

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

**RUTÁCEAS COMO POTENCIAIS HOSPEDEIRAS DE
Diaphorina citri E RESERVATÓRIOS DE *Candidatus*
*Liberibacter asiaticus***

**Patrícia Aparecida de Carvalho Felisberto
Engenheira Agrônoma**

2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

RUTÁCEAS COMO POTENCIAIS HOSPEDEIRAS DE
Diaphorina citri* E RESERVATÓRIOS DE *Candidatus
Liberibacter asiaticus

Patrícia Aparecida de Carvalho Felisberto
Orientador: Prof. Dr. Silvio Aparecido Lopes

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

2018

F315r

Felisberto, Patrícia Aparecida de Carvalho

Rutáceas como potenciais hospedeiras de *Diaphorina citri* e reservatórios de *Candidatus Liberibacter asiaticus* / Patrícia Aparecida de Carvalho Felisberto. -- Jaboticabal, 2018

73 p. : il., tabs., fotos

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

Orientador: Silvio Aparecido Lopes

1. Citros. 2. Greening. 3. Huanglongbing. 4. Psílídeo. I.
Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: RUTÁCEAS COMO POTENCIAIS HOSPEDEIRAS DE *Diaphorina citri* E RESERVATÓRIOS DE *Candidatus Liberibacter asiaticus*

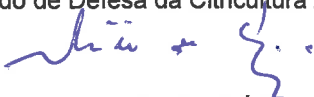
AUTORA: PATRÍCIA APARECIDA DE CARVALHO FELISBERTO

ORIENTADOR: SILVIO APARECIDO LOPES

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



Prof. Dr. SILVIO APARECIDO LOPES
Fundo de Defesa da Citricultura / FUNDECITRUS - Araraquara/SP



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



Pesquisador Dr. RENATO BEOZZO BASSANEZI
Fundo de Defesa da Citricultura / FUNDECITRUS - Araraquara/SP



Prof. Dr. MILTON GROPPPO JUNIOR
Departamento de Biologia / Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras - USP / Ribeirão Preto/SP



Prof. Dr. LAUDECIIR LEMOS RAIOL JÚNIOR
Fundecitrus / Araraquara/SP

Jaboticabal, 28 de setembro de 2018

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

PATRÍCIA APARECIDA DE CARVALHO FELISBERTO - nasceu em 22 de julho de 1989 em Pilar do Sul, São Paulo. Engenheira Agrônoma formada pela Universidade Estadual Paulista - UNESP - "Júlio de Mesquita Filho", Câmpus de Registro, em 2012. Durante o período de graduação trabalhou na área de Fitopatologia e Nutrição de Plantas. Foi bolsista de iniciação científica da FAPESP com projeto de adubação nitrogenada na cultura do pimentão. Realizou estágio curricular na área de Fitopatologia e Melhoramento da Cultura do Milho e Sorgo em multinacional de biotecnologia e sementes. Mestre em Agronomia pela Universidade Federal de Goiás - UFG, Regional Jataí, em 2015, onde atuou em Manejo da Cultura do Milho e Tecnologia de Aplicação de Produtos Fitossanitários. Em 2015 iniciou o curso de pós-graduação em Agronomia (Produção Vegetal), nível Doutorado pela Universidade Estadual Paulista - UNESP - "Júlio de Mesquita Filho", Câmpus de Jaboticabal atuando principalmente em fitossanidade dos citros, huanglongbing, *Candidatus Liberibacter asiaticus* e *Diaphorina citri*.

AGRADECIMENTOS

A Deus e à Nossa Senhora Aparecida por sempre me proporcionarem saúde, esperança e força para lutar e enfrentar os desafios da vida.

Ao Prof. Dr. Silvio Aparecido Lopes, pela orientação, ensinamentos, dedicação e confiança em meu trabalho.

Ao meu esposo Guilherme Felisberto por estar sempre ao meu lado, ajudando, apoiando e contribuindo na instalação, condução e avaliação dos experimentos.

Aos meus pais, produtores rurais, Paulo e Maria que mesmo distantes sempre serão minhas fontes inspiradoras de dedicação, incentivo e educação.

Aos meus irmãos Isabela e Rodrigo pelo companheirismo e apoio aos meus estudos.

Ao meu sogro Osvaldo e minha sogra Sueli pela torcida, apoio e confiança demonstrada.

À UNESP (FCAV) e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal) pela oportunidade.

Aos professores e funcionários do Departamento de Fitossanidade, setor Fitopatologia, meus agradecimentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, pela concessão da bolsa e apoio para a realização deste trabalho.

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

Aos pesquisadores do FUNDECITRUS Dr. Leandro Peña e Dr. Nelson Wulf e ao pesquisador da EMBRAPA Mandioca e Fruticultura Dr. Eduardo Augusto Girardi pelos ensinamentos.

Aos funcionários do FUNDECITRUS Amanda, André, Fernanda, Hermes, Luís e Priscila pelos auxílios prestados.

Aos colegas de pós-graduação pelo apoio, em especial Andréia Ramos (Unesp Botucatu) e Rafael Barreto (Unesp Jaboticabal).

A todos que direta ou indiretamente contribuíram com este trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
 CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS	 1
1 Introdução	1
2 Revisão de literatura	2
2.1 Huanglongbing (HLB)	2
2.1.1 Cenário atual das principais citriculturas	2
2.1.2 Importância do HLB	3
2.1.3 Inseto vetor	5
2.2 Rutáceas	6
2.2.1 A família do <i>Citrus</i>	6
2.2.2 Potenciais hospedeiras de <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> e <i>Diaphorina citri</i>	7
2.3 Manejo da doença	9
3 Referências	10
 CAPÍTULO 2 - UNSUITABILITY OF INDIGENOUS SOUTH AMERICAN RUTACEAE AS POTENTIAL HOSTS OF <i>Diaphorina citri</i>	 19
Abstract	19
1 Introduction	20
2 Materials and Methods	21
2.1 Plant species and growing conditions	21
2.2 New shoot development	22
2.3 <i>Diaphorina citri</i> biology on new shoots	24
2.4 <i>Diaphorina citri</i> survival on newly differentiated and fully expanded soft leaves	25
2.5 Statistical analyses	25
3 Results	28
3.1 New shoot development	28
3.2 <i>Diaphorina citri</i> biology on new shoots	28

3.3 <i>Diaphorina citri</i> adult survival.....	29
3.4 Clustering and principal components analysis.....	32
4 Discussion.....	34
5 References.....	37
 CAPÍTULO 3 - TRANSMISSÃO DE <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> POR ENXERTIA E <i>Diaphorina citri</i> EM RUTACEAE.....	47
RESUMO	47
1 Introdução	48
2 Material e métodos	49
2.1 Plantas e condições de crescimento	49
2.2 Transmissão de <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> por enxertia.....	50
2.3 Transmissão de <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> por <i>Diaphorina citri</i>	52
2.4 Extração de DNA.....	52
2.5 Detecção de <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>	53
3 Resultados	53
3.1 Transmissão por enxertia	53
3.2 Transmissão por inseto	60
4 Discussão	64
5 Referências.....	67
 CAPÍTULO 4 - CONSIDERAÇÕES FINAIS	71
 APÊNDICE	72

RUTÁCEAS COMO POTENCIAIS HOSPEDEIRAS DE *Diaphorina citri* E RESERVATÓRIOS DE *Candidatus Liberibacter asiaticus*

RESUMO - Huanglongbing (HLB) é a doença mais devastadora dos citros. Está associada a bactérias de floema disseminadas eficientemente pelo psílídeo *Diaphorina citri*, inseto altamente prolífico e com ampla gama de hospedeiros dentre as rutáceas. Diversas espécies desta família ocorrem em matas onde o inseto poderia estar se reproduzindo e reinfestando pomares além de servir como fonte de multiplicação de *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), dificultando o controle do HLB. Nesse sentido foram realizados dois estudos, sendo o primeiro para avaliar a sobrevivência de *D. citri* em folhas jovens recém-diferenciadas e totalmente expandida e a reprodução de *D. citri* em brotos em 20 espécies de rutáceas. E o segundo para avaliar a reação dessas espécies após inoculação do patógeno por meio de enxertia de tecidos infectados e uso de adultos infectivos de *D. citri*. No primeiro, classificou-se as espécies quanto a favorabilidade em reproduzir *D. citri* em quatro grupos de plantas: Grupo I (altamente favorável ao inseto) incluiu *Citrus ×aurantium* 'Valência', *Citrus limonia*, *Murraya paniculata* (syn. *Murraya exotica* L.) (Aurantioideae: Aurantieae) e *Bergera koenigii* (Aurantioideae: Clauseneae). As espécies do Grupo II (de intermediário a baixa favorabilidade) incluiu *Citrus* (Poncirus) *trifoliata* 'Pomeroy', *Citrus wintersii*, *Swinglea glutinosa* (Aurantioideae) e *Clausena lansium* (Clauseneae). O grupo III (não favorável) incluiu *Aegle marmelos*, *Atalantia buxifolia* e *Citrus* ('*Microcitrus*') sp. (Aurantioideae) e *Helietta apiculata* (Amyridoideae). O grupo IV (não hospedeiro) incluiu *Glycosmis pentaphylla* (Clauseneae), *Balfourodendron riedelianum*, *Casimiroa edulis*, *Esenbeckia febrifuga*, *Esenbeckia leiocarpa*, *Metrodorea stipularis*, *Zanthoxylum rhoifolium* (Amyridoideae) e *Dictyoloma vandellianum* (Cneoroideae). Os insetos sobreviveram por mais tempo em folhas jovens recém-diferenciadas do que em folhas totalmente expandidas. No segundo, confirmou-se a suscetibilidade de laranjeira 'Valência' em multiplicar CLas. Quando a inoculação foi por enxertia *C. trifoliata* 'Pomeroy' tornou-se mais suscetível à multiplicação da bactéria e a ausência de sintomas não significa que a planta não esteja infectada por CLas. *B. koenigii* não multiplica CLas e *M. paniculata* não favorece a multiplicação de CLas tanto quanto os citros. *G. pentaphylla* não é uma espécie favorável a multiplicação de CLas. *Z. rhoifolium*, *E. febrifuga*, *E. leiocarpa*, *M. stipularis*, *B. riedelianum* e *D. vandellianum* ocorrem quase que exclusivamente em matas brasileiras próximas a áreas de produção comercial de citros e não apresentam risco para aumento da incidência de HLB. Por fim, acredita-se que as principais fontes de inóculo de CLas e *D. citri* são principalmente pomares de citros abandonados, mal manejados ou ainda plantas de citros existentes em fundos de quintais e chácaras sem manejo. *M. paniculata* é importante hospedeiro do vetor e portanto quando próximas de citros o problema seria o grande número de psílídeos se movimentando entre as plantas de *M. paniculata* e citros, infectados e saudáveis.

Palavras-chave: Citros, greening, huanglongbing, psílídeo

RUTACEOUS AS POTENTIAL HOSTS OF *Diaphorina citri* AND RESERVOIRS OF *Candidatus Liberibacter asiaticus*

ABSTRACT - Huanglongbing (HLB) is the most devastating disease of citrus. It is associated with phloem bacteria efficiently disseminated by the psyllid *Diaphorina citri*, a highly prolific insect with a wide range of hosts among the rutaceous. Several species of this family occur in forests where the insect could be reproducing and reinfesting orchards besides serving as a source of multiplication of *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), hindering the control of HLB. In this sense, two investigations were carried out, the first one to evaluate the survival of *D. citri* on newly differentiated and fully-expanded soft leaves and the shoots reproduction of *D. citri* in 20 species of rutaceous. And the second to evaluate the reaction of these species after inoculation of the pathogen by grafting of infected tissues and use of infective adults of *D. citri*. In the first, this allowed suitability of the plants as hosts of the psyllid to be separated into 4 groups of plants. Group I (highly suitable to the insect) species included *Citrus ×aurantium* 'Valencia', *Citrus limonia*, and *Murraya paniculata* (syn. *Murraya exotica* L.) (Aurantioideae: Aurantieae), and *Bergera koenigii* (Aurantioideae: Clauseneae). Group II (intermediate to low suitability) species included *Citrus* (*Poncirus*) *trifoliata* 'Pomeroy', *Citrus wintersii*, and *Swinglea glutinosa* (Aurantieae), and *Clausena lansium* (Clauseneae). Group III (not suitable) included *Aegle marmelos*, *Atalantia buxifolia*, and *Citrus* ('*Microcitrus*') sp. (Aurantieae), and *Helietta apiculata* (Amyridoideae). Group IV (non-hosts) included *Glycosmis pentaphylla* (Clauseneae), *Balfourodendron riedelianum*, *Casimiroa edulis*, *Esenbeckia febrifuga*, *Esenbeckia leiocarpa*, *Metrodorea stipularis*, *Zanthoxylum rhoifolium* (Amyridoideae) and *Dictyoloma vandellianum* (Cneoroideae). The insects survived longer on newly differentiated than fully-expanded soft leaves. In the second, the susceptibility of 'Valencia' orange tree in multiplying CLas was confirmed. When the inoculation was by grafting *C. trifoliata* 'Pomeroy' becomes more susceptible to multiplication of the bacteria and the absence of symptoms does not mean that the plant is not infected by CLas. *B. koenigii* does not multiply CLas and *M. paniculata* does not multiply CLas as much as citrus. *G. pentaphylla* is not a good species to CLas multiplication. *Z. rhoifolium*, *E. febrifuga*, *E. leiocarpa*, *M. stipularis*, *B. riedelianum* and *D. vandellianum* occur almost exclusively in Brazilian forests near of citrus commercial production areas and do not represent a risk for HLB incidence increasing. Finally, it is believed that the main inoculum sources of CLas and *D. citri* are mainly abandoned citrus orchards, poorly managed or even citrus plants existing in backyards and unmanaged small farms. *M. paniculata* is an important host of the vector and therefore when close to citrus the problem would be the large number of psyllids moving between *M. paniculata* and citrus infected and healthy orchards.

Keywords: Citrus, greening, huanglongbing, Asian citrus psyllid

CAPÍTULO 1 - Considerações gerais

1 Introdução

As principais regiões produtoras de citros do mundo têm enfrentado a pior doença das plantas cítricas dos últimos tempos. Huanglongbing (HLB) ou greening tem causado inúmeras perdas de produtividade além de afetar a qualidade dos frutos colhidos. Essa doença está associada a três bactérias - *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), *Ca. L. americanus* (CLam) e *Ca. L. africanus* (CLaf). Todas são transmitidas por psílideos. CLas e CLam por *Diaphorina citri* e CLaf por *Trioza erytrae*. No Brasil estão presentes CLas e CLam, mas CLas é a mais importante por estar em maior concentração (título bacteriano) nas plantas. CLam não tolera altas temperaturas o que favoreceu sua menor incidência ao longo dos anos.

Sintomas de greening podem ser observados em folhas, frutos e ramos e raízes. As folhas tornam-se mosqueadas e os frutos ficam menores, deformados e caem prematuramente. Os ramos amarelecem e com o avanço da doença tornam-se improdutivos. As raízes perdem massa comprometendo a absorção de água e minerais exacerbando o impacto de estresses abióticos.

Relatada há mais de cem anos na China, a bactéria se disseminou pelo mundo atingindo nos últimos anos as principais regiões produtoras. O vetor é prolífico, altamente eficiente em transmitir CLas e se movimenta facilmente dentro e entre pomares. Isso tem levado os produtores a realizar sucessivas e frequentes aplicações de inseticidas, além de eliminar fontes de inóculo visando retardar o progresso da doença. A eliminação de plantas doentes tem provocado queda na produção e, devido às aplicações de inseticidas, há aumento dos custos de produção, o que pode inviabilizar economicamente a continuidade da atividade citrícola em algumas regiões. Muitas espécies pertencentes à família Rutaceae, à qual pertence o gênero *Citrus*, podem estar hospedando as Liberibacters e seus vetores. Por ocorrerem espontaneamente em florestas próximas a pomares comerciais de citros, podem estar atuando como reservatórios do patógeno e vetor e contribuindo para a disseminação da doença. Na literatura, a falsa-murta (*Murraya paniculata*) e “curry leaf” (*Berberis koenigii*) já são descritas como hospedeiras preferidas de *D. citri*. Porém, diversas outras espécies existem sobre as quais pouco se sabe do seu papel na disseminação

do HLB, o que nos estimulou a conduzir o presente trabalho, o qual está estruturado em quatro capítulos. No primeiro é apresentada revisão de literatura e no segundo e terceiro, respectivamente, dados sobre reprodução de *D. citri* e transmissão e multiplicação da bactéria em 20 espécies de plantas estudadas. E, por fim, no quarto capítulo, as considerações finais.

2 Revisão de literatura

2.1 Huanglongbing (HLB)

2.1.1 Cenário atual das principais citriculturas

O Brasil superou os Estados Unidos e se tornou o maior produtor de suco de laranja do mundo já na década de 1980 (Neves et al., 2010; Neves e Trombin, 2017). Esse posto é mantido até hoje, com a safra 2018/2019 no cinturão citrícola de SP e Triângulo/Sudoeste Mineiro estimada em 288,29 milhões de caixas de 40,8 kg contra 45 milhões de caixas no estado da Flórida, Estados Unidos. Há que se considerar que no cinturão citrícola, a safra 2018/2019 deverá ser 28% menor que a safra anterior (398,35 milhões de caixa) e 11% menor que a média dos últimos 10 anos. Isto se deve à queda em 17% de frutos causada por condições climáticas adversas e pelo incremento da severidade do HLB que ocorreu nos últimos anos, acentuando a queda dos frutos (Fundecitrus, 2018b; USDA, 2018). Na Flórida, a diminuição da produção se deve à maior incidência de HLB nos pomares aliada à passagem do furacão Irma em setembro de 2017 (Singerman, 2018).

Na citricultura paulista, 9443 citricultores cultivam um total aproximado de 191 milhões de laranjeiras, 12 milhões abaixo do total estimado no segundo semestre de 2014, com cerca de 2 milhões de plantas eliminadas por estarem afetadas por HLB (CDA, 2015; 2018). A área plantada em todo o cinturão citrícola é de mais de 465 mil ha, distribuídos em 9845 propriedades, das quais 89% produzem laranja, 8% limas-ácidas e limões e 3% tangerinas. Desde 2015, houve diminuição de quase 17 mil ha (Fundecitrus, 2018b).

As principais causas da redução da área plantada com citros são atribuídas ao baixo retorno econômico como consequência de altos custos de produção que, por sua vez, se devem aos altos custos envolvidos no manejo de doenças, sendo o HLB a mais impactante. Muitos citricultores se deslocaram para outras culturas de menor risco como a cana-de-açúcar (Lorenzi et al., 2014). Na Flórida, o custo atual do manejo de doenças é 40% maior que na era pré HLB. A menor produtividade das plantas e o aumento do custo de produção elevaram o custo total da caixa em aproximadamente 300%. Portanto, o principal desafio dos produtores americanos é aumentar a produtividade para obter lucro (Singerman, 2018).

A incidência da doença nas laranjeiras comerciais de São Paulo e Minas Gerais em 2017 (16,73%) foi 159% maior que a de 2012, mas similar a de 2015 (17,89%) e 2016 (16,92%), afetando em 2017, 32 milhões de árvores (Fundecitrus, 2017). Desde que a doença foi detectada no Brasil, a maior incidência foi detectada em 2018 (18,15%), sendo 8,5% maior que em 2017 (Fundecitrus, 2018c). Na Flórida, a incidência chega a 90% das plantas do estado que é responsável por 49% da produção de citros dos Estados Unidos, seguida pela Califórnia (47%), Texas (3%) e Arizona (1%) (Singerman, 2018).

Somente com a adoção da estratégia de controle rigoroso e regional pode haver redução da incidência do HLB. Manejo intensivo dos pomares, do ponto de vista fitotécnico e fitossanitário, que resulte em produtividades elevadas e estáveis que cubram os elevados custos de produção atuais, por meio de gestão eficiente das fazendas - esta é a fórmula da sobrevivência da citricultura na presença do HLB. E neste cenário, a citricultura paulista é a única do mundo com produção em larga escala que tem conseguido se manter competitiva no cenário mundial e gerando empregos (Cappello et al., 2018; Fundecitrus, 2018a). A continuidade desta situação vai depender da continuidade e aprimoramento das ações que vêm sendo tomadas.

2.1.2 Importância do HLB

O HLB afeta todas as espécies comerciais de citros sendo considerada a mais grave e destrutiva doença desta cultura (da Graça, 1991; Bové, 2006). A pirâmide da doença é composta de Liberibacters, psílídeos vetores, hospedeiros e o ambiente

(Wang et al., 2017). Liberibacters são bactérias Gram-negativas restritas ao floema e pertencentes à subdivisão α -proteobactérias (Jagoueix et al., 1994). *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) e *Ca. L. americanus* (CLam) são transmitidas por *Diaphorina citri* e *Ca. L. africanus* (CLaf) por *Trioza erytrae* (Capoor et al., 1967; Yamamoto et al., 2006; McClean e Oberholzer, 1965). As bactérias associadas ao HLB não são cultiváveis em meio de cultura. Portanto, sua identificação e classificação taxonômica se baseia na sequência de nucleotídeos da região 16S do DNA ribossomal (Jagoueix et al., 1994).

HLB causa declínio das plantas, redução da produtividade e consequentemente prejuízos econômicos aos citricultores (Bassanezi et al., 2011). Primeiramente são visualizados nos pomares plantas com ramos amarelados, folhas com presença ou não de nervuras salientes e com mosqueado (gradiente de cores que abrange do verde escuro até amarelo, de padrões diferentes nas duas metades da folha) (Bové, 2006; da Graça et al., 2016). Há também diminuição do sistema radicular, efeito que pode ser percebido até mesmo antes de ser observado sintomas na copa (Johnson et al., 2014). Os frutos ficam deformados, menores, assimétricos, podem ter suas sementes menores e abortadas e caem prematuramente. Além de comprometer a qualidade dos frutos, há também alteração no sabor do suco (Gottwald et al., 2007; Bassanezi et al., 2009). À medida em que os sintomas progridem, os ramos secam associados a um retardo no desenvolvimento da planta podendo levar à morte (Bové, 2006).

Sintomas de HLB foram observados pela primeira vez no Brasil em março de 2004, em pomares de laranja doce próximos à cidade de Araraquara, no estado de São Paulo (Teixeira et al., 2005a). Foram encontradas a bactéria CLas (Colleta Filho et al., 2004) e uma nova espécie depois denominada de CLam (Teixeira et al., 2005b). Posteriormente demonstrou-se que CLam é menos tolerante à altas temperaturas e se multiplica menos em plantas cítricas, o que ajuda a explicar redução na sua frequência de ocorrência em plantas doentes, de 98% em 2004 para menos de 0,5% em 2015, paralelo a um aumento da frequência de CLas de 2% em 2004 para mais de 99,5% em 2015 (Lopes et al., 2009a; Lopes et al., 2009b; Lopes et al., 2017; Fundecitrus, 2015; Gasparoto et al., 2012).

A transmissão de CLas e CLam é feita por meio de insetos, o psílídeo *D. citri* (Capoor et al., 1967), ou, em condições experimentais, por meio de enxertia de material infectado (Lin, 1963; Lopes et al., 2009a). CLas atinge maiores concentrações nos tecidos das plantas infectadas (Lopes et al., 2009b) e, muito provavelmente, esta seja a principal causa de ser mais eficientemente transmitida tanto pelo psílídeo quanto por enxertia do que CLam (Lopes et al., 2017). CLas é a única presente nos demais países das América do Sul, Central e Norte.

Nos Estados Unidos a doença foi detectada inicialmente na Flórida, em agosto de 2005 (Halbert, 2005), posteriormente no Texas (Kunta et al., 2012), Califórnia (Kumagai et al., 2013), e em vários países do Caribe (Luis et al., 2009). HLB tem se disseminado por toda a Flórida hoje afetando a maioria das plantas em cultivo, comprometendo produção e renda (Singerman, 2018). O HLB continua sendo uma ameaça aos demais estados produtores do Brasil (foi reportada até agora somente em São Paulo, Minas Gerais e Paraná) como Bahia, Sergipe, Rio Grande do Sul, Pará, Goiás, Alagoas, Santa Catarina, Rio de Janeiro, entre outros. Nos Estados Unidos, o HLB está em quarentena em alguns locais do estado da Califórnia (CPDPP, 2018), onde continua a se disseminar na região sul daquele estado, porém, até o momento somente em áreas urbanas (Fitchette, 2018; Milosavljević et al., 2017).

2.1.3 Inseto vetor

O psílídeo *D. citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) é um inseto pequeno, sugador de seiva do floema com o primeiro relato de sua ocorrência no Brasil na década de 40 (Costa Lima, 1942). Na Flórida sua presença foi relatada somente em 1998 (Halbert, 1998). Em outras áreas nas Américas como Honduras, México e Costa Rica e em outros estados dos Estados Unidos como Califórnia e Mississipi, os relatos são mais recentes (Halbert et al., 2010). O adulto tem de 2,7 a 3,3 mm de comprimento e possuem asas transparentes com listas marrom. Caracterizam-se por se manterem em posição inclinada em ângulo de 45° na superfície de brotos, folhas e ramos (Hall et al., 2013).

De coloração amarela, os ovos são depositados em brotos novos e as ninfas desenvolvem-se de forma sincronizada com o crescimento dos ramos. Estas passam

por cinco ínstaes com maior mobilidade nos ínstaes finais próximos ao estágio adulto (Tsai e Liu, 2000; Hall et al., 2013). Os adultos por sua vez se movimentam saltando entre ramos e plantas (Gallo et al., 2002), ou alçam voos de curtas e longas distâncias (Hall et al., 2013). O período de desenvolvimento do inseto de ovo a adulto varia de acordo com a temperatura (Liu e Tsai, 2000). A disponibilidade de ramos novos é o fator determinante para ocorrência e incremento populacional de *D. citri* (Parra et al., 2010; Cifuentes-Arenas et al., 2018).

