

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**TRANSMISSÃO DE *Candidatus* LIBERIBACTER ASIATICUS
POR *Diaphorina citri* EM FOLHAS DESTACADAS DE
CITROS**

Laudecir Lemos Raiol Júnior

Engenheiro Agrônomo

JABOTICABAL - SÃO PAULO

2013

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**TRANSMISSÃO DE *Candidatus* LIBERIBACTER ASIATICUS
POR *Diaphorina citri* EM FOLHAS DESTACADAS DE
CITROS**

Laudecir Lemos Raiol Júnior

Orientador: Prof. Dr. Silvio Aparecido Lopes

Co-orientador: Prof. Dr. Antonio de Goes

Dissertação apresentada a Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Agronomia (Produção Vegetal).

JABOTICABAL - SÃO PAULO

2013

R159t Raiol Júnior, Laudecir Lemos
Transmissão de *Candidatus Liberibacter asiaticus* por *Diaphorina citri* em folhas destacadas de citros / Laudecir Lemos Raiol Júnior. –
– Jaboticabal, 2013
xii, 56 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013

Orientador: Silvio Aparecido Lopes

Co-orientador: Antonio de Goes

Banca examinadora: Luis Otávio Saggion Beriam, Viviani Vieira
Marques

Bibliografia

1. Citros 2. qPCR 3. Inoculação 4. Multiplicação de liberibacter
I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias.

CDU 632.35:634.31

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da
Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de
Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: TRANSMISSÃO DE *Candidatus* LIBERIBACTER ASIATICUS POR
Diaphorina citri EM FOLHAS DESTACADAS DE CITROS

AUTOR: LAUDECIR LEMOS RAIOL JÚNIOR

ORIENTADOR: Prof. Dr. SILVIO APARECIDO LOPES

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. ANTONIO DE GOES

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM AGRONOMIA
(PRODUÇÃO VEGETAL), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. ANTONIO DE GOES

Departamento de Fitossanidade / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. LUÍS OTÁVIO SAGGION BERIAM
Instituto Biológico / Campinas/SP

Profa. Dra. VIVIANI VIEIRA MARQUES
Fundo de Defesa da Citricultura / Araraquara/SP

Data da realização: 30 de julho de 2013.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

LAUDECIR LEMOS RAIOL JÚNIOR – nascido em 10 de outubro de 1987, no município de Tucuruí – PA. Iniciou o curso de graduação em Engenharia Agrônômica, em maio de 2007, na Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), concluindo-o em agosto de 2011. Durante a Graduação, foi integrante do Programa de Educação Tutorial (PET) e monitor nas disciplinas de Fitopatologia Geral e Agrícola. Em agosto de 2011, iniciou o curso de mestrado junto ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal) na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP - Jaboticabal). Foi bolsista CNPQ de agosto de 2011 a julho de 2013.

Nos momentos de incertezas, angustia e saudade, **Deus** me manteve forte para continuar lutando pelos sonhos que ele tem para minha vida. A minha mãe **Hélia**, meu pai **Laudecir**, minha irmã **Patrícia**, meu sobrinho **Luis** e meus avós **Lourival** (em memória) e **Darcy**, **Raimundo** e **Almerinda** e a **Família Barcelos**, pelo apoio, incentivo, diálogo, orações, ensinamentos, torcida e por estarem sempre presentes em minha vida...

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus por todas as bênçãos recebidas, a quem devo todas as minhas conquistas e sei que elas são a realização dos sonhos que o senhor tem para a minha vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Silvio Aparecido Lopes, pela confiança depositada, pelos ensinamentos recebidos, pelo incentivo e amizade.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Antonio de Goes pelo apoio, ensinamentos, ajuda e amizade.

A UNESP/Jaboticabal, ao atual coordenador Prof. Dr. Rouverson Pereira da Silva e ao ex-coordenador Prof. Dr. Arthur Bernardes e aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal), pelo aperfeiçoamento e formação acadêmica.

Aos Membros componentes da comissão examinadora, Dr. Luis Otávio Beriam e Dr^a. Viviani Marques, pelas contribuições na correção, incentivo e todo apoio recebido.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação pela disponibilidade no atendimento e informações prestadas.

Aos meus amigos Fernanda Queiroz, Camila Giácomo, Hermes Teixeira, Luis e Anélio, por me ajudarem na realização deste trabalho de mestrado, pela companhia e amizade... muitooo OBRIGADO!!!

Aos amigos do Departamento Científico do FUNDECITRUS: Tatiane, Gleison, Sidney, Deividson, William, Dona Fátima, César, João, Murilo, Fernanda, Josiane, Wanner, Gabriel, Jean, Júlio, Eder, Montesino, Luana, Rosana, Priscila, Fábio, Scapin, Rafael, Dani, Elaine e Nelson pelas muitas dúvidas esclarecidas, pela grande amizade, ajuda, ensinamentos, paciência e momentos de descontração. Valew pessoal!!!

Aos grandes amigos Suelen, Iolanda, Ediane, Naira, Renato, Jordana, Nara, Dayse, Ana Dulce, Lilian, Marilena, Raquel, Saulo e Diego pela grande amizade, momentos de alegria e descontração, muito obrigado!!

Em especial a minha família, que mesmo distante sempre se mantiveram presente, pelo apoio sempre, por acreditarem e investirem nos meus sonhos e principalmente pelo amor e carinho, meu ponto de referência, meu porto seguro.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao FUNDECITRUS pelo apoio financeiro e técnico concedido para o desenvolvimento da pesquisa.

Enfim, a todos que de uma maneira direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

Sem vocês não teria sido possível chegar até aqui! MUITO OBRIGADO A TODOS!!!

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1. Huanglongbing (HLB, ex-greening)	15
2.2. <i>Diaphorina citri</i>	18
2.3. Folhas destacadas	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1. Aprimoramento do método de folhas destacadas	22
3.1.1. Criação de <i>Diaphorina citri</i>	22
3.1.2. Manutenção de plantas cítricas.....	23
3.1.3. Sobrevivência das folhas em diferentes estádios vegetativos	25
3.1.4. Efeito de solução nutritiva na sobrevivência e longevidade das folhas	26
3.1.5. Curva de sobrevivência de <i>D. citri</i> em folhas destacadas	27
3.2. Uso do método para estudos de transmissão de <i>Ca. Liberibacter</i> por <i>D. citri</i>	27
3.2.1. Teste preliminar de inoculação e aquisição	27
3.2.2. Número mínimo de adultos de <i>D. citri</i> e tempo mínimo necessário para inoculação de <i>Ca. L. asiaticus</i>	28
3.2.3. Influência do número de insetos e período de acesso a inoculação e incubação para detecção de <i>Ca. L. asiaticus</i> nas folhas.....	28
3.2.4. Eficiência da inoculação de folhas destacadas e folhas mantidas na planta	29
3.3. Avaliação dos experimentos.....	29
3.3.1. Extração do DNA do material vegetal	29
3.3.2. Extração do DNA de insetos	31

3.3.3.	PCR quantitativo (qPCR)	32
3.3.4.	Quantificação e forma de análise dos resultados	33
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1.	Aprimoramento do método de folhas destacadas	34
4.1.1	Sobrevivência das folhas em diferentes estádios vegetativos	34
4.1.2.	Efeito de solução nutritiva (MS) na sobrevivência e longevidade das folhas .	36
4.1.3.	Curva de sobrevivência de <i>D. citri</i> em folhas destacadas	36
4.1.4.	Aprimoramento	38
4.2.	Uso do método para estudos de transmissão de <i>Ca. Liberibacter</i> por <i>D. citri</i>	39
4.2.1.	Teste preliminar de inoculação e aquisição	39
4.2.2.	Número mínimo de adultos de <i>D. citri</i> e tempo mínimo necessário para inoculação de <i>Ca. L. asiaticus</i>	41
4.2.3.	Influência do número de insetos e período de acesso à inoculação e incubação para detecção de <i>Ca. L. asiaticus</i> nas folhas	43
4.2.4.	Comparação do método de folhas destacadas e folhas mantidas na planta quanto à taxa de inoculação de <i>Ca. L. asiaticus</i> por <i>D. citri</i>	45
5.	CONCLUSÃO	47
6.	REFERÊNCIAS	48

TRANSMISSÃO DE *Candidatus* LIBERIBACTER ASIATICUS POR *Diaphorina citri* EM FOLHAS DESTACADAS DE CITROS

RESUMO

Huanglongbing (HLB) ou greening é uma doença de difícil controle e altamente destrutiva que, no Brasil, está associada as bactérias *Candidatus* Liberibacter asiaticus e *Ca. L. americanus*, transmitidas pelo inseto *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). *Ca. L. asiaticus* é atualmente a mais frequentemente encontrada no campo. Este trabalho objetivou o aprimoramento de metodologia que envolve o uso de folhas jovens destacadas de laranja doce (*Citrus sinensis* L.) para estudos sobre a transmissão de *Ca. L. asiaticus* por *D. citri*. Os experimentos envolveram diferentes números de insetos adultos (1, 4 ou 8 indivíduos), diferentes períodos de acesso à inoculação (PAI) da bactéria (1, 24, 48 ou 72 horas) e diferentes períodos de incubação (PI) da bactéria nas folhas (1, 7, e 15 dias) após o PAI e comparação com a inoculação em mudas. Insetos e folhas foram avaliados por qPCR para detecção e quantificação de *Ca. L. asiaticus*. Com PAI de 1 dia *Ca. L. asiaticus* foi detectada, no total dos 3 PIs, em 19, 29 e 36% das folhas expostas, respectivamente, a 1, 4 ou 8 insetos. Este aparente efeito de dose (aumento da taxa de inoculação bem sucedida com o aumento no número de indivíduos) foi ainda maior quanto maiores foram os PAIs e PIs. O método se mostrou útil para estudos da transmissão de *Ca. L. asiaticus* por *D. citri* com as seguintes vantagens em relação ao uso de plantas inteiras: menor tempo necessário para obtenção dos resultados, maior economia de material, drástica redução da área necessária para a condução dos experimentos.

Palavras chaves: huanglongbing, qPCR, inoculação, multiplicação de liberibacter

“TRANSMISSION OF *Candidatus* LIBERIBACTER ASIATICUS BY *Diaphorina citri* IN DETACHED LEAVES OF CITRUS”

ABSTRACT

Huanglongbing (HLB) or greening disease is difficult-to-control citrus disease that, in Brazil, is associated bacteria *Candidatus* Liberibacter asiaticus and *Ca. L. americanus*, transmitted by insect *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). *Ca. L. asiaticus* is currently the most frequently encountered in the field. This study aimed to the upgrading of methodology that involves the use of detached young leaves of sweet orange (*Citrus sinensis* L.) for studies on the transmission of *Ca. L. asiaticus* by *D. citri*. The experiments involved different numbers of adult insects (1, 4 or 8 individuals), different inoculation access periods (IAP) of bacteria (1, 24, 48 or 72 hours) and different incubation periods (IP) of the bacteria on leaves (1, 7, and 15 days) after PAI and comparison with inoculation seedlings. Insects and leaves were assessed by qPCR for the detection and quantification of *Ca. L. asiaticus*. With PAI 1 day *Ca. L. asiaticus* was detected in all of the three IPs, 19, 29 and 36% of the exposed leaves, respectively, at 1, 4 or 8 insects. This apparent dose effect (increased rate of successful inoculation with the increase in the number of individuals) was greater the higher were the PAIs and PIs. The method proved useful for studies of transmission of *Ca. L. asiaticus* by *D. citri* with the following advantages over the use of whole plants: less time needed to obtain the results, the largest economy of material, drastically reducing the area required for conducting experiments.

Additional keywords: Huanglongbing, qPCR, inoculation, multiplication liberibacter

1. INTRODUÇÃO

A citricultura brasileira passou por grande desenvolvimento e expansão durante o século XX, com essa expansão sendo acompanhada pelo surgimento de diversos problemas associados ao ataque de doenças e pragas (DONADIO et al., 2005), algumas de considerável importância por ocasionarem grandes perdas na produção de frutas. Dentre as doenças que fortemente afetam os citros na atualidade, destacam-se a clorose variegada, o cancro, a leprose, a pinta preta, a morte súbita, e o huanglongbing (HLB), popularmente conhecido como “greening”. O HLB é doença de difícil controle, altamente destrutiva e já relatada nas principais áreas produtoras de citros do mundo (HALBERT; MANJUNATH, 2004; SUTTON et al., 2005; GOTTWALD, 2010; BASSANEZI; MONTESINO, 2011). Alta incidência nos pomares levam a significativa diminuição na produtividade e considerável aumento nos custos de produção (DA GRAÇA, 1991; BOVÉ, 2006; GOTTWALD, 2010).

O HLB está associado a três espécies de proteobactérias gram-negativas que se desenvolvem no floema das plantas. São denominadas *Candidatus Liberibacter africanus*, *Ca. L. asiaticus* e *Ca. L. americanus* (JAGOUÉIX et al., 1994; TEIXEIRA et al., 2005). São disseminadas no campo por insetos, sendo o psíldeo asiático dos citros, *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera: Psyllidae), o vetor de *Ca. L. asiaticus* e *Ca. L. americanus* (CAPOOR et al., 1967; YAMAMOTO et al., 2006) ambas as espécies encontradas nos pomares brasileiros (COLETTA-FILHO et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2005), e o psíldeo africano *Trioza erytreae* (Del Guercio) (Hemiptera: Psyllidae) o vetor de *Ca. L. africanus* (McCLEAN, et al., 1965).

