.; ABDULLAH, T. L.; SIJAMB, K.; ABDULLAH, S. N. A. Potential use of selected citrus rootstocks and interstocks against HLB disease in Malaysia. **Crop Protection**, v. 30, n. 5, p. 521-525, 2011.

SOUAZE, F.; NTODOU-THOME, A.; TRAN, C.Y.; ROSTENE, W.; FORGEZ, P. Quantitative RT-PCR: limits and accuracy. **Biotechniques**, New York, v. 21, n.2, p.280-285, 1996.

SWINGLE, W.T. The botany of Citrus and its wild relatives of the orange subfamily (family Rutaceae, subf. Aurantioideae). In: WEBBER, H.J.; BATCHELOR, L.D. (Ed.). **The citrus industry**. Berkeley: University of California, v.1, p. 129-474, 1943.

SWINGLE, W.T.; REECE, P.C. The botany of Citrus and its wild relatives. In: REUTHER, W.; BATCHELOR, L.D.; WEBBER, H.J. (Ed.). **The citrus industry**. Berkeley: University of California, p. 190-430, 1967.

TEIXEIRA, D. C.; WULFF, N. A.; LOPES, S. A. YAMAMOTO, P. T.; MIRANDA, M. P.; SPÓSITO, M. B.; BELASQUE JÚNIOR, J.; BASSANEZI, R. B. Caracterização e etiologia das bactérias associadas ao huanglongbing. **Revista Citrus Research & Technology**, Cordeiropolis, v. 31, n. 2, p. 115-128, 2010.

TERSI, F. E. A. Convivendo com o huanglongbing: visão do setor produtivo. **Revista Citrus Research & Technology**, Cordeiropolis, v. 31, n. 1, p. 75-84, 2010.

TICHOPAD, A.; DILGER, M.; SCHWARZ, G.; PFAFFL, M.W. Standardised determination of real-time PCR efficiency from a single reaction setup. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 31, n. 21, p.122, 2003.