No Brasil, *D. citri* tornou-se importante alvo de controle a partir de 2004 por transmitir as bactérias do HLB (Colleta Filho et al., 2004; Teixeira et al., 2005a, 2005b). O tempo que leva da infecção ao surgimento dos sintomas em folhas pode variar de 3 a 8 meses em condições experimentais (Lopes e Frare, 2008; Lopes et al., 2009a; Hung et al., 2004). No campo isto ainda não foi claramente definido. Após a infecção, CLas movimenta-se para as regiões de crescimento da planta como extremidades de ramos e raízes (Raiol Júnior, 2017) e durante a colonização ocorre a obstrução dos vasos do floema (Kim et al., 2009; Wang e Trivedi, 2013; Wang et al., 2017) impedindo o transporte dos produtos da fotossíntese das folhas maduras para áreas de crescimento e armazenamento (Taiz e Zeiger, 2013), incluindo as raízes.

2.2 Rutáceas

2.2.1 A família do *Citrus*

A família Rutaceae é ampla englobando mais de 150 gêneros e 2000 espécies (Swingle e Reece, 1967; Bayer et al., 2009; Kubitziki et al., 2011; Morton e Telmer, 2014). Essa família é conhecida por conter o gênero *Citrus* que abriga diversas espécies com frutos comercialmente importantes e amplamente consumidos mundialmente (Grosso et al., 2008). Mais ou menos cosmopolita, as espécies dessa família estão amplamente distribuída nos trópicos e regiões temperadas do Hemisfério Sul, especialmente na Austrália e África do Sul. Aproximadamente 25% das espécies ocorrem no Hemisfério Ocidental (Morton e Telmer, 2014).

De acordo com Engler (1931), as espécies estão classificadas em sete subfamílias (Aurantioideae, Dictyolomatoideae, Flindersioideae, Rhabdendroideae,

Rutoideae, Spathelioideae e Toddalioideae), classificação baseada principalmente em características morfológicas. O gênero *Citrus* pertence a subfamília Aurantioideae, tribo Citreae e subtribo Citrinae. Nessa mesma subtribo encontram-se gêneros próximos de *Citrus* como *Fortunella*, *Eremocitrus*, *Poncirus*, *Clymenia* e *Microcitrus* (Swingle e Reece, 1967).

No Brasil, em regiões citrícolas de São Paulo, Minas Gerais e Paraná encontram-se espécies dos gêneros *Balfourondendron*, *Esenbeckia*, *Galipea*, *Helietta*, *Hortia*, *Metrodorea*, *Neoraputia*, *Zanthoxylum* (Amyridoideae) e *Dictyoloma* (Cneoroideae) (Lorenzi 2008; 2009), de forma isolada e em matas nativas, muitas vezes próximas de pomares de citros. Conhecer o potencial dessas espécies em reproduzir ou simplesmente servir de fonte de alimento de *D. citri*, ou ainda em multiplicar Liberibacters é importante para o controle do HLB nos pomares.

2.2.2 Potenciais hospedeiras de *Candidatus Liberibacter asiaticus* e *Diaphorina citri*

Espécies próximas e distantes de citros podem hospedar *D. citri* e algumas as bactérias associadas ao HLB. Em uma extensa revisão, Halbert e Manjunath (2004) listaram 23 gêneros hospedeiros de *D. citri* e 20 gêneros hospedeiros de *Candidatus Liberibacter* spp.. Todos esses gêneros de hospedeiros estão dentro da família Rutaceae e alguns gêneros mais próximos de citros dentro da subfamília Aurantioideae. Entretanto, podem existir plantas hospedeiras fora da família Rutaceae como é o caso de *Ficus carica* L. (Moraceae), hospedeira de *D. citri* (Thomas e De León, 2011).

Bergera koenigii L. ("curry leaf") e *Murraya paniculata* (L.) (falsa-murta) estão entre os hospedeiros preferidos para alimentação e reprodução de *D. citri* (Halbert e Manjunath, 2004; Subandiyah et al., 2008; Sétamou et al., 2016). Em um estudo recentemente realizado no Texas, o inseto ovipositou em dez das onze espécies de rutáceas estudadas, mas o ciclo de vida foi concluído em apenas cinco hospedeiros: *B. koenigii*, *Choisya arizonica*, *Choisya ternata*, *Helietta parvifolia* e *M. paniculata*. O maior número de adultos por planta foi obtido em *B. koenigii* (561) e *M. paniculata* (231) (Sétamou et al., 2016).

Comercializada em centros varejistas de flores, viveiros de mudas nativas e ornamentais, no Brasil, *M. paniculata* não favorece a multiplicação de Liberibacters tanto quanto os citros (Lopes et al., 2010). Por apresentar títulos bacterianos baixos podem até se tornar indetectáveis com o tempo, sendo considerada, portanto não hospedeira de CLas (Walter et al., 2012). O problema de *M. paniculata* próxima de pomares comerciais de citros seria o grande número de psílídeos se movimentando entre as plantas de *M. paniculata* e citros infectados e plantas cítricas saudáveis. Por isso, sua importância na epidemia de HLB não deve ser subestimada uma vez que é bom hospedeiro de *D. citri*. (Lopes et al., 2010; Damsteegt et al., 2010).

Diferentemente de *M. paniculata*, *Swinglea glutinosa* “Tabog” é muito utilizada como cerca viva na Colômbia onde o HLB foi detectado em 2015, quarto país da América do Sul a detectar a doença (Fundecitrus, 2016). Em estudo recente mostrou-se que *S. glutinosa* tem potencial em multiplicar CLas. Apresenta menor título bacteriano quando comparado com laranjeira ‘Valência’ e maior quando comparado com *M. paniculata*. Além disso, *D. citri* pode reproduzir-se e adquirir CLas em *S. glutinosa* e infectar plantas de citros sadias (Cifuentes-Arenas, 2017).

Das várias espécies nativas encontradas no Brasil, existem informações quanto à sobrevivência de *D. citri* apenas em *Helietta apiculata* e *Zanthoxylum fagara*, duas representantes da subfamília Rutoideae. A oviposição e sobrevivência de adultos foram menores em *H. apiculata* que em *Murraya paniculata* (Pimpinato et al., 2017). Entretanto, o papel dessa rutácea nativa do Brasil na dinâmica populacional do inseto e na incidência de CLas é desconhecida. *D. citri* não sobreviveu e nem se reproduziu em *Z. fagara* (Halbert e Manjunath, 2004; Sétamou et al., 2016).

Em uma região endêmica de HLB, sob condições naturais de inoculação da doença, Ramadugu et al. (2016) encontraram duas espécies imunes, seis resistentes e quatorze tolerantes a doença. *Clausena excavata* e *Glycosmis pentaphylla* foram consideradas espécies imunes porque em um período de seis anos não foi detectado a presença de CLas. Para os gêneros *Eremocitrus* e *Microcitrus* observaram certa resistência/tolerância a doença. Tais gêneros merecem atenção pois são sexualmente compatíveis com citros e podem ser usados em um programa de melhoramento genético em busca de um citros cultivado resistente ao HLB.

Citrus trifoliata é espécie alvo de melhoristas uma vez que é usada comercialmente como porta-enxerto. *C. trifoliata* possui baixa incidência de infecção por CLas e quando infectada apresenta baixo título bacteriano. Geralmente os sintomas de HLB são menos pronunciados nessa espécie (Albrecht e Bowan, 2012; Folimonova et al., 2009). Ainda, *C. trifoliata* parece ter certa resistência do tipo antixenose a *D. citri*, o que pode ser considerado uma espécie disponível para programas de melhoramento genético que visam desenvolver cultivares resistentes ao vetor para controlar o HLB (Borgoni et al., 2014; McCollum et al., 2016; George e Lapointe, 2018).

2.3 Manejo da doença

Nos países onde ocorre o HLB, o seu manejo é o maior desafio enfrentado atualmente. Seu alto poder destrutivo pode colocar em risco a produção economicamente viável e sustentável de citros no mundo. Todas as espécies de citros e variedades comerciais são suscetíveis e ainda não há cura para a doença. A capacidade de dispersão do inseto vetor *D. citri* é alta entre talhões e entre propriedades o que requer controle rigoroso e coordenado por meio de adoção de medidas contra o inseto vetor associadas a eliminação de fontes de inóculo (Fundecitrus, 2017).

As epidemias de HLB podem ser estabelecidas em propriedades citrícolas por meio do plantio de mudas infectadas ou imigração de adultos de *D. citri* portando CLas. Quando os insetos chegam nas propriedades se concentram nas bordas, em faixa que pode chegar a 200 metros. Ao infectar as plantas presentes criam o que se chama de “efeito de borda”, ou seja, maior concentração de plantas doentes na borda em relação ao interior da propriedade. Este efeito tornam as pequenas propriedades mais vulneráveis à doença do que as maiores. É por isso que o manejo bem sucedido do HLB só se consegue com adoção de medidas preventivas aplicadas de forma regional e coordenada entre produtores (Fundecitrus, 2017; 2018a). Consistem no plantio de mudas saudáveis e certificadas, eliminação de plantas com sintomas de HLB e aplicações regulares de inseticidas. Tais medidas devem ser tomadas dentro e fora das propriedades. Em áreas externas (pomares abandonados, chácaras, áreas

urbanas), onde não se permitem que sejam feitas aplicações de inseticidas, deve-se fazer a liberação do inimigo natural do psíldeo, o parasitoide *Tamarixia radiata*, (Milosavljević et al., 2017; Fundecitrus, 2018a). Resultados promissores contra *D. citri* tem sido conseguido com o uso do fungo *Isaria fumosorosea* (Avery et al., 2011).

3 Referências

Adami ACO (2017) Fórum: Viabilidade de reforma do pomar citrícola. **Hortifruti Brasil** 167:38–39.

Avery PB, Wekesa VW, Hunter WB, Hall DG, McKenzie CL, Osborne LS, Powell CA, Rogers ME (2011) Effects of the fungus *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: Cordycipitaceae) on reduced feeding and mortality of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). **Biocontrol Science and Technology** 21:1065–1078.

Albrecht U, Bowman KD (2012) Tolerance of trifoliate citrus rootstock hybrids to ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’. **Scientia Horticulturae** 147:71–80

Bassanezi RB, Montesino LH, Gasparoto MCG, Bergamim Filho A, Amorim L (2011) Yield loss caused by huanglongbing in diferente sweet Orange cultivars in São Paulo, Brazil. **European Journal of Plant Pathology** 130: 577–586.

Bassanezi RB, Montesino LH, Stuchi ES (2009) Effects of huanglongbing on fruit quality of sweet orange cultivars in Brazil. **European Journal of Plant Pathology** 125: 565–572.

Bassanezi RB, Lopes SA, Belasque Júnior J, Spósito MB, Yamamoto, PT, Miranda MP, Teixeira DC, Wulff NA (2010) Epidemiologia do huanglongbing e suas implicações para o manejo da doença. **Citrus Research & Technology** 31:11–23.

Bayer RJ, Mabberley DJ, Morton C, Miller CH, Sharma IK, Pfeil BE, Rich S, Hitchcock R, Sykes S (2009) A molecular phylogeny of the orange subfamily (Rutaceae: Aurantioideae) using nine cpDNA sequences. **American Journal of Botany** 96:668–685.

Borgoni PC, Vendramim JD, Lourenção AL, Machado MA (2014) Resistance of Citrus and related genera to *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae). **Neotropical Entomology** 43:465–469.

Botteon M, Cappello, FP, Ribeiro RG, Palmieri FG, Ribeiro C (2017) Citricultura retoma investimentos em 2017. **Hortifruti Brasil** 167:10–19.

Bové JM (2006) Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old, disease of citrus. **Journal of Plant Pathology** 88:7–37.

Capoor SP, Rao DG, Viswanath SM (1967) *Diaphorina citri*: a vector of the greening disease of citrus in India. **Indian Journal of Agricultural Science** 37:572–576.

Cappello FP, Botteon M, Ribeiro RG (2018) HLB (greening) muda de vez a gestão dos pomares citrícolas. **Hortifruti Brasil** 178:10–17.

CDA, Coordenadoria de Defesa Agropecuária do Estado de São Paulo. **Dados da Citricultura Paulista**. Disponível em: <<http://www.cda.sp.gov.br/www/gdsv/index.php?action=dadosCitriculturaPaulista>>. Acesso em: 30 ago. 2015.

CDA, Coordenadoria de Defesa Agropecuária do Estado de São Paulo. **Dados da Citricultura Paulista**. Disponível em: <<http://www.cda.sp.gov.br/www/gdsv/index.php?action=dadosCitriculturaPaulista>>. Acesso em: 26 jun. 2018.

Cifuentes-Arenas JC (2017) **Huanglongbing e *Diaphorina citri*: estudos das relações patógeno-vetor-hospedeiro**. 133 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Unesp, Jaboticabal.

Cifuentes-Arenas JC, de Goes A, de Miranda MP, Beattie GAC, Lopes SA (2018) Citrus flush shoot ontogeny modulates biotic potential of *Diaphorina citri*. **PLoS ONE** 13:1–17.

Colleta Filho HD, Targon MLPN, Takita MA, de Negri JD, Pompeu Júnior J, Machado MA, Amaral AM, Muller GW (2004) First report of the causal agent of Huanglongbing (“*Candidatus Liberibacter asiaticus*”) in Brazil. **Plant Disease** 88:1382–1382.

Costa Lima AM (1942) **Insetos do Brasil: Homoptera**. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Agronomia. Série didática, 101p.

CPDPP, Citrus Pest & Disease Prevention Program. **A threat to California citrus**. Disponível em: <<http://californiacitrusthreat.org>>. Acesso em: 1 ago. 2018.

da Graça JV (1991) Citrus greening disease. **Annual Review of Phytopathology** 29:109–136.

da Graça JV, Douhan GW, Halbert SE, Keremane ML, Lee RF, Vidalakis G, Zhao H (2016) Huanglongbing: An overview of a complex pathosystem revaging the world's citrus. **Journal of Integrative Plant Biology** 58:373–387.

Damsteegt VD, Postnikova EN, Stone AL, Kuhlmann M, Wilson C, Sechler A, Schaad NW, Bransky RH, Schneider WL (2010). *Murraya paniculata* and related species as potential hosts and inoculum reservoirs of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*', causal agent of Huanglongbing. **Plant Disease** 94:528–533.

Engler A (1931) Rutaceae. In: Engler HCA, Prantl K. (Eds.). **Die natürlichen Pflanzenfamilien**. Leipzig: Wilhelm Engelmann, p. 187–359.

Fitchette T (2018) Huanglongbing continues to spread across southern California. Disponível em: <<https://www.westernfarmpress.com/crop-disease/huanglongbing-continues-spread-across-southern-california>>. Acesso em: 1 ago. 2018.

Folimonova SY, Robertson CJ, Garnsey SM, Gowda S, Dawson WO (2009) Examination of the responses of different genotypes of citrus to huanglongbing (citrus greening) under different conditions. **Phytopathology** 99:1346–1354.

FUNDECITRUS, Fundo de Defesa da Citricultura (2015) CVC e HLB: Levantamento mostra situação oposta para as duas doenças. **Revista Citricultor** 31:8–11.

FUNDECITRUS, Fundo de Defesa da Citricultura (2016) Plantas com sintomas de HLB são identificadas na Colômbia. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/noticias/integra/plantas-com-sintomas-de-hlb-sao-identificadasna-colombia/390>>. Acesso em: 24 ago. 2018.

FUNDECITRUS, Fundo de Defesa da Citricultura (2017) Greening afeta 32 milhões de árvores em SP e MG. **Revista Citricultor** 43:26–29.

FUNDECITRUS, Fundo de Defesa da Citricultura (2018a) Produtividade triplica em 30 anos. **Revista Citricultor** 44:7–20.

FUNDECITRUS, Fundo de Defesa da Citricultura (2018b) 288,29 milhões de caixas. **Revista Citricultor** 45:12–16.

FUNDECITRUS, Fundo de Defesa da Citricultura (2018c) Greening atinge 18,15% das laranjeiras de SP e MG. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/noticias/integra/greening-atinge-1815-das-laranjeiras-de-sp-e-mg-maiorincidenciades-de-que-a-doenca-foi-identificada-no-brasil-em-2004/719>>. Acesso em: 23 ago. 2018.

Gasparoto MCG, Coletta-Filho HD, Bassanezi RB, Lopes SA, Lourenço AS, Amorim L (2012) Influence of temperature on infection and establishment of '*Candidatus Liberibacter americanus*' and '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' in citrus plants. **Plant Pathology** 61:658–664.

George J, Lapointe SL (2018) Host plant resistance associated with Poncirus trifoliata influence oviposition, development and adult emergence of Diaphorina citri (Hemiptera: Liviidae). Pest Management Science (wileyonlinelibrary.com) DOI: 10.1002/ps.5113.

Gottwald TR, da Graça JV, Bassanezi RB (2007) Citrus Huanglongbing: The pathogen and its impact. **Plant Health Progress**. Disponível em: <<http://www.apsnet.org/online/feature/huanglongbing/>>. Acesso em: 20 jun. 2018.

Groppo M, Pirani JR, Salatino MLF, Blanco SR, Kallunki JA (2008) Phylogeny of rutaceae based on two moncoding regions from cpDNA. **American Journal of Botany**, 95:985–1005.

Halbert SE (1998) Entomology section: Citrus. **Tri-ology** 37:6–7.

Halbert SE (2005) The discovery of huanglongbing in Florida. In: 2nd International Citrus Canker and Huanglongbing Research Workshop. **Resumo...** Orlando, p. 50.

Halbert SE, Manjunath KL (2004) Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and Greening Disease of Citrus: A literature review and assessment of risk in Florida. **Florida Entomologist** 87:330–353.

Halbert SE, Manjunath KL, Ramadugu C, Brodie MW, Webb SE, Lee R (2010) Trailers transporting oranges to processing plants move Asian citrus psyllids. **Florida Entomologist** 93:33–38.

Hall DG, Richardson ML, Ammar ED, Halbert SE (2013) Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, vector of citrus huanglongbing disease. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 146:207–223.

Huang CH, Tsai MY, Wang CL (1984) Transmission of citrus likubin by a psyllid, *Diaphorina citri*. **Journal of Agricultural Research**, 33:65–72.

Hung TH, Hung SC, Chen CN, Hsu MH, Su HJ (2004) Detection by PCR of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the bacterium causing citrus huanglongbing in vector psyllids: application to the study of vector-pathogen relationships. **Plant Pathology** 53:96–102.

Jagoueix S, Bové JM, Garnier M (1994) The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the α subdivision of the Proteobacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology** 44:379–386.

Johnson EG, Wu J, Bright DB, Graham JH (2014) Association of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' root infection, but not phloem plugging with root loss on huanglongbing-affected trees prior to appearance of foliar symptoms. **Plant Pathology** 63:290–298.

Kim JS, Sagaram US, Burns JK, Li JL, Wang N (2009) Response of sweet orange (*Citrus sinensis*) to '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' infection: microscopy and microarray analyses. **Phytopathology** 99:50–57.

Kubitzki K, Kallunki JA, Duretto M, Wilson PG (2011) Rutaceae. In: Kubitzki K, (Eds.) **The Families and Genera of Vascular Plants: Flowering Plants. Eudicots**. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, p. 276–356.

Kumagai LB, LeVesque CS, Blomquist CL, Madishetty K, Guo Y, Woods PW, Rooney-Latham S, Rascoe J, Gallindo T, Schnabel D, Polek M (2013). First report of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' associated with citrus huanglongbing in California. **Plant Disease** 97:283.

Kunta M, Setamou M, Skaria M, Rascoe J, Li W, Nakhla M, da Graça J (2012) First report of citrus huanglongbing in Texas. **Phytopathology** 102:66.

Lin CK (1963) Notes on citrus yellow shoot disease. **Acta Phytophylactica Sinica** 2:243–251.

Liu YH, Tsai JH (2000) Effects of temperature on biology and life table parameters of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae). **Annals of Applied Biology** 137:201–206.

Lopes SA, Bertolini G, Frare GF, Martins EC, Wulff NA, Teixeira DC (2009a) Graft transmission efficiencies and multiplication of '*Candidatus* Liberibacter americanus' and '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' in citrus plants. **Phytopathology** 99:301–306.

Lopes SA, Frare GF (2008) Graft transmission and cultivar reaction of citrus to '*Candidatus* Liberibacter americanus'. **Plant Disease** 92:21–24.

Lopes SA, Frare GF, Bertolini E., Cambra M, Fernandes NG, Ayres AJ, Marin DR, Bové JM (2009b) Liberibacters associated with citrus Huanglongbing in Brazil: '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' is heat tolerant, '*Ca. L. americanus*' is heat Sensitive. **Plant Disease** 93:3.

Lopes SA, Frare GF, Camargo LEA, Wulff NA, Teixeira DC, Bassanezi RB, Beattie GAC, Ayres AJ (2010) Liberibacters associated with orange jasmine in Brazil: incidence in urban areas and relatedness to citrus liberibacters. **Plant Pathology** 59:1044–1053.

Lopes SA, Luiz, FQB, Oliveira HT, Cifuentes-Arenas JC, Raiol Junior LL (2017) Seasonal variation of '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' titers in new shoots of citrus in distinct environments. **Plant Disease** 101:583–590.

Lorenzi CO, Viana MM, Boteon M (2014) Aspectos econômicos da cadeia citrícola paulista. In: Andrade DJ, Ferreira MC, Martinelli NM (Eds.) **Aspectos da fitossanidade em citros**. Jaboticabal: Cultura Acadêmica, p. 11–29.

Lorenzi H (2008) **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 384p.

Lorenzi H (2009) **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 384p.

Luis M, Collazo C, Llauger R, Blanco E, Peña I, López D, González C, Casín JC, Batista L, Kitajima E, Tanaka FAO, Salaroli RB, Teixeira DC, Martins EC, Bove JM (2009) Occurrence of citrus huanglongbing in Cuba and association of the disease with '*Candidatus Liberibacter asiaticus*'. **Journal of Plant Pathology** 91:709–712.

McCollum G, Hilf M, Irey M, Luo W, Gottwald T (2016) Susceptibility of sixteen citrus genotypes to '*Candidatus Liberibacter asiaticus*'. **Plant Disease** 100:1080–1086.

McClean APD, Oberholzer PCJ (1965) Citrus Psylla, a vector of the greening disease of sweet orange. **South African Journal of Agricultural Science**, 8:297–298.

Milosavljević I, Schall K, Hoddle C, Morgan D, Hoddle M (2017) Biocontrol program targets Asian citrus psyllid in California's urban areas. **California Agriculture** 71:169–177.

Morton CM, Telmer C (2014) New subfamily classification for the Rutaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden** 99:620–641.

Neves MF, Trombin VG (2017) **Anuário da citricultura 2017**. São Paulo: CitrusBR, 60p.

Neves MF, Trombin VG, Milan P, Lopes FF, Cressoni F, Kalaki F (2010) **O retrato da citricultura brasileira**. São Paulo: Markestrat, 138p.

Parra JRP, Lopes JRS, Gómez Torres ML, Nava DE, Paiva PEB (2010) Bioecologia do vetor *Diaphorina citri* e transmissão das bactérias associadas ao Huanglongbing. **Citrus Research & Technology** 31:35–51.

Pimpinato HAS, Alves GR, Yamamoto PT (2017) Feeding and oviposition of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) on *Helietta apiculata* (Sapindales: Rutaceae): a potencial host? **Florida Entomologist** 100:476–477.

Raiol Júnior LL (2017) **Translocação de Candidatus Liberibacter asiaticus em citros**. 102 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Unesp, Jaboticabal.

Ramadugu C, Keremane ML, Halbert SE, Duan YP, Roose ML, Stover E, Lee RF (2016) Long-term field evaluation reveals huanglongbing resistance in *Citrus* relatives. **Plant Disease**, 100:1858–1869.

Sétamou M, Graça JV, Sandoval II JL (2016) Suitability of native North American Rutaceae to serve as host plants for the Asian citrus psyllid (Hemiptera: Liviidae), **Journal of Applied Entomology** 140:645–654.

Singerman A (2018) Fórum: Desafios da citricultura na Flórida. **Hortifruti Brasil** 178: 34.

Subandiyah S, Himawan A, Joko T, Astuti IP, Holford P, Beattie GAC, Krueger R (2008) Colonization of Asiatic citrus psyllid and huanglongbing development on citrus and citrus relatives in Indonesia. In: International Research Conference on HLB. **Resumo...** Orlando, p. 393.

Swingle WT, Reece PC (1967) The botany of citrus and its wild relatives. In: Reuther W, Webber HJ, Batchelor LD **The citrus industry**. Berkeley: University of California, p. 190–430.

Taiz L, Zeiger E (2013). Translocação no floema. In: **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: Artmed, p. 271–303.

Teixeira DC, Ayres J, Kitajima EW, Tanaka FAO, Danet L, Jagoueix–Eveillard S, Saillard C, Bové JM (2005a) First report of a Huanglongbing like disease of citrus in Sao Paulo State, Brazil and association of a new *Liberibacter* species, ‘*Candidatus Liberibacter americanus*’, with the disease. **Plant Disease** 89:107–107.

Teixeira DC, Saillard C, Eveillard S, Danet JL, da Costa PI, Ayres AJ, Bové JM (2005b) ‘*Candidatus Liberibacter americanus*’, associated with citrus huanglongbing (greening disease) in São Paulo State, Brazil. **International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology** 55:1857–1862.

Thomas DB, De León JH (2011) Is the old world fig, *Ficus carica* L. (Moraceae), an alternative host for the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Homoptera: Psyllidae)? **Florida Entomologist** 94:1081–1083.

Tsai JH, Liu YH (2000) Biology of *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) on four host plants. **Journal of Economic Entomology** 93:1721–1725.

USDA, United States Department of Agriculture. **Citrus: Maturity test results and fruit size**. Disponível em: <https://www.nass.usda.gov/Statistics_by_State/Florida/Publications/Citrus/Citrus_Forecast/index.php>. Acesso em: 28 jun. 2018.

Walter AJ, Duan Y, Hall DG (2012) Titters of 'Ca. Liberibacter asiaticus' in *Murraya paniculata* and *Murraya*-reared *Diaphorina citri* are much lower than in *Citrus* and *Citrus*-reared psyllids. **HortScience** 47:1449–1452.