O HLB tornou-se fator limitante para a produção de citros aonde ocorre porque todas as espécies de citros e suas variedades conhecidas são suscetíveis e, uma vez infectada, a planta não pode ser curada nem com aplicações de antibióticos e nem por meio de poda dos ramos com sintomas (LOPES et al., 2007).

A não adoção em escala regional das práticas de manejo tem contribuído ainda mais para o avanço da doença, em especial na região centro-sul do estado de São Paulo. Levantamento amostral realizado em 2012 pelo Fundo de Defesa da Citricultura - FUNDECITRUS, indicou que 6,91% das plantas de todo o parque citrícola paulista estavam expressando sintomas da doença, representando aumento de 82,8% em relação ao encontrado em 2011, quando foram estimados 3,78% de plantas com sintomas. A região central é a mais afetada com 9,89% das plantas sintomáticas. A preocupação com o aumento da doença inibe investimentos para ampliação da área plantada. A doença, encontrada primeiramente em São Paulo, já foi relatada também nos estados de Minas Gerais e Paraná (FUNDECITRUS, 2013a).

As medidas de supressão da doença, baseadas na prevenção, fundamentadas no plantio de mudas sadias e certificadas, na erradicação de plantas sintomáticas e no controle do vetor, são onerosas e difíceis de serem implementadas. Melhorias nas práticas de manejo virão quando houver um melhor entendimento de todo o patossistema o que, por sua vez, é dificultado em grande parte por ainda não se conseguir cultivar em meios de cultura artificiais as bactérias associadas a doença (DAVIS et al., 2008; SECHLER et al., 2009).

Resultados de estudos sobre interação e transmissão de *Ca. Liberibacter* spp. por *D. citri* têm sido variáveis e contraditórios. Tanto insetos na fase de ninfa quanto adultos alimentando-se em plantas sintomáticas por períodos de 30 minutos à uma hora (XU et al., 1988) podem adquirir a bactéria. Já o período de latência, ou seja, período necessário para que o inseto se torne inoculativo, pode chegar a 21 dias em insetos adultos, enquanto que as ninfas tornam-se inoculativas já a partir do quarto ínstar (XU et al., 1988). Baixas taxas de transmissão da bactéria pelo inseto foram relatadas em condições experimentais, com a eficiência sendo maior em estágio de ninfa, especialmente se se multiplicam em ramos com sintomas da doença (HUANG et al., 1984; YAMAMOTO, 2006; PELZ-STELINSKI et al., 2010).

O período de incubação, ou tempo entre o momento da inoculação pelo inseto e a manifestação dos sintomas de HLB, é variável. Desconhecem-se no momento quais fatores envolvidos na manifestação e progressão dos sintomas. O clima, principalmente a temperatura, parece ter papel preponderante (LOPES et al., 2009),

bem como o número e tempo de alimentação dos insetos para o estabelecimento da infecção.

A carência de dados sobre o processo de estabelecimento e progressão da doença se deve, em particular, à ausência de métodos de pesquisa padronizados, de baixo custo e que facilitem a condução dos estudos. Isto porque pesquisas desta natureza envolvem grandes populações do inseto e de plantas. A grande quantidade de plantas requer também amplo espaço físico com maiores dificuldades de controle do ambiente.

Foi recentemente demonstrado que os processos de aquisição e transmissão de *Ca. L. asiaticus* por *D. citri* podem ser estudados *in vitro* com o uso de folhas destacadas ao invés de plantas inteiras (AMMAR et al., 2011). As dificuldades acima mencionadas foram minimizadas além dos dados experimentais serem gerados em menor tempo em relação ao uso de seedlings. Ao empregar somente partes da planta houve economia de material vegetal e drástica redução da área necessária para os estudos. Tendo em vista os resultados preliminares promissores apresentados pelos autores do método, este trabalho teve como objetivos testar sua efetividade, promover ajustes se necessário, e avaliar aspectos da transmissão de *Ca. L. asiaticus* por *D. citri*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Huanglongbing (HLB, ex-greening)

O termo huanglongbing é chinês e significa "doença do ramo amarelo", em referência aos sintomas foliares iniciais setorizados na copa (VAN VUUREN, 1996). Nos ramos amarelos ocorrem folhas mosqueadas, ou seja, com coloração verde e amarela sem limites claros entre elas.

São conhecidas atualmente três espécies de proteobactérias Gram-negativas associadas à doença. Foram denominadas *Candidatus* (*Ca.*) *Liberibacter* (*L.*)

africanus, *Ca. L. asiaticus* e *Ca. L. americanus*, que colonizam o floema das plantas (DAVIS et al., 2008; SECHLER et al., 2009). O termo *Candidatus* é usado por não se ter informações genéticas, metabólicas, fisiológicas, etc. E isto se deve ao fato destas bactérias ainda não serem passíveis de cultivo em meios artificiais. A impossibilidade de cultivo tem dificultado o fechamento do postulado de Koch. As fortes evidências de que as liberibacters são os agentes causais do HLB provém da constante associação entre presença de sintomas típicos e presença das bactérias.

Até 2004, eram conhecidas apenas duas espécies de *Candidatus Liberibacter* associadas ao HLB, que eram *Ca. L. asiaticus* e *Ca. L. africanus*. Isto porque, aparentemente *Ca. L. americanus* não ocorre nos países asiáticos e africanos onde as duas primeiras espécies estão presentes há muitas décadas. A terceira espécie foi relatada até agora somente no Brasil. Foi considerada uma nova espécie por causa das diferenças existentes ao nível de DNA em relação às outras duas espécies até então conhecidas (TEIXEIRA et al., 2005).

Observações de campo e inoculações artificiais (LOPES; FRARE, 2008) demonstram que todas as cultivares comerciais de laranja doce são suscetíveis ao HLB, o que aumenta os riscos de expansão da doença para todas as áreas produtoras. Também foi relatado que os títulos de *Ca. L. asiaticus* no tecido foliar (a espécie mais prevalente nos dias atuais) não varia significativamente entre as cultivares, confirmando a similaridade nos níveis de suscetibilidade (LOPES et al., 2010).

Os sintomas característicos do HLB estão associados ao colapso dos vasos do floema, com obstrução do fluxo de translocação das substâncias fotossintetizadas pela colonização de *Ca. Liberibacter* spp. (ACHOR et al., 2010). Ocorre a redução na altura da planta, amarelecimento e mosqueado nas folhas e sintomas similares aos induzidos por deficiência de zinco e ferro. Com o tempo as folhas caem e os ramos secam (BOVE, 2006). Os frutos produzidos em ramos com sintomas são menores, deformados, com a inversão das cores, têm uma alta taxa de aborto de sementes e abscisão prematura. O sistema radicular também apresenta-se pouco desenvolvido (DA GRAÇA, 1991). O tempo necessário para manifestação dos sintomas pode variar dependendo da forma de transmissão do patógeno. Varia de quatro meses a um ano se a infecção for feita por meio de enxertia de ramos

doentes (LOPES; FRARE, 2008), e em geral oito meses se a infecção ocorrer por meio de psílídeos infectivos (HUNG et al., 2001). Este longo e variável período de incubação dificulta a detecção de plantas doentes no campo e a adoção das práticas de manejo (LOPES et al., 2006).

O controle da doença vem sendo baseado em medidas preventivas, uma vez que não existe cura para uma planta com HLB. Para reduzir os danos à cultura e impedir sua disseminação para áreas de cultivos livres da doença, as medidas se baseiam no plantio de mudas sadias adquiridas de viveiros certificados, controle químico do vetor e erradicação de plantas sintomáticas para redução das fontes de inóculo (GOTTWALD, 2010).

Avaliações sobre o efeito da doença em diferentes regiões do mundo com produção expressiva de citros, incluindo-se o estado de São Paulo, demonstram que pomares adultos inteiros podem tornar-se inviáveis economicamente entre sete e dez anos após o aparecimento da primeira planta com sintomas, se as medidas de controle existentes não forem empregadas (GOTTWALD et al., 2007). Esse tempo é ainda consideravelmente menor em pomares de até quatro anos. Na China, pomares mais velhos são mais resistentes ao HLB, talvez porque os sintomas progridem aparentemente mais lentamente em plantas adultas (LIN, 1963). Resultados semelhantes foram observados no Brasil em fazendas aonde medidas de controle não eram adotadas (BASSANEZI, 2008).

Os agentes associados ao HLB são considerados, portanto, uma ameaça ao desenvolvimento da citricultura em todo o mundo. Tem havido redução nas áreas produtoras de laranja em diversos países. Em algumas áreas os cultivos de citros têm sido substituídos por culturas de menor risco de ocorrência de problemas fitossanitários, mas também de menores retornos financeiros. É o caso da região central do estado de São Paulo, ainda com grande pressão de inóculo do HLB, aonde os plantios de laranja vêm sendo substituídos pelos de cana de açúcar.

Perdas de produtividade vem sendo relatadas nos pomares citrícolas de todo o mundo. Só no estado de São Paulo 7,2 milhões de plantas foram erradicadas durante o ano de 2012, de acordo com informações colhidas nos relatórios fornecidos pelos próprios citricultores à Secretaria de Agricultura e Abastecimento do estado de São Paulo (FUNDECITRUS, 2013b).

2.2. *Diaphorina citri*

No manejo da doença, destaque deve ser dado ao inseto *D. citri*. Quando em grandes populações, *D. citri* pode danificar as plantas diretamente por meio de picadas sucessivas durante a alimentação, quando aparentemente injetam toxinas que levam ao enrolamento das folhas novas, engruvinhamento das brotações e morte das gemas apicais (MEAD, 1977). E através da excreção liberam grande quantidade de elementos líquidos açucarados (“honeydew”) que propicia o crescimento de fumagina que, por sua vez, interfere na atividade fotossintética da planta e prejudica visualmente a qualidade dos frutos (WANG et al., 1996). No entanto, é o fato de transmitir as bactérias do HLB que o tornam o mais temido inseto nas regiões de cultivos de citros aonde o HLB já foi encontrado. É ele que durante a alimentação adquire a bactéria nos vasos do floema da planta doente e a transmite para a planta sadia (HUNG et al., 2004).

D. citri tem seu centro de origem o sul da Ásia (HOLLIS, 1987; HALBERT; MANJUNATH, 2004; BEATTIE; BARKLEY, 2009). Sua disseminação ocorreu de forma natural, associado às atividades humanas. Ocorre em regiões tropicais, subtropicais, e em algumas regiões temperadas da Ásia, ilhas do Pacífico e do Oceano Índico. No Brasil foi relatado em 1940 (COSTA LIMA, 1942). Pela sua habilidade de voo, grande fecundidade das fêmeas e possuir diversas plantas hospedeiras, possui alta capacidade de adaptação e exploração de diversos ambientes (AUBERT, 1987). A dispersão a longas distâncias pode ocorrer por repetidos voos a curta distância (ARAKAWA; MIVAMOLO, 2007) ou pelo auxílio de correntes de vento (SAKAMAKI, 2005).

Quando atingem a idade adulta, os insetos medem de 2 a 3 mm de comprimento, saltam a curtas distâncias, e quando em repouso sobre a planta flexionam o primeiro par de pernas ficando num ângulo de 30° a 45° em relação a superfície que se encontra (FERNÁNDEZ, 2003). Tem vida média de 2 a 3 meses

em condições adequadas de temperatura ($\pm 27^{\circ}\text{C}$), umidade e fonte de alimento (RICHARDSON; HALL, 2012). Para atingir a fase adulta, o inseto passa por 5 instares, com a fêmea chegando a colocar de 500 a 800 ovos durante toda a sua vida (TSAI; LIU, 2000; NAVA et al., 2007).

A flutuação populacional do psílídeo está diretamente relacionada à presença de brotações e condições ambientais favoráveis ao seu desenvolvimento (GALLO et al., 2002; HALL et al., 2008). O inseto adulto se alimenta em caules jovens e folhas de todas as fases de desenvolvimento, mas tem preferência para oviposição em brotos novos. As ninfas se desenvolvem em estádios vegetativos iniciais e se alimenta em folhas novas (TSAI; LIU, 2000).

Nos períodos de maior precipitação, a população de *D. citri* diminui devido a eliminação de ovos e ninfas pela água das chuvas. No entanto, os adultos conseguem se proteger no interior da copa das árvores e na parte abaxial das folhas, levando à altas populações quando as condições favoráveis se reestabelecem (REGMI; LAMA, 1988; WHITESIDE et al., 1993).

Ca. Liberibacter spp. mantém uma relação persistente com o vetor, ou seja, uma vez adquirida possui a capacidade de se replicar no sistema circulatório do inseto e, conseqüentemente, ser disseminada durante toda a vida do mesmo (XU et al., 1988; HUNG et al., 2004). Baixas taxas de transmissão foram relatadas, as quais são compensadas pela alta taxa de multiplicação do inseto na presença de fontes de alimento, que leva a grande taxa de inoculação. A eficiência é maior com ninfas, especialmente se se multiplicam em ramos com sintomas da doença (HUANG et al., 1984; YAMAMOTO, 2006; PELZ-STELINSKI et al., 2010).

