

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

**MULTIPLICAÇÃO DE *Diaphorina citri* E DE *Candidatus
LIBERIBACTER ASIATICUS* EM HÍBRIDOS DE CITROS
INDICADOS COMO PORTA-ENXERTO**

Ana Dulce Botelho Baia
Engenheira Agrônoma

2015

**D
I
S
S.**

/

**B
A
I
A**

**A.
D.
B.**

**2
0
1
5**

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

**MULTIPLICAÇÃO DE *Diaphorina citri* E DE *Candidatus
LIBERIBACTER ASIATICUS* EM HÍBRIDOS DE CITROS
INDICADOS COMO PORTA-ENXERTO**

Ana Dulce Botelho Baia

Orientador: Prof. Dr. Silvio Aparecido Lopes

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

2015



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: MULTIPLICAÇÃO DE *Diaphorina citri* E DE *Candidatus LIBERIBACTER ASIATICUS* EM DIFERENTES HÍBRIDOS DE CITROS USADOS COMO PORTA-ENXERTO

AUTORA: ANA DULCE BOTELHO BAIA

ORIENTADOR: Prof. Dr. SILVIO APARECIDO LOPES

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

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

Prof. Dr. NELSON ARNO WULFF
Fundo de Defesa da Citricultura / Araraquara/SP

Profa. Dra. RITA DE CASSIA PANIZZI
Departamento de Fitossanidade / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Data da realização: 03 de março de 2015.

B152m Baia, Ana Dulce Botelho
Multiplicação de *diaphorina citri* e de *candidatus liberibacter asiaticus* em híbridos de citros indicados como porta-enxerto / Ana Dulce Botelho Baia. -- Jaboticabal, 2015
xii, 54 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015
Orientador: Silvio Aparecido Lopes
Banca examinadora: Rita de Cássia Panizzi, Nelson Arno Wulff

Bibliografia

1. HLB. 2. Híbridos de porta-enxertos. 3. qPCR. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 632.9:634.3

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ANA DULCE BOTELHO BAIA – nascida em 06 de setembro de 1985 no município de Tucuruí – PA. Iniciou o curso de graduação em Engenharia Agrônômica em maio de 2007 na Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), concluindo-o em agosto de 2012. Em março de 2013 iniciou o curso de mestrado junto ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal) na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP - Jaboticabal). Foi bolsista do CNPq de março de 2013 a fevereiro de 2015.

*“Entrega o teu caminho ao Senhor; confia nele, e
ele tudo fará.”
(Salmo 37:5)*

Dedico,

Aos meus pais Sylvânia e Carlos, por todos os ensinamentos e esforços, à minha irmã querida, minha família pelo apoio incondicional, e aos meus amigos, pelo carinho, torcida e momentos de alegrias.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por todas as oportunidades que me proporcionou e por proteger e iluminar meus caminhos mesmo em tempos difíceis.

Ao meu orientador Prof. Dr. Silvio Aparecido Lopes, pela orientação, dedicação, ensinamentos, apoio e amizade.

À minha mãe que é uma guerreira e que nunca mediu esforços para me ajudar a alcançar meus objetivos.

À minha família que é a minha base, me apoiando em todos os momentos da minha vida e sempre se fazendo presente, mesmo distante.

Aos meus amigos de longa data e aos meus amigos feitos recentemente, que contribuíram para os momentos alegres e me apoiaram nos momentos difíceis.

Ao meu namorado Ezequias, pelo carinho, conselhos, amizade e por se fazer presente em todos os momentos.

Aos meus amigos do Laboratório de Fitopatologia Juan, Amanda, Juliana, Laís e Fernanda, e aos técnicos, Rosângela, Ângela e Vanderlei pelo apoio e amizade e momentos de felicidade.

Aos professores Dr. Antônio de Goes, Dra. Rita de Cássia Panizzi e Dra. Margarete Camargo, pelo espaço, confiança e todos os esforços em ajudar para o andamento desta pesquisa.