Wang N, Stelinski LL, Pelz–Stelinski KS, Graham JH, Zhang Y (2017) Tale of the huanglongbing disease pyramid in the context of the citrus microbiome. **Phytopathology** 107:380–387.

Wang N, Trivedi P (2013) Citrus huanglongbing: a newly relevant disease presents unprecedented challenges. **Phytopathology** 103:652–665.

Yamamoto PT, Felipe MR, Garbim LF, Coelho JHC, Ximenes NL, Martins EC, Leite APR, Sousa MC, Abrahao DP, Braz JD (2006) *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera Psyllidae): vector of the bacterium *Candidatus Liberibacter americanus*. In: Huanglongbing-Greening International Workshop. **Resumo...** Ribeirão Preto, p. 96.

CAPÍTULO 2 - Unsuitability of indigenous South American Rutaceae as potential hosts of *Diaphorina citri*¹

Abstract

BACKGROUND: ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ is efficiently transmitted by the Asiatic citrus psyllid, *Diaphorina citri*, an insect with a wide range of hosts in Rutaceae family. *Citrus* relatives occur in Brazilian forests where they may serve as hosts for the psyllid and infest citrus orchards.

RESULTS: This allowed suitability of the plants as hosts of the psyllid to be separated into 4 groups. Group I (highly suitable to the insect) species included *Citrus ×aurantium* ‘Valencia’, *Citrus limonia*, and *Murraya paniculata* (syn. *Murraya exotica* L.) (Aurantioideae: Aurantieae), and *Bergera koenigii* (Aurantioideae: Clauseneae). Group II (intermediate to low suitability) species included *Citrus (Poncirus) trifoliata* ‘Pomeroy’, *Citrus wintersii*, and *Swinglea glutinosa* (Aurantieae), and *Clausena lansium* (Clauseneae). Group III (not suitable) included *Aegle marmelos*, *Atalantia buxifolia*, and *Citrus* (‘*Microcitrus*’) sp. (Aurantieae), and *Helietta apiculata* (Amyridoideae). Group IV (non-hosts) included *Glycosmis pentaphylla* (Clauseneae), *Balfourodendron riedelianum*, *Casimiroa edulis*, *Esenbeckia febrifuga*, *Esenbeckia leiocarpa*, *Metrodorea stipularis*, *Zanthoxylum rhoifolium* (Amyridoideae) and *Dictyoloma vandellianum* (Cneoroideae). As expected, insects survived longer on newly differentiated than fully expanded soft leaves. The psyllids did not develop, or survive for long intervals, on most Group IV species, all of which, with the exception of *Glycosmis pentaphylla*, occur naturally in Brazilian forests. These species may not serve as psyllid sources to infest commercial orchards. However, 40% of the adults were alive 30 days after confinement on the Group III species *H. apiculata*.

CONCLUSION: *Citrus* relatives occurring in forests near citrus orchards are not suitable to the *D. citri* and, therefore, are not contributing to huanglongbing spread.

Keywords: Aurantioideae; Asian citrus psyllid; citrus greening; citrus relatives; host plant; Huanglongbing.

¹Este capítulo corresponde ao artigo científico submetido e encontra-se em avaliação para publicação.

1 INTRODUCTION

Diaphorina citri Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) is a phloem feeding insect¹ that transmits ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ (CLas) and ‘*Ca. L. americanus*’ (CLam),^{2,3} Gram-negative alpha-proteobacteria limited to the phloem of citrus trees and some other rutaceous plants.^{4,5} The bacteria are associated with huanglongbing (HLB), the most devastating disease of citrus.⁵ CLas originated in South Asia. It now occurs widely in Asia and the Americas.^{6–15} It tolerates relative high temperature and reaches high titers in citrus.^{16,17} These conditions might have favored its spread and it is now present in all major citrus regions of São Paulo, Minas Gerais and Paraná States. CLam, of uncertain origin, was also detected in São Paulo State in 2004.⁸ It has low tolerance to high temperatures and multiplies poorly in citrus. It is very uncommon in commercial orchards.^{16–18}

HLB is incurable^{19–22} and rates of CLas acquisition are affected by the life stage of the feeding insect,²³ the time the insect remains feeding on the new shoots,²⁴ new shoot developmental stage,¹ and the titer of the bacterium in infected tissues on which the psyllid feeds, particularly shoots.^{24,25,18} The titer of CLas in new shoots and other tissues is, in turn, impacted by the environment, with temperature and rain intensity seeming to play important roles.¹⁸

HLB is a disease difficult to control. Control success is highly dependent on the extent and rigor with which inoculum sources and vector populations are eliminated within and near citrus orchards, which is attained through removal of symptomatic trees and frequent insecticidal applications. In properly managed orchards, unsprayed diseased trees present outside are the main sources of infectious vectors, the responsible for bringing the pathogen into the orchards and causing the primary infections.²⁶

Known hosts of *D. citri* include *Citrus* and other Rutaceae,^{27–31} with detailed information on suitability as hosts for the insect existing only for *Citrus* and a few other species within the Aurantioideae.^{27,32,30} *Berbera* (*Murraya*) *koenigii* L. (curry leaf) and *Murraya paniculata* (L.) Jack *sensu*³³ (*Murraya exotica* L: orange jasmine) are among the most preferred hosts for feeding and development.^{27,32,34,30}

Rutaceae is a large family comprising more than 150 genera and more than 2000 species.^{35–38} Since many wild species of Rutaceae can occur in native forests near citrus orchards, it is

imperative to know their suitability for *D. citri* to feed and/or develop in order to suppress incidence of the psyllid and HLB in commercial orchards.

In a study recently undertaken in Texas, the insect laid eggs on most of the eleven Rutaceae species tested, but life cycle was only completed on five hosts, with results varying depending on whether the insect was used in non- or multi-choice trials.³⁰ Of the several wild species found in Brazil, information on *D. citri* suitability exists only for *Helietta apiculata* and *Zanthoxylum fagara*, two representatives of the subfamily Amyridoideae. Oviposition and adult survival on *H. apiculata* were lower than on *M. paniculata*.³⁹ *Diaphorina citri* did not reproduce or survive on *Z. fagara*.^{27,30} The lack of information in this regard for many native Rutaceae such as *Balfourodendron riedelianum* (Engl.) Engl. (Amyridoideae), *Esenbeckia febrifuga* (A.St.-Hil.) A. Juss. Ex. Mart, *Esenbeckia leiocarpa* Engl., *Metrodorea stipularis* Mart., *Zanthoxylum rhoifolium* L., *Dictyoloma vandellianum* A. Juss. (Cneoroideae) and other genera and species^{40,41,42,36,43} in Brazil prompted us to undertake this study.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Plant species and growing conditions

One to 2.5-year-old plants were used (Table 1). The species were classified according to Swingle & Reece³⁵, Mabberley⁴⁴⁻⁴⁶, Zhang *et al.*⁴⁷, Bayer *et al.*⁴⁸, Kubitzki *et al.*³⁶, Morton & Telmer³⁷ and Christenhusz *et al.*³⁸ *Aegle marmelos* (L.) Corr., *Glycosmis pentaphylla* (Retz.) DC., *Casimiroa edulis* La Llave & Lev. and *Clausena lansium* (Lour.) Skells originated from seeds collected at ‘Estação Experimental de Citricultura’ located in Bebedouro municipality, São Paulo. *Balfourodendron riedelianum* (Engl.) Engl., *Dictyoloma vandellianum* A. Juss., *Esenbeckia febrifuga* (A. St.-Hil.) A. Juss. ex Mart., *Esenbeckia leiocarpa* Engl., *Helietta apiculata* Benth., *Metrodorea stipularis* Mart. and *Zanthoxylum rhoifolium* L. also originated from seeds collected from several regions of São Paulo State and commercialized by Camará Nursery in Ibaté, São Paulo. *Bergera koenigii* L., *Murraya paniculata* (L.) Jack, *Citrus limonia* Osbeck, and *Swinglea glutinosa* Blanco (Merr.) grew from seeds obtained from commercial nurseries or from Fundecitrus seed stock in Araraquara, São Paulo. *Citrus ×aurantium* L. ‘Valencia’ and *Citrus trifoliata* L. ‘Pomeroy’ were nucelar plants originated from seeds at Fundecitrus, and *Citrus wintersii* Mabb., *Citrus* sp. (‘*Microcitrus*’), and *Atalantia buxifolia*

(Poiret) Oliv. were kindly provided by Embrapa Cassava and Tropical Fruits in Cruz das Almas, Bahia. A single bud of the latest five species was grafted on individual six-month-old ‘Cravo’ Rangpur lime (*Citrus limonia* Osbeck, *incertae sedis*, possibly *Citrus ×limon* (L.) Osbeck) plants.

All plants were transferred to 4.5 L pots containing 80% pine (*Pinus*) bark, 15% vermiculite, and 5% charcoal, pH 6.8, four months before the start of the experiments. The plants were irrigated with water as needed and supplemented every week with a nutritional solution containing, in milligram per liter, 181.5 N-NO₃⁻, 12.0 N-NH₄⁺, 23.1 P-H₂PO₄⁻, 54.0 K⁺, 229.0 Ca²⁺, 40.0 Mg²⁺, 52.0 S-SO₄⁻, 1.4 Zn²⁺, 2.18 Cu²⁺, 0.98 Mn²⁺, 4.5 Fe²⁺, 0.22 Mo-MoO₄²⁻ and 0.61 B. For the cation micronutrients, EDTA chelated sources were used, except Fe, for which EDDHA was used. All experiments were carried out in a greenhouse from December 2015 to February 2017. A data logger (HT-500, Instrutherm, São Paulo, São Paulo State, Brazil) was used to register temperature and relative humidity every hour.

2.2 New shoot development

Given the lack of information on new shoot development for most plant species used in this work and the close association of new shoot growth with *D. citri* adult preferences and life cycle, shoot development was characterized for all species (Fig. 1, Table S1). When the experiments started the plants varied in height from 52.5 to 53.8 cm in *Murraya paniculata* to 98.4 to 106.5 cm in *Metrodorea stipularis*. All plants were then top pruned with the apical and secondary branches cut 20 cm below the terminal apices, and the apical bud marked. The plants were observed daily. Intervals taken from pruning to the appearance of (i) apical swelled bud, (ii) new shoot (V2 to V3 stages), (iii) newly differentiated leaves, and (iv) fully expanded soft leaves were recorded on four plants of each species. The phenological stages were classified based on the morphology and new shoot development described for citrus.⁴⁹ New shoot length and leaf length and width were measured in one shoot per plant (Table S2).

Table 1 Classification of the rutaceous species used in this work adapted from Swingle & Reece³⁵, Bayer *et al.*⁴⁸, Kubitzki *et al.*³⁶, Mabberley⁴⁴⁻⁴⁶, Zhang *et al.*⁴⁷ and Morton & Telmer³⁷. Species are ranked from sweet orange to the most distant citrus relative.

Botanical name	Common name	Subfamily/Tribe/Subtribe
<i>Citrus ×aurantium</i> L. ‘Valencia’ (syn. <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck ‘Valencia’)	Sweet orange	Aurantioideae/Aurantieae/Citreae
<i>Citrus limonia</i> Osbeck, <i>incertae sedis</i> , possibly <i>Citrus ×limon</i> (L.) Osbeck	Rangpur lime	Aurantioideae/Aurantieae/Citreae
<i>Citrus trifoliata</i> L. ‘Pomeroy’ (syn. <i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf. ‘Pomeroy’)	‘Little-leaf’ trifoliolate	Aurantioideae/Aurantieae/Citreae
<i>Citrus wintersii</i> Mabb. = <i>Microcitrus papuana</i> H.F. Winters	Brown River finger-lime	Aurantioideae/Aurantieae/Citreae
<i>Citrus</i> sp. (‘ <i>Microcitrus</i> ’) = <i>Microcitrus</i> sp.	Unnamed hybrid	Aurantioideae/Aurantieae/Citreae
<i>Atalantia buxifolia</i> (Poiret) Oliv. (syn. <i>Severinia buxifolia</i> (Poiret) Ten.	Chinese box Orange	Aurantioideae/Aurantieae/Citreae
<i>Swinglea glutinosa</i> (Blanco) Merr.	Tabog	Aurantioideae/Aurantieae/Citreae
<i>Aegle marmelos</i> (L.) Correa	Indian bael fruit	Aurantioideae/Aurantieae/Citreae
<i>Murraya paniculata</i> (L.) Jack = <i>Murraya exotica</i> L.	Orange jasmine	Aurantioideae/Aurantieae/Citreae
<i>Bergera koenigii</i> L. (syn. <i>Murraya koenigii</i> (L.) Spreng.)	Curry leaf	Aurantioideae/Aurantieae/Citreae
<i>Glycosmis pentaphylla</i> (Retz.) DC.	Orange berry	Aurantioideae /Clauseneae
<i>Clausena lansium</i> (Lour.) Skeels	Wampee	Aurantioideae /Clauseneae
<i>Zanthoxylum rhoifolium</i> L.	‘Mamica-de-porca’	Amyridoideae
<i>Esenbeckia febrifuga</i> (A.St.-Hil.) A. Juss. ex. Mart.	‘Crumarim’	Amyridoideae
<i>Esenbeckia leiocarpa</i> Engl.	‘Guarantã’	Amyridoideae
<i>Metrodorea stipularis</i> Mart.	‘Chupa-ferro’	Amyridoideae
<i>Balfourodendron riedelianum</i> (Engl.) Engl.	‘Pau-marfim’	Amyridoideae
<i>Helietta apiculata</i> Benth.	‘Canela-de-veado’	Amyridoideae
<i>Casimiroa edulis</i> La Llave & Lex.	White sapote	Amyridoideae
<i>Dictyoloma vandellianum</i> A. Juss.	‘Tingui-preto’	Cneoroideae

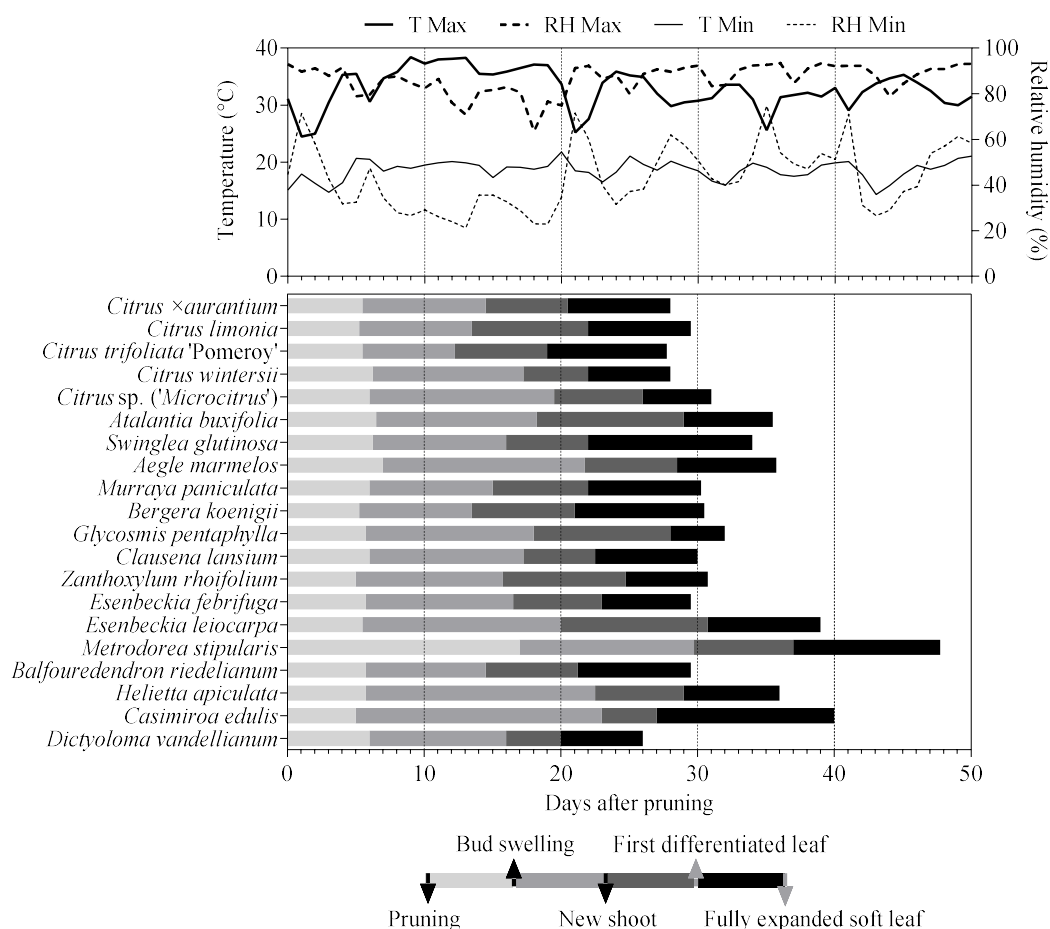


Figure 1 Time for bud swelling and development of new shoots, newly differentiated leaves and fully expanded soft leaves in days after pruning. Air temperature and relative humidity inside the greenhouse were recorded during this period.

2.3 *Diaphorina citri* biology on new shoots

A group of 50 adults were transferred to new shoots of healthy orange jasmine and maintained in an acclimatized room ($26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $70 \pm 5\%$ RH) to generate insects to be used in all the experiments. The insects were caged on the plants for 7 days for laying eggs. These plants were observed daily. As soon as new adults emerged, starting about 30 days after initial colony removal, males and females were separated and transferred to previously psyllid-free orange jasmine plants. Two-week-old virgin adults were combined forming two couples and then transferred onto a single new shoot of each 5 experimental plants per species, where they remained caged for up to 72 h for laying eggs. A manual aspirator was used to collect the adults, and a $30\times$ hand lens was used to distinguish males and females. The shoots chosen for caging

the insects were at the initial stage of development as indicated in Fig. 2. Every day after pairs of adults were transferred to the new shoots, the shoots were observed for the presence of eggs, nymphs and new emerged adults. The emerged adults also were separated for sex ratio assessment. These data allowed determination viabilities of egg ($N_{\text{nymph}}/N_{\text{egg}}*100$), nymphs ($N_{\text{adult}}/N_{\text{nymph}}*100$], and total ($N_{\text{adult}}/N_{\text{egg}}*100$). The experiment was carried out in a completely randomized design from August 2016 to February 2017 in a greenhouse with the plants exposed to an average ambient temperature of 25.1°C (max 37.9°C, min 14.2°C) and 68.6% RH (max 95.3%, min 30.3%).

2.4 *Diaphorina citri* survival on newly differentiated and fully expanded soft leaves

Groups of five two-week-old adults, removed randomly from a colony maintained in orange jasmine, were transferred and caged as indicated onto two first differentiated leaves. Each leaf received one group of insects. Two leaves per plant and 5 plants per species were used. The same experiment was repeated, now using fully expanded but still soft leaves, as indicated in Fig. 3. Both experiments were carried out at the same time in the greenhouse in a completely randomized design, with plants and insects exposed to an average ambient temperature of 24.1°C (max 36.1°C, min 13.6°C) and 71% RH (max 94.3%, min 35.5%). In both experiments the leaves were observed every day for a total 30 days for the presence of live and dead insects.

2.5 Statistical analyses

Insect biology data were transformed in $\log(x+1)$ and subjected to ANOVA and F test ($p \leq 0.05$). The means were compared using the least significant difference test ($p \leq 0.05$) using the GraphPad Prism Software 6.01 (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com). The Statistica Software 7.0 (StatSoft, Tulsa Oklahoma USA, www.statsoft.com) was used for an exploratory analysis of leaf morphology and insect biology data. The data were standardized and subjected to hierarchic grouping. Euclidian Distance was used to measure similarity and Ward's Method was used to assess linkage. As a complement to the clustering analysis, a principal components analysis was performed. Eigenvalues above 1 were considered⁵⁰ as they generated components with a significant amount of information from

the original variables. Principal component 1 (PC1=51.56%) and principal component 2 (PC2=21.79%) together retained 73.35% of total variability.

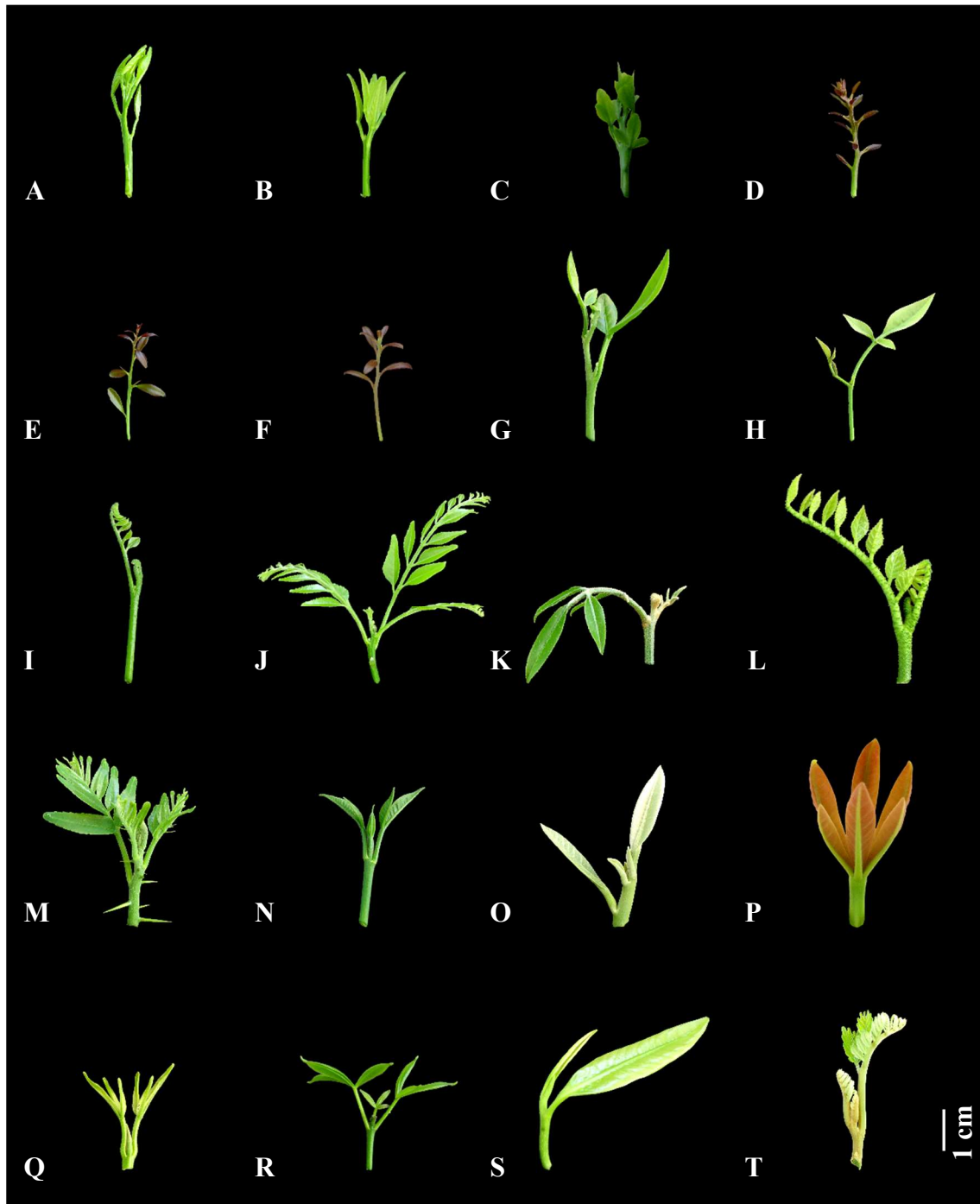


Figure 2 Image of new shoots of *Citrus ×aurantium* (A), *Citrus limonia* (B), *Citrus trifoliata* ‘Pomeroy’ (C), *Citrus wintersii* (D), *Citrus* sp. (‘*Microcitrus*’) (E), *Atalantia buxifolia* (F), *Swinglea glutinosa* (G), *Aegle marmelos* (H), *Murraya paniculata* (I), *Bergera koenigii* (J) *Glycosmis pentaphylla* (K), *Clausena lansium* (L), *Zanthoxylum rhoifolium* (M), *Esenbeckia febrifuga* (N), *Esenbeckia leiocarpa* (O), *Metrodorea stipularis* (P), *Balfourodendron riedelianum* (Q) *Helietta apiculata* (R), *Casimiroa edulis* (S) and *Dictyoloma vandellianum* (T).