Insetos adultos podem adquirir a bactéria alimentando-se em plantas sintomáticas de 30 minutos à uma hora (XU et al., 1988). Já o período de latência ou multiplicação da bactéria no tecido do inseto até atingir as glândulas salivares e este se tornar infectivo podem variar de 8 a 21 dias (ROGERS et al., 2012). Na fase de ninfa, podem adquirir o patógeno a partir do segundo instar quando desenvolvem-se em ramos de plantas infectadas, no entanto somente ninfas de quarto e quinto ínstaes são capazes de transmissão (XU et al., 1988; INOUE et al., 2009; PELZ-STELINSKI et al., 2010). As fêmeas de *D. citri* infectadas transmitem *Ca. L. asiaticus* para 2 a 6% da progênie (transovariana) (PELZ-STELINSKI et al., 2010), e machos

infectivos transmitem a bactéria para as fêmeas durante o acasalamento (MANN et al., 2011).

O controle do vetor está baseado principalmente no uso de defensivos químicos. O controle requer uso intensivo e constantes aplicações de inseticidas, que aumentam ainda mais os custos de produção. É baseado na avaliação amostral para a detecção do inseto e tomada de decisão. A inspeção é feita por vistorias dos pomares, evitando-se com isto aplicações desnecessárias de produtos químicos que podem ter efeitos negativos ao meio ambiente, insetos benéficos, contaminação do solo e da água e levar a ocorrência de resistência do inseto alvo a moléculas químicas (BASS; FIELD, 2011; TIWARI et al., 2011).

Trabalhos de controle biológico do vetor com uso de agentes biológicos vêm sendo desenvolvidos, com uso principalmente do parasitoide *Tamarixia radiata* (Waterston) (Hymenoptera: Eulophidae) (HALBERT; MANJUNATH, 2004). Contudo, o uso de inimigos naturais não vem sendo usado nos pomares por causa das constantes aplicações de defensivos (PARRA et al., 2010).

Aplicações de inseticidas reduzem as populações de *D. citri*, as não tem contribuído para diminuir a disseminação do HLB (GOTTWALD, 2007; BERGAMIN-FILHO et al., 2009; ICHINOSE et al., 2010).

2.3. Folhas destacadas

O uso de folhas destacadas é amplamente empregado em fitopatologia especialmente nas áreas de virologia, bacteriologia e micologia. Foi inicialmente empregada em estudos de fisiologia vegetal, como absorção de água, transpiração, respiração e fotossíntese. Os fitopatologistas começaram a utilizá-la em testes de inoculação e em estudos sobre a fisiologia do parasitismo (YARWOOD, 1946). Seu emprego teve início na década de 50 quando foram inoculados com sucesso folhas, frutos, raízes e flores, entre outras (CLINTON; McCORMICK, 1924). Houve modificações e aprimoramentos na técnica ao longo do tempo apresentando como características a simplicidade e efetividade na obtenção dos resultados. Nos ensaios

obtidos utilizando partes das plantas apresentaram resultados similares aos obtidos usando plantas inteiras.

Hoje seu uso é comum em avaliação da patogenicidade de diversos microrganismos, e em testes de resistência do hospedeiro. Neste caso emprega-se folhas inteiras ou partes delas, as quais são mantidas dentro de placas de petri ou outros recipientes, sobre papel de filtro umedecido ou imerso em água ou soluções de sacarose (SILVERMAN, 1957; BROWDER, 1964). Também podem, dependendo das necessidades, incluir fungicidas específicos como o benzimidazol, e hormônios vegetais como cinetina, ou inibidores de síntese de hormônios. O método tem sido tão eficiente quanto os que empregam plantas inteiras em casa de vegetação ou campo, com a vantagem de permitir estudos de fitopatógenos quarentenários em condições de laboratório (HOOKER; YARWOOD, 1966; WILCOXSON et al., 1974).

Mignucci (1978) descreve o uso de folhas destacadas também para manter e aumentar populações de nematoides em estudos de heterotalismo. Folhas destacadas também são empregadas na manutenção de isolados ou raças de parasitas obrigatórios, grupo de organismos que inclui as ferrugens, míldios e oídios, não cultiváveis em meios de cultura artificiais. Esses agentes biotróficos podem ser mantidos em órgãos destacados das plantas em coleções de laboratórios para pesquisa de fisiologia, ecologia e diversidade genética.

O método tem como vantagens a economia de espaço e material vegetal possibilitando emprego elevado número de repetições, a facilidade de controle e manipulação de fatores ambientais, redução das chances de contaminação do material em estudo e do local onde o trabalho é desenvolvido, uniformidade experimental, e facilidade nas observações (YARWOOD, 1946; HOOKER; YARWOOD, 1966; TUIE, 1969; MIGNUCCI, 1978). No entanto o método tem como fatores limitantes murchamento, senescência relativamente rápida dos tecidos e apodrecimento, dificultando estudos que requerem períodos de tempo mais longos (CLINTON; McCORMICK, 1924; YARWOOD, 1946). Mas estes são fatores que variam entre espécies vegetais, necessitando estudos detalhados prévios sobre as condições ideais para aumento da longevidade do material.

Ammar et al. (2011a) relatou que os processos de aquisição e inoculação de *Ca. L. asiaticus* por *D. citri* podem ser também estudados *in vitro*, utilizando folhas

destacadas. Resultados preliminares foram apresentados na Segunda Conferência Internacional sobre Pesquisas com HLB, em Orlando na Flórida. Resultados conclusivos foram publicados mais recentemente (AMMAR et al., 2013). No estudo, os autores avaliaram diversos aspectos do processo de transmissão da bactéria do HLB. O método permitiu, por exemplo, avaliar a influência do número de insetos e o tempo de exposição das folhas aos mesmos necessários para efetiva inoculação da bactéria. O tempo para obtenção dos resultados foi reduzido de 8 meses (quando usadas plantas) para apenas 2 semanas quando utilizando folhas destacadas. Além disso a área experimental foi drasticamente reduzida e promoveu maior facilidade de controle das condições ambientais. O método mostrou-se útil nos estudos de inoculação de liberibacter por *D. citri* e promissor para estudos sobre os demais aspectos envolvidos no patossistema do HLB. Este trabalho teve, portanto, como objetivos promover aprimoramento ao método e estudar outros aspectos da transmissão da bactéria e influência do período de incubação no estabelecimento da infecção.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Aprimoramento do método de folhas destacadas

3.1.1. Criação de *Diaphorina citri*

Os insetos utilizados no estudo foram provenientes da criação do Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento do FUNDECITRUS, localizada em Araraquara-SP. Populações de adultos foram mantidos por várias gerações em plantas de citros (laranja Valência [*Citrus sinensis* (L.)] enxertadas em limão cravo [*Citrus limonia* (Osbeck)]), sintomáticas e positivas para *Ca. L. asiaticus* determinada por PCR em tempo real ou quantitativo (qPCR). Plantas e insetos foram mantidos

em câmaras de crescimento à temperatura constante de 26°C. Lotes de insetos foram testados por qPCR antes de cada experimento para confirmação da presença e estimativa dos títulos de *Ca. L. asiaticus*.

Os insetos livres de *Ca. L. asiaticus* (controle) foram criados segundo técnica de criação adaptada de Gómez-Torres (2009), em plantas de murta (*Murraya exotica* L.) sadias, sendo essa a espécie preferencial de *D. citri* para alimentação e oviposição (AUBERT, 1987; NAVA et al., 2007). Insetos foram mantidos nas plantas à temperatura ambiente e rotineiramente amostrados para confirmação da ausência de *Ca. L. asiaticus*.

Os insetos foram transferidos para as folhas, por meio de sugador manual e avaliados quanto a taxa de sobrevivência após períodos variáveis de confinamento, de acordo com cada experimento.

3.1.2. Manutenção de plantas cítricas

Plantas sadias de laranja Valência, em número de 12, enxertadas em limão Cravo, com 3 anos de idade (Figura 01), foram cultivadas em vasos de 50L contendo o substrato comercial Plantmax citrus (Eucatex, Paulínia, SP) e mantidas em estufas protegidas com telas antiafídicas e livres de insetos. A irrigação foi realizada 4 vezes por semana e, uma vez por semana, foi feito o manejo nutricional das plantas através da fertirrigação contendo os seguintes fertilizantes em g 1000L⁻¹ de água: nitrato de cálcio= 900, nitrato de potássio= 300, MAP= 70, sulfato de magnésio= 260, cobre-ácido etileno diamino tetracético (EDTA) (14,5% Cu)= 10, Zinco-EDTA (14% Zn)= 7, Manganês-EDTA (13% Mn)= 5, Ácido Bórico= 3,5, Molibdato de Amônio= 0,3, Ferro- ácido dietileno diamino hidróxidofenilacético (EDDHA) (6% Fe)= 50.

As plantas foram podadas de forma escalonada para produção de novos fluxos vegetativos, de acordo com a necessidade e o calendário de instalação dos experimentos. Foram empregadas folhas no estágio V4, segundo a escala da Stoller

(STOLLER, 2013) que proporciona condições necessárias para alimentação dos insetos (Figura 02).



Figura 1. Plantas de laranja Valencia cultivada sobre o porta-enxerto limão Cravo com três anos de idade, mantidas em ambiente protegido, livre de insetos.



3.1.3. Sobrevivência das folhas em diferentes estádios vegetativos

O ensaio foi conduzido empregando-se os procedimentos estabelecidos previamente e de acordo com o demonstrado por Ammar (2011). Neste experimento foi avaliada a sobrevivência das folhas em diferentes estádios vegetativos. Folhas nos estádios V3, V4 e V5 seguindo a escala fenológica da Stoller, foram retiradas do mesmo ramo vegetativo de plantas sadias. As folhas foram removidas usando-se lâmina de bisturi esterilizado. Foram retiradas juntamente com o pecíolo e parte do caule, cortado em bizel para proporcionar maior área de absorção de água, e transferidas para tubos de polipropileno com fundo cônico de 50 mL, contendo 15 mL de água Milli-Q esterilizada. As folhas foram fixadas no centro do tubo, por um disco de papel de filtro de 8 cm de diâmetro, servindo como suporte para a folha e para evitar o contato dos insetos com a água. O volume da água foi completado sempre que necessário. Os tubos foram mantidos em grades-suporte em câmaras de crescimento com temperatura de 26°C, 50% de umidade relativa e fotoperíodo de 12 horas (Figura 8).

Foi determinado o tempo máximo de sobrevivência de cada estádio, com observação visual da cor e turgidez. As folhas foram consideradas inapropriadas para os estudos quando se apresentaram murchas, amareladas e/ou com a maior parte da área foliar apresentando necrose ou oxidação. O índice de sobrevivência das folhas em cada tratamento consistiu no período de tempo em que 50% das folhas apresentavam pelo menos uma das características citadas anteriormente. Os estádios vegetativos representam os tratamentos e cada tratamento possui 10 repetições.

3.1.4. Efeito de solução nutritiva na sobrevivência e longevidade das folhas

Folhas no estágio V3 e V5 foram transferidas para tubos de polipropileno de 50mL, seguindo metodologia já descrita no item 3.1.3. Foram comparadas água e solução nutritiva (meio MS) para cultura de células vegetais (MURASHIGE & SKOOG, 1962) para tentar manter por maior tempo possível a turgidez e coloração verde das folhas. Os tratamentos foram avaliados sob duas formas de aplicação, direta em contato com o caule e pecíolo e embebida em algodão envolto na região do caule e parte do pecíolo (Figura 3). Água e solução nutritiva foram completadas sempre que necessário. Os tubos foram mantidos em bancadas à temperatura ambiente ($26^{\circ}\text{C}\pm 2$). A avaliação foi realizada diariamente observando características como cor, turgidez e senescência foliar.

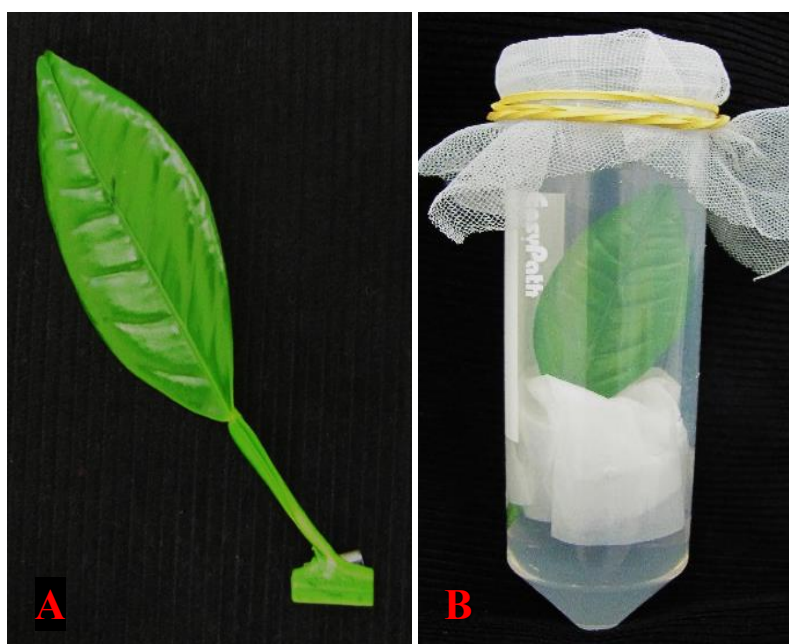


Figura 3. (A) Folha em estágio V4 (escala da Stoller) com pecíolo e parte do caule, utilizada nos ensaios. (B) Tubos de polipropileno de 50 ml, contendo uma folha destacada de citros com pecíolo e parte do caule imersa em água, sustentada por disco de papel filtro. A abertura dos tubos foi envolta tela antiafídica fixada com elástico para evitar a saída dos insetos e permitir trocas gasosas entre o material vegetal e o meio.