Aos meus amigos do Fundecitrus, Laudecir, Fernanda, Hermes, Haroldo, Luana, Rejane, Victória, Amanda, Leila, Priscila e todos que contribuíram de alguma forma para realização desse trabalho.

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

Ao Fundo de Defesa da Citricultura (FUNDECITRUS) pelo apoio técnico e financeiro para o desenvolvimento da pesquisa e pelas disciplinas oferecidas no curso de Mestrado Profissional da instituição que muito contribuíram para minha formação acadêmica e profissional.

À UNESP/Jaboticabal, a todos os membros, profissionais e professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal), que contribuíram para a minha formação acadêmica e profissional.

Enfim, a todos que contribuíram de alguma forma para a produção desse trabalho, o meu muito obrigada!

Sumário

RESUMO.....	II
ABSTRACT	III
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Histórico, importância e manejo do Huanglongbing.....	3
2.2. As bactérias do HLB	6
2.3. Bioecologia de <i>Diaphorina citri</i>	7
2.4. Porta-enxertos comerciais de citros	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1. Produção de seedlings	13
3.2. Criação de <i>Diaphorina citri</i>	13
3.3. Multiplicação de <i>D. citri</i> em diferentes hospedeiros	15
3.4. Inoculação por enxertia	16
3.5. Detecção e quantificação de <i>Ca. L. asiaticus</i> por qPCR.....	19
3.5.1. Extração de DNA do material vegetal	19
3.5.2. PCR quantitativo (qPCR)	20
3.6. Tratamentos, delineamento experimental e análise dos resultados	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
4.1. Multiplicação de <i>D. citri</i> em citros	21
4.2. Multiplicação de <i>Ca. L. asiaticus</i> em diferentes hospedeiros	26
5. CONCLUSÕES	32
6. REFERÊNCIAS	33

MULTIPLICAÇÃO DE *Diaphorina citri* E DE *Candidatus LIBERIBACTER ASIATICUS* EM HÍBRIDOS DE CITROS INDICADOS COMO PORTA-ENXERTO

RESUMO - Huanglongbing (HLB) ou greening é uma doença que, no Brasil, está associada às bactérias *Candidatus Liberibacter asiaticus* e a *Ca. L. americanus*, ambas transmitidas pelo inseto *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae). O HLB uma doença altamente destrutiva e de difícil controle, sendo atualmente *Ca. L. asiaticus* a mais frequentemente encontrada nos pomares. Nenhuma variedade explorada comercialmente é resistente ao patógeno ou ao inseto vetor. Visando suprir as necessidades dos produtores por porta-enxertos mais produtivos e que promovam redução no volume da copa, diversos híbridos têm sido testados para uso comercial nos últimos anos. Sobre esses novos híbridos nada se sabe sobre seu potencial em limitar o desenvolvimento da bactéria do HLB ou do inseto vetor, características que poderiam ser úteis no manejo da doença. Em vista disso, o objetivo do presente trabalho foi avaliar taxas de multiplicação de *Ca. L. asiaticus* e de *D. citri* em cinco novos híbridos indicados para uso como porta-enxertos. Para fins de comparação foram também incluídos no estudo os porta-enxertos comerciais limoeiro 'Cravo', o citrumeleiro 'Swingle', *Poncirus trifoliata*, a tangerineira 'Sunki', variedade de laranja doce 'Valência', e a planta ornamental murta (*Murraya exotica*). A multiplicação de *D. citri* foi determinada em brotos jovens sadios pela contagem diária do número de ovos, ninfas e adultos gerados do acasalamento de dois casais confinados por 72 horas ou até que ovos fossem visualizados. A multiplicação de *Ca. L. asiaticus* foi avaliada por meio de PCR quantitativo em raízes e na parte aérea das plantas seis meses após a inoculação do caule por enxertia de ramos doentes. Influência dos genótipos foi detectada tanto na multiplicação do inseto como na multiplicação da bactéria. Maior número de ovos foi encontrado no híbrido 81G513 e na laranjeira 'Valência', e menor número em *P. trifoliata*. A viabilidade das ninfas foi maior em murta e *P. trifoliata* e menor no híbrido 79AC. Menores títulos de *Ca. L. asiaticus* foram detectados nas brotações da fonte de inóculo sobre o híbrido 81G513, e no caule e raiz do citrumeleiro 'Swingle', limoeiro 'Cravo', 75AB e *P. trifoliata*. Estudos adicionais são necessários para um melhor entendimento dos resultados obtidos e para determinação se os efeitos observados nos porta-enxertos se repetem em copas de citros enxertadas sobre os mesmos.