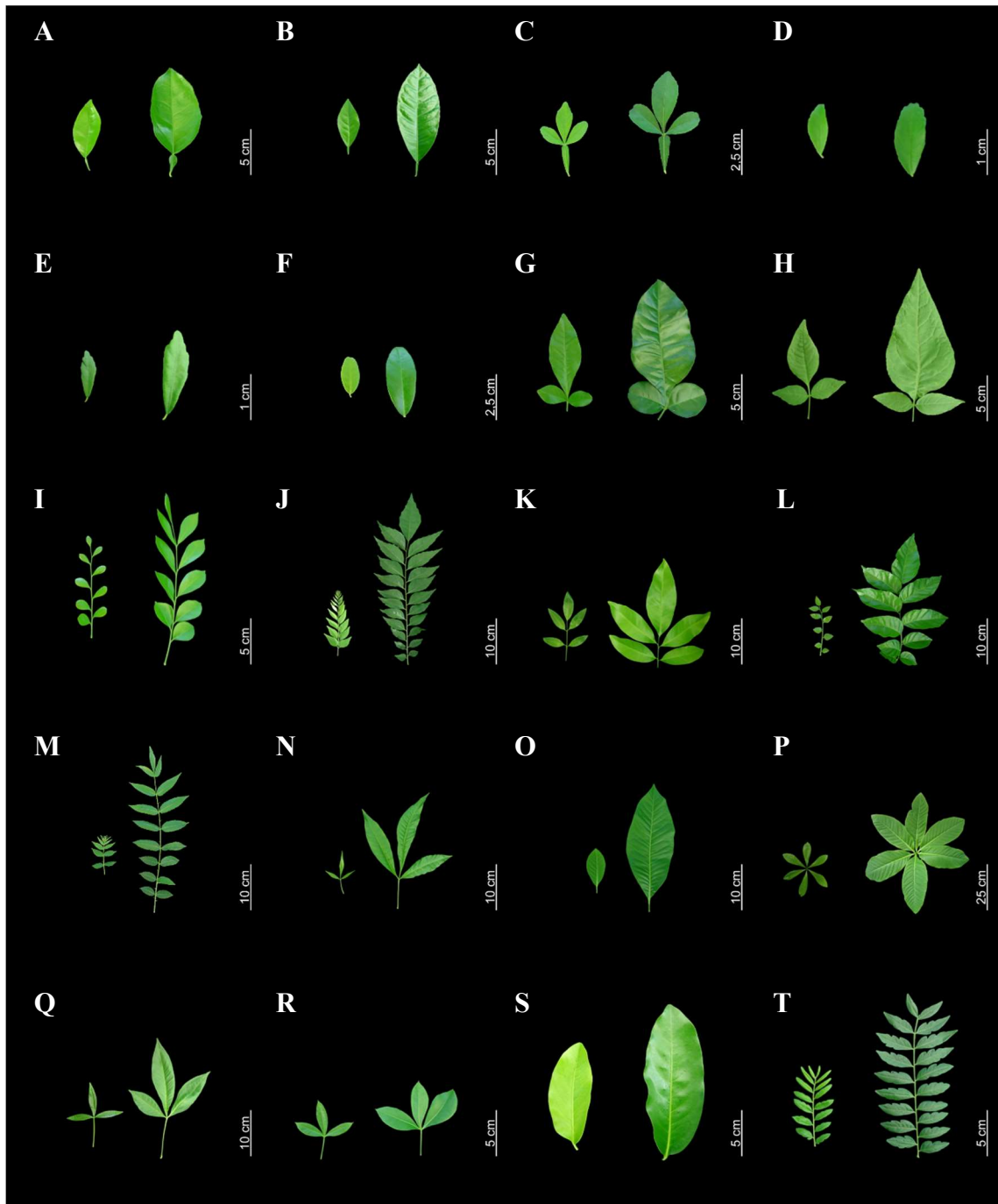


Figure 3 Image of newly differentiated leaves (left) and fully expanded soft leaves (right) of *Citrus ×aurantium* (A), *Citrus limonia* (B), *Citrus trifoliata* 'Pomeroy' (C), *Citrus wintersii* (D), *Citrus* sp. ('Microcitrus') (E), *Atalantia buxifolia* (F), *Swinglea glutinosa* (G), *Aegle marmelos* (H), *Murraya paniculata* (I), *Bergera koenigii* (J), *Glycosmis pentaphylla* (K), *Clausena lansium* (L), *Zanthoxylum rhoifolium* (M), *Esenbeckia febrifuga* (N), *Esenbeckia leiocarpa* (O), *Metrodorea stipularis* (P), *Balfourodendron riedelianum* (Q), *Helietta apiculata* (R), *Casimiroa edulis* (S) and *Dictyoloma vandellianum* (T).

3 RESULTS

3.1 New shoot development

The time needed for the appearance of new shoots, newly differentiated but not-expanded leaves, and fully expanded soft leaves varied, respectively, between 12.25 days in *Citrus trifoliata* to 29.75 in *Metrodorea stipularis*, 4 in *Casimiroa edulis* and *Dictyoloma vandellianum* to 10.75 in *Atalantia buxifolia* and *Esenbeckia leiocarpa*, and 4 in *G. pentaphylla* to 13 days in *C. eduli*. The time needed for full development was 26 days in *D. vandellianum* to 47.75 in *M. stipularis* (Table S1).

3.2 *Diaphorina citri* biology on new shoots

The Rutaceae species included in this study greatly varied in their potential to serve as hosts for *D. citri*. The insect laid eggs on 13 of the 20 species. The average time to start oviposition varied from 2.4 to 3.8 days on *Clausena lansium*, *Citrus limonia*, *C. ×aurantium*, *Glycosmis pentaphylla*, *Murraya paniculata* and *Bergera koenigii*, 4.2 to 4.8 days on *C. trifoliata*, *Helietta apiculata* and *Citrus* sp. ('*Microcitrus*'), 5 to 5.6 days on *Atalantia buxifolia*, *Swinglea glutinosa* and *Citrus wintersii*, and 11 days on *Aegle marmelos*. The highest egg numbers were found in *B. koenigii* (158.4) followed by *C. limonia* (144.4), *M. paniculata* (116.4), *C. ×aurantium* (108.7), *C. lansium* (78.20), *S. glutinosa* (67.4), *A. buxifolia* (29.6), *Citrus* sp. (24.4), *C. wintersii* (24.3), *C. trifoliata* (21.5), *A. marmelos* (16.2) and *H. apiculata* (9.6) (Fig. 4).

On *Citrus ×aurantium*, *Citrus limonia*, *Bergera koenigii*, *Murraya paniculata* and *Swinglea glutinosa* most eggs (80%) hatched after average 5–7 days, with most generated nymphs (>80%) developing to adults 2 to 3 weeks later. On *Clausena lansium*, although most eggs (78.2%) hatched, only 28.7% of the nymphs reached the adult stage. On the remaining species, the few detected eggs developed to adults only on *Citrus wintersii*. and *Citrus trifoliata*. The adults that emerged on each host were separated by sex and counted. Statistically similar ratios of male to female species were detected on all species. Although the insects laid eggs in 13 species, in four of them, namely, *Atalantia buxifolia*, *Citrus* sp., *Aegle marmelos* and *Helietta apiculata*, the generated nymphs did not survive, and in *Glycosmis pentaphylla* the few eggs

found (<10 per plant) differed in shape and were not viable. *D. citri* was unable to lay eggs on *Balfourodendron riedelianum*, *Casimiroa edulis*, *Dictyoloma vandellianum*, *Esenbeckia febrifuga*, *E. leiocarpa*, *Metrodorea stipularis* and *Zanthoxylum rhoifolium* (Fig. 4).

3.3 *Diaphorina citri* adult survival

In attempts to understand the potential of wild Rutaceae as refuges for *D. citri*, especially during the time the citrus orchards are being sprayed with insecticides against the psyllid, the interval the insects could survive in newly or fully expanded leaves was assessed.

The survival dynamics is shown in Fig. 5 and the percentages of live insects after 7, 14, 21 and 28 days of confinement in Table S3. Those intervals were chosen based on the intervals normally used by growers to perform orchard sprays. In general, survival rates decreased faster and remained lower on fully-expanded than on newly differentiated young leaves.

On both shoot stages, the species most favorable for the insect to fully complete the life cycle also were the most favorable for adult survival. This was observed in plants of Group I, which included the two commercial *Citrus* types used as controls plus *Bergera koenigii* and *Murraya paniculata*. On newly developed young leaves of *M. paniculata* and *B. koenigii*, the insects not only survived but also reproduced successfully, with the new adults starting to emerge after 19 and 23 days of confinement on *M. paniculata* and *B. koenigii*, respectively (Fig. 5). On fully expanded leaves survival was, however, lower on *M. paniculata* than on *B. koenigii*. On *Citrus ×aurantium* and *Citrus limonia*, over 85% of the insects were alive after 28 days of confinement (Fig. 5).

Group II also allowed the insect to reproduce. In this group, which included species less favorable to *D. citri* than those in Group I, over 80% of the insects remained alive most of the confinement time on *Citrus wintersii*, *Clausena lansium* and *Swinglea glutinosa*, but not on *Citrus trifoliata*, on which the population had decreased to half of the initial population 25 days when confined on newly developed and 7 days on fully expanded shoots.

On plants of Group III, considered unfavorable to insect reproduction, adult survival was rather high on both leaf types most of the assessment times on *Aegle marmelos* and *Citrus* sp. Survival on *Atalantia buxifolia* and *Helietta apiculata*, decreased to 89 and 81%, respectively, after 7 days of confinement on new leaves, and 80 and 60%, respectively, on fully expanded leaves.

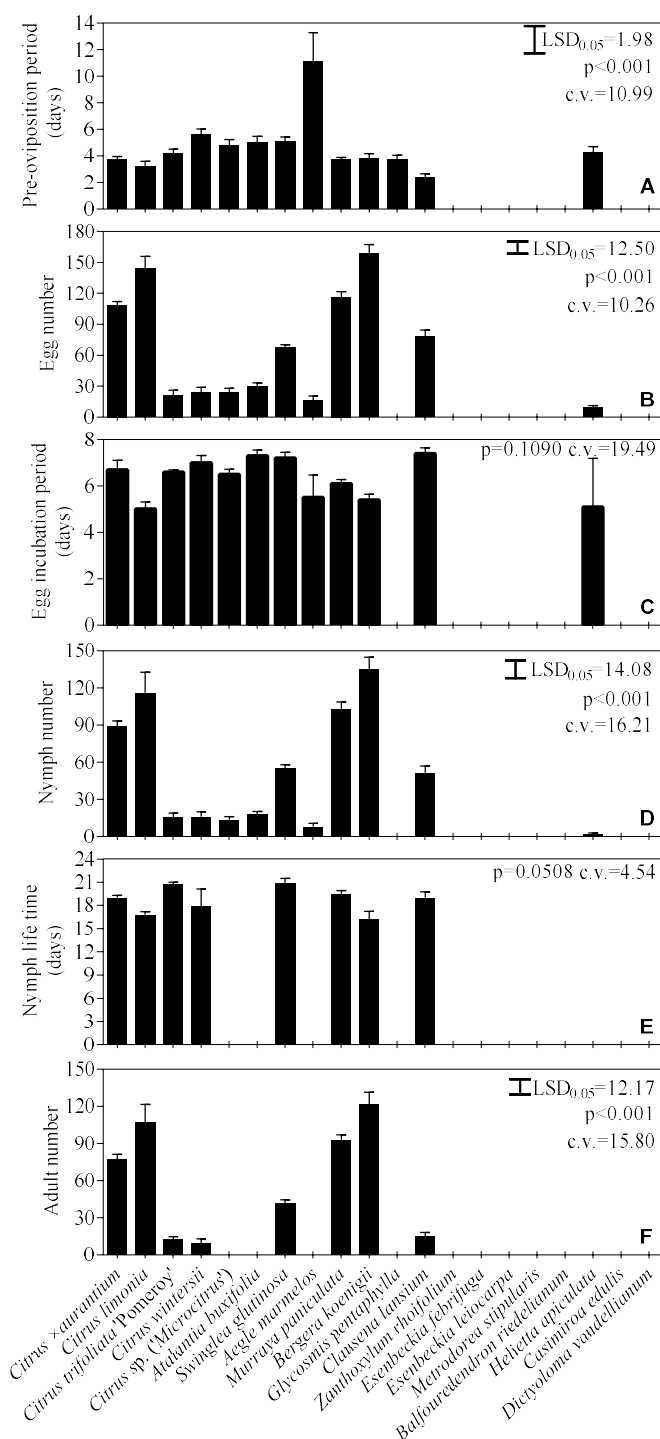


Figure 4 Pre-oviposition period (A), egg number (B), egg incubation period (C), nymph number (D), nymph life time (E) and adult number (F) in no-choice tests. *Average values of two experiments expressed as means $\pm$ standard errors of means (SEs) of $n=5$ plant species replicates. Data were $\log(x+1)$ transformed before analysis, but back transformed means are presented. Means were subjected to analysis of variance ($P < 0.05$) and significant differences comparisons were evaluated by least significant difference (LSD, $P < 0.05$); Coefficient of variation (c.v.).

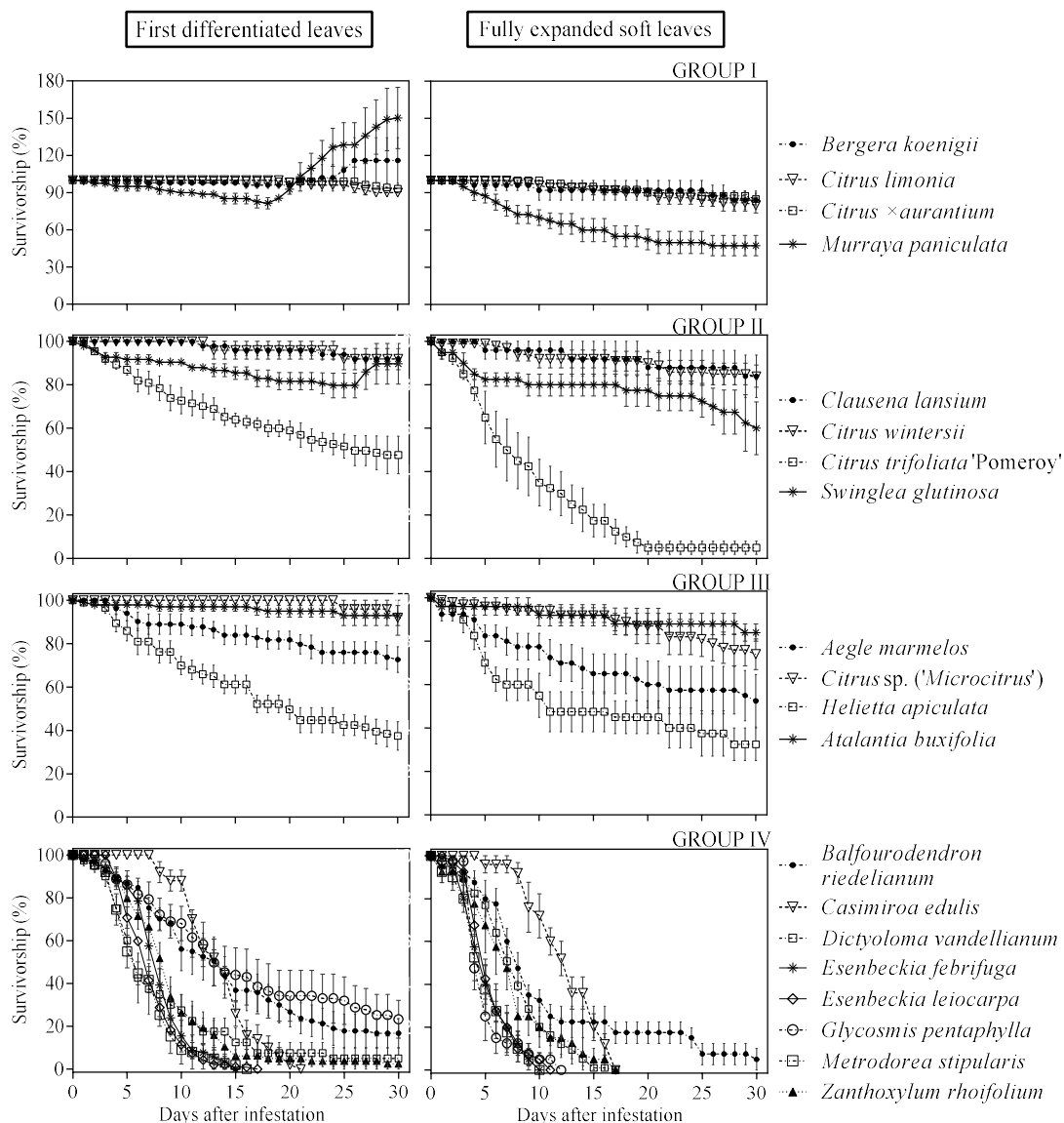


Figure 5 Survival (%) of *Diaphorina citri* adults up to 30 days after infestation in newly differentiated leaves and fully expanded soft leaves on Rutaceae plants. Average values of two experiments expressed as means $\pm$ standard errors of means (SEs) of $n=5$ plant species replicates.

Group IV included the species considered non-hosts and non-refugees for the insect. They most pronouncedly impacted *D. citri* survival. A drastic decrease in the percentage of live insects was detected after 7-day confinement time. This decrease continued, in both leaf types, with most insect found dead three days later.

3.4 Clustering and principal components analysis

Hierarchical grouping analysis was applied to all data, which confirmed the separation of the Rutaceae in 4 groups (Fig. 6). Group I included *Bergera koenigii*, *Citrus ×aurantium*, *Citrus limonia*, and *Murraya paniculata*, highly suitable to the insect. Oviposition rates were high and, due to the high suitability to nymphs to develop, high amounts of adult emerged. Group II included *Citrus trifoliata*, *Citrus wintersii*, *Clausena lansium* and *Swinglea glutinosa*, which showed an intermediate suitability to *D. citri*. The insects laid viable eggs and the nymphs reached the adult stage but, due to lower oviposition rates fewer nymphs and adults emerged. Group III included *Aegle marmelos*, *Atalantia buxifolia*, *Citrus* sp. and *Helietta apiculata*, unsuitable to psyllid development. Oviposition was low and the nymphs did not survive. Group IV included *Balfourodendron riedelianum*, *Casimiroa edulis*, *Dictyoloma vandellianum*, *Esenbeckia febrifuga*, *E. leiocarpa*, *Glycosmis pentaphylla*, *Metrodorea stipularis* and *Zanthoxylum rhoifolium*. These species could be classified as non-hosts. On these species, the vast majority of *D. citri* females did not lay eggs and when eggs were laid they were misshapen and not viable (Fig. 6).

Through the biplot of Principal Component Analysis (PCA), considering host range results and shoot development and morphological data, complemented with the cluster analysis, it could be concluded that species from Group I (highly suitable) and Group II (moderately suitable) could be grouped as *D. citri* hosts and this was independent of shoot development traits and leaf morphology. Those species from Groups III and IV (non-suitable) were also grouped by the PCA as non-hosts, independently of their shoot developmental and morphological characteristics (Fig. 7). The insect mortality rate in newly differentiated leaves and fully expanded soft leaves of Group I and II plants is lower when compared to Group III and IV (Table S4). Moreover, host range groupings were independent of the phylogenetic relations among the Rutaceae species investigated, according to phylogenies derived by Bayer *et al.*⁴⁸

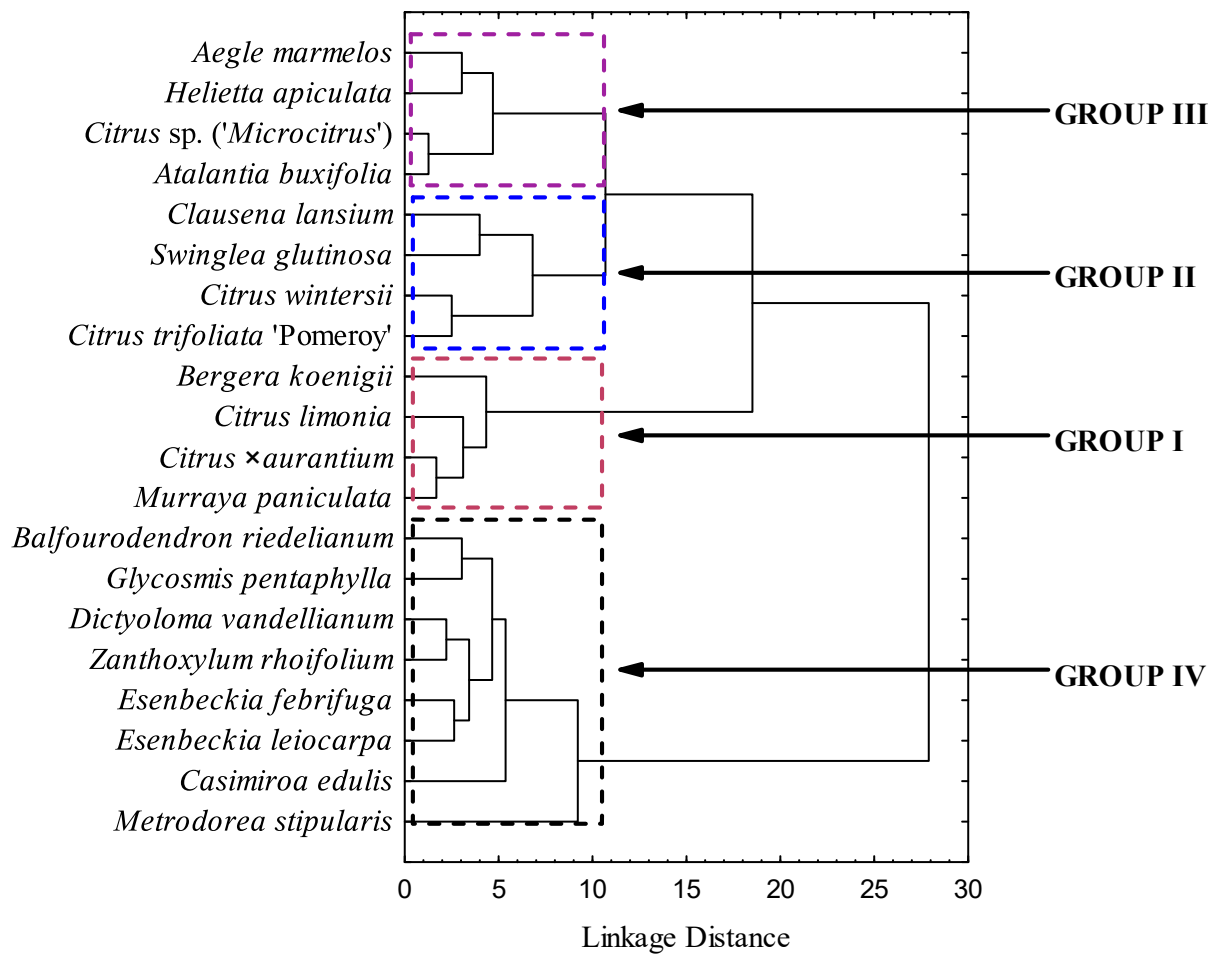


Figure 6 Tree diagram showing the hierarchy of groups formed by the 20 species of the Rutaceae family used in this study, considering *D. citri* host range and shoot and leaf morphology. Measurement of similarity and method of linkage used were Euclidian Distance and Ward's Method, respectively. Group I: highly suitable to the insect; Group II: intermediate to low suitability to *D. citri*; Group III: non-suitable to the insect and Group IV: non-hosts.

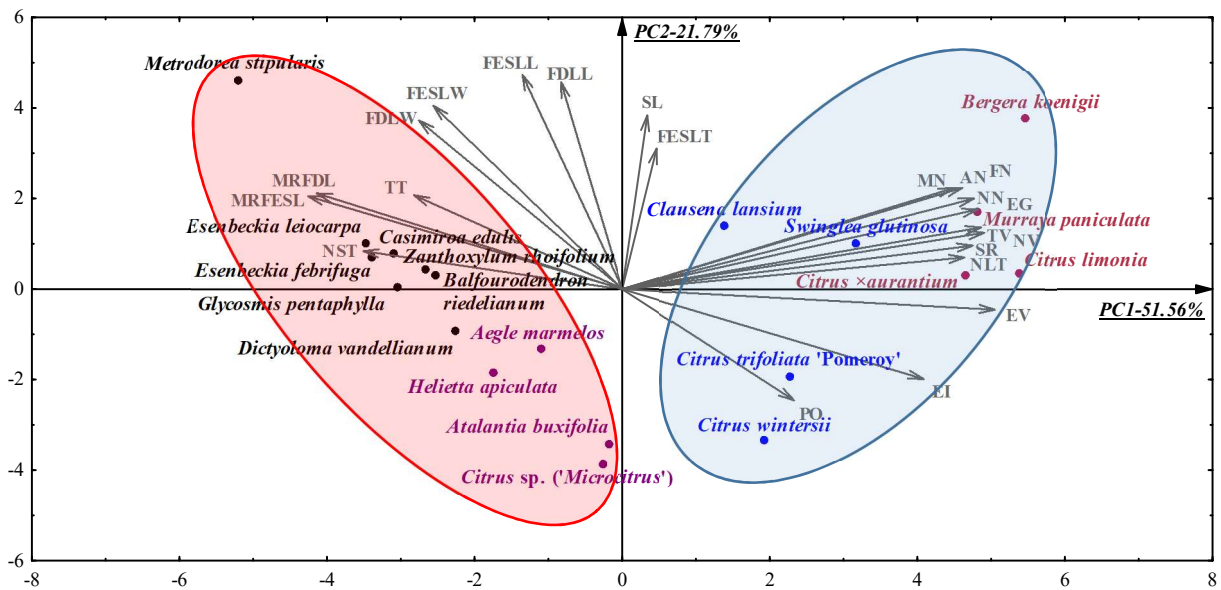


Figure 7 Biplot showing the distribution of Rutaceae species by means of the first and the second principals components (PC1 and PC2) complemented by cluster analysis. Pre-oviposition period (PO), egg incubation period (EI), egg viability (EV), nymph life time (NLT), sex ratio (SR), nymph viability (NV); total viability (TV); egg number (EG), nymph number (NN), female number (FN), male number (MN), adult number (AN), shoot length (SL), newly differentiated leaves length (FDLL), newly differentiated leaves width (FDLW), fully expanded soft leaves length (FESLL), fully expanded soft leaves width (FESLW), new shoot development time (NST), fully expanded soft leaves development time (FESLT), development total time (TT), *Diaphorina citri* mortality rate in newly differentiated leaves (MRFDL), *Diaphorina citri* mortality rate in full expanded soft leaves (MRFESL). Red ellipse represents Rutaceae species which did not reproduce *Diaphorina citri* (Groups III and IV, respectively in purple and black labels) and blue ellipse represents Rutaceae species which are hosts for *Diaphorina citri* (Groups I and II, respectively in pink and blue labels).

4 DISCUSSION

Indigenous species of Rutaceae growing naturally near citrus orchards in São Paulo State in Brazil and taxa originating in Asia were studied to determine their potential to serve as hosts or temporary refuges of *D. citri*. The plants included five *Citrus* genotypes, close relatives in the Aurantioideae, and distant relatives from other Rutaceae subfamilies. They are exotic to or native in South America, growing naturally in forests or exploited as ornamentals and fences in urban areas and citrus commercial orchards. Based on favorability of newly differentiated and fully expanded young leaves for *D. citri* to just survive or fully complete its life cycle, the species were divided in four groups.