3.1.5. Curva de sobrevivência de *D. citri* em folhas destacadas

Insetos adultos criados em plantas doentes, em lotes de 4 e 8 insetos, foram transferidos com sugador manual para tubos polipropileno de 50 mL usando os procedimentos descritos no item 3.1.3. A abertura superior dos tubos foi envolta com um pedaço de tela antiafídica fixada com elástico para evitar a saída dos insetos e permitir trocas gasosas do material vegetal com o meio. Os tubos foram acondicionados em grades suporte, deixados em bancadas a temperatura ambiente ($26^{\circ}\text{C} \pm 2$) e fotoperíodo de 12 horas. A avaliação foi realizada diariamente durante um período de 15 dias, onde foi observado visualmente a cor, turgidez e senescência do material vegetal, características que determinam a qualidade fisiológicas das folhas destacadas e influenciam na alimentação dos insetos. Para avaliar a sobrevivência e alimentação de *D. citri*, foram contados os insetos vivos, que estavam na posição em que denota estarem se alimentando, quando se posicionam num ângulo de 30° a 45° com a superfície da folha. E os que não estavam em posição de alimentação, caminhando sobre o material vegetal ou presentes em outras partes do tubo, e os insetos mortos. Foi avaliado a correlação entre a qualidade e manutenção das características morfológicas das folhas com a sobrevivência dos insetos.

3.2. Uso do método para estudos de transmissão de *Ca. Liberibacter* por *D. citri*

3.2.1. Teste preliminar de inoculação e aquisição

Folhas no estágio V4 oriundas de plantas sadias e de plantas doentes foram transferidas para tubos seguindo a metodologia descrita no item 3.1.5, para avaliar a inoculação e aquisição de *Ca. L. asiaticus*. Insetos qPCR+ (que contém a bactéria,

confirmado por qPCR) e insetos qPCR- (livres da bactéria), retirados de colônias de criação, foram transferidos segundo cada tratamento: insetos qPCR+ para folhas de plantas sadias (inoculação) e insetos qPCR- para folhas de plantas doentes (aquisição). Os insetos foram mantidos por sete dias em temperatura ambiente ($26^{\circ}\text{C} \pm 2$). Insetos e folhas posteriormente tiveram seu DNA extraído e amplificados por qPCR.

3.2.2. Número mínimo de adultos de *D. citri* e tempo mínimo necessário para inoculação de *Ca. L. asiaticus*

Insetos adultos qPCR+ para *Ca. L. asiaticus*, foram confinados em tubos de polipropileno de 50mL contendo folhas destacadas provenientes de plantas de citros sadias como determinado no item 3.13. Para avaliação foram utilizados insetos em número de 1, 4 e 8 foram mantidos por 1, 7, 15 e 21 dias para acesso à inoculação (período de acesso à inoculação ou PAI) e as folhas mantidas por 7, 15 e 21 dias para incubação (período de incubação ou PI) ou multiplicação de *Ca. L. asiaticus*.

A avaliação dos insetos e do material vegetal foi feita diariamente até o término do experimento. No final de cada PAI o material vegetal foi processado para extração de DNA (itens 3.3.1 e 3.3.2) e analisado por qPCR (item 3.3.3).

3.2.3. Influência do número de insetos e período de acesso a inoculação e incubação para detecção de *Ca. L. asiaticus* nas folhas

Insetos adultos qPCR+ de *D. citri*, em número de 4, foram confinados seguindo metodologia descrita no item 3.1.3. Foram confinados em folhas para PAI de 24 e 72 horas e as folhas incubadas por 7 e 15 dias de PI para se avaliar a influência do PAI e do PI na taxa de transmissão e na multiplicação de *Ca. L. asiaticus*.

3.2.4. Eficiência da inoculação de folhas destacadas e folhas mantidas na planta

Mudas de laranja Valencia enxertadas em limão Cravo, com três meses de idade, acondicionadas em sacos plásticos de 4 litros, foram podadas e transferidas para câmaras de crescimento a temperatura constante de 38°C, para acelerar a emissão e desenvolvimento de novos brotos. As duas folhas que primeiro atingiram os estádios V4 ou V5 em cada planta foram selecionadas e as restantes removidas. Uma das folhas foi retirada com auxílio de tesoura de poda, cortada em bisele com parte do caule e transferida para tubos de polipropileno de 50 mL (Figura 4). A outra folha foi deixada intacta na muda e envolta com tela antiafídica, presa com arame na base do caule (Figura 5). Foram transferidos para interior dos tubos contendo as folhas destacadas e para as plantas (no interior dos sacos de “voil”) 5 insetos adultos de *D. citri* qPCR+. Os insetos foram mantidos por 3 dias de PAI e as folhas foram deixadas por 7 e 15 dias de PI da bactéria. As folhas na mudas e nos tubos foram transferidos para câmara de crescimento a temperatura constante de 26°C, 50% de umidade relativa e fotoperíodo de 12 horas.

3.3. Avaliação dos experimentos

3.3.1. Extração do DNA do material vegetal

Amostras de DNA foram extraídas de folhas no estágio V4. Foi pesado 0,5g de material vegetal, picados sobre papel toalha com lâmina e colocados em sacos de BAG plástico. Foram adicionados 3,0 mL de tampão de extração (CTAB 20g, NaCl 82g, PVP 10000 20g, H₂O 400mL, 100 mL de Tris 0,1 M pH 8,0 e EDTA 0,5 M

pH 8,0, adicionado β -mercaptoetanol em uma proporção de 0,2%) e macerado com macerador Homex.

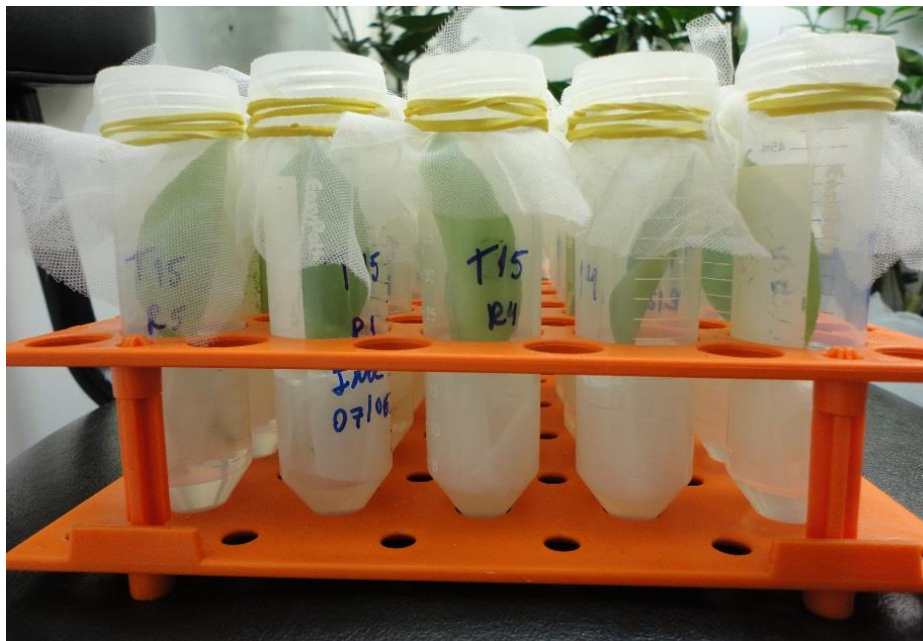


Figura 4. Confinamentos de insetos adultos de *D. citri* qPCR+ em folhas destacadas de laranja doce da variedade Valência, mantidos em câmara de crescimento à temperatura constante 26°C, umidade relativa 50% e fotoperíodo de 12 horas.



Figura 5. Mudas de citros com 3 meses de idade mantidas com uma folha. Folha mantida na planta envolta com tela antiafídica em formato de saco, presa no caule com arame.

Em seguida, 1,5 mL do macerado (tanto parte líquida quanto a sólida) foi transferida para tubos eppendorf de 2,0 mL, e incubado em banho maria a 65°C por 30 min. As amostras foram centrifugadas a 15294g por 5 minutos. Volume de 900 µL do sobrenadante foi recuperado e transferido para outro tubo eppendorf de 2,0 mL.

Posteriormente foram adicionados 900 µL de clorofórmio Álcool Isoamil (24:1), homogeneizado por inversão do tubo e centrifugado a 15294g por 5 min. Foram recuperados 800 µL do sobrenadante e transferidos para eppendorf de 1,5 mL. O DNA foi então precipitado pela adição de 0,6 vezes o volume de isopropanol (480 µL), homogeneizando levemente pela inversão dos tubos e mantidos a -4°C por 30 minutos ou 'overnight'. As amostras foram centrifugadas a 15294g durante 20 min. para formação do precipitado, em seguida foram lavadas duas vezes com 0,9 mL de etanol 70%, e centrifugado a 15294g por 10 min. Posteriormente, o DNA foi desidratado por 6 min em *speed-vac* e ressuspendido em 50 µL de água Milli-Q autoclavada e armazenado a 4°C.

3.3.2. Extração do DNA de insetos

Os DNAs dos insetos foram extraídos individualmente. Os insetos foram macerado em tubos eppendoff de 1,5 mL contendo 400uL de tampão de extração (CTAB 20g, NaCl 82g, PVP 10000 20g, H₂O 400mL, 100 mL de Tris 0,1 M pH 8,0 e EDTA 0,5 M pH 8,0, adicionado β-mercaptoetanol, em uma proporção de 0,2%) com pistilo para microtubos. Em seguida, foi incubado por 30 min em banho maria a 65°C e centrifugados a 956g por 5 min. Foram recuperados das amostras 350 µL do sobrenadante e transferido para novo eppendorf e adicionado igual volume (350 µL) de Clorofórmio Álcool Isoamil (24:1), homogeneizando a solução composta por inversão dos tubos e centrifugados a 15294g por 10 min. Em seguida foram recuperados 300 µL do sobrenadante transferido novamente para eppendorf e tratados com 0,6 vezes o volume de Isopropanol (180uL), homogeneizando

levemente a solução pela inversão dos tubos e deixado durante 30 min a -20°C ou em “overnight”. Posteriormente foi centrifugado a 15294g por 20 min, para formação do precipitado e descartado o sobrenadante. O precipitado foi lavado duas vezes com 900 μL de etanol 70% e centrifugado a 15294g por 10 min. E seguida foi desidratado por 6 min no *speed vácuo* e ressuspensão em 25 μL de H_2O Milli-Q autoclavada e deixado em overnight a 4°C .

3.3.3. PCR quantitativo (qPCR)

Para os ensaios de qPCR, o DNA foi previamente diluído em água Milli-Q autoclavada para uma concentração final de 100 $\text{ng}/\mu\text{L}$. Para a amplificação via qPCR foi utilizado o aparelho StepOne Plus thermocycler (Applied Biosystems) do Laboratório de Pesquisa e Diagnóstico do FUNDECITRUS. Para a amplificação foi utilizado um Kit da Applied Biosystems denominado SYBR Green PCR Master Mix, que é um composto fluorescente que se liga entre a fita dupla de DNA, e com excitação da luz emitida pelo sistema ótico do termociclador, emite fluorescência verde. Durante os ciclos consecutivos do qPCR, a quantidade de DNA fita dupla se eleva de maneira exponencial, monitorando o aumento da quantidade de fluorescência combinada à geração de *amplicons* durante os ciclos da fase exponencial (LUZ, 2004). Para cada reação foi utilizado uma quantidade de 25 μL do mix: 1x master mix, 150 nM de cada primer de *Ca. L. asiaticus* f-*rrp*/LAS (5' CGC CCG TTT CCG TTG 3') e *rrp*/LAS (5' AGC CTC TTT AAG CCC TAA ATC AG 3') (LI et al., 2006) e 500 ng do DNA genômico. Para amplificação do DNA, o programa utilizado consistiu em 95°C por 10 min e 45 ciclos de 95°C por 15s e 58°C por 60s. Cada amostra de DNA foi avaliada em duplicata para o cálculo da média dos valores referentes ao número de ciclos de PCR. A análise dos dados foi feita no software do mesmo aparelho StepOne Plus. O ponto que detecta o ciclo na qual a reação atinge o limiar da fase exponencial é denominado de Cycle Threshold (CT), ponto que permite estimativa da quantidade de fluorescência de cada amostra (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004).