Palavras chave: HLB, híbridos de porta-enxertos, qPCR

***Diaphorina citri* AND *Candidatus* LIBERIBACTER ASIATICUS MULTIPLICATION ON CITRUS HYBRIDS INDICATED AS ROOTSTOCK**

ABSTRACT - Huanglongbing (HLB), or greening, is a disease that in Brazil is associated to the *Candidatus* *Liberibacter asiaticus* and *Ca. Liberibacter americanus*, both transmitted by the insect *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae). HLB is a disease highly destructive and of difficult control. Nowadays *Ca. L. asiaticus* is most frequently found in citrus orchards. No commercial variety is resistant to the pathogen or insect vector. In order to satisfy grower necessity for more productive rootstocks and that promote smaller canopies to facilitate harvesting, several new hybrids have been tested for planting in the last years. For these hybrids no information exist on their potential in limiting the multiplication of the HLB bacteria or the vector, which could be used in disease management. In view of this, the objective of the present work was to evaluate multiplication rates of *Ca. L. asiaticus* and *D. citri* on five new hybrids suitable for use as rootstocks. For comparison purposes, the commercial rootstocks 'Cravo' Rangpur lime, 'Swingle' citrumelo, *Poncirus trifoliata*, and 'Sunki' mandarin, the sweet orange variety 'Valencia', and the ornamental orange jasmine *Murraya exotica* also were included in the study. *D. citri* multiplication was determined in healthy young shoots by daily counting of the number of eggs, nymphs and adults generated from two adult mating pairs, after confining them for 72 hours on the shoots or until eggs were observed. *Ca. L. asiaticus* multiplication was evaluated by quantitative PCR on the aerial part and roots of the plants, six months after stem graft inoculation. Influence of genotypes was observed on the multiplication of the insect as well as on the multiplication of the bacteria. The higher number of eggs was found on the hybrid 81G513 and on the orange 'Valencia', and the lower number of eggs on *P. trifoliata*. Nymph viability was higher on orange jasmine and *P. trifoliata* and lower on the hybrid 79AC. Smaller titers of *Ca. L. asiaticus* were detected on the flushes of the inoculum source grafted on the hybrid 81G513, and on the stem and roots of 'Swingle', 'Cravo', 75AB and *P. trifoliata*. Additional studies are needed for a better understanding of the results obtained in this work and for determining if the effects observed on the rootstocks will repeat on citrus scions grafted on them.

Keywords: HLB, rootstock hybrids, qPCR

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de citros, sendo responsável por 22% da produção total de laranja e por 52% da produção de suco (AGRIANUAL, 2014). Contudo, este cenário está ameaçado pelos sérios problemas fitossanitários que a citricultura tem enfrentado ao longo do tempo. Dentre os mais importantes da atualidade, destaca-se o ‘huanglongbing’ (HLB), popularmente conhecido como ‘greening’. O HLB é considerado a doença mais importante e destrutiva da cultura sendo já relatada nas principais áreas produtoras do Brasil e do mundo (HALBERT; MANJUNATH, 2004; SUTTON et al., 2005; GOTTWALD, 2010; BASSANEZI; MONTESINO, 2011). Sua presença nos pomares tem gerado significativas perdas de produtividade e considerável aumento nos custos de produção (DA GRAÇA, 1991; BOVÉ, 2006; GOTTWALD, 2010).