Within the Aurantioideae, the high suitability of *Bergera koenigii*, *Citrus ×aurantium*, *Citrus limonia*, and *Murraya paniculata* as hosts of the psyllid,^{27,32,30} and the lower favorability of *Citrus wintersii*, *Citrus trifoliata*, *Clausena lansium* and *Swinglea glutinosa*^{27,31,51,52,30,53} were confirmed in this work. In general, the more suitable a host was for development of the psyllid the more suitable it was for longevity of adult psyllids regardless of leaf age.

The reasons for the differences among species are not known. They could result from the presence of compounds toxic to the insect, nutritional imbalances, or morphological/developmental features of the young shoots and leaves not allowing the females to lay eggs or the nymphs to survive.^{54,1} Although the time required for the shoots to develop and mature varied among species, no clear association of these traits with the reproductive and survival favorability of the insect was detected.

Citrus trifoliata is used as a rootstock and in fences in of commercial citrus regions in Brazil. In some orchards, particularly in the eastern region of the São Paulo State, the incidence of HLB in orange trees is high, but low or absent in *C. trifoliata* plants used in fences. The low occurrence of HLB in *C. trifoliata* may involve not only a lower favorability to the psyllid, but also a relatively tolerance to CLas infection.⁵⁵ However, use of *C. trifoliata* in fences near and within citrus orchards should be avoided.

Murraya paniculata and *Swinglea glutinosa* are also used as fences in some citrus regions of South America. The former is more suitable for development and survival of the psyllid than the latter. However, while *M. paniculata* is a very poor and transient host of CLas,⁵⁶ *S. glutinosa* supports multiplication of the bacterium⁵⁷ and Tirtawidjaja⁵⁸ reported transmission, based in phloem degeneration, mottling and chlorosis, by *D. citri* from HLB-infected citrus. Therefore, planting of these two species should be avoided near citrus orchards.

Although *Bergera koenigii* was a very favourable host of *D. citri* in this study, and as reported in previous studies,^{32,30} it is not a host of CLas.^{59,60} In contrast to *Murraya paniculata*, *B. koenigii* is not found in rural or urban areas in Brazil. Therefore, it is unlikely to contribute to *D. citri* populations in citrus orchards in this country. However, in parts of Asia where it occurs naturally and in cultivation near citrus orchards, it is an important host of the psyllid from which the psyllid can disperse.^{61–65,60}

As for *Bergera koenigii*, the Australasian species of *Citrus*, *Aegle marmelos*, *Atalantia buxifolia* and *Clausena lansium* are also not present in citrus commercial areas of Brazil. In this work some of these species supported adult *D. citri* survival for one month and at relatively

high rates. According to Ramadugu *et al.*²⁹ *Clausena lansium* is ‘resistant’ to CLAs.²⁹ However, stunting was reported by Tirtawidjaja,⁵⁸ suspicious symptoms were observed by Koizumi *et al.*⁶⁶ after transmission by *D. citri*, and PCR detection of the pathogen after natural infection was reported by Ding *et al.*⁶⁷ *Aegle marmelos* has not been reported as a host,⁶⁸ but for *A. buxifolia* Martinez & Wallace⁶⁹ reported slight yellowing, faint mottling and slight stunting, Su *et al.*⁷⁰ reported DNA hybridisation, Hung *et al.*^{59,71} reported graft transmission from infected sweet orange. Hung *et al.*⁷¹ also reported *D. citri* transmission and Koizumi *et al.*⁶⁶ observed stunting after vector transmission. Leaf mottling/yellowing, with no significant effect on plant growth, was reported by Deng *et al.*⁷². Deng *et al.*⁷² also reported graft transmission to mandarin. Koizumi *et al.*⁶⁶ reported stunting of *Citrus* (*‘Microcitrus’*) *australasica* F. Muell. after transmission of the pathogen by the psyllid. Further studies are required to determine the threat these taxa and other species within the genera pose for spread of HLB, particularly taxa for which claims of ‘resistance’ to CLAs are inconclusive.

Glycosmis pentaphylla (Aurantioideae: Clauseneae) and *Casimiroa edulis* (Amyridoideae) may not represent any risk for spread of HLB as they are not suitable for development of *D. citri*³¹ and or support adult survival of the psyllid for more than 15 days. Moreover, they are not hosts of CLAs.²⁹

Balfourodendron riedelianum, *Esenbeckia febrifuga*, *E. leiocarpa*, *Helietta apiculata*, *Metrodorea stipularis* and *Zanthoxylum rhoifolium* (Amyridoideae), and *Dictyoloma vandellianum* (Cneoroideae) are indigenous to Brazil where they occur almost exclusively in forests located in citrus growing regions^{41,42} and where until recently placed in the Rutoideae/Toddalioideae³⁷. In our study, *D. citri* did not develop or survive for a long time on *B. riedelianum*, *D. vandellianum*, *E. febrifuga*, *E. leiocarpa*, *M. stipularis*, and *Zanthoxylum rhoifolium* (Amyridoideae) plants. Consequently, they do not represent a risk for spread of HLB spread. However, 40% of the adults confined in newly differentiated leaves of *H. apiculata* were alive after 30 days of confinement. Thus, the potential of *H. apiculata* as a host of CLAs warrants further investigation.

5 REFERENCES

- 1 Hall DG, Richardson ML, Ammar E, Halbert SE, Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, vector of citrus huanglongbing disease. *Entomol Exp et Appl* **146**:207–223 (2013).
- 2 Capoor SP, Rao DG, Viswanath SM, *Diaphorina citri*: a vector of the greening disease of citrus in India. *Indian J of Agr Sci* **37**:572–576 (1967).
- 3 Yamamoto PT, Felipe MR, Garbim LF, Coelho JHC, Ximenes NL, Martins EC, Leite APR, Sousa MC, Abrahao DP, Braz JD *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera Psyllidae): vector of the bacterium *Candidatus Liberibacter americanus*, *Proceedings of the Huanglongbing-Greening International Workshop*, Ribeirão Preto, São Paulo, p. 96 (2006).
- 4 Jagoueix S, Bové JM, Garnier M, The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the α subdivision of the Proteobacteria. *Int J Syst Bacteriol*, **44**:397–386 (1994).
- 5 Bové JM, Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus, *J Plant Pathol* **88**:7–37 (2006).
- 6 Colleta Filho HD, Targon MLPN, Takita MA, de Negri JD, Pompeu Júnior J, Machado MA, Amaral AM, Muller GW, First report of the causal agent of Huanglongbing (“*Candidatus Liberibacter asiaticus*”) in Brazil. *Plant Dis* **88**:1382–1382 (2004).
- 7 Weinert MP, Jacobson SC, Grimshaw JF, Bellis GA, Stephens PM, Gunua TG, Kame MF, Davis RI, Detection of Huanglongbing (citrus greening disease) in Timor-Leste (East Timor) and in Papua New Guinea. *Australas Plant Pathol* **33**:135–136 (2004).
- 8 Teixeira DC, Ayres J, Kitajima EW, Tanaka FAO, Danet L, Jagoueix-Eveillard S, Saillard C, Bové JM, First report of a Huanglongbing like disease of citrus in Sao Paulo State, Brazil and association of a new *Liberibacter* species, “*Candidatus Liberibacter americanus*”, with the disease. *Plant Dis* **89**:107–107 (2005).
- 9 Halbert S, The discovery of huanglongbing in Florida, in *Proceedings of the Second International Citrus Canker and Huanglongbing Research Workshop*, ed by Gottwald TR, Dixon WN, Graham JH and Berger P. Orlando, Florida. Nov p. 50 (2005).
- 10 Luis M, Collazo C, Llauger R, Blanco E, Peña I, López D, González C, Casín JC, Batista L, Kitajima E, Tanaka FAO, Salaroli RB, Teixeira DC, Martins EC, Bove JM, Occurrence of citrus huanglongbing in Cuba and association of the disease with ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’. *J Plant Pathol* **91**:709–712 (2009).
- 11 Faghihi MM, Salehi M, Bagheri A, Izadpanah K, First report of citrus huanglongbing disease on orange in Iran. *Plant Pathol* **58**:793–793 (2009).

- 12 Halbert SE, Manjunath KL, Ramadugu C, Brodie MW, Webb SE, Lee R, Trailers transporting oranges to processing plants move Asian citrus psyllids. *Fla Entomol* **93**:33–38 (2010).
- 13 Kunta M, Setamou M, Skaria M, Rascoe J, Li W, Nakhla M, da Graça J, First report of citrus huanglongbing in Texas. *Phytopathology* **102**:66 (2012).
- 14 Kumagai LB, LeVesque CS, Blomquist CL, Madishetty K, Guo Y, Woods PW, Rooney-Latham S, Rascoe J, Gallindo T, Schnabel D, Polek M, First report of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ associated with citrus huanglongbing in California. *Plant Dis*, **97**:283 (2013).
- 15 da Graça JV, Kunta M, Sétamou M, Rascoe J, Li W, Nakhla MK, Salas B, Bartels DW, Huanglongbing in Texas: Report on the first detections in comercial citrus. *Journal of Citrus Pathology*, iocv_journalcitruspathology_27939, 1–6 (2015).
- 16 Lopes SA, Bertolini G, Frare GF, Martins EC, Wulff NA, Teixeira DC, Graft transmission efficiencies and multiplication of ‘*Candidatus Liberibacter americanus*’ and ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ in citrus plants. *Phytopathology* **99**:301–306 (2009a).
- 17 Lopes SA, Frare GF, Bertolini E, Cambra M, Fernandes NG, Ayres AJ, Marin DR, Bové JM, Liberibacters associated with citrus huanglongbing in Brazil: ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ is heat tolerant, ‘*Ca. L. americanus*’ is heat sensitive. *Plant Dis*, **93**:257–262 (2009b).
- 18 Lopes SA, Luiz FQBF, Oliveira HT, Cifuentes-Arenas JC, Raiol Júnior LL, Seasonal variation of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ titers in new shoots of citrus in distinct environments. *Plant Dis* **101**:583–590 (2017).
- 19 Lopes SA, Frare GF, Graft transmission and cultivar reaction of citrus to ‘*Candidatus Liberibacter americanus*’. *Plant Dis* **92**:21–24 (2008).
- 20 Hoffman MT, Doud MS, Willians L, Zhang M-Q, Ding F, Stover E, Hall D, Zhang S, Jones L, Gooch M, Fleites L, Dixon W, Gabriel D, Duan Y-P, Heat treatment eliminates ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ from infected citrus trees under controlled conditions. *Phytopathology* **13**:15–22 (2013).
- 21 Zhang M, Guo Y, Powell CA, Doud MS, Yang C, Duan Y (2014) Effective antibiotics against ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ in HLB-affected Citrus plants identified via the graft-based evaluation. *PLoS ONE* **9**:1–11 (2014).
- 22 Yang C, Powell CA, Duan Y, Shatters R, Fang J, Zhang M, Deciphering the bacterial microbiome in huanglongbing-affected citrus treated with thermotherapy and sulfonamide antibiotics. *PLoS ONE* **11**:1–15 (2016).
- 23 Wu F, Huang J, Xu M, Fox EGP, Beattie GAC, Holford P, Cen Y, Deng X, Host and environmental factors influencing ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ acquisition in *Diaphorina citri*. *Pest Manag Sci* (wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/ps.5060 (2018).

- 24 Colleta Filho HD, Daugherty MP, Ferreira C, Lopes JRS, Temporal progression of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ infection in citrus and acquisition efficiency by *Diaphorina citri*. *Phytopathology* **104**:416–421 (2014).
- 25 Lopes SA, Luiz FQBF, Martins EC, Fassini CG, Sousa MC, Barbosa JC, Beattie GAC, ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ titers in citrus and acquisition rates by *Diaphorina citri* are decreased by higher temperature. *Plant Dis* **97**:1563–1570 (2013).
- 26 Bergamim Filho A, Inoue-Nagata AK, Bassanezi RB, Belasque Jr J, Amorim L, Macedo MA, Barbosa JC, Willocquet L, Savary S, The importance of primary inoculum and area-wide disease management to crop health and food security. *Food Secur* **8**:221–238 (2016).
- 27 Halbert SE, Manjunath KL, Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and Greening Disease of Citrus: A literature review and assessment of risk in Florida. *Fla Entomol* **87**:330–353 (2004).
- 28 Nava DE, Torres MLG, Rodrigues MDL, Bento JMS, Parra, JRP, Biology of *Diaphorina citri* (Hem., Psyllidae) on different hosts and at different temperatures. *J Appl Entomol* **131**:709–715 (2007).
- 29 Ramadugu C, Keremane ML, Halbert SE, Duan YP, Roose ML, Stover E, Lee RF, Long-term field evaluation reveals huanglongbing resistance in *Citrus* relatives. *Plant Dis* **100**:1858–1869 (2016).
- 30 Sétamou M, Graça JV, Sandoval II JL, Suitability of native North American Rutaceae to serve as host plants for the Asian citrus psyllid (Hemiptera: Liviidae). *J Appl Entomol* **140**, 645–654 (2016).
- 31 Westbrook CJ, Hall DG, Stover E, Duan YP, Lee RF, Colonization of Citrus and Citrus-related germplasm by *Diaphorina citri*. *HortScience* **46**:997–1005 (2011).
- 32 Subandiyah S, Himawan A, Joko T, Astuti IP, Holford P, Beattie GAC, Krueger R, Colonization of Asiatic citrus psyllid and huanglongbing development on citrus and citrus relatives in Indonesia, *Proceedings International Research Conference on HLB*, Orlando, Florida, Dec p. 393 (2008).
- 33 Mabberley DJ, Proposal to conserve the name *Chalcas paniculata* (*Murraya paniculata*) (*Rutaceae*) with a conserved type. *Taxon*, **65**:394–395 (2016).
- 34 Teck SLC, Fatimah A, Beattie A, Heng RKJ, King WS Influence of host plant species and flush growth stage on the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama. *Am J Agricul and Biol Sci* **6**:536–543 (2011).
- 35 Swingle WT, Reece PC, The botany of citrus and its wild relatives. In: *The citrus industry*. pp. 190–430, Reuther W, Webber HJ, Batchelor LD, Berkeley: University of California (1967).

- 36 Kubitzki K, Kallunki JA, Duretto M, Wilson PG, Rutaceae. In: *The Families and Genera of Vascular Plants: Flowering Plants. Eudicots*, pp. 276–356, Eds Kubitzki K. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag (2011).
- 37 Morton CM, Telmer C, New Subfamily Classification for the Rutaceae. *Ann Mo Bot Gard* **99**:620–641 (2014).
- 38 Christenhusz MJM, Fay MF, Chase MW, *Plants of the World – An Illustrated Encyclopaedia of Vascular Plant Families*. Kew Publishing, Richmond (2017).
- 39 Pimpinato HAS, Alves GR, Yamamoto PT, Feeding and oviposition of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) on *Helieta apiculata* (Sapindales: Rutaceae): a potencial host? *Fla Entomol* **100**:476–477 (2017).
- 40 Pirani JR (coord.), Rutaceae. In: *Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo*. v. 2, pp. 281–308, Wanderley MGL, Shepherd GJ, Giulietti AM, Melhem TS, Bittrich V, Kameyama C (eds.). São Paulo: Instituto de Botânica, São Paulo (2002).
- 41 Lorenzi H, *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. 384p. Nova Odessa: Instituto Plantarum (2008).
- 42 Lorenzi H, *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. 384p. Nova Odessa: Instituto Plantarum (2009).
- 43 Saueressig D, *Plantas do Brasil: árvores nativas*. 432 p. Irati: Editora Plantas do Brasil (2014).
- 44 Mabberley DJ, A classification for edible *Citrus* (Rutaceae). *Telopea* **7**:167–172 (1997).
- 45 Mabberley DJ, Australian Citreae with notes on other Aurantioideae (Rutaceae). *Telopea* **7**:333–344 (1998).
- 46 Mabberley DJ, *Citrus* (Rutaceae): a review of recent advances in etymology, systematics and medical applications. *Blumea* **49**:481–498 (2004).
- 47 Zhang DX, Hartley TG, Mabberley DJ, Rutaceae. In: Wu ZY, Raven PH, Hong DY (eds.), *Flora of China*, Vol. 11 (Oxalidaceae through Aceraceae). Beijing: Science Press, St. Louis: Missouri Botanical Garden Press (2008).
- 48 Bayer RJ, Mabberley DJ, Morton C, Miller CH, Sharma IK, Pfeil BE, Rich S, Hitchcock R, Sykes S, A molecular phylogeny of the orange subfamily (Rutaceae: Aurantioideae) using nine cpDNA sequences. *Am J Bot* **96**:668–685 (2009).
- 49 Cifuentes-Arenas JC, Goes A, Miranda MP, Beattie GAC, Lopes AS, Citrus flush shoot ontogeny modulates biotic potencial of *Diaphorina citri*. *Plos One* **13**:1–17 (2018).
- 50 Kaiser HF, The varimax criterion for analytic rotation in factor analysis. *Psychometrika* **23**:187–200 (1958).

- 51 Richardson ML, Hall DG, Resistance of *Poncirus* and *Citrus* x *Poncirus* germplasm to the Asian citrus psyllid. *Crop Sci* **53**:183–188 (2013).
- 52 Borgoni PC, Vendramim JD, Lourenção AL, Machado MA, Resistance of *Citrus* and related genera to *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae). *Neotrop Entomol* **43**:465–469 (2014).
- 53 Hall DG, Hentz MG, Stover Ed, Field survey of Asian citrus psyllid (Hemiptera: Liviidae) infestations associated with six cultivars of *Poncirus trifoliata* (Rutaceae). *Fla Entomol* **100**:667–668 (2017).
- 54 Clark KE, Hartley SE, Brennan RM, Mackenzie K, Johnson SN, Oviposition and feeding behaviour by the vine weevil *Otiorhynchus sulcatus* on red raspberry: effects of cultivars and plant nutritional status. *Agr Forest Entomol* **14**:157–163 (2012).
- 55 Folimonova SY, Robertson CJ, Garnsey SM, Gowda S, Dawson WO, Examination of the responses of different genotypes of *Citrus* to huanglongbing (Citrus greening) under different conditions. *Phytopathology* **99**:1346–1354 (2009).
- 56 Lopes SA, Frare GF, Camargo LEA, Wulff NA, Teixeira DC, Bassanezi RB, Beattie GAC, Ayres AJ Liberibacters associated with orange jasmine in Brazil: incidence in urban areas and relatedness to citrus liberibacters. *Plant Pathol* **59**:1044–1053 (2010).
- 57 Cifuentes-Arenas JC, Huanglongbing e *Diaphorina citri*: Estudos das relações patógeno-hospedeiro. Ph.D. Thesis. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista (UNESP). Jaboticabal, SP, Brazil. 133 p. (2017).
- 58 Tirtawidjaja S, Insect, dodder and seed transmissions of citrus vein phloem degeneration (CVPD). In Proceedings of the Fourth International Society of Citriculture Congress. Tokyo, Japan. International Society of Citriculture, pp. 469–471 (1981).
- 59 Hung TH, Wu ML, Su HJ, Identification of alternate hosts of fastidious bacterium causing citrus greening disease. *J Phytopathol*, **148**:321–326 (2000).
- 60 Om N, The Roles of Psyllids, Host Plants and Environment in the Aetiology of Huanglongbing in Bhutan. Ph.D. Thesis, Western Sydney University, Australia. 379 p. (2017).
- 61 Husain MA, Nath D, The citrus psylla (*Diaphorina citri*, Kuw.) [Psyllidae: Homoptera]. p. 5-27. In: Memoirs of the Department of Agriculture in India, Entomological Series 10. Indian Agricultural Research Institute, Calcutta (1927).
- 62 Tara JS, Sharma M, Record of hemipteran insect pest diversity on *Murraya koenigii* (L.) Sprengel (curry leaf), a medicinally important plant from Jammu region of J and K State. *The Bioscan* **5**:71–74 (2010a).
- 63 Tara JS, Sharma M, Survey of insect pest diversity on economically important plant *Murraya koenigii* (L.) Sprengel in Jammu, J & K. *J Entomol Res* **34**:265–270 (2010b).

- 64 Yamamoto PT, Control of citrus huanglongbing (ex-greening) and citrus tristeza virus. Report of Mission, September 14 to 27, 2007. Bhutan. FAO Technical Cooperation Program/BHU/3001 (A). TR: NPPC/ADM-25, Technical Report 1 (2007).
- 65 Bové JM, Heat-tolerant Asian HLB meets heat-sensitive African HLB in the Arabian Peninsula! Why? *Journal of Citrus Pathology*, **1**, 1–78 (2014).
- 66 Koizumi M, Prommintara M, Ohtsu Y, Wood apple, *Limonia acidissima*: a new host for the huanglongbing (greening) vector, *Diaphorina citri*. In: da Graca JV, Moreno P, Yokomi R.K. (eds), *Proceedings of the Thirteenth Conference of the International Organization of Citrus Virologists*, Fuzhou, Fujian, China, 16–23 November 1995. International Organization of Citrus Virologists, University of California: Riverside. pp. 271–275 (1996).
- 67 Ding F, Wang G, Yi G, Zhong Y, Zeng J, Zhou B, Infection of wampee and lemon by the citrus huanglongbing pathogen (*Candidatus Liberibacter asiaticus*) in China. *Journal of Plant Pathology* **87**:207–212 (2005).
- 68 Beattie GAC, Barkley P Huanglongbing and its vectors: A pest-specific contingency plan for the citrus and nursery and garden industries (Version 2), February 2009. Horticulture Australia Ltd., Sydney. 272 pp (2009).
- 69 Martinez AL, Wallace JM, Citrus greening disease in the Philippines. In: Chapman HD (ed.), *Proceedings of the First International Citrus Symposium, University of California, Riverside*, 16–26 March 1968. California: Publications Department of the University of California. **3**:1427–1431 (1969).
- 70 Su HJ, Hung TH, Lim WH, Infection and spreading of citrus greening. In: Abstracts of the International Symposium on Integrated Management Insect-borne Virus Diseases of Tropical fruit. FFTC/ASPAC, Taipei, Taiwan. p. 29 (1995).
- 71 Hung TH, Wu ML, Su HJ, Identification of the Chinese box orange (*Severinia buxifolia*) as an alternative host of the bacterium causing citrus huanglongbing. *Eur J Plant Pathol* **107**:183–189 (2001).
- 72 Deng X, Lou Z, Feng Z, Li H, Chen J, Civerolo EL, First Report of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ from *Atalantia buxifolia* in Guangdong, China. *Plant Dis*, **92**:314 (2008).

Supporting Information

Additional Supporting Information can be found in the online version of this article:

Table S1 Time in days needed for the emergence of new shoots, newly differentiated and non-expanded leaves, and fully expanded soft leaves, in top-pruned potted-plants of the Rutaceae species used.

Plant species	New shoots	Non-expanded leaves	Fully-expanded leaves	Total
<i>Citrus ×aurantium</i>	14.50 ± 0.65*	6.00 ± 0.71	7.50 ± 0.50	28.00 ± 0
<i>Citrus limonia</i>	13.50 ± 0.65	8.50 ± 1.04	7.50 ± 0.50	29.50 ± 0.50
<i>Citrus trifoliata</i> ‘Pomeroy’	12.25 ± 0.25	6.75 ± 0.25	8.75 ± 0.25	27.75 ± 0.25
<i>Citrus wintersii</i>	17.25 ± 0.63	4.75 ± 0.75	6.00 ± 0.58	28.00 ± 0
<i>Citrus</i> sp. (‘ <i>Microcitrus</i> ’)	19.50 ± 0.50	6.50 ± 0.50	5.00 ± 0.41	31.00 ± 0.41
<i>Atalantia buxifolia</i>	18.25 ± 0.75	10.75 ± 0.25	6.50 ± 0.29	35.50 ± 0.29
<i>Swinglea glutinosa</i>	16.00 ± 0.58	6.00 ± 0	12.00 ± 0.58	34.00 ± 0
<i>Aegle marmelos</i>	21.75 ± 0.75	6.75 ± 0.48	7.25 ± 0.75	35.75 ± 1.03
<i>Murraya paniculata</i>	15.00 ± 0.82	7.00 ± 1.00	8.25 ± 0.75	30.25 ± 0.25
<i>Bergera koenigii</i>	13.50 ± 1.19	7.50 ± 0.29	9.50 ± 1.19	30.50 ± 0.29
<i>Glycosmis pentaphylla</i>	18.00 ± 0.58	10.00 ± 0.58	4.00 ± 0	32.00 ± 0
<i>Clausena lansium</i>	17.25 ± 0.25	5.25 ± 0.75	7.50 ± 0.50	30.00 ± 0
<i>Zanthoxylum rhoifolium</i>	15.75 ± 0.48	9.00 ± 0.71	6.00 ± 1.00	30.75 ± 0.48
<i>Esenbeckia febrifuga</i>	16.50 ± 0.96	6.50 ± 0.96	6.50 ± 0.50	29.50 ± 0.50
<i>Esenbeckia leiocarpa</i>	20.00 ± 1.22	10.75 ± 0.48	8.25 ± 1.11	39.00 ± 0.58
<i>Metrodorea stipularis</i>	29.75 ± 0.63	7.25 ± 0.48	10.75 ± 0.48	47.75 ± 0.63
<i>Balfourodendron riedelianum</i>	14.50 ± 0.87	6.75 ± 0.75	8.25 ± 0.48	29.50 ± 0.50
<i>Helietta apiculata</i>	22.50 ± 0.96	6.50 ± 0.96	7.00 ± 0.58	36.00 ± 0
<i>Casimiroa edulis</i>	23.00 ± 0.58	4.00 ± 0	13.00 ± 0.58	40.00 ± 0
<i>Dictyoloma vandellianum</i>	16.00 ± 0.58	4.00 ± 0	6.00 ± 0.58	26.00 ± 0
P – value	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
LSD	2.08	1.79	1.81	1.14
SEDs	0.74	0.64	0.64	0.40
C.V. (%)	8.31	18.10	16.48	2.47

*Each number represents means ± standard errors (SEs) of four plants per species. Data was subjected to ANOVA (P<0.05) followed mean comparison using the least significant difference test (LSD, P<0.05). Data was subjected to ANOVA (P<0.05) followed mean comparison using the least significant difference test (LSD, P<0.05). Degrees of freedom was 60. C.V. means coefficient of variation, and SEDs standard errors of differences between means.