3.3.4. Quantificação e forma de análise dos resultados

O delineamento de todos os experimentos foi o inteiramente casualizado. Para quantificação dos títulos bacterianos os valores de Ct ('Cycle threshold'), obtidos por qPCR foram convertidos no logaritmo do número de genomas de *Ca. L. asiaticus* por grama de tecido, empregando-se uma curva de titulação já definida (Figura 6) (LOPES et al., 2013). Como o gene alvo usado no qPCR ocorre em cópia única no genoma de *Ca. L. asiaticus*, pode se afirmar que o log do número de genomas se equivale ao log do número de células de *Ca. L. asiaticus*. Foram considerados positivos, valores obtidos de Ct por qPCR quando $\leq 34,0$, determinado com base na curva de quantificação para determinar a concentração da bactéria.

Quando cabível, as médias dos valores de Ct foram comparadas entre tratamentos após determinação da dispersão dos valores dentro de cada tratamento em relação à média usando-se o erro padrão.

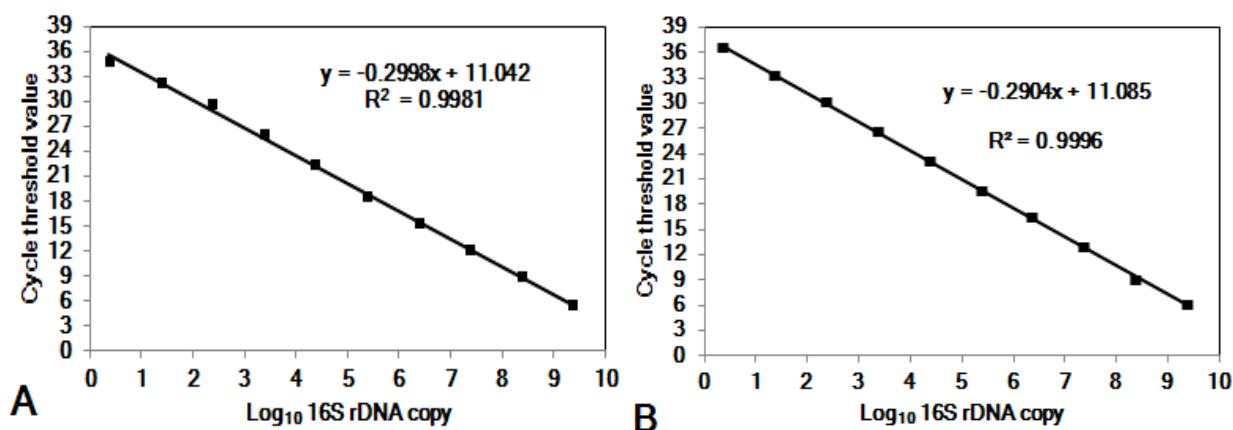


Figura 6. Curvas padrão para quantificação de '*Ca. L. asiaticus*' em plantas (A) e *D. citri* (B) (LOPES et al., 2013).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Aprimoramento do método de folhas destacadas

4.1.1 Sobrevivência das folhas em diferentes estádios vegetativos

Folhas em estágio V3 foram as que apresentaram menor longevidade, com tempo máximo de 4 dias mantidas fora da planta (Figura 6). A partir do segundo dia já se observava sinais de senescência com os folíolos destacando-se do broto, oxidação das bordas das folhas e murchamento. Apesar de ser esse o estágio preferido para alimentação de *D. citri*, o curto período de sobrevivência inviabilizaria seu uso em estudos de inoculação em folhas destacadas, conforme demonstrado neste trabalho item 4.2.3 (Tabela 2) que deve ser de no mínimo 7 dias. No entanto, podem ser empregados em estudos de aquisição, que exigem períodos de tempo menores (1 a 2 dias), conforme também demonstrado neste trabalho e já empregado por Lopes et al. (2013).

As folhas em estágio V4 e V5 não apresentaram diferença significativa quanto ao tempo de sobrevivência. As folhas no estágio V4 sobreviveram intactas por 23 e as do estágio V5 por 28 dias. As características manifestadas pelas folhas nesses estádios foram oxidação nas bordas, amarelecimento do limbo, murchamento, e 'desligamento' do pecíolo ou do fragmento de caule. Foi possível caracterizar que quanto mais velha a folha, nesse caso estágio V5, sobreviveram por mais tempo quando destacada da planta de citros (Figura 6).

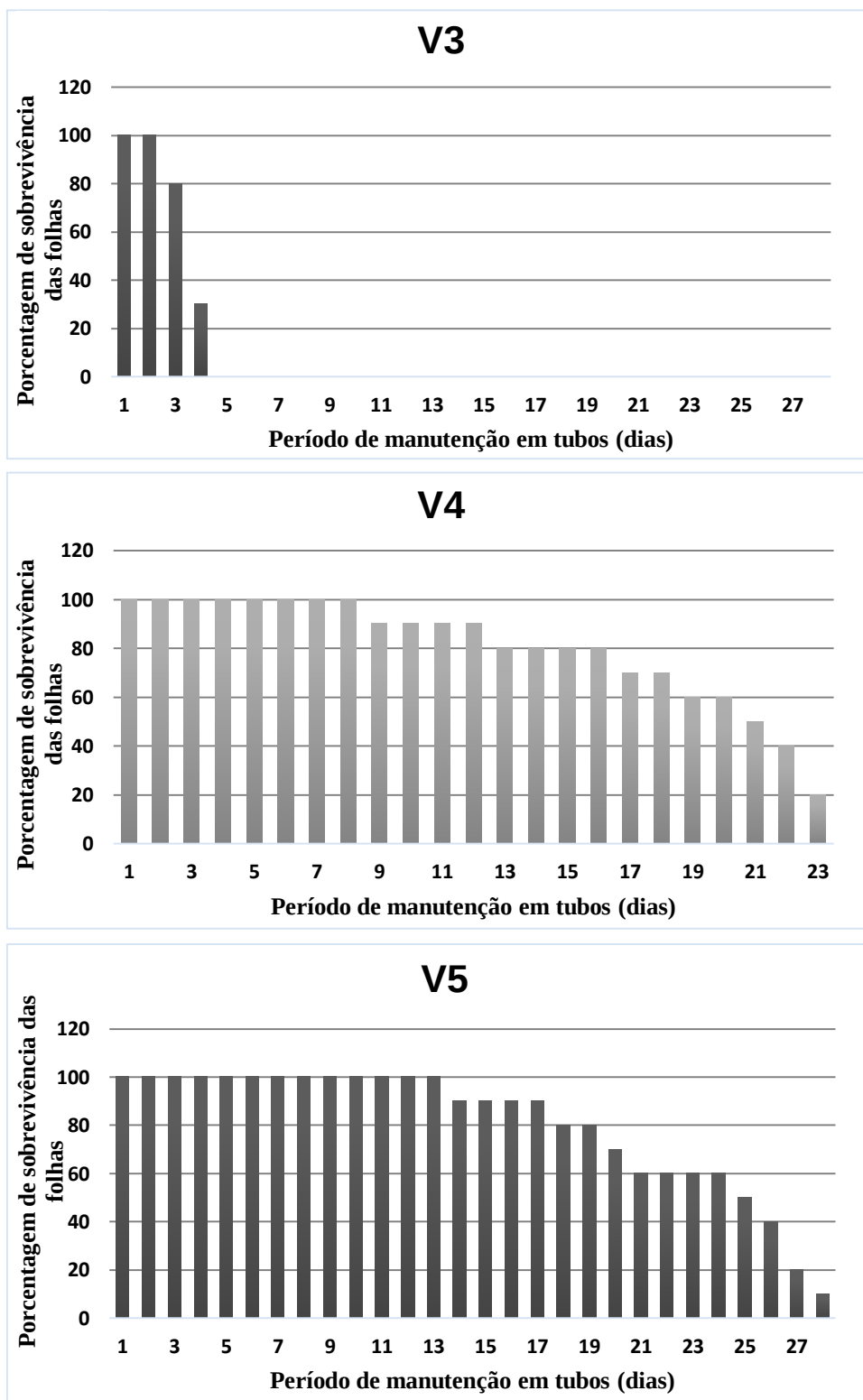


Figura 6: Viabilidade de folhas destacadas de citros, em 3 fenológicos distintos, após diferentes períodos de manutenção em tubos contendo água destilada. Estádio V3, estágio V4 e estágio V5.

4.1.2. Efeito de solução nutritiva (MS) na sobrevivência e longevidade das folhas

Após a escolha do estágio vegetativo a ser utilizada nos estudos, foi instalado experimento para avaliar a vida útil das folhas tentando proporcionar manutenção da umidade, longevidade, absorção de nutrientes e água pelas folhas. Foram comparadas 2 tratamentos: a água e a solução mineral nutritiva (meio MS) em duas formas de aplicação, direta em contato com a folha e embebidas em algodão. As folhas em que foram mantidas na solução nutritiva, nas duas formas de aplicação, apresentaram logo a partir do segundo dia a presença de microrganismos que foram observados pela mudança na colocação da solução presente no tubo. No final do sétimo dia, as folhas apresentaram apodrecimento do caule e do pecíolo que estavam em contato com a solução, necrose e murchamento da bainha foliar.

A água apresentou os melhores resultados, com tempo de sobrevivência da folha avaliado até 21 dias quando aplicado de forma direta (Figura 6). Quando embebida em algodão, a água evaporou de forma rápida, foi necessário reposição constante da água para evitar o murchamento e seca das folhas mais rápido quando comparado com o tratamento em que a água foi aplicado em contato direto com a folha.

4.1.3. Curva de sobrevivência de *D. citri* em folhas destacadas

Esse experimento mostrou existir relação diretamente proporcional entre a sobrevivência dos psíldeos e a sobrevivência das folhas, independente do número de insetos que se alimentaram nelas. A sobrevivência das folhas é diretamente influenciada pelo número de insetos e pelo tempo em que ficam se alimentam nas folhas.

Quanto aos insetos, a taxa de sobrevivência foi diminuindo com o tempo, mas de forma similar até o sétimo dia para os dois grupos, com média de 82,5% para os

grupos de 4 indivíduos e de 81,3 % para os grupos com 8 indivíduos (Figura 7). Neste período as folhas se mostravam ainda inalteradas em relação ao seu aspecto original, ou seja, a do momento da transferência para os tubos. A partir do sétimo dia de avaliação, houve diferença significativa nas taxas de sobrevivência entre as densidades de insetos chegando a 67,5% nas folhas com 4 e 52,5% nas folhas com 8 indivíduos no final do experimento (15º dia). A concorrência por espaço e locais de alimentação podem ser as causas das diferenças observadas.

A disponibilidade de alimento é fundamental para a sobrevivência dos insetos, pois influencia diretamente a distribuição, número e afeta seus aspectos morfológicos, biológicos e comportamentais (GALLO et al., 2002).

Os insetos também influenciaram aparentemente na taxa de sobrevivência das folhas, que neste experimento serviu de alimento por 15 dias quando alimentadas por lotes de oito insetos, e superior a 15 dias quando alimentadas por lotes de quatro insetos. Isto se deve muito provavelmente, promovido pela retirada de seiva pelos insetos durante a alimentação, não descartando também a possibilidade de ação de toxinas, embora não haja comprovação experimental em literatura de que isto ocorra. A presença de toxinas justificaria as deformações nos bordos da lâmina de folhas maduras que quando ainda no estágio de brotos, serviram de fonte de alimento tanto para adultos quanto para ninfas de *D. citri*.

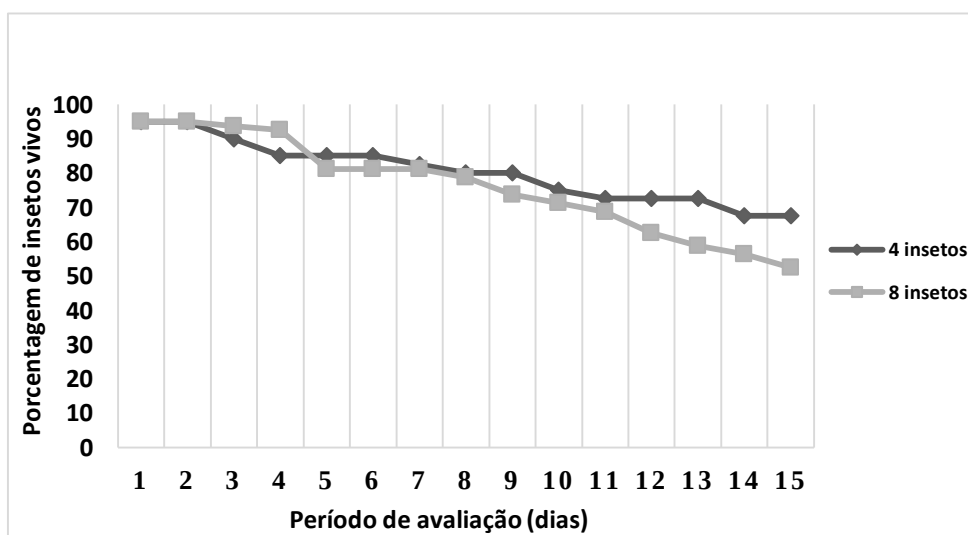


Figura 7. Porcentagem de adultos de *D. citri* vivos mantidos confinados, em grupos de 4 e 8 indivíduos, em tubos de polipropileno contendo folhas destacadas de citros, no estágio V4 da escala de Stoller, nos diferentes períodos de avaliação.