Mundialmente, o HLB está associado a três espécies de bactérias Gram-negativas (GARNIER et al., 1984; TEIXEIRA et al., 2005) pertencentes ao grupo das alfa-proteobactérias (JAGOUÉIX et al., 1994) que colonizam o floema das plantas. São denominadas de *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Ca. Liberibacter africanus* e *Ca. Liberibacter americanus* (JAGOUÉIX et al., 1994; TEIXEIRA et al., 2005). São disseminadas por insetos vetores sendo o psílídeo asiático dos citros, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae), relatado pela primeira vez no Brasil em 1942 (COSTA LIMA, 1942), o vetor de *Ca. L. asiaticus* e *Ca. L. americanus* (CAPOOR et al., 1967; YAMAMOTO et al., 2006), ambas as espécies encontradas em 2004 nos pomares brasileiros (COLETTA-FILHO et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2005), e o psílídeo africano *Trioza erythrae* (Del Guercio) (Hemiptera: Triozidae) o vetor de *Ca. Liberibacter africanus* (McCLEAN, et al., 1965).

No manejo da doença destaque deve ser dado ao inseto vetor. Apesar de em grandes populações poder danificar diretamente as plantas levando ao enrolamento das folhas engruvinhamento das brotações e morte das gemas apicais, resultado das picadas sucessivas em busca de alimento (MEAD, 1977), e interferir na atividade fotossintética da planta e prejudicar visualmente a qualidade dos frutos, resultado do crescimento de fumagina sobre os açúcares (“honeydew”) liberados durante a alimentação (WANG et al., 1996), é o fato de transmitir as bactérias do

HLB (HUNG et al., 2004) que o torna o mais temido inseto nos pomares onde o HLB já foi encontrado.

Estudos referentes à biologia de *D. citri* e à interação e transmissão da bactéria pelo inseto ainda têm produzidos resultados variáveis e contraditórios. Segundo alguns autores a aquisição da bactéria ocorre em durante 15 a 30 minutos (OBERHOLZER e HOFMEYR, 1955; CAPOOR; RAO; VISWANATH, 1974) ou 5 a 7 horas (XU et al., 1987) de alimentação na planta doente. O período de latência pode variar de 24 horas (XU et al., 1987) a 21 dias (CAPOOR; RAO; VISWANATH, 1974). Longos períodos de alimentação conferem ao inseto alta capacidade de transmitir a bactéria (DA GRAÇA, 1991). As ninfas podem adquiri-la já a partir do segundo instar, mas somente a partir do quarto e quinto instares bem como os adultos são capazes de transmitir (FLOYD; KRASS, 2006; RAYCHAUDHURI, 1972; ZHAO, 1981).

O controle da doença é baseado na prevenção da infecção o que é conseguido com o plantio de mudas saudáveis, eliminação de plantas doentes e controle do inseto vetor. A não adoção dessas medidas em escala regional tem contribuído para o avanço da doença, conforme se pode observar nos levantamentos amostrais realizados de 2004 a 2012 pelo Fundo de Defesa da Citricultura – FUNDECITRUS. A incidência de plantas com sintomas nos pomares passou de 0,58% em 2008 para 6,91% em 2012. As regiões mais afetadas são as centro e leste que em 2012 apresentaram, respectivamente, 9,9% e 14,8% das plantas sintomáticas. A preocupação com o aumento da doença inibe investimentos para ampliação da área plantada. A doença, encontrada primeiramente em São Paulo, já foi relatada também nos estados de Minas Gerais e Paraná (FUNDECITRUS, 2013).