Table S2 New shoot length, newly differentiated and non-expanded leaves and fully expanded soft leaf blade length and width.

Plant species	New shoot	Non-expanded leaves		Fully-expanded leaves	
	Length	Length	Width	Length	Width
	----- (cm) -----				
<i>Citrus ×aurantium</i>	3.7 ± 0.13*	8.4 ± 0.13	3.6 ± 0.24	12.6 ± 0.57	6.1 ± 0.14
<i>Citrus limonia</i>	2.2 ± 0.09	6.7 ± 0.16	2.4 ± 0.21	13.5 ± 0.23	5.0 ± 0.12
<i>Citrus trifoliata</i> ‘Pomeroy’	3.2 ± 0.11	3.4 ± 0.13	2.2 ± 0.18	4.8 ± 0.13	3.4 ± 0.13
<i>Citrus wintersii</i>	2.8 ± 0.14	1.3 ± 0.10	0.4 ± 0.05	1.6 ± 0.06	0.7 ± 0.05
<i>Citrus</i> sp. (‘ <i>Microcitrus</i> ’)	2.8 ± 0.09	1.3 ± 0.14	0.4 ± 0.03	2.3 ± 0.02	0.7 ± 0.03
<i>Atalantia buxifolia</i>	2.6 ± 0.22	2.5 ± 0.09	1.1 ± 0.06	4.5 ± 0.11	1.7 ± 0.05
<i>Swinglea glutinosa</i>	4.6 ± 0.24	10.4 ± 0.18	6.4 ± 0.16	15.5 ± 0.46	8.4 ± 0.14
<i>Aegle marmelos</i>	3.6 ± 0.17	10.8 ± 0.12	6.9 ± 0.30	18.4 ± 0.59	10.1 ± 0.24
<i>Murraya paniculata</i>	4.4 ± 0.20	12.0 ± 0.32	3.7 ± 0.35	19.9 ± 0.06	6.3 ± 0.18
<i>Bergera koenigii</i>	4.6 ± 0.13	14.7 ± 0.25	6.3 ± 0.41	37.4 ± 1.02	14.5 ± 0.52
<i>Glycosmis pentaphylla</i>	2.1 ± 0.10	15.3 ± 0.54	11.4 ± 0.29	22.5 ± 1.23	19.0 ± 0.59
<i>Clausena lansium</i>	5.0 ± 0.21	14.7 ± 0.32	5.8 ± 0.41	29.8 ± 1.33	21.3 ± 0.62
<i>Zanthoxylum rhoifolium</i>	4.2 ± 0.10	8.3 ± 0.19	5.9 ± 0.24	36.2 ± 0.46	13.3 ± 0.65
<i>Esenbeckia febrifuga</i>	3.3 ± 0.15	9.5 ± 0.22	6.8 ± 0.27	26.3 ± 0.72	20.2 ± 0.63
<i>Esenbeckia leiocarpa</i>	3.9 ± 0.13	10.4 ± 0.40	4.5 ± 0.28	29.5 ± 0.63	11.0 ± 0.34
<i>Metrodorea stipularis</i>	5.1 ± 0.13	13.5 ± 0.60	21.8 ± 0.41	33.5 ± 0.55	32.7 ± 0.63
<i>Balfourodendron riedelianum</i>	2.6 ± 0.12	12.9 ± 0.66	11.2 ± 0.39	23.5 ± 0.95	16.6 ± 0.23
<i>Helietta apiculata</i>	2.7 ± 0.19	6.7 ± 0.23	6.2 ± 0.10	8.2 ± 0.17	8.5 ± 0.25
<i>Casimiroa edulis</i>	3.7 ± 0.10	11.9 ± 0.40	4.4 ± 0.30	16.0 ± 0.65	6.4 ± 0.26
<i>Dictyoloma vandellianum</i>	3.8 ± 0.20	7.7 ± 0.17	4.4 ± 0.24	15.5 ± 0.41	8.7 ± 0.41

*Average values expressed as means ± standard errors (SEs) of four plants per species.

Table S3 *Diaphorina citri* adult survival percentages after caging for 7, 14, 21 and 28 days on first differentiated leaves (FDL) and fully expanded soft leaves (FESL) of the Rutaceae species used.

Grouping	Plant species	Percentage of live insects after various exposure periods on newly differentiated leaves (FDL) and fully expanded soft leaves (FESL)							
		7 days		14 days		21 days		28 days	
		FDL	FESL	FDL	FESL	FDL	FESL	FDL	FESL
I	<i>B. koenigii</i>	98 ± 2.00*	96 ± 4.00	98 ± 2.00	92 ± 8.00	100 ± 5.48	92 ± 8.00	116 ± 18.33	84 ± 7.48
	<i>C. limonia</i>	100 ± 0.00	100 ± 0.00	100 ± 0.00	94 ± 2.45	98 ± 2.00	86 ± 5.10	90 ± 3.16	82 ± 6.63
	<i>C. ×aurantium</i>	100 ± 0.00	100 ± 0.00	100 ± 0.00	95 ± 3.06	99 ± 1.00	90 ± 2.50	95.5 ± 2.11	87.5 ± 3.95
	<i>M. paniculata</i>	95 ± 2.34	77.50 ± 6.12	85.25 ± 4.37	60 ± 9.19	102.75 ± 11.51	50 ± 8.84	143 ± 21.88	47.5 ± 8.29
II	<i>C. lansium</i>	100 ± 0.00	96 ± 4.00	98 ± 2.00	92 ± 8.00	96 ± 2.45	88 ± 8.00	92 ± 2.00	88 ± 8.00
	<i>C. wintersii</i>	100 ± 0.00	97 ± 2.00	96 ± 4.00	92 ± 4.06	96 ± 4.00	89 ± 6.00	92 ± 4.90	85 ± 5.00
	<i>C. trifoliata</i>	81 ± 5.29	50 ± 14.25	65.25 ± 3.86	22.5 ± 10.0	57 ± 5.65	5 ± 3.06	48.75 ± 7.77	5 ± 3.06
	<i>S. glutinosa</i>	91.75 ± 2.08	82.5 ± 3.06	86.75 ± 2.95	80 ± 5.00	81.75 ± 3.93	75 ± 6.85	89.75 ± 9.32	67.5 ± 10.16
III	<i>A. marmelos</i>	89 ± 4.67	80 ± 6.37	84 ± 4.39	67.5 ± 9.35	79.75 ± 4.53	60 ± 10.75	76 ± 4.97	57.5 ± 10.90
	<i>Citrus</i> sp.	100 ± 0.00	95 ± 1.58	100 ± 0.00	92 ± 3.39	100.0 ± 0.00	87 ± 8.15	96 ± 4.00	76 ± 7.31
	<i>H. apiculata</i>	81 ± 6.06	60 ± 7.29	61.25 ± 4.22	47.5 ± 9.19	44.75 ± 5.73	45 ± 7.5	39.5 ± 5.72	32.5 ± 7.50
	<i>A. buxifolia</i>	98 ± 1.22	96 ± 4.00	97 ± 2.00	92 ± 4.90	95 ± 2.74	88 ± 4.90	93 ± 4.64	88 ± 4.90
IV	<i>B. riedelianum</i>	75.25 ± 5.00	60 ± 6.12	43.75 ± 8.82	22.5 ± 7.29	23.75 ± 7.31	17.5 ± 5.00	16.75 ± 7.00	7.5 ± 5.00
	<i>C. edulis</i>	100 ± 0.00	96 ± 4.00	44 ± 4.00	36 ± 7.48	0	0	0	0
	<i>D. vandellianum</i>	37.5 ± 11.89	50.75 ± 2.42	17.5 ± 6.37	5.25 ± 3.36	7.5 ± 5.00	0	5 ± 5.00	0
	<i>E. febrifuga</i>	57.5 ± 6.65	20 ± 6.37	3.5 ± 3.50	0	0	0	0	0
	<i>E. leiocarpa</i>	41.5 ± 4.25	20 ± 10.16	2 ± 1.22	0	0	0	0	0
	<i>G. pentaphylla</i>	79.25 ± 8.10	12.5 ± 5.59	45.25 ± 12.13	0	34.25 ± 11.85	0	25.25 ± 9.69	0
	<i>M. stipularis</i>	41.75 ± 6.04	17.5 ± 9.35	3 ± 3.00	0	0	0	0	0
	<i>Z. rhoifolium</i>	66.5 ± 6.60	47.5 ± 10.00	10.5 ± 5.28	7.5 ± 7.50	5 ± 2.34	0	3.75 ± 2.50	0

*Average values of two experiments expressed as means ± standard errors of means (SEs) from n=5 plant species replicates.

Table S4 *Diaphorina citri* daily mortality rate on first differentiated leaves and full expanded soft leaves.

Plant species	<i>Diaphorina citri</i> daily mortality rate	
	Newly differentiated leaves	Full expanded soft leaves
<i>Citrus ×aurantium</i>	0.2250*	0.5000
<i>Citrus limonia</i>	0.3333	0.6667
<i>Citrus trifoliata</i> ‘Pomeroy’	1.7417	3.1667
<i>Citrus wintersii</i>	0.2667	0.5333
<i>Citrus</i> sp. (‘ <i>Microcitrus</i> ’)	0.2667	0.8667
<i>Atalantia buxifolia</i>	0.2333	0.5333
<i>Swinglea glutinosa</i>	0.3417	1.3333
<i>Aegle marmelos</i>	0.9083	1.5883
<i>Murraya paniculata</i>	0.6167	1.7500
<i>Bergera koenigii</i>	0.1333	0.5333
<i>Glycosmis pentaphylla</i>	2.5583	8.3333
<i>Clausena lansium</i>	0.2667	0.5333
<i>Zanthoxylum rhoifolium</i>	3.2500	5.8824
<i>Esenbeckia febrifuga</i>	6.6667	10.0000
<i>Esenbeckia leiocarpa</i>	5.8824	9.0909
<i>Metrodorea stipularis</i>	6.2500	10.0000
<i>Balfouredendron riedelianum</i>	2.7750	3.1667
<i>Helietta apiculata</i>	2.0833	2.2500
<i>Casimiroa edulis</i>	4.7619	5.8824
<i>Dictyoloma vandellianum</i>	3.1667	5.8824

*Daily mortality rate (%) = (100 - percentage of psyllids alive x days after caging)/x, where x is the maximum number of days in which psyllids remained alive in the cages. The maximum period of caging was 30 days.

CAPÍTULO 3 - Transmissão de *Candidatus Liberibacter asiaticus* por enxertia e *Diaphorina citri* em Rutaceae

RESUMO - Huanglongbing (HLB) é relatada como a doença mais devastadora dos citros por causar severas perdas na produção. Além disso, a principal bactéria associada à doença (*Candidatus Liberibacter asiaticus*) é eficientemente disseminada pelo psíldeo *Diaphorina citri*, inseto prolífico e com ampla gama de hospedeiros dentre as rutáceas. Diversas espécies desta família ocorrem em matas onde poderia estar servindo como fonte de multiplicação de CLas. Assim, visando determinar a importância das rutáceas na epidemia do HLB avaliou-se a reação de diversas espécies de rutáceas após inoculação do patógeno por meio de enxertia de tecidos infectados e uso de adultos infectivos de *D. citri*. No primeiro estudo, as plantas foram enxertadas por garfos provenientes de plantas de *Citrus ×aurantium* 'Valência' infectadas por CLas de pomares comerciais. Nas plantas em que o garfo não sobreviveu fez-se enxertia por borbúlia. No segundo estudo, inoculou-se CLas nas plantas por meio de adultos de *D. citri* infectivos, criados em plantas de *C. ×aurantium* 'Valência' infectadas por CLas. Ambos os estudos foram instalados em delineamento inteiramente casualizado e conduzidos em casa de vegetação. As plantas foram avaliadas por meio de análise qPCR das folhas e raízes, sendo as análises feitas nas folhas aos 4, 6, 8 e 12 meses após inoculação (MAI) e nas raízes aos 10 MAI. Confirmou-se a suscetibilidade da laranjeira 'Valência' em multiplicar CLas. Quando a inoculação foi por enxertia, *Citrus trifoliata* 'Pomeroy' tornou-se mais suscetível a multiplicação da bactéria e a ausência de sintomas não significa que a planta não esteja infectada por CLas. *Bergera koenigii* não multiplica CLas e *Murraya paniculata* não favorece a multiplicação de CLas tanto quanto os citros. Porém, como *B. koenigii* sua importância na epidemia de HLB não deve ser desconsiderada uma vez que são bons hospedeiros de *D. citri*. *Glycosmis pentaphylla* não é uma espécie favorável a reprodução de *D. citri* nem para multiplicação de CLas. *Zanthoxylum rhoifolium*, *Esenbeckia febrifuga*, *Esenbeckia leiocarpa*, *Metrodorea stipularis*, *Balfourodendron riedelianum* e *Dictyoloma vandellianum* ocorrem quase que exclusivamente em matas brasileiras próximas a áreas de produção comercial de citros e não apresentam risco para aumento da incidência de HLB. Com isso, acredita-se que as principais fontes de inóculo de CLas e *D. citri* são principalmente pomares de citros abandonados, mal manejados ou ainda plantas de citros existentes em fundos de quintais e chácaras sem manejo. *M. paniculata* é importante hospedeiro do vetor e portanto quando próximas de citros o problema seria o grande fluxo de psíldeos entre as plantas de *M. paniculata* e citros, infectados e saudáveis.

Palavras-chave: Citros, greening, hospedeiros, huanglongbing, qPCR

1 Introdução

A doença Huanglongbing (HLB) ou *greening* é relatada como a mais devastadora dos citros por provocar severas perdas na produção e ser muito eficientemente disseminada por inseto (Bové, 2006; da Graça, 1991). Está associada a três bactérias Gram-negativas restritas ao floema, nomeadas de *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), *C. L. americanus* (CLam) e *C. L. africanus* (CLaf), pertencentes à subdivisão α do grupo das proteobactérias (Jagoueix et al., 1994; Hocquellet et al., 1999; Sechler et al., 2009; Teixeira et al., 2005a, 2005b). As bactérias são transmitidas por meio dos insetos *Trioza erytreae*, que transmite CLaf, e *Diaphorina citri* (*D. citri*) Kuwayama, que transmite CLas e CLam (Capoor et al., 1967; Mcclean e Oberholzer, 1965; Yamamoto et al., 2006). No Brasil, estão presentes CLas e CLam (Teixeira et al., 2005a, 2005b; Coletta Filho et al., 2004) e o inseto *D. citri* (Costa Lima, 1942).

O inseto vetor foi relatado pela primeira vez no Brasil no ano de 1942 (Costa Lima, 1942). Hoje se encontra presente em todo o país e, aonde a doença está presente, tem sido o principal alvo de controle, exigindo muito rigor, envolvendo constantes aplicações de inseticidas. A doença foi relatada em 2004, aproximadamente 60 anos depois do primeiro relato do inseto, na região central do estado de São Paulo, coincidentemente no centro da principal região produtora de citros (Coletta Filho et al., 2004; Teixeira et al., 2005a, 2005b). Hoje, o HLB se encontra em mais de 400 municípios dos estados de São Paulo, Paraná e Minas Gerais. Somente em São Paulo levou à eliminação de mais de 40 milhões de plantas (CDA, 2018).

O manejo do HLB envolve (i) eliminação de plantas com sintomas da doença (principalmente mosqueado nas folhas e frutos deformados), independentemente do quanto de sintomas está presente na copa e da idade da planta, (ii) rigoroso e constante controle do inseto vetor, e (iii) plantio de mudas sadias. Para que o manejo seja bem sucedido, estas medidas devem ser aplicadas em larga escala e de forma coordenada entre produtores. A eliminação de plantas não está sendo feita da maneira recomendada pela maioria dos produtores. Ela é necessária porque não existe cura para a doença. Logo após a infecção, a bactéria se move muito

rapidamente para o sistema radicular e de lá para toda a copa (Raiol Júnior, 2017). A não eliminação de plantas doentes tem dificultado sobremaneira o manejo da doença no país que, na principal região produtora, que inclui o estado de São Paulo e sul do Triângulo Mineiro, a incidência da doença evoluiu de 7% em 2012 para 18,15% em 2018 (Fundecitrus, 2018).

O futuro da citricultura pode estar no desenvolvimento de variedades resistentes ao HLB ou repelentes ao inseto. Poderia se pensar em obter tais variedades por meio do melhoramento convencional, ou seja, com cruzamentos controlados onde se procura transferir para a progênie as características desejadas. A grande dificuldade desta estratégia está na inexistência, dentro do gênero *Citrus* ou parentais próximos como por exemplo *Poncirus* (*Citrus trifoliata*), de plantas resistentes à CLas ou repelentes ao vetor. Visando identificar essas plantas, ou seja, por meio da resposta à infecção por CLas, foi realizado esta pesquisa que teve por objetivo avaliar a reação de diversas espécies de rutáceas após inoculação do patógeno por meio de enxertia de tecidos infectados e uso de adultos infectivos de *D. citri*.

2 Material e métodos

2.1 Plantas e condições de crescimento

Utilizou-se plantas de 1 a 2,5 anos de idade, as quais foram classificadas com base em Swingle & Reece (1967), Mabberley (1997, 1998, 2004), Zhang et al. (2008), Bayer et al. (2009), Kubitzki et al. (2011), Morton & Telmer (2014) e Christenhusz et al. (2017), como indicado na Tabela 1 (Capítulo 2). *Aegle marmelos* e *Glycosmis pentaphylla* originaram de sementes coletadas na Estação Experimental de Citricultura, localizada em Bebedouro, SP. *Balfourodendron riedelianum*, *Dictyoloma vandellianum*, *Esenbeckia febrifuga*, *Esenbeckia leiocarpa*, *Heliotta apiculata*, *Metrodorea stipularis* e *Zanthoxylum rhoifolium* também se originaram de sementes, mas de várias regiões do Estado de São Paulo e comercializadas pelo Viveiro Camará em Ibaté, SP. *Bergera koenigii*, *Murraya paniculata*, *Citrus limonia* e *Swinglea glutinosa* foram obtidas de sementes de planta mantidas em viveiros comerciais ou no

Fundecitrus (Araraquara, SP). *Citrus trifoliata* 'Pomeroy' e *Citrus ×aurantium* 'Valência' eram plantas nucleares originadas de sementes no Fundecitrus, e *Citrus wintersii*, *Citrus* sp. ('*Microcitrus*') e *Atalantia buxifolia* foram cedidas pela Embrapa Mandioca e Fruticultura (Cruz das Almas, BA). Uma única gema das últimas quatro espécies foi enxertado em plantas individuais de limoeiro Cravo com seis meses de idade (Figura A1).

Todas as plantas foram transferidas para vasos de 4,5 L contendo substrato composto por 80% de casca de pinheiro, 15% de vermiculita e 5% de carvão, pH 6,8, quatro meses antes do início dos experimentos. As plantas foram irrigadas com água conforme necessário e suplementadas semanalmente com uma solução nutritiva contendo, em miligramas por litro, 181,5 N-NO₃⁻, 12,0 N-NH₄⁺, 23,1 P-H₂PO₄⁻, 54,0 K⁺, 229,0 Ca²⁺, 40,0 Mg²⁺, 52,0 S-SO₄⁻, 1,4 Zn²⁺, 2,18 Cu²⁺, 0,98 Mn²⁺, 4,5 Fe²⁺, 0,22 Mo-MoO₄²⁻ e 0,61 B. Para os micronutrientes catiônicos, foram utilizadas fontes quelatadas de EDTA, exceto Fe para o qual foi utilizado EDDHA. Todos os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação de setembro de 2016 a dezembro de 2017. Um aparelho HT-500 (Instrutherm, São Paulo, SP, Brasil) foi usado para registrar temperatura e umidade relativa a cada hora no interior da casa de vegetação.

2.2 Transmissão de *Candidatus Liberibacter asiaticus* por enxertia

As plantas foram enxertadas por garfos provenientes de plantas de *Citrus ×aurantium* 'Valência' infectadas por CLas de pomares comerciais. Os garfos tinham aproximadamente de 10 a 15 cm de comprimento. A escolha das plantas infectadas com CLas foi feita primeiramente por meio da observação de sintomas foliares e posteriormente pela comprovação da presença da bactéria com o uso de qPCR (PCR quantitativa em tempo real). Inicialmente, tentou-se inoculação por meio de garfagem de topo em fenda cheia. Nas plantas nas quais o garfo não sobreviveu e em laranja 'Valência' (controle), enxertou-se borbulhas na parte superior do caule, conforme indicado na Figura 5 (Lopes e Frare, 2008). Quatro, seis e oito meses após a inoculação (MAI), amostras foliares (3 a 5 folhas maduras por planta que surgiram após a enxertia) foram coletadas e, após extração de DNA (Murray e Thompson, 1980) analisadas por qPCR (Li et al., 2006). Aos 10 MAI, amostras de cascas foram retirados

do garfo ou borbulha, processados e também analisados por qPCR para saber se de fato continham CLas. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em casa de vegetação de outubro de 2016 a novembro de 2017. Neste período a temperatura média do ar foi de 23,3°C (máx. 39,3°C; mín. 6,5°C) e a umidade relativa de 70,0% (máx. 95,4%; mín. 16,1%).

2.2.1 Aquisição de *Candidatus Liberibacter asiaticus* por *Diaphorina citri*

As plantas também foram avaliadas quanto ao potencial que representavam como fontes de células de CLas adquiridas por ninfas de *D. citri*. Para a geração de ninfas um grupo de 50 adultos de *D. citri* foi transferido para plantas de murta sadias e mantidas em casa de vegetação sob temperatura média de 20,8°C (máx. 35,1°C; mín. 9,4°C) e umidade relativa de 63,7% (máx. 95,0%; mín. 19,0%). Os adultos foram mantidos nas plantas por 7 dias para oviposição. Após esse período, os adultos foram removidos e as plantas foram observadas até a eclosão de ninfas. Com o auxílio de um pincel foram transferidas para brotos tenros das espécies que tiveram os inóculos (garfo ou borbulha) removidos (um broto por planta), 10 ninfas de 3° e 4° ínstaes (Figura 1).

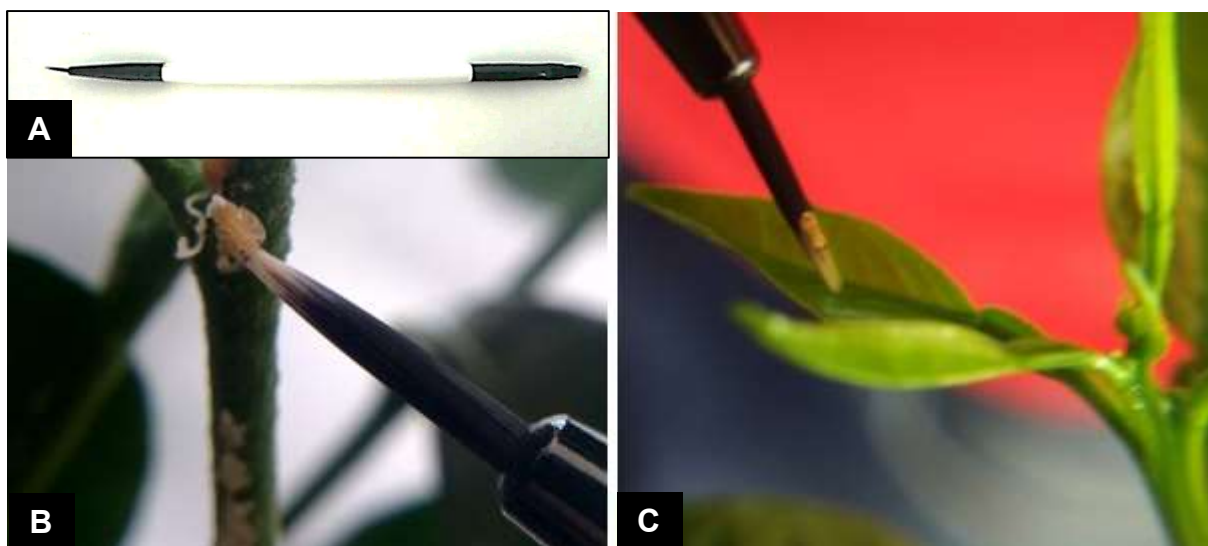


Figura 1. Imagens ilustrativas demonstrando a transferência, com auxílio de um pincel (A), de ninfas de *Diaphorina citri* de ramo de planta de *Murraya paniculata* (B) para broto jovem de *Citrus xaurantium* 'Valência' (C).

O experimento foi conduzido em casa de vegetação em delineamento inteiramente casualizado, no mês de setembro de 2017. Plantas e insetos foram expostos a temperatura média de 24,0°C (máx. 35,3°C; mín. 11,4°C) e umidade relativa de 48,5% (máx. 91,9%; mín. 16,1%). Os adultos emergidos foram analisados por qPCR (Li et al., 2006). Dois meses após remoção do inóculo foram coletadas amostras de raízes (5 g por planta) e analisadas por qPCR. Também foram analisadas por qPCR, aos 4 meses, amostras de folhas maduras que surgiram após a retirada do inóculo.

2.3 Transmissão de *Candidatus Liberibacter asiaticus* por *Diaphorina citri*

Insetos com 14 dias após emergência (os quais haviam sido criados em plantas de murta sadias conforme indicado) foram transferidos e confinados por sete dias em plantas doentes de laranjeira 'Valência' que apresentavam brotação adequada para oviposição (estádios v2 e v3, Cifuentes-Arenas et al., 2018). Adultos emergidos com aproximadamente 20 DAE foram avaliados por qPCR (amostra de 15 adultos) e usados no experimento. Foram confinados por sete dias cinco adultos portadores de CLas em um único broto de cada espécie. Durante o período de criação dos insetos a temperatura média foi 26,7°C (máx. 40,3°C; mín. 18,0°C) e umidade relativa de 70,7% (máx. 90,3%; mín. 35,3%) e durante o período de inoculação a temperatura média foi 24,9°C (máx. 39,2°C; mín. 18,0°C) e umidade relativa de 70,7% (máx. 89,6%; mín. 36,7%).