4.1.4. Aprimoramento

Após os testes realizados nos itens 4.1.1 e 4.1.2, chegou-se a metodologia padrão a ser utilizada nos experimentos para avaliação da inoculação de *Ca. L. asiaticus* por *D. citri*. No método inicialmente apresentado por Ammar et al., (2011a), a taxa de sobrevivência das folhas em estádios ideais para alimentação de *D. citri* não foram superiores a 7 dias o que levou a utilização de folhas maduras com tecidos lignificados que dificultam a alimentação do inseto. Para aumentar a longevidade da folha destacada, foi utilizada uma proporção maior de água nos tubos (15 mL) em contato direto com a folha, comparado com os 2 mL utilizados por Ammar et al. (2011a) colocados em micro eppendoff. Além do que, nos ensaios foi observado que folhas retiradas com parte do caule (Figura 3 A), conservavam folhas em estádios mais jovens, V4 ou V5, destacada por períodos mais longos, chegando a 30 dias.

No estudo utilizamos folhas V4 ou V5 que nos ensaios de sobrevivência foram os que melhor resultados produziram, removidas de plantas sadias usando-se lâmina de bisturi esterilizado. Foram retiradas juntamente com o pecíolo e parte do caule cortado em bixel para proporcionar maior área de absorção de água. As folhas foram lavadas com água Milli-Q para retirada de resíduos químicos que pudessem interferir na sobrevivência dos insetos e secas em temperatura ambiente. Folhas e insetos foram transferidos para tubos de polipropileno de 50 mL contendo 15 mL de água Milli-Q. As folhas foram fixadas no centro do tubo, por um disco de papel de filtro de 8 cm de diâmetro (servindo como ponte) para sustentação da folha e para evitar o contato dos insetos com a água. O volume da água foi completado sempre que necessário.

Os tubos foram mantidos em grades-suporte em câmaras de crescimento com temperatura de 26°C, 50% umidade relativa e fotoperíodo de 12 horas de luz/12 horas de escuro. A abertura superior dos tubos foi envolta com um pedaço de tela antiáfida fixada com elástico para evitar a fuga dos insetos e permitir trocas gasosas do material vegetal com o meio como já demonstrados nas figuras 3 e 4.

4.2. Uso do método para estudos de transmissão de *Ca. Liberibacter* por *D. citri*

4.2.1. Teste preliminar de inoculação e aquisição

No final da avaliação, após 7 dias de acesso a aquisição, 60% dos grupos de insetos que se alimentaram em folhas doentes continham *Ca. L. asiaticus*, com valores médios de Ct variando entre 21,0 e 33,4, o que corresponderam a valores médios de log no número de cópias do genoma de *Ca. L. asiaticus* por lote de insetos entre 1,90 a 5,50 (Tabela 1). Nos estudos de Ammar et al., (2011a) foi observado valores na taxa de transmissão entre 50 e 60% para os insetos analisados quando colocados para se alimentar em folhas destacadas retiradas de plantas sintomáticas e qPCR+.

A porcentagem de aquisição verificada neste estudo está próxima dos valores obtidos por outros pesquisadores com o emprego de plantas inteiras. Pelz-Stelinski et al. (2010) obtiveram porcentagem variando de 40 a 60%. Cen et al. (2012) relataram que a severidade dos sintomas associados ao HLB influenciam negativamente a atividade de alimentação no floema por insetos adultos, contribuindo para as diferenças na taxa de aquisição de *Ca. L. asiaticus* encontradas entre experimentos. Fatores como altas temperaturas também podem influenciar negativamente a aquisição do patógeno (LOPES et al., 2013).

Na avaliação da inoculação apenas 30% das folhas nas quais insetos qPCR+ para *Ca. L. asiaticus* se alimentaram por período de sete dias continham a bactéria, com valores médios de Ct entre 30,3 e 33,7, o que corresponderam a Log do número de cópias do genoma de *Ca. L. asiaticus* por grama de nervura central nessas amostras entre 2,29 e 3,30. Nos estudos preliminares de Ammar et al., (2011a) usando 5 insetos a eficiência de inoculação foi de 20%. Nos dados obtidos nesse estudo não se observou um padrão definido no processo de inoculação,

refletindo talvez em diferenças genéticas dentro das populações, fatores de respostas das plantas e influência de fatores ambientais. Barreiras naturais dentro do corpo do inseto que interferem na circulação do agente patogênico podem impedir que atinjam as glândulas salivares diminuindo a possibilidade de transmissão da bactéria (AMMAR et al., 2009).

Embora tenha sido empregado um número pouco representativo de indivíduos (repetição) o método mostrou-se útil para estudos de transmissão como observado por Ammar et al. (2011a e 2013). Permitiu a sobrevivência tanto dos insetos quanto das folhas por período suficiente para que houvesse aquisição ou inoculação de *Ca. L. asiaticus*.

Tabela 1: Aquisição e inoculação de *Ca. L. asiaticus* por grupos de 5 indivíduos adultos de *D. citri* em folhas destacadas de citros após período de sete dias de acesso à aquisição ou inoculação.

Repetição	Aquisição			Inoculação		
	Insetos vivos após 7 dias	qPCR		Status da folha após 7 dias	qPCR	
		Média Ct	Média Log		Média Ct	Média Log
1	3	33,3	1,95	verde e túrgida	37,3	0
2	2	36,7	0	verde e túrgida	indet	0
3	4	30,1	2,88	verde e túrgida	30,3	3,30
4	1	32,0	2,32	verde e túrgida	32,8	2,54
5	5	21,0	5,50	verde e túrgida	indet	0
6	4	34,4	0	verde e túrgida	indet	0
7	3	36,6	0	verde e túrgida	indet	0
8	4	27,4	3,66	verde e túrgida	33,7	2,29
9	2	indet	0	verde e túrgida	35,5	0
10	2	33,4	1,90	verde e túrgida	38,6	0
Total	30	31,7	1,82	10	34,7	0,81

Os valores de Ct (threshold cycle) obtidos por qPCR foram considerados positivos para insetos e folhas quando $\leq 34,0$, determinado com base na curva de quantificação para determinar a concentração da bactéria por grama de tecido avaliado. Valores indeterminados também são considerados negativos pelo programa Step One que acompanha o termociclador de DNA. O Log representa o logaritmo base 10 do número de cópias do gene ribossomal 16S (16S rDNA) de *Ca. L. asiaticus* por lote de insetos ou grama de nervura foliar.

4.2.2. Número mínimo de adultos de *D. citri* e tempo mínimo necessário para inoculação de *Ca. L. asiaticus*

A porcentagem de folhas destacadas qPCR+ expostas a 1, 4 e 8 insetos qPCR+, mantidos confinados nas folhas por 1, 7 e 15 dias de período de acesso a inoculação (PAI), seguidos de 1, 7 e 15 dias de períodos de incubação (PI) são mostrados na Tabela 2.

Houve, de maneira geral, aumento na taxa de inoculação (avaliada com base na porcentagem de folhas com a bactéria) com o aumento no número de insetos. Aumentou, na média de todos os períodos de incubação avaliados, de 19,4% com 1 inseto para 29,0% com 4 insetos e para 36,7% com 8 insetos, depois de 1 dia de acesso à inoculação. Aumentou de 52,2% com 1 inseto para 64,0% com 4 insetos para 62,5% com 8 insetos, depois de 7 dias de acesso à inoculação. E, finalmente, aumentou de 35,7% com 1 inseto para 44,4% com 4 insetos para 55,6% com 8 insetos, depois de 15 dias de acesso à inoculação. Demonstrou-se assim ter havido, aparentemente, um efeito de dose de *Ca. L. asiaticus* inoculada pelos insetos, ou seja, quanto maior o número de insetos que se alimentaram nas folhas, maior foram as taxas de inoculação bem sucedida da bactéria, porém sem grande variação nos valores médios de Ct entre os tratamentos. O Ct entre as folhas expostas aos insetos oscilaram, na média, entre 28,2% e 33,4% (correspondentes a 3,9 e 2,4 log do número de bactéria por grama de tecido). Neste estudo não foram feitas análises dos títulos da bactéria nos insetos usados no experimento.

Quando se analisa o efeito do PAI sobre a taxa de inoculação, observa-se também, na média dos três grupos de insetos, um aumento considerável de 1 para 7 dias (28,4% para 60%,0) seguido de decréscimo com 15 dias de PAI (45,2%). Dentro de cada grupo de insetos também houve variação. Para o grupo de 1 inseto, a variação foi de 19,4% com PAI de 1 dia, 52,2% com PAI de 7 dias e 35,7% com PAI de 15 dias. Para o grupo de 4 insetos, a variação foi de 29,0% com PAI de 1 dia, 64,0% com PAI de 7 dias e 44,4% com PAI de 15 dias. Para o grupo de 8 insetos, a variação foi de 36,7% com PAI de 1 dia, 62,5% com PAI de 7 dias e 55,6% com PAI de 15 dias.

Tabela 2: Influência do número de insetos e período de incubação e inoculação na transmissão de *Ca. L. asiaticus* por *D. citri*

Período de Acesso a Inoculação (dias)	Período de Incubação (dias)	1 inseto				4 insetos				8 insetos			
		qPCR + / Total testado	% Las positivo	Média Ct ± erro padrão	Média Log ± erro padrão	qPCR + / Total testado	% Las positivo	Média Ct ± erro padrão	Média Log ± erro padrão	qPCR + / Total testado	% Las positivo	Média Ct ± erro padrão	Média Log ± erro padrão
1	1	0 (9)	0,0	0	0	0 (9)	0	0	0	1 (9)	11,1	33,6	2,3
	7	3 (9)	33,3	33,5 ±0,11	2,3 ±0,03	4 (9)	44	31,1 ±0,56	3,1 ±0,17	4 (9)	44,4	32,1 ±0,53	2,8 ±0,16
	15	1 (8)	12,5	31	3,1	2 (8)	25	28,4 ±4,82	3,9 ±1,45	3 (7)	42,9	31,9 ±1,47	2,8 ±0,44
	21	2 (5)	40,0	33,4 ±0,22	2,4 ±0,07	3 (5)	60	32,5 ±0,74	2,7 ±0,22	3 (5)	60,0	30,6 ±1,6	3,2 ±0,48
	Total	6 (31)	19,4	32,6		9 (31)	29	30,7		11 (30)	36,7	32,05	
7	7	8 (10)	80,0	32,9 ±0,33	2,5 ±0,10	7 (10)	70	32,2 ±0,40	2,7 ±0,12	6 (10)	60,0	31,4 ±0,83	3,0 ±0,25
	15	3 (8)	37,5	31,9 ±1,04	2,8 ±0,31	6 (10)	60	32,7 ±0,46	2,6 ±0,14	6 (9)	66,7	31,0 ±0,98	3,1 ±0,29
	21	1 (5)	20,0	34	2,2	3 (5)	60	32,7 ±0,14	2,6 ±0,04	3 (5)	60,0	30,0 ±1,03	3,4 ±0,31
	Total	12 (23)	52,2	32,9		16 (25)	64	32,5		15 (24)	62,5	30,8	
15	15	4 (9)	44,4	30,8 ±0,58	3,2 ±0,75	4 (6)	67	33,2 ±0,58	2,5 ±0,17	3 (6)	50,0	29,4 ±2,15	3,6 ±0,64
	21	1 (5)	20,0	28,2	3,9	0 (3)	0	0	0	2 (3)	66,7	33,0 ±0,48	2,5 ±0,14
	Total	5 (14)	35,7	29,5		4 (9)	44	33,2		5 (9)	55,6	31,2	
Total		23 (68)	33,8	31,7		29 (65)	45	32,1		31 (63)	49,2	31,35	

Os valores de Ct obtidos por qPCR foram considerados positivos quando $\leq 34,0$, determinado com base na curva de quantificação para determinar a concentração da bactéria por grama de tecido avaliado. O Log representa o logaritmo base 10 do número de cópias do gene 16S (16S rDNA) de *Ca. L. asiaticus* por grama de nervura foliar.

O aumento na taxa de inoculação foi observada foi gradual acompanhando o aumento do período de incubação, em que os insetos foram retirados e as folhas foram deixadas para incubação da bactéria. Esse aumento pode ser o resultado da multiplicação da bactéria nas folhas, atingindo limites passíveis de serem detectados por qPCR. Este mesmo efeito também foi detectado por Ammar, 2013, em seus estudos onde as porcentagens de inoculação foram de 12%, 29% e 48%, respectivamente, quando utilizou 1, 5 e 10 insetos.

A porcentagem de folhas positivas para *Ca. L. asiaticus* nos tratamentos de 15 dias de PAI foi menor para todos os tratamentos. No entanto, a quantidade de bactérias, avaliada pelo valor de Ct e Log calculados, foi igual ou superior aos encontrados nos outros tratamentos mesmo com porcentagem inferiores de positivos analisados.

O fator incubação não pode ser analisado para o tratamento com 15 dias de PAI pela baixa sobrevivência das folhas o que não permitiu analisar a diferença dentro dos períodos de incubação de forma representativa. A porcentagem de folhas qPCR+ diminuiu com o aumento do período de incubação, fator que pode estar relacionado com a qualidade fisiológica das folhas, e pode ter influenciado na degradação do DNA das bactérias e interferido no resultado do qPCR.

4.2.3. Influência do número de insetos e período de acesso à inoculação e incubação para detecção de *Ca. L. asiaticus* nas folhas

Com base nos resultados anteriores (Tabela 2), avaliou-se de forma mais detalhada, em dois experimentos, os efeitos do período de inoculação e incubação na eficiência de inoculação de *Ca. L. asiaticus* por *D. citri*, em grupos de 4 insetos, criados por várias gerações em plantas de citros doentes, foram confinados por 24h e 72h para inoculação da bactéria nas folhas destacadas, as quais foram mantidas por 7 e 15 dias para incubação da bactéria. Os resultados são apresentados na Tabela 3. Sobre os insetos usados no estudo, são também apresentadas porcentagens de insetos qPCR+ para *Ca. L. asiaticus* e títulos bacterianos nos mesmos.

Houve variação nas taxas de inoculação entre experimentos. Com 24h de PAI as taxas de inoculação para 7 dias de PI foram de 10% no primeiro e 3,33% no segundo experimento. Com 15 dias de PI a taxa foi de 20% no primeiro e 8% no segundo experimento. O mesmo ocorreu para 72h de PAI. Com 7 dias de PI as taxas de inoculação foram de 13,3% no primeiro e 20% no segundo experimento. Para 15 dias de PI as taxas de inoculação foram de 33,3% no primeiro dia e 25% no segundo experimento.

De maneira geral, a tendência observada no experimento anterior (Tabela 2) se repetiu aqui, ou seja, as taxas de inoculação aumentaram com o aumento tanto do PAI (que resultaram, na média, em 10,3% para 24h e 22,9% para 72h) como com o aumento do PI (que resultaram, na média, em 11,7% com 7 dias de PI e 22,1% com 15 dias de PI). Não se pode afirmar, no entanto, que isto se deva a um aumento na multiplicação da bactéria nas folhas.

Tabela 3: Influência do tempo de inoculação e incubação na transmissão de *Ca. L. asiaticus* por *D. citri*.

citri.		Psilídeos testados				Período Incubação (PI)									
						7 dias				15 dias					
Período de acesso a inoculação (PAI)	Expt.	Nº de lotes de 4 insetos	% Ca . L. asiaticus qPCR+	Média Ct ± erro padrão	Média Log ± erro padrão	Nº de folhas	% Ca . L. asiaticus qPCR+	Média Ct ± erro padrão	Média Log ± erro padrão	Nº de folhas	% Ca . L. asiaticus qPCR+	Média Ct ± erro padrão	Média Log ± erro padrão	Média %Ca . L. asiaticus qPCR+	
24h	1	16	100,0	26,2 ±2,05	3,99 ±0,59	30	10,0	29,6 ±2,03	3,51 ±0,61	30	20,0	32,4 ±0,45	2,68 ±0,14	15,0	
	2	16	89,5	28,7 ±1,88	3,26 ±0,56	30	3,3	27,7	4,09	25	8,0	32,5 ±1,02	2,64 ±0,31	5,7	
	Total	32	94,8	27,5	3,6	60	13,3	28,7	3,8	55	28,0	32,5	2,7	20,7	
72h	1	20	100,0	28,3 ±1,75	3,38 ±0,44	15	13,3	31,5 ±1,04	2,93 ±0,31	12	33,3	30,9 ±0,35	3,12 ±0,10	23,3	
	2	20	100,0	25,9 ±0,63	4,08 ±0,19	15	20,0	29,5 ±1,69	3,55 ±0,82	15	25,0	31,8 ±1,45	2,85 ±0,64	22,5	
	Total	40	100,0	27,1	3,7	30	16,7	30,5	3,2	27	58,3	31,4	3,0	37,5	

D. citri em grupos de 4 insetos criados por várias gerações em plantas de citros doentes foram mantidos em folhas destacadas sadias de laranja por 24 e 72h as quais foram mantidas a 26°C por período de 7 e 15 dias e em seguida analisadas por qPCR. Foram considerados positivos, valores de Ct ≤ 34,0, determinado com base na curva de quantificação. O Log representa o logaritmo base 10 do número de cópias do gene 16S (16S rDNA) de *Ca. L. asiaticus* por grama de nervura foliar.

Não foi observada relação entre valores de Ct dos insetos e a taxa de inoculação de *Ca. L. asiaticus*, contrário ao resultado encontrado por Ammar et al. (2013), onde foi demonstrado correlação positiva entre o Ct dos insetos e das folhas

onde eles se alimentaram. No entanto, as porcentagens observadas no presente estudo, nas folhas nas quais a inoculação foi bem sucedida, foram semelhantes aos encontrados por Ammar et al. (2013).

No campo a doença continua sendo disseminada muito rapidamente, onde a baixa eficiência de transmissão de *Ca. L. asiaticus* para plantas de citros deve estar sendo compensada pelas altas populações de *D. citri*. Neste estudo a taxa de inoculação aumentou com o aumento do número de insetos.

4.2.4. Comparação do método de folhas destacadas e folhas mantidas na planta quanto à taxa de inoculação de *Ca. L. asiaticus* por *D. citri*

Visando validação do método de folhas destacadas quanto à taxa de inoculação de *Ca. L. asiaticus* por *D. citri*, este foi comparado ao uso de folhas mantidas na planta (Tabela 4). Para as folhas destacadas com 7 e 15 dias de PI os resultados foram de 10 e 13% de inoculação para os tratamentos, com Cts médios de 30,3 e 31,6. A porcentagem de inoculação foi inferior a encontrada nos experimentos anteriores com mesmo PAI e PI (Tabela 3).

Tabela 4. Inoculação de *Ca. L. asiaticus* por lotes de 5 adultos de *D. citri* em folhas destacadas e em folhas mantidas na planta após períodos de acesso a inoculação de 72 horas.

Período de incubação (PI)	Folhas destacadas				Folhas mantidas na planta			
	Nº de folhas	% <i>Ca. L. asiaticus</i> qPCR+	Média Ct ± erro padrão	Média Log ± erro padrão	Nº de folhas	% <i>Ca. L. asiaticus</i> qPCR+	Média Ct ± erro padrão	Média Log ± erro padrão
7 dias	20	10,0	30,3 ±2,26	3,0 ±0,5	20	5,0	31,7	3,9
15 dias	15	13,3	31,6 ±0,56	2,3 ±0,3	20	0,0	0	0
Total	35	13,3	31,0	2,7	40	5,0	31,7	3,9

D. citri em grupos de 4 insetos criados por várias gerações em plantas de citros doentes e deixados para se alimentar em folhas destacadas e em folhas mantidas em mudas sadias de laranja por 72h de inoculação e 7 e 15 dias de incubação. Foram considerados positivos os valores obtidos de Ct por qPCR quando $\leq 34,0$, determinado com base na curva de quantificação para determinar a concentração da bactéria.

A taxa de inoculação nas folhas mantidas nas mudas foi inferior à taxa de inoculação nas folhas destacadas sendo de 5 e 0%, respectivamente após 7 e 15 dias de PI.

Em seus estudos, Ammar et al., (2013) compararam a inoculação em folhas destacadas e em plantas, demonstrando eficiência similar para os dois métodos. No entanto, as plantas foram avaliadas após 8 meses da inoculação, e não após 7 ou 15 dias, conforme conduzidos neste estudo. Embora esse fator impeça comparações precisas dos dois trabalhos, é possível que no trabalho aqui apresentado a não detecção da bactéria na folha após 15 dias de PI não indique que a infecção não foi bem sucedida, pode ter ocorrido falha do qPCR, ou apenas que, no local de alimentação do inseto a bactéria se manteve em concentração abaixo do limite de detecção por qPCR, além do que com o tempo, tenha se movido para outra parte da planta impedindo sua detecção.

Os valores baixos de inoculação observados estão na capacidade de psílídeos em transmitir *Ca. L. asiaticus*. Embora um único dia foi suficiente para que a inoculação fosse bem sucedida (Tabela 3), a taxa de transmissão das populações de insetos foi baixa, como já verificado por outros pesquisadores usando plantas intactas que variou de 4% a 10% (INOUE et al., 2009, PELZ- STELINSKI et al., 2010) e em média 15% usando folhas destacadas (AMMAR et al., 2013).

Fatores relacionados aos insetos podem ter influenciado na baixa taxa de inoculação observada em todos os experimentos aqui avaliados. Barreiras dentro do corpo de *D. citri* podem impedir o movimento de *Ca. L. asiaticus* e outros fatores isolados ou combinados podem influenciar as taxas de transmissão, incluindo as defesas da planta, as condições ambientais e as diferenças genéticas entre as populações de *D. citri* que influenciam na sua capacidade de adquirir e transmitir *Ca. L. asiaticus* (PELZ- STELINSKI et al., 2010, AMMAR et al., 2009, 2011).

Pesquisas sobre as barreiras de transmissão e receptores que estão associados a capacidade de *D. citri* em adquirir e inocular a bactéria (HOGENHOUT et al., 2008; AMMAR et al., 2009) podem ajudar na elaboração de métodos de controle que visam reduzir as taxas de transmissão do psílídeo vetor. Impedir o surgimento de novas infecções sistêmicas das plantas são necessárias e como estratégias para proteger os pomares e manter a doença em níveis satisfatórios.

Inicialmente observou-se grande concordância nos resultados obtidos aqui com os obtidos na Flórida, o que é um indício de que as populações de *Ca. L. asiaticus* e de *D. citri* que ocorrem na Flórida têm os mesmos comportamentos que as populações de *Ca. L. asiaticus* e de *D. citri* que ocorrem no estado de São Paulo.

Apesar de a taxa de inoculação de *Ca. L. asiaticus* ser baixa o que, de maneira geral foi confirmado no presente trabalho, um único dia desprotegida no campo é o suficiente para que a planta seja infectada por liberibacter se serviu de alimento a um inseto inoculativo. Quando isto ocorre, mesmo que seja em apenas um único broto da planta, ela já está irremediavelmente condenada. Isto porque a bactéria é sistêmica e o período de incubação é longo e a doença não tem cura.

5. CONCLUSÃO

O método mostrou-se útil para estudos de inoculação e aquisição de *Ca. L. asiaticus* por *D. citri*, no entanto não é viável para utilização em experimentos que necessitam de tempos longos de avaliação pela baixa longevidade apresentada pela folha destacada.

A inoculação de *Ca. L. asiaticus* não segue um padrão definido, e sofreu variação entre os experimentos. A taxa de inoculação foi baixa, mas no campo, é compensada pelas altas populações do inseto. Nos experimentos um único inseto com 1 dia de PAI foi suficiente para detecção da bactéria, mesmo que a multiplicação da bactéria não tenha sido confirmada.

O uso do método aqui estudado e aprimorado poderá ser ampliado para estudos de outros aspectos do problema, como estudos da nutrição de *D. citri* e testes para controle com produtos químico e biológicos. Além de possibilitar avaliação de indução de resistência, transformação de plantas e uso de antimicrobianos, se ajustes forem feitos no sentido de ampliar ainda mais o tempo de longevidade das folhas destacadas de citros.

O conhecimento do fitopatossistema reforça a ideia que o controle da doença só é possível se envolver ações preventivas, complementares, relacionados ao controle do vetor e redução das fontes de inóculo.

6. REFERÊNCIAS

ACHOR DS, ETXEBERRIA E, WANG N, FOLIMONOVA SY, CHUNG KR, ALBRIGO LG. Sequence of Anatomical Symptom Observations in Citrus Affected with Huanglongbing Disease. *Plant Pathol J* 9: 56–64, 2010.

AMMAR, E.; TSAI, C. W.; WHITFIELD, A. F.; REDINBAUGH, M. G.; HOGENHOUT, S. A. Cellular and molecular aspects of rhabdovirus interactions with insect and plant hosts. *Annual Review of Entomology* 54: 447–468, 2009.

AMMAR, E.; WALTER, A. J.; HALL, D. G. A new detached-leaf assay to test the inoculativity of psyllids with *Candidatus Liberibacter asiaticus* associated with huanglongbing disease. **Phytopathology**. 101:S6, 2011a.

AMMAR, E.; SHATTERS, R. G.; LYNCH, C.; HALL, D. G. Detection and relative titer of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in the salivary glands and alimentary canal of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) vector of citrus huanglongbing disease. **Annals of the Entomological Society of America**, 104: 526–533, 2011b.

AMMAR, E.; WALTER, A. J.; HALL, D. G. New excised-leaf assay method to test inoculativity of asian citrus psyllid (Hemiptera: Psyllidae) with *Candidatus Liberibacter asiaticus* associated with citrus huanglongbing disease. **Entomological Society of America**, 106, 25-35, 2013.

ARAKAWA, K. & MIVAMOLO, K. Flight ability of Asiatic citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera; Psyllidae), measured by a flight mill. **Research Bulletin of the Plant Protection Service of Japan** 43: 23–26, 2007.

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

BASS, C.; FIELD, L. M. Gene amplification and insecticide resistance. **Pest Management Science**. 67:886–890, 2011.

BASSANEZI, R. B. & BASSANEZI, R. C. An approach to model the impact of huanglongbing on citrus yield. 2008. **Proceedings of the International Research Conference on Huanglongbing**, Orlando, p.301-304, 2008.