2.4 Extração de DNA

Para a extração do DNA das amostras foi usado o método CTAB (Murray e Thompson, 1980). As amostras de folhas, cascas e raízes novas foram lavadas com esponja, detergente neutro e secas com papel toalha. Em seguida foram picadas 0,5 g da nervura central e pecíolo e 0,3 g de raízes. O material picado foi colocado em saco plástico com 3 mL de tampão de extração contendo CTAB + 0,2% de β -mercaptoetanol e macerado no equipamento Homex. Em seguida, o extrato foi transferido para microtubos plásticos de capacidade de 2 mL e incubado a 65°C por

30 minutos, com uma agitação de inversão aos 15 minutos de incubação. As etapas de extração seguiram o protocolo descrito por Murray e Thompson (1980), a qual finaliza-se com o DNA extraído ressuspendido em 50 μL de H_2O ultrapura (Milli-Q) autoclavada.

Para a extração de DNA de *D. citri*, os insetos foram agrupados em lotes de cinco indivíduos, em seguida macerados com auxílio de um pistilo, diretamente em tubos de 1,5 mL com 400 μL de tampão CTAB, incubados a 65°C por 30 min e centrifugados a 960 g por 5 min. As etapas de extração seguiram protocolo (Murray e Thompson (1980), o qual finaliza-se com a formação do precipitado (“pellet”) de DNA dissolvido em 30 μL de H_2O ultrapura (Milli-Q) autoclavada.

2.5 Detecção de *Candidatus Liberibacter asiaticus*

O DNA extraído foi quantificado e ajustado à concentração de 100 ng μL^{-1} . Para a análise do DNA de folhas, cascas e raízes, o volume final (12 μL) continha 3 μL de DNA e 150 nM dos primers e sonda HLBspr. Para a análise do DNA de insetos o volume final (12 μL) continha 3 μL de DNA e 6 μL de Path ID Master Mix (Li et al., 2006). Todas as amostras e controles positivos (DNA genômico de amostras positivas para CLas) e negativos (amostras sem o DNA da bactéria) foram amplificados em termociclador StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems). O ponto que detecta o ciclo no qual a reação atinge o “threshold line” da fase exponencial é denominado “Cycle Threshold” (C_T), ponto que permite estimar a quantidade de ciclos que a amostra demorou para acumular fluorescência. Foram consideradas positivas somente amostras que apresentaram C_T menor ou igual a 34,0.

3 Resultados

3.1 Transmissão por enxertia

Quatro meses após enxertia 80% dos garfos de laranjeira ‘Valência’ sobre *Citrus trifoliata* ‘Pomeroy’, 60% em *Glycosmis pentaphylla*, 50% em *Aegle marmelos*, 30% em *Citrus ×aurantium* ‘Valência’, *Esenbeckia leiocarpa* e *Murraya paniculata*,

20% em *Swinglea glutinosa* e *Bergera koenigii* e 10% em *Balfourodendron riedelianum* estavam vivos. A sobrevivência caiu no decorrer dos 14 meses de avaliação do experimento, com alguns novos garfos vindo a sucumbir. Nas espécies enxertadas por borbulha a sobrevivência da borbulha foi de 50% em *Citrus ×aurantium* 'Valência', *Citrus wintersii* e *Atalantia buxifolia*. Diferentemente da garfagem, na enxertia por borbulha não houve morte do inóculo (tecido com a bactéria) mas sim morte de uma planta de cada espécie (Tabela 1).

Dos garfos usados como inóculo houve emissão de brotos naqueles enxertados em *Citrus ×aurantium* 'Valência', *Citrus trifoliata* 'Pomeroy', *Aegle marmelos*, *Murraya paniculata*, *Bergera koenigii*, *Swinglea glutinosa* e *Glycosmis pentaphylla* (Figura 3). Os novos brotos permaneceram viáveis em todas as espécies, exceto em *B. koenigii*, *M. paniculata* e *S. glutinosa*. Em *B. koenigii* os brotos perderam as folhas e o garfo morreu. Em *M. paniculata* e *S. glutinosa* as folhas caíram, mas o garfo sobreviveu até o fim das avaliações.

Independentemente do tipo de enxertia e tecido enxertado (garfo ou borbulha) os menores C_{Ts} foram observados em *Citrus ×aurantium* aos 4, 6 e 8 MAI, variando de 19,8 a 22,7. Até o 8º MAI todas as plantas de *C. ×aurantium* e *Citrus trifoliata* se apresentavam positivas a CLas. Em *Citrus wintersii* foram encontrados C_{Ts} médios de 29,9, 27,6 e 27,9 aos 4, 6 e 8 MAI, respectivamente. Em *Atalantia buxifolia*, 20%, 50% e 75% das plantas estavam infectadas com CLas aos 4 (C_T médio de 23,9), 6 (23,5) e 8 (25,6) MAI, respectivamente (Figura 5). Nesse mesmo período, em *Murraya paniculata* a qPCR resultou em C_T acima de 30,0 (31,5 a 32,5) (Figura 2). Já em *Glycosmis pentaphylla* CLas foi detectado apenas no 8º MAI com C_T médio de 33,5 (Tabela 1).

Dez meses após a inoculação, CLas estava presente em todos os tecidos usados na enxertia, com valores de C_T variando de 21,1 a 24,9. Ninfas foram transferidas nos brotos que surgiram nas plantas inoculadas após a remoção do inóculo. Após a remoção do garfo, CLas esteve presente somente em adultos de *D. citri* que emergiram em brotos de *Citrus ×aurantium* e *Citrus trifoliata*, em 100% e 75% dos lotes de insetos, com C_T médio de 20,9 e 29,4, respectivamente. Após a remoção da borbulha, CLas esteve presente somente em adultos de *D. citri* que emergiram em brotos de *C. ×aurantium* (100% de aquisição), *Citrus wintersii* (75%) e *Atalantia*

buxifolia (50%), com valores médios de C_T de 26,4, 31,4 e 30,0, respectivamente. Em *Esenbeckia leiocarpa* as ninfas morreram e conseqüentemente não houve emergência de adultos.

Em raízes, no 12º MAI CLas foi detectada em *Citrus ×aurantium* (C_T 21,7 a 22,9), *Citrus trifoliata* (23,5), *Citrus wintersii* (25,8), *Atalantia buxifolia* (27,6), *Murraya paniculata* (28,7), *Aegle marmelos* (30,9), *Glycosmis pentaphylla* (32,7) e *Esenbeckia leiocarpa* (33,6) (Figuras 4 e 6).

Aos 14 MAI foi feita uma última avaliação das folhas que surgiram e amadureceram após a remoção do inóculo. CLas foi detectada em seis das onze espécies. Em *Citrus ×aurantium* foram novamente encontrados os menores valores de C_T (21,5 – 22,3), seguidos de *Atalantia buxifolia* (23,5), *Citrus trifoliata* (24,9) e *Citrus wintersii* (29,9). *Murraya paniculata* e *Glycosmis pentaphylla* apresentaram C_{Ts} >30,0 (32,7 e 32,9, respectivamente). Em *G. pentaphylla*, CLas foi encontrada na raiz de apenas uma das seis plantas inoculadas.



Figura 2. Sintomas foliares de huanglongbing (mosqueado) em *Murraya paniculata* inoculada com *Candidatus Liberibacter asiaticus* por enxertia (garfagem de topo de fenda cheia).

Tabela 1. Presença da bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus* determinada por valores de “Cycle threshold” (C_T) após reação de PCR quantitativa em amostras de plantas de diversas rutáceas, após variados períodos da data de inoculação das plantas, por meio de enxertia de garfos (garfagem) ou borbulha (borbulhia) oriundos de plantas de *Citrus ×aurantium* ‘Valência’ sintomáticas e qPCR positivas para CLas.

Espécies	Folha				Inóculo**	<i>D. citri</i> ***	Raiz	Folha						
	----- Meses após inoculação -----				----- Meses após remoção do inóculo -----									
	4		6		8		10		2		2		4	
	Garfagem													
	n*	C _T (n) [†]	n	C _T (n)	n	C _T (n)	n	C _T (n)	n	C _T (n)	n	C _T (n)	n	C _T (n)
<i>C. ×aurantium</i> 'Valência'	3	19,8 (3)	2	20,9 (2)	2	20,6 (2)	2	21,2 (2)	2	20,9 (2)	2	21,7 (2)	2	21,5 (2)
<i>C. trifoliata</i> 'Pomeroy'	8	24,2 (7)	5	26,2 (5)	3	25,2 (3)	8	22,8 (8)	8	29,4 (6)	8	23,5 (7)	8	24,9 (8)
<i>Swinglea glutinosa</i>	2	29,8 (1)	2	30,2 (2)	2	31,2 (1)	2	22,8 (2)	2	-	2	-	2	-
<i>Aegle marmelos</i>	5	- ^{††}	5	-	4	-	3	21,1 (3)	1	-	3	30,9 (1)	1	-
<i>Murraya paniculata</i>	3	31,5 (3)	3	32,0 (3)	3	32,5 (2)	3	22,1 (3)	3	-	3	28,7 (2)	3	32,7 (2)
<i>Bergera koenigii</i>	2	-	2	-	2	-	0	-	0	-	0	-	0	-
<i>Glycosmis pentaphylla</i>	6	-	6	-	6	33,5 (4)	5	23,2 (5)	6	-	6	32,7 (2)	6	32,9 (1)
<i>Esenbeckia leiocarpa</i>	3	-	3	33,7 (1)	3	-	0	-	3	-	3	33,6 (1)	0	-
<i>B. riedelianum</i>	1	-	1	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
	Borbulhia													
<i>C. ×aurantium</i> 'Valência'	5	22,7 (5)	5	21,5 (5)	5	21,6 (5)	4	22,7 (4)	4	26,4 (4)	4	22,9 (4)	4	22,3 (4)
<i>Citrus wintersii</i>	5	29,9 (3)	5	27,6 (4)	4	27,9 (4)	4	24,9 (4)	4	31,4 (3)	4	25,8 (3)	4	29,9 (4)
<i>Atalantia buxifolia</i>	5	23,9 (1)	4	23,5 (2)	4	25,6 (3)	4	23,6 (4)	4	30,0 (2)	4	27,6 (4)	4	23,5 (3)

*Número de repetições (plantas) nas quais o enxerto sobreviveu;

** C_T do garfo ou borbulha removidos aos 10 meses após inoculação;

*** C_T dos adultos de *Diaphorina citri* emergidos de ninfas aprisionadas em brotos que surgiram nas plantas inoculadas;

[†]Número de repetições com $C_T \leq 34,0$;

^{††} $C_T > 34,0$ ou C_T indeterminado.

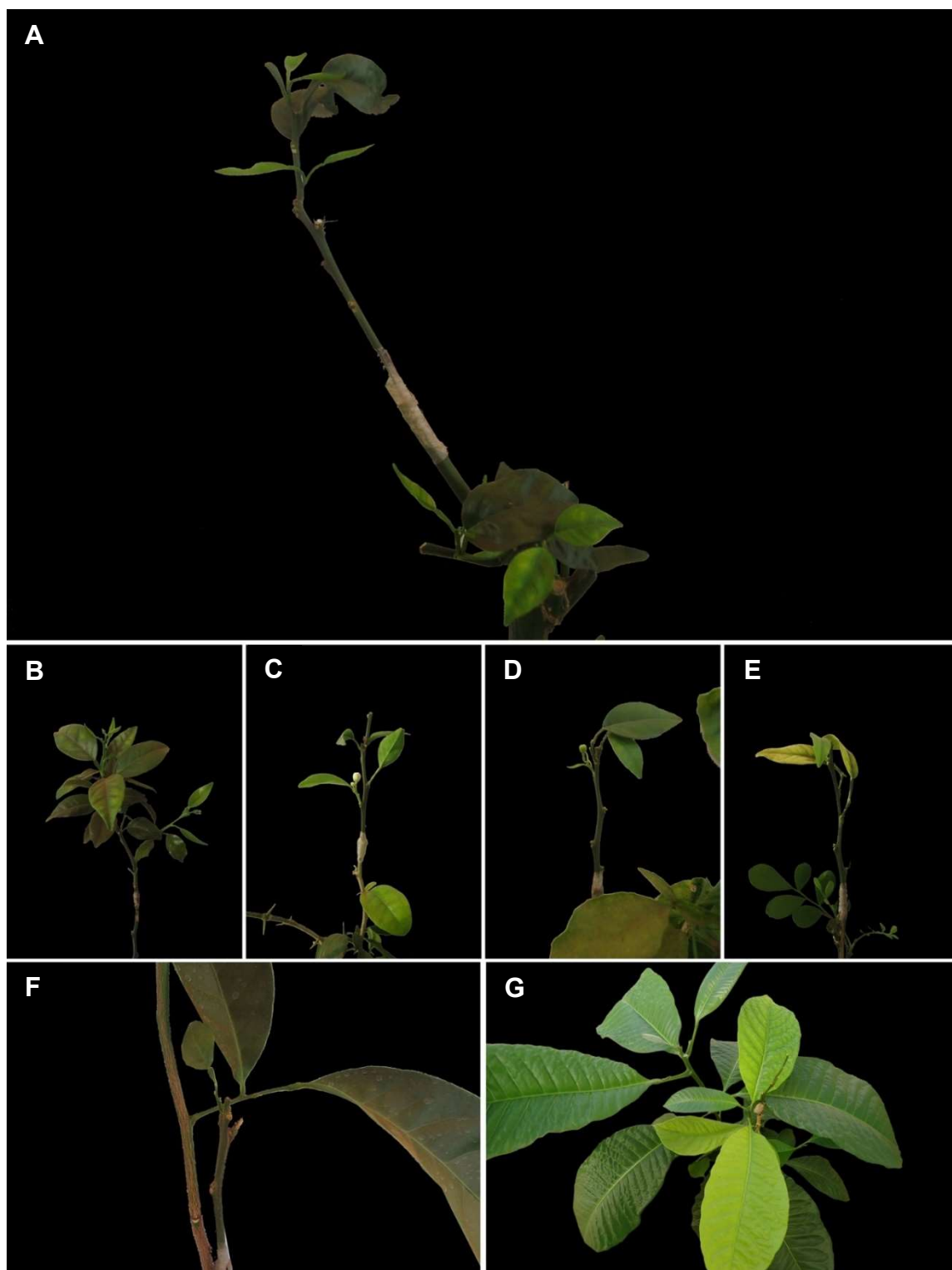


Figura 3. Sintomas foliares de huanglongbing (mosqueado) em garfos de *Citrus xaurantium* 'Valência' enxertados em laranjeira 'Valência' (A), *Citrus trifoliata* 'Pomeroy' (B), *Swinglea glutinosa* (C), *Aegle marmelos* (D), *Murraya paniculata* (E) e *Glycosmis pentaphylla* (F). *Esenbeckia leiocarpa* com sintomas foliares de huanglongbing (mosqueado) aos seis meses após inoculação com a presença de garfo sem brotação (G).

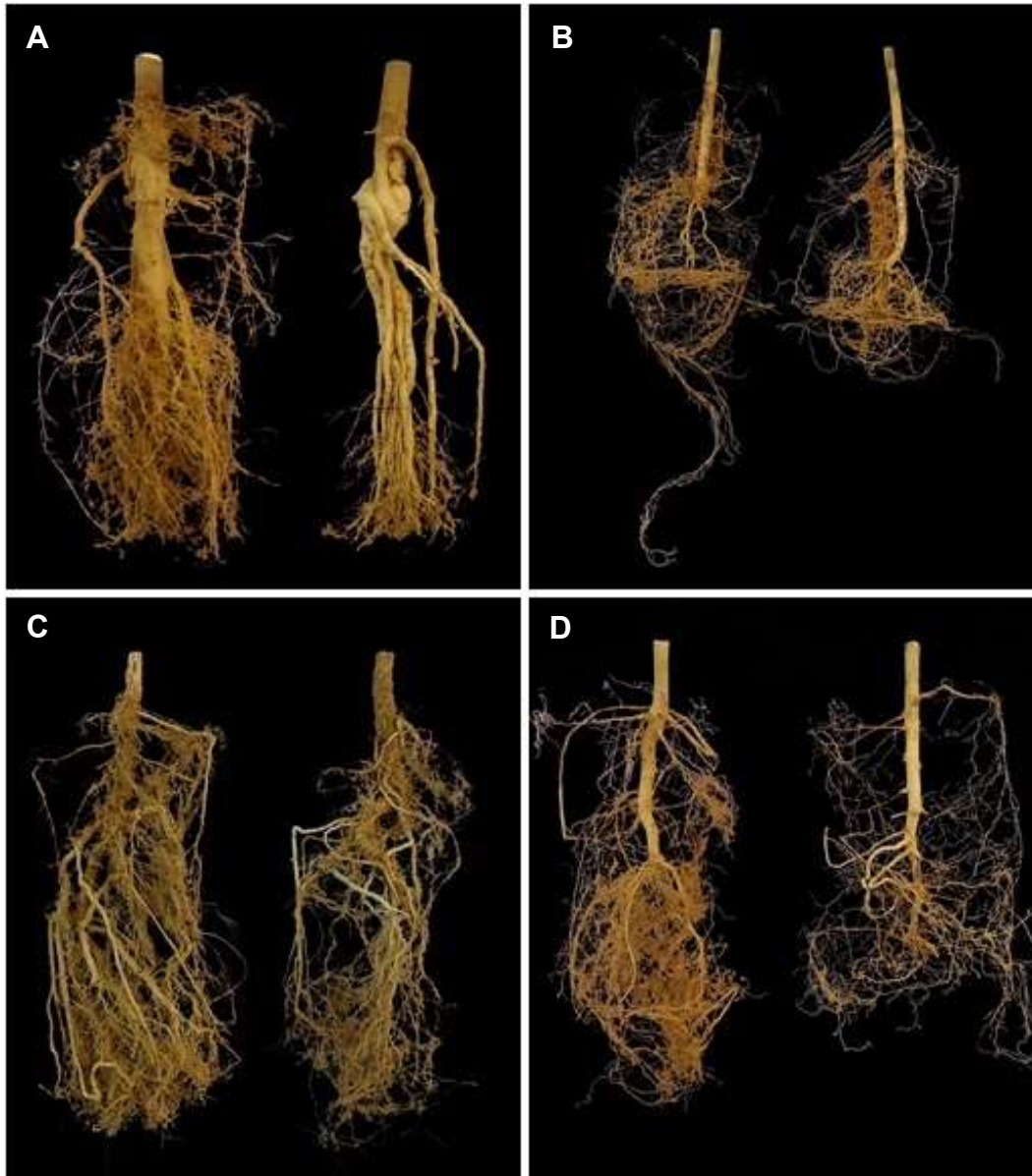


Figura 4. Raízes saudáveis (esquerda) e infectadas (direita) com *Candidatus Liberibacter asiaticus*, inoculada por meio de garfos infectivos de 'Valência', de limoeiro 'Cravo' com copa de laranjeira 'Valência' (A), *Citrus trifoliata* 'Pomeroy' (B), *Aegle marmelos* (C) e *Murraya paniculata* (D).

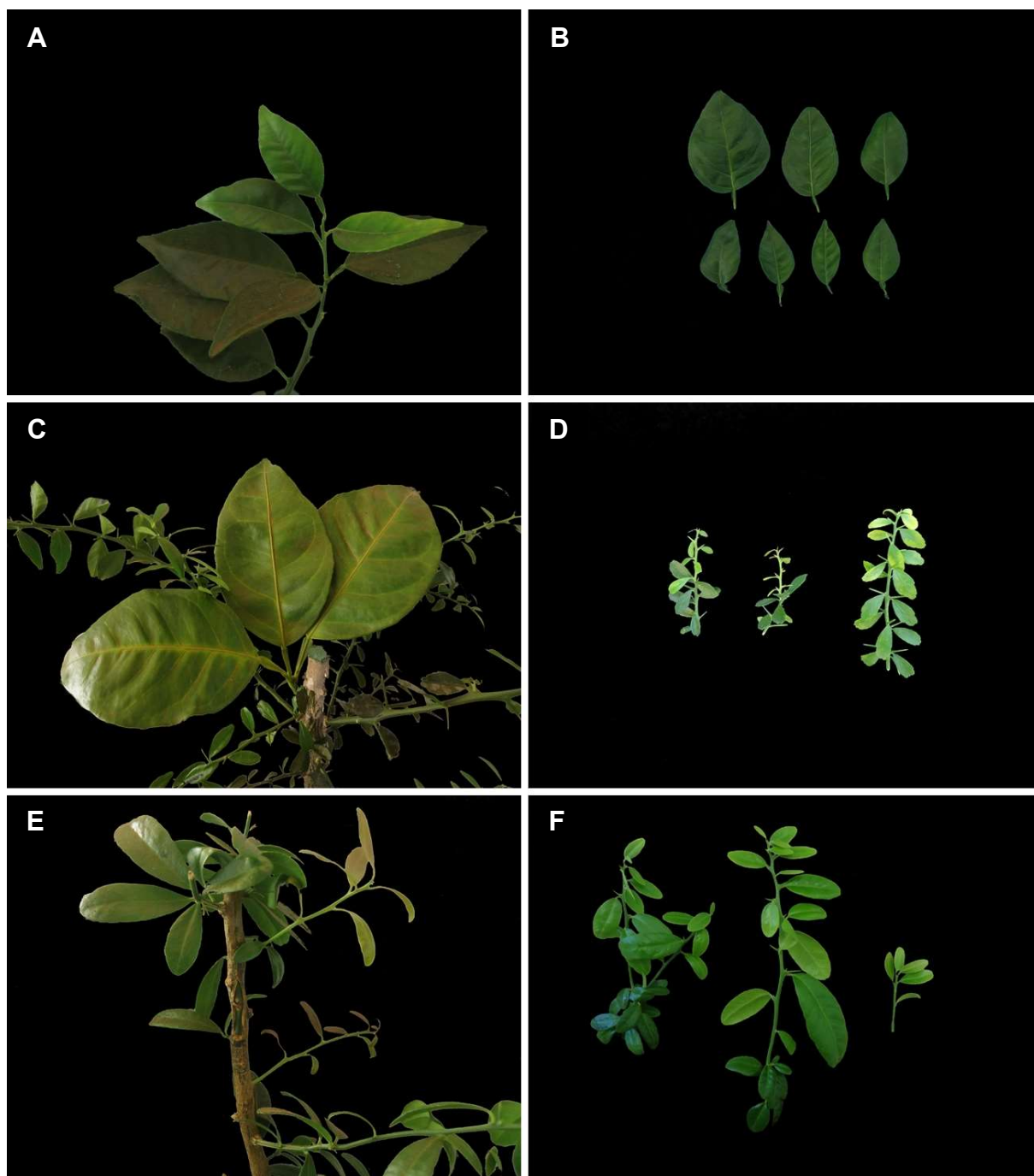


Figura 5. Sintomas foliares de huanglongbing (mosqueado) em folhas que surgiram de borbulhas infectivas de *Citrus ×aurantium* ('Valência') enxertados em laranjeira 'Valência' (A) e *Citrus wintersii* (C). *Atalantia buxifolia* com borbulha infectiva de 'Valência' sem brotação (E). Folhas com sintomas de HLB de 'Valência' (B), *C. wintersii* (D) e *A. buxifolia* (F) provenientes de plantas inoculadas com *Candidatus Liberibacter asiaticus* por borbulha.

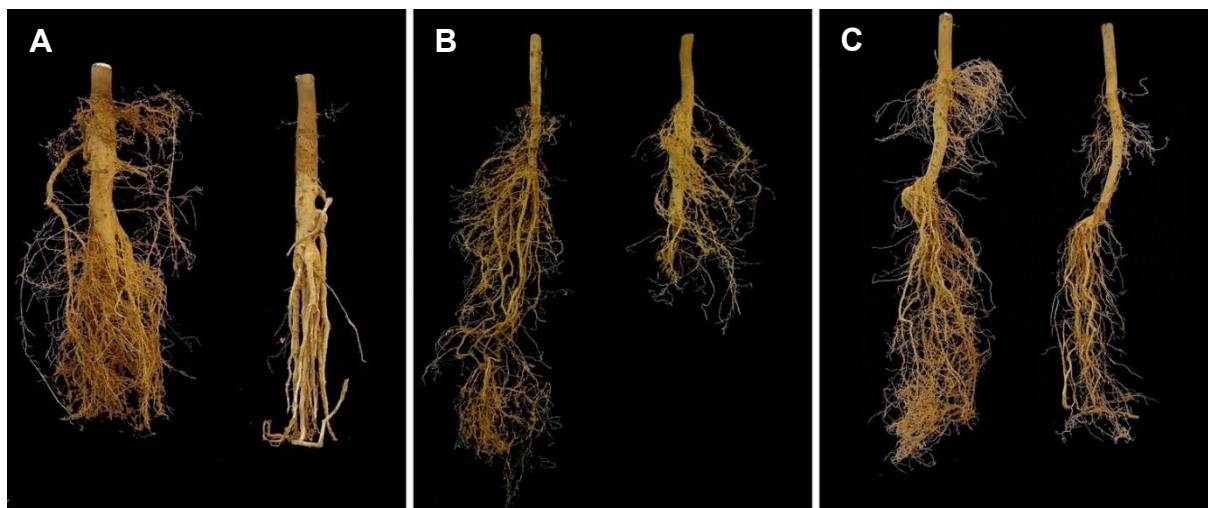


Figura 6. Raízes saudáveis (esquerda) e infectadas (direita) com *Candidatus Liberibacter asiaticus*, inoculada por meio de borbulhas infectivas de 'Valência', de limoeiro 'Cravo' com copa de laranjeira 'Valência' (A), *Citrus wintersii* (B) e *Atalantia buxifolia* (C).