BASSANEZI, R. B.; MONTESINO, L. H. Yield loss caused by huanglongbing in different sweet orange cultivars in São Paulo, Brazil. **Eur. J. Plant Pathol**. 130: 577-586, 2011.

BEATTIE, G.A.C. and BARKLEY, P. Huanglongbing and its vectors: A pest-specific contingency plan for the citrus and nursery and garden industries. **Horticulture Australia Ltd**. Sydney, 2009.

BERGAMIN-FILHO, A; GASPAROTO, M. C. G.; BASSANEZI, R. B.; AMORIM, L. Relationship between insecticide sprays and huanglongbing progress in a citrus orchard in São Paulo, Brazil. Proceedings of the International Research Conference on Huanglongbing, Orlando, Florida, USA, December 2008 (ed. by TR Gottwald & JH Graham). **Plant Management Network**, St. Paul, MN. pp. 282–284, 2009.

BOVÉ, J. M. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. **Journal of Plant Pathology**, 88: 7-37, 2006.

BROWDER, L. E. A modified detached-leaf culture technique for study of cereal rusts. **Plant Disease Reporter**, Beltsville, n.48, p. 906 - 908. 1964.

CAPOOR, S. P.; RAO, D. G.; VISWANATH, S. M. *Diaphorina citri* Kuwayama., a vector of greening disease of citrus in India. **Indian J. Agric. Sci.** v. 37, p. 572-576, 1967.

CEN, Y; YANG, C; HOLFORD, P. BEATTIE, GAC; SPOONER-HART, R. N. et al. Feeding behavior of the Asiatic citrus psyllid, *Diaphorina citri*, on healthy and huanglongbing-infected citrus. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 143: 13–22, 2012.

CLINTON, G. P.; McCORMICK, F. A. Rust infection of leaves in Petri dishes. **Connecticut Agric. Exp. Station**, New Haven, Conn., Bulletin n.260, p. 475 - 501. 1924.

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

COSTA LIMA, A. M. Insetos do Brasil: Homopteros. Rio de Janeiro: **Escola Nacional de Agronomia**, 3:1-327, 1942.

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

DAVIS, M. J; MONDAL, S.N; CHEN, H; ROGERS, M. E; BRLANSKY, R. H. Co-cultivation of "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" with Actinobacteria from citrus with huanglongbing. **Plant Dis**, 92:1547-1550, 2008.

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

FERNÁNDEZ, C. G. *Diaphorina citri* (Kuwayama.) (Hemiptera, Psyllidae) in the cuban citriculture. **La Habana: RIAC – IACNET**, n. 21 e 22, 56p, 2003.

FUNDECITRUS. Fundo de Defesa da Citricultura. 2013a. Levantamento amostral. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/Pagina/Levantamento-amostral,106>> Acesso em 30/01/2013.

FUNDECITRUS. Fundo de Defesa da Citricultura. 2013b. Disponível em: <http://www.fundecitrus.com.br/Noticias/27.03.13---7,2-milhoes-de-plantas-são-arrancadas-por-causa-do-greening-em-2012,333>> Acesso em 15/04/2013.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BATISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIN, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Manual de Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920 p.

GÓMEZ-TORRES, M.L. Estudos bioecológicos de *Tamarixia radiata* (Waterston, 1922) (Hymenoptera: Eulophidae) para o controle de *Diaphorina citri* Kuwayama,

1907 (Hemiptera: Psyllidae). 138p. **Tese (Doutorado)** - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2009.

GOTTWALD, T. R. Citrus canker and citrus huanglongbing, two exotic bacterial diseases threatening the citrus industries of the Western Hemisphere. **Outlooks on Pest Management**, 18: 274–279, 2007.

GOTTWALD, T. R. Current epidemiological understanding of citrus huanglongbing. **Annu. Rev. Phytopathol.** 48: 119 - 139, 2010.

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

HALL, D. G. Biology, history and world status of *Diaphorina citri*. **North American Plant Protection Organization, Proceedings of the Taller Internacional Sobre Huanglong-** 220 Hall et al. bing y el Psilido Asiatico de los Citricos, del 7 al 9 de Mayo de 2008, Hermosillo, Sonora, p. 11. Disponível em: http://www.concitver.com/huanglongbingYPsilidoAsiatico/Memor_ia-2%20Hall.pdf. Acesso: 14/02/2013.

HOGENHOUT, S. A.; AMMAR, E.; WHITFIELD, A. E.; REDINBAUGH, M. G. Insect vector interactions with persistently transmitted viruses. **Annual Review of Phytopathology**, 46: 327–359, 2008.

HOOKE A. L.; YARWOOD, C. E. Culture of *Puccinia sorghi* on detached leaves of corn and *Oxalis corniculata*. **Phytopathology**, St. Paul, 56, p. 536-539. 1966.

HUANG, C. H., TSAI, M. Y.; WANG, C. L. Transmission of citrus likubin by a psyllid, *Diaphorina citri*. **J. Agric. Res. China**, 33: 65-72, 1984.

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

ICHINOSE, K.; MIYAZI, K.; MATSUHIRA, K.; YASUDA, K.; SADOYAMA, Y. et al. Unreliable pesticide control of the vector psyllid *Diaphorina citri* (Hemiptera:

Psyllidae) for the reduction of microorganism disease transmission. **Journal of Environmental Science and Health Part B**, 45: 466–472, 2010.

INOUE, H.; OHNISHI, J.; ITO, T.; TOMIMURA, K.; MIYATA, S.; IWANAMI, T.; ASHIHARA, W. Enhanced proliferation and efficient transmission of *Candidatus Liberibacter asiaticus* by adult *Diaphorina citri* after acquisition feeding in the nymphal stage. *Ann. Appl. Biol.* 155: 29-36, 2009.

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

LI, W. B., J. S. HARTUNG, AND L. LEVY. Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus huanglongbing. **J. Microbiol. Methods** 66: 104-115, 2006.

LIN, C.K. Notes on citrus yellow shoot disease. **Acta Phytophylact.** Sin. 2:243-251, 1963.

LOPES, S. A.; LUIZ, F. Q. B. Q.; MARTINS, E. C.; FASSINI, C. G. ; BARBOSA, J. C. ; BEATTIE, G. A. C. . *Candidatus Liberibacter asiaticus* titers in citrus and acquisition rates by *Diaphorina citri* are decreased by higher temperature. **Plant Disease**, 2013. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-11-12-1031-RE>.

LOPES, S. A.; FRARE, G. F.; YAMAMOTO, P. T.; AYRES, A. J.; BARBOSA, J. C. Ineffectiveness of pruning to control citrus huanglongbing caused by *Candidatus Liberibacter americanus*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 119, p. 463-468, 2007.

LOPES, S. A. ; FRARE, G. F. ; CAMARGO, L. E. A. ; WULFF, N. A. ; TEIXEIRA, D. C. ; BASSANEZI, R. B. ; BEATTIE, G. A. C. ; AYRES, A. J. . Liberibacters associated with orange jasmine in Brazil: incidence in urban areas and relatedness to citrus liberibacters. **Plant Pathology (Print)**, v. 59, p. 1044-1053, 2010. DOI: 10.1111/j.1365-3059.2010.02349.x.

LOPES, S. A.; BERTOLINI, G.; FRARE, G. F.; MARTINS, E. C.; WULFF, N. A.; TEIXEIRA, D. C. Graft transmission efficiencies and multiplication of '*Candidatus Liberibacter americanus*' and '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' in citrus plants. **Phytopathology**, 99, 301–306, 2009.

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

LOPES, S.A; FRARE, G.F.; MARTINS, E.C. Plantas hospedeiras de Liberibacter no Brasil. In: **Huanglongbing – Greening International Workshop**, 2006. Ribeirão Preto, p.27, 2006.

LUZ, W. C. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Volume 12, 2004.

MANN, R. S.; ROUSEFF, R. L.; SMOOT, J. M.; CASTLE, W. S. & STELINSKI, L. L. Sulfur volatiles from *Allium* spp. affect Asian citrus psyllid, *Diaphorina Citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), response to citrus volatiles. *Bulletin of Entomological Research* 101: 89–97, 2011.

MCCLEAN, A. P. D.; OBERHOLZER, P. C. J. Citrus psyllid, a vector of the greening disease of sweet orange. **S. Afri. J. Agric. Sci.**, v. 8, p. 297-298, 1965.

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

MIGNUCCI, J. S., Development of soybean leaf cultures for maintenance and study of *Microsphaera diffusa*. **Plant Disease Reporter**, Beltsville, n.62, p. 271-273. 1978.

MEAD, F. W. The Asiatic citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae). Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Division of Plant Industry, **Entomology Circular**, 180: 1–4, 1977.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. **Plant Physiol**, 15: 473-479, 1962.

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, 33o ed., p. 10-13, 2004.

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

PELZ-STELINSKI, K. S.; BRLANSKY, R. H.; EBERT, T. A.; ROGERS, M. E. Transmission parameters for *Candidatus Liberibacter asiaticus* by Asian citrus psyllid (Hemiptera: Psyllidae). **J. Econ. Entomol.** 103: 1531-1541, 2010.

REGMI, C.; LAMA, T. K. Greening incidence and Greening vector population dynamics in Pokhara. In: **CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS**, 10., 1988, Valencia. **Proceedings...** Riverside: University of California, p. 238-242, 1988.

RICHARDSON, M. L.; HALL, D. G. Resistance of Poncirus and Citrus Poncirus germplasm to the Asian citrus psyllid. **Crop Science**, 2012. doi:10.2135/cropsci2012.02.0091.

ROGERS, M. E.; STANSLY, P. A. & STELINSKI, L. L. Florida Citrus Pest Management Guide: Asian Citrus Psyllid and Citrus Leafminer. IFAS Extension Publication ENY-734. University of Florida, Gainesville, FL, USA, 2012.

SAKAMAKI, Y. Possible migration of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae) between and within islands. **Occasional Papers Kagoshima University Research Center for the Pacific Islands** 42: 121–125, 2005.

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

SILVERMAN, W. B. The development of *Puccinia graminis* var. *tritici* on detached leaves of wheat as influenced by nutrients and metabolite antagonist. **Phytopathology** (Abstract). St. Paul, n.47, p. 31-31. 1957.

STOLLER. Guia de fases dos citros. 2013. Disponível em: <http://www.stoller.com.br/guias/guia-de-fases>. Acesso em 08/07/2013.

SUTTON B, DUAN Y, HALBERT S, SUN X, SCHUBERT T, DIXON W: Detection and identification of citrus huanglongbing (greening) in Florida, USA. In **Proceeding of the Second International Citrus Canker and Huanglongbing Research Workshop**: 7-11 November 2005; Orlando. Edited by Gottwald TR, Dixon WN, Graham JH, Berger P. Florida: Citrus Mutual, 59, 2005.

TEIXEIRA, D. C.; SAILLARD, C.; COUTURE, C.; MARTINS, E. C.; WULFF, N. A.; EVEILLARD-JAGOUÉIX, S.; YAMAMOTO, P. T.; AYRES, A. J.; BOVE, J. M. Distribution and quantification of *Candidatus Liberibacter americanus*, agent of huanglongbing disease of citrus in Sao Paulo State, Brazil, in leaves of an affected sweet orange tree as determined by PCR. **Molecular and Cellular Probes**, v. 22, p. 139-150, 2008.

TEIXEIRA, D.C.; DANET, J.L.; EVEILLARD, S.; MARTINS, E.C., JESUS JUNIOR, W.C.; YAMAMOTO, P.T.; LOPES, A.S.; BASSANEZI, R.B.; AYRES, A.J.; SAILLARD, C.; BOVÉ, J.M. Citrus huanglongbing in São Paulo State, Brazil: PCR detection of the '*Candidatus*' *Liberibacter* species associated with the disease. **Molecular and Cellular Probes**. 19:173-179, 2005.

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

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

TUITE, J. Plant Pathological Methods: fungi and bacteria. Minneapolis, Minn.: **Burgess Publishing Company**, 1969. 239 p.

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

WANG, L. Y., HUNG, S. C.; HUNG, T. H.; SU, H. J. Population fluctuation of *Diaphorina citri* Kuwayama and incidence of citrus likubin in citrus orchards in Chiayi area. **Plant Prot. Bull.**, Taiwan, v. 38, p. 355-365, 1996.

WILCOXSON, R. D.; ATIF, A. H.; SKOVMAND, B. Slow rusting of wheat varieties in the field correlated with stem rust severity on detached leaves in the greenhouse. **Plant Disease Reporter**, Beltsville, n.58, p. 1085-1087. 1974.

WHITESIDE, J. O.; GARNSEY, S. M.; TIMMER, L. W. **Compendium of citrus disease**. 2. ed. Saint Paul: Americal Phytopathological Society, 1993. 80 p.

XU, C. F.; XIA, Y. H.; LI, K. B. & KE, C. Further study of the transmission of citrus huanglongbing by a psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama. **Proceedings of the 10th Conference of the International Organization of Citrus Virologists**, 17–21 November 1986, Valencia, Spain (ed. by L W Timmer, SM Garnsey & L Navarro), pp. 243–248. International Organization of Citrus Virologists, University of California, Riverside, CA, USA, 1988.

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

YARWOOD, C. E. Detached leaf culture. **The Botanical Review**, Lancaster, n.12, p.1-56. 1946.