3.2 Transmissão por inseto

Os adultos de *D. citri* utilizados na transmissão estavam com C_T médio de 20,9. Aos 4 MAI todas as plantas de *Citrus ×aurantium* 'Valência' já continham CLas nas folhas, com C_T médio de 26,3, seguidas de 75% das de *Murraya paniculata* (C_T 32,1), 50% de *Citrus limonia* (C_T 25,5), 43% de *Aegle marmelos* (C_T 24,9), 25% de *Dictyoloma vandellianum* (C_T 32,5) e 12,5% de *Citrus trifoliata* (C_T 24,1) (Figura 7 e 8). Nas espécies do gênero *Esenbeckia*, CLas foi detectada no 6º MAI (C_{Ts} 33,4 e 33,2). CLas não foi detectada em nenhuma amostra de folha das plantas de *Bergera koenigii* e *Balfourodendron riedelianum*.

No 10º MAI CLas foi detectada na raiz, em respectivas porcentagens e C_{Ts} de 50 e 27,8 em *Citrus ×aurantium* 'Valência', 40 e 31,1 em *Aegle marmelos*, 37,5 e 25,0 em *Citrus limonia*, 25 e 29,1 em *Citrus trifoliata* 'Pomeroy', 25 e 24,9 em *Citrus* sp. 'Microcitrus', 25 e 31,8 em *Murraya paniculata*, 12,5 e 26,2 em *Zanthoxylum rhoifolium*, 12,5 e 32,9 em *Dictyoloma vandellianum* (Figura 9). CLas não foi detectada em nenhuma amostra de raiz das plantas de *Bergera koenigii*, *Esenbeckia febrifuga*, *Esenbeckia leiocarpa* e *Balfourodendron riedelianum*.

Tabela 2. Presença da bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus* determinada por valores de “Cycle threshold” (C_T) após reação de PCR quantitativa em amostras de plantas de diversas rutáceas, após variados períodos da data de inoculação das plantas, por meio de insetos infectivos.

Espécies	Folha								Raiz	
	4		6		8		12		10	
	----- Meses após inoculação por <i>Diaphorina citri</i> -----									
	n*	C _T (n) [†]	n	C _T (n)	n	C _T (n)	n	C _T (n)	n	C _T (n)
<i>Citrus ×aurantium</i> 'Valência'	8	26,3 (8)	8	24,1 (5)	8	19,5 (4)	8	24,2 (5)	8	27,8 (4)
<i>Citrus limonia</i>	8	25,5 (4)	8	24,0 (4)	8	23,5 (3)	8	24,7 (3)	8	25,0 (3)
<i>Citrus trifoliata</i> 'Pomeroi'	8	24,1 (1)	8	26,5 (2)	8	23,8 (1)	8	27,6 (1)	8	29,1 (2)
<i>Citrus</i> sp. (' <i>Microcitrus</i> ')	4	- ^{††}	4	-	4	-	4	-	4	24,9 (1)
<i>Aegle marmelos</i>	7	24,9 (3)	5	28,8 (1)	6	26,5 (2)	5	-	5	31,1 (2)
<i>Murraya paniculata</i>	8	32,1 (6)	8	33,0 (2)	8	-	8	32,3 (1)	8	31,8 (2)
<i>Bergera koenigii</i>	8	-	8	-	8	-	8	-	8	-
<i>Zanthoxylum rhoifolium</i>	8	-	8	-	8	-	8	-	8	26,2 (1)
<i>Esenbeckia febrifuga</i>	7	-	6	33,4 (2)	7	-	7	-	7	-
<i>Esenbeckia leiocarpa</i>	8	-	8	33,2 (1)	8	-	8	-	8	-
<i>Balfourodendron riedelianum</i>	8	-	8	-	8	-	8	-	8	-
<i>Dictyoloma vandellianum</i>	8	32,5 (2)	8	-	8	-	8	-	8	32,9 (1)

*Número de repetições (plantas) avaliadas;

[†]Número de repetições com C_T ≤ 34;

^{††}C_T > 34,0 ou C_T indeterminado.



Figura 7. Sintomas foliares de huanglongbing (mosqueado) em folhas de *Citrus ×aurantium* 'Valência' (A), *Citrus limonia* (B) e *Citrus trifoliata* 'Pomeroy' (C) aos oito meses após inoculação por inseto.

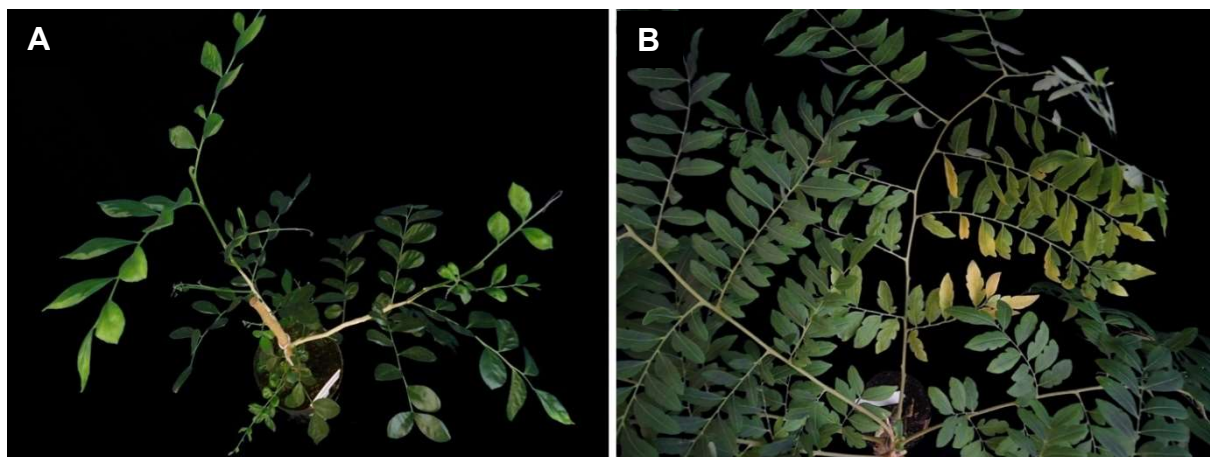


Figura 8. Sintomas foliares de huanglongbing (mosqueado) em folhas de *Murraya paniculata* (A) e *Dictyoloma vandellianum* (B) aos doze e quatro meses após inoculação por inseto, respectivamente.



Figura 9. Raízes sadias (esquerda) e infectadas (direita) com *Candidatus Liberibacter asiaticus*, inoculada por insetos, de limoeiro 'Cravo' com copa de laranja 'Valência' (A), *Citrus limonia* (B), *Citrus trifoliata* 'Pomeroy' (C), *Aegle marmelos* (D) e *Murraya paniculata* (E).

4 Discussão

Neste estudo foram avaliadas 18 espécies de plantas pertencentes a família Rutaceae quanto à compatibilidade com *Citrus ×aurantium*, além da transmissão de CLas por enxertia e *D. citri*. Dessas, sete espécies (*Zanthoxylum rhoifolium*, *Esenbeckia febrifuga*, *Esenbeckia leiocarpa*, *Metrodorea stipularis*, *Balfourodendron*

riedelianum, *Helietta apiculata* e *Dictyoloma vandellianum*) ocorrem naturalmente em matas brasileiras próximas aos pomares de citros. As outras espécies são parentes próximos e distantes do gênero *Citrus*.

Em algumas regiões do estado de São Paulo, particularmente na região leste, *Citrus trifoliata* tem sido usada como cerca viva e bordadura de pomares comerciais. Tem também sido usada como porta-enxerto. É comum encontrar plantas de *C. trifoliata* assintomáticas ao redor de plantações de citros. Essa tolerância de *C. trifoliata* (Folimonova et al., 2009; Ramadugu et al., 2016) pode ser explicada pela menor preferência do inseto em se alimentar dessa espécie (Capítulo 2; Richardson e Hall, 2013), porém como demonstrado neste trabalho, quando a inoculação foi por enxertia *C. trifoliata* torna-se mais suscetível a multiplicação da bactéria. Ainda, a ausência de sintomas não significa que a planta não esteja infectada por CLas.

Como *Murraya paniculata*, *Bergera koenigii* é considerada hospedeira favorita de *D. citri* como confirmado no Capítulo 2 (Halbert e Manjunath, 2004; Subandiyah et al., 2008; Teck et al., 2011; Sétamou et al., 2016). No Brasil, ao contrário de *M. paniculata*, *B. koenigii* não é encontrada em áreas urbanas e rurais. Com os resultados deste trabalho pode-se afirmar que *B. koenigii* apresenta resistência a CLas (Hung et al., 2000; Ramadugu et al., 2016), portanto é uma espécie que não serve como hospedeira do patógeno. Com isso, países em que a existência de *B. koenigii* é comum não há necessidade de preocupação quanto ao impacto desse hospedeiro de *D. citri* com a multiplicação de CLas (Beloti et al., 2018). *M. paniculata* também não favorece a multiplicação de Liberibacters tanto quanto os citros (Lopes et al., 2010). Porém, como *B. koenigii* sua importância na epidemia de HLB não deve ser desconsiderada uma vez que são bons hospedeiros de *D. citri* (Lopes et al., 2010; Damsteegt et al., 2010).

Apesar de apresentar menor título bacteriano quando comparado com laranjeira 'Valência' e maior quando comparado com *M. paniculata*, *S. glutinosa* tem potencial em multiplicar CLas (Cifuentes-Arenas, 2017). Como demonstrado no Capítulo 2, *D. citri* pode reproduzir-se em plantas de *S. glutinosa*.

Citrus wintersii, *Atalantia buxifolia* e *Aegle marmelos* não são encontradas em pomares comerciais de citros. Porém, essas espécies são parentais próximas de citros e são alvo de melhoramento genético. Todavia, essas plantas apresentaram

certa suscetibilidade a infecção por CLas, sendo *C. wintersii* e *A. buxifolia* mais suscetível, e *A. marmelos* menos suscetível, quando comparado a *Citrus ×aurantium*. Ramadugu et al. (2016) classificaram *C. wintersii* e *A. marmelos* como tolerante a CLas. *A. buxifolia* é classificada como suscetível com sintomas típicos de HLB (Hung et al., 2000; Ramadugu et al., 2016). Contudo, a suscetibilidade ao vetor não pode ser subestimada. Como demonstrado no Capítulo 2, *C. wintersii* foi considerada hospedeira intermediária de *D. citri*, pois adultos sobreviveram por longo tempo nessa espécie, além de se reproduzirem. Já em *A. marmelos* e *A. buxifolia* *D. citri* não conseguiu completar o ciclo.

Glycosmis pentaphylla não é uma espécie favorável a reprodução de *D. citri* (Westbrook et al., 2011) e também é considerada imune a multiplicação de CLas por Ramadugu et al. (2016). Como demonstrado no Capítulo 2, essa espécie também não é boa hospedeira de adultos. No entanto, no presente estudo *G. pentaphylla* apresentou certa resistência a CLas ($C_T > 32$). Por ser parcialmente compatível por enxertia com algumas espécies de citros (Bowman et al., 2001), *G. pentaphylla* é alvo de transformação genética em busca de uma planta de citros comercialmente resistente ao HLB.

Zanthoxylum rhoifolium, *Esenbeckia febrifuga*, *Esenbeckia leiocarpa*, *Metrodorea stipularis*, *Balfourodendron riedelianum* e *Dictyoloma vandellianum* ocorrem quase que exclusivamente em matas brasileiras próximas a áreas de produção comercial de citros. Nessas espécies, sabe-se que *D. citri* não se reproduz ou sobrevive por muito tempo (Capítulo 2), e também confirmou-se com este estudo que essas espécies não representam risco para aumento da incidência de HLB.

Os resultados obtidos neste estudo indicam que algumas espécies da família Rutaceae, presentes em matas no Brasil, não atuam como fonte de CLas. Além disso, *Glycosmis pentaphylla*, considerada parcialmente resistente a CLas deve ser melhor compreendida, pois é uma espécie que apresenta possibilidades de ser usada em um programa de melhoramento genético de *Citrus* visando a produção de plantas resistentes ao HLB (CLas e *D. citri*).

5 Referências

- Bayer RJ, Mabberley DJ, Morton C, Miller CH, Sharma IK, Pfeil BE, Rich S, Hitchcock R, Sykes S (2009) A molecular phylogeny of the orange subfamily (Rutaceae: Aurantioideae) using nine cpDNA sequences. **American Journal of Botany** 96:668–685.
- Beloti VH, Alves GR, Coletta-Filho HD, Yamamoto PT (2018) The Asian Citrus Psyllid host *Murraya koenigii* is immune to *Citrus* huanglongbing pathogen “*Candidatus* Liberibacter asiaticus”. **Phytopathology** 108:1089–1094.
- Bové JM (2006) Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old, disease of citrus. **Journal of Plant Pathology** 88:7–37.
- Bowman KD, Shapiro JP, Lapointe SL (2001) Sources of resistance to *Diaprepes weevil* in subfamily Aurantioideae, Rutaceae. **HortScience** 33:332–336.
- Capoor SP, Rao DG, Viswanath SM (1967) *Diaphorina citri*: a vector of the greening disease of citrus in India. **Indian Journal of Agricultural Science** 37:572–576.
- CDA, Coordenadoria de Defesa Agropecuária do Estado de São Paulo. **Dados da Citricultura Paulista**. Disponível em: <<http://www.cda.sp.gov.br/www/gdsv/index.php?action=dadosCitriculturaPaulista>>. Acesso em: 26 jun. 2018.
- Christenhusz MJM, Fay MF, Chase MW (2017) **Plants of the World – An Illustrated Encyclopaedia of Vascular Plant Families**. Kew Publishing, Richmond.
- Cifuentes-Arenas JC, Goes A, Miranda MP, Beattie GAC, Lopes SA (2018) Citrus flush shoot ontogeny modulates biotic potencial of *Diaphorina citri*. **Plos One** 13:1–17.
- Colleta Filho HD, Targon MLPN, Takita MA, de Negri JD, Pompeu Júnior J, Machado MA, Amaral AM, Muller GW (2004) First report of the causal agent of Huanglongbing (“*Candidatus* Liberibacter asiaticus”) in Brazil. **Plant Disease** 88:1382–1382.
- Costa Lima AM (1942) **Insetos do Brasil: Homoptera**. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Agronomia. Série didática, 101p.

da Graça JV (1991) Citrus greening disease. **Annual Review of Phytopathology** 29:109–136.

Damsteegt VD, Postnikova EN, Stone AL, Kuhlmann M, Wilson C, Sechler A, Schaad NW, Bransky RH, Schneider WL (2010). *Murraya paniculata* and related species as potential hosts and inoculum reservoirs of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*', causal agent of Huanglongbing. **Plant Disease** 94:528–533.

FUNDECITRUS, Fundo de Defesa da Citricultura (2015) CVC e HLB: Levantamento mostra situação oposta para as duas doenças. **Revista Citricultor** 31:8–11.

FUNDECITRUS, Fundo de Defesa da Citricultura (2018) Greening atinge 18,15% das laranjeiras de SP e MG. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/noticias/integra/greening-atinge-1815-das-laranjeiras-de-sp-e-mg-maiorincidenciades-de-que-a-doenca-foi-identificada-no-brasil-em-2004/719>>. Acesso em: 23 ago. 2018.

Halbert SE, Manjunath KL (2004) Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and Greening Disease of Citrus: A literature review and assessment of risk in Florida. **Florida Entomologist** 87:330–353.

Hocquellet P, Toorawa P, Bové JM, Garnier M (1999) Detection and identification of the two *Candidatus liberobacter* species associated with citrus huanglongbing by PCR amplification of ribosomal protein genes of the β operon. **Molecular and Cellular Probes** 13:373–379.

Hung TH, Wu ML, Su HJ (2000) Identification of alternative hosts of the fastidious bacterium causing citrus greening disease. **Journal of Phytopathology** 148:321–326.

Jagoueix S, Bové JM, Garnier M (1994) The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the α subdivision of the Proteobacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology** 44:379–386.

Kubitzki K, Kallunki JA, Duretto M, Wilson PG (2011) Rutaceae. In: Kubitzki K, (Eds.) **The Families and Genera of Vascular Plants: Flowering Plants. Eudicots**. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, p. 276–356.

Li W, Hartug JS, Levy L (2006) Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus huanglongbing. **Journal of Microbiological Methods** 66:104–115.

Lopes SA, Frare GF, Camargo LEA, Wulff NA, Teixeira DC, Bassanezi RB, Beattie GAC, Ayres AJ (2010) Liberibacters associated with orange jasmine in Brazil: incidence in urban areas and relatedness to citrus liberibacters. **Plant Pathology** 59:1044–1053.

Lopes SA, Luiz FQBF, Stuchi ES (2014) Colonization and distribution patterns of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in distinct citrus rootstocks. **Journal of Citrus Pathology** 1:233.

Mcclean APD, Oberholzer PCJ (1965) Citrus psyllid, a vector of the greening disease of sweet orange. **South Africa Journal of Agricultural Science** 8:297–298.

Mabberley DJ (1997) A classification for edible *Citrus* (Rutaceae). **Telopea** 7:167–172.

Mabberley DJ (1998) Australian Citreae with notes on other Aurantioideae (Rutaceae). **Telopea** 7:333–344.

Mabberley DJ (2004) *Citrus* (Rutaceae): a review of recent advances in etymology, systematics and medical applications. **Blumea** 49:481–498.

Morton CM, Telmer C (2014) New Subfamily Classification for the Rutaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden** 99:620–641.

Murray MG, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research** 239:487–91.

Raiol Júnior LL (2017) **Translocação de Candidatus Liberibacter asiaticus em citros**. 102 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Unesp, Jaboticabal.

Ramadugu C, Keremane ML, Halbert SE, Duan YP, Roose ML, Stover E, Lee RF (2016) Long-term field evaluation reveals huanglongbing resistance in *Citrus* relatives. **Plant Disease**, 100:1858–1869.

Richardson ML, Hall DG (2013) Resistance of *Poncirus* and *Citrus* x *Poncirus* germplasm to the Asian citrus psyllid, **Crop Science**, 53:183–188.

Sechler A, Schuenzel EL, Cooke P, Donnua S, Thaveechai N, Postnikova E, Stone L, Schneider WL, Damsteegt VD, Schaad NW (2009) Cultivation of '*Candidatus*

Liberibacter asiaticus, 'Ca. *L. africanus*, and 'Ca. *L. americanus* associated with Huanglongbing. **Phytopathology** 99:480–486.

Subandiyah S, Himawan A, Joko T, Astuti IP, Holford P, Beattie GAC, Krueger R (2008) Colonization of Asiatic citrus psyllid and huanglongbing development on citrus and citrus relatives in Indonesia. In: International Research Conference on HLB. **Resumo...** Orlando, p. 393.

Swingle WT, Reece PC (1967) The botany of citrus and its wild relatives. In: Reuther W, Webber HJ, Batchelor LD **The citrus industry**. Berkeley: University of California, p. 190–430.

Teck SLC, Fatimah A, Beattie A, Heng RKJ, King WS (2011) Influence of host plant species and flush growth stage on the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama, **American Journal of Agricultural and Biological Sciences** 6:536–543.

Teixeira DC, Ayres J, Kitajima EW, Tanaka FAO, Danet L, Jagoueix-Eveillard S, Saillard C, Bové JM (2005a) First report of a Huanglongbing like disease of citrus in Sao Paulo State, Brazil and association of a new *Liberibacter* species, 'Candidatus *Liberibacter americanus*', with the disease. **Plant Disease** 89:107–107.

Teixeira DC, Saillard C, Eveillard S, Danet JL, da Costa PI, Ayres AJ, Bové JM (2005b) 'Candidatus *Liberibacter americanus*', associated with citrus huanglongbing (greening disease) in São Paulo State, Brazil. **International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology** 55:1857–1862.

Westbrook CJ, Hall DG, Stover E, Duan YP, Lee RF (2011) Colonization of Citrus and Citrus-related germplasm by *Diaphorina citri*. **HortScience** 46:997–1005.

Yamamoto PT, Felipe MR, Garbim LF, Coelho JHC, Ximenes NL, Martins EC, Leite APR, Sousa MC, Abrahao DP, Braz JD (2006) *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera Psyllidae): vector of the bacterium *Candidatus Liberibacter americanus*. In: Huanglongbing-Greening International Workshop. **Resumo...** Ribeirão Preto, p. 96.

Zhang DX, Hartley TG, Mabberley DJ (2008) Rutaceae. In: Wu Z.Y., Raven PH, Hong DY (Eds.) **Flora of China**, Vol. 11 (Oxalidaceae through Aceraceae). Beijing: Science Press, St. Louis: Missouri Botanical Garden Press. p. 51–97.

CAPÍTULO 4 - Considerações finais

Com base nos resultados obtidos neste estudo pode-se considerar que as espécies nativas estudadas pertencentes à família Rutaceae, presentes nas matas brasileiras próximas a pomares comerciais de citros, não estão contribuindo para o avanço da epidemia de huanglongbing (HLB). Com isso, acredita-se que ainda as principais fontes de inóculo de *Candidatus Liberibacter asiaticus* e *Diaphorina citri* são principalmente pomares de citros abandonados, mal manejados ou ainda plantas de citros existentes em fundos de quintais e chácaras sem manejo. Plantas ornamentais como *Murraya paniculata* é importante hospedeiro do vetor e, portanto, quando cultivadas próximas de citros o problema maior deve ser o fluxo de psílídeos entre as plantas de *M. paniculata* e citros infectados e plantas cítricas saudáveis. *Citrus trifoliata* não é favorável à reprodução e sobrevivência do inseto, porém apresenta certa importância como reservatório de CLas, uma vez que sintomas nem sempre são visualizados. E *Glycosmis pentaphylla* pode ser uma das plantas alvo da engenharia genética visando resistência ao HLB, tanto de CLas quanto de *D. citri*.

APÊNDICE

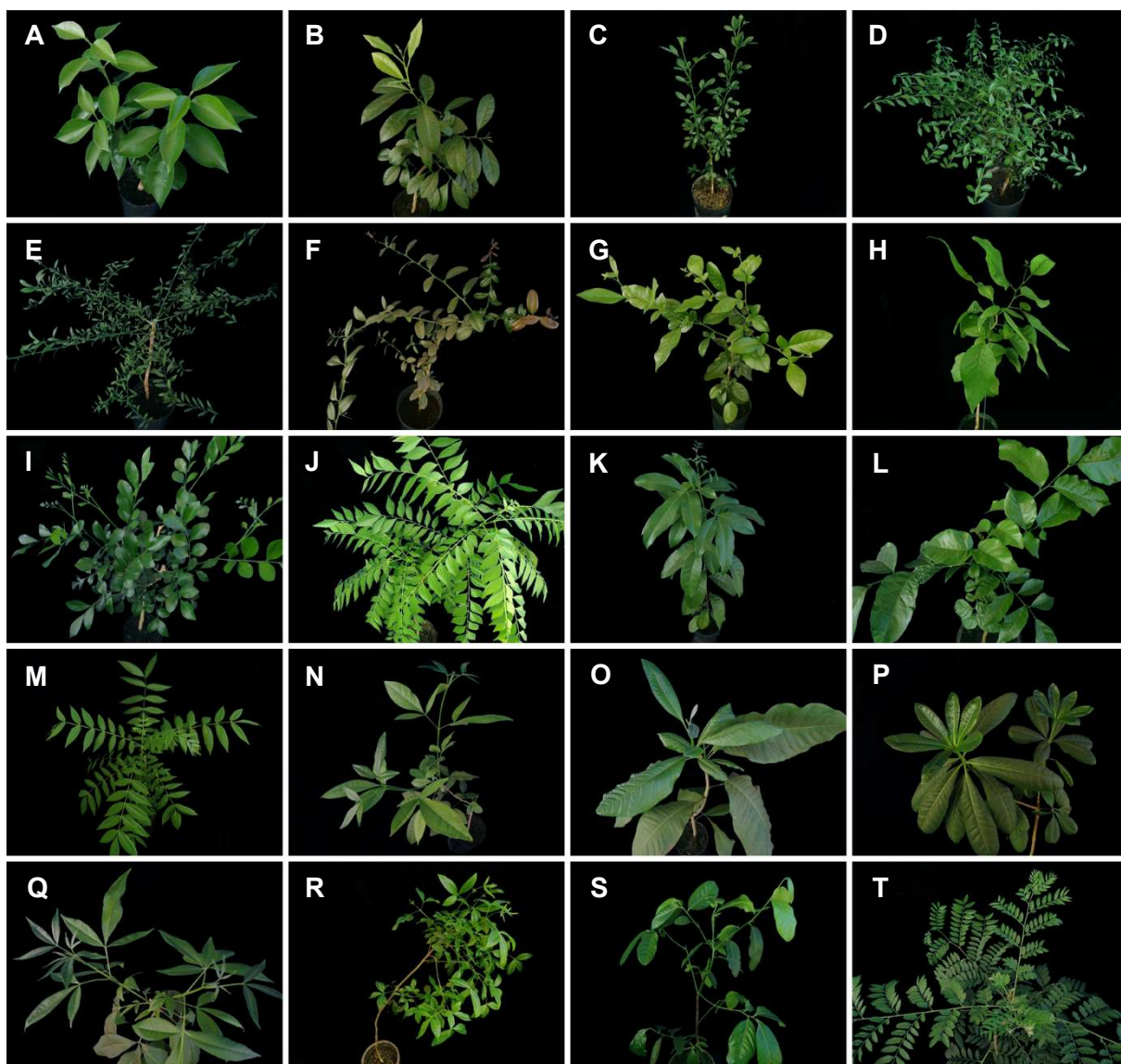


Figura A1. Imagem das espécies estudadas: *Citrus ×aurantium* 'Valência' (A), *Citrus limonia* (B), *Citrus trifoliata* 'Pomeroy' (C), *Citrus wintersii* (D), *Citrus* sp. ('*Microcitrus*') (E), *Atalantia buxifolia* (F), *Swinglea glutinosa* (G), *Aegle marmelos* (H), *Murraya paniculata* (I), *Bergera koenigii* (J), *Glycosmis pentaphylla* (K), *Clausena lansium* (L), *Zanthoxylum rhoifolium* (M), *Esenbeckia febrifuga* (N), *Esenbeckia leiocarpa* (O), *Metrodorea stipularis* (P), *Balfourodendron riedelianum* (Q), *Helietta apiculata* (R), *Casimiroa edulis* (S) e *Dictyoloma vandellianum* (T).