As dificuldades de se adotar as medidas de controle citadas devem-se ao seu alto custo de execução. Melhorias na prática de manejo virão quando houver um melhor entendimento de todo o patossistema o que, por sua vez, é em parte dificultado pelo fato de que as bactérias associadas ao HLB ainda não serem facilmente cultiváveis em meio de cultura (BELASQUE Jr et al., 2009).

Conforme já mencionado, não existe total compreensão dos fatores que podem influenciar a interação entre os componentes do patossistema HLB que

incluem a planta cítrica (combinação da copa e do porta-enxerto), a bactéria *Liberibacter* e o inseto vetor. Dentre os componentes mencionados ainda não investigados a contento é o porta-enxerto que, em tese, pode estar influenciando o avanço do HLB no campo, de forma direta sobre a bactéria ou indireta sobre o inseto vetor. Neste estudo procurou-se investigar este assunto testando-se o potencial de novos híbridos indicados porta-enxerto, tanto na redução da multiplicação da bactéria do HLB como na do inseto vetor.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Histórico, importância e manejo do Huanglongbing

O huanglongbing ou HLB, também conhecido como “greening”, é considerada na atualidade como uma das doenças mais ameaçadoras dos citros em nível mundial. Foi relatada pela primeira vez no Sul da China em 1919 como a doença do ramo amarelo (“*yellow shoot disease*”) (REINKING, 1919; LIN, 1956). Na África, em 1937, uma doença com sintomas similares, mas transmitida por outra espécie de psíldeo e posteriormente demonstrada tratar-se de doença associada a uma espécie diferente de *Liberibacter*, foi descrita como “greening” (VAN DE MERWE e ANDERSON, 1937). Nas Filipinas a doença é conhecida como “mottle leaf”, na Índia como “dieback” e na Indonésia como “vein phloem degeneration”.

A doença foi relatada no continente americano em 2004, aonde se encontram os dois maiores centros produtores de laranja usados na produção de suco concentrado - o Brasil e os Estados Unidos (BOVÉ, 2006). Nos anos que se seguiram o HLB foi relatado em Cuba em 2007 (LLAUGER et al., 2008, PANTOJA et al., 2008, LUIS et al., 2009), na República Dominicana (MATOS et al., 2009) e no México (NAPPO - www.pestalert.org) em 2008, em Belize, Jamaica e Porto Rico em 2009 (International Society for Infectious Diseases - www.promedmail.org).

Desde o seu primeiro relato no Brasil em março de 2004, na região de Araraquara, Estado de São Paulo (COLLETA-FILHO et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2005) a doença já foi encontrada nas principais regiões citrícolas do Estado e também nos estados de Minas Gerais e Paraná.

No campo a identificação de plantas doentes é feita por meio da observação dos sintomas, que se iniciam como manchas amareladas assimétricas no limbo foliar que contrastam com a cor verde normal das folhas, conhecido como mosqueado. Podem ser observados também sintomas secundários, ou seja, folhas com tamanhos reduzidos e com clorose similar a deficiência de manganês, ferro e zinco (BOVÉ, 2006). As folhas de ramos sintomáticos podem apresentar-se curvadas e com nervuras mais grossas e escurecidas. Além disso, podem ocorrer floradas fora de época e intensa desfolha dos ramos afetados, progredindo por toda a planta, inclusive com seca e morte dos ponteiros (HALBERT; MANJUNATH, 2004). Os frutos de ramos sintomáticos podem apresentar-se de tamanho reduzido, assimétricos, com maturação irregular, com a região estilar mantendo-se verde, ao contrário do que ocorre com frutos de ramos saudáveis. A assimetria é determinada por meio de cortes perpendiculares ao eixo dos frutos, o que também permite a observação das sementes que, em frutos afetados, são escurecidas ou abortadas. A região do sistema vascular se apresenta de cor alaranjada (DA GRAÇA, 1991; BOVE, 2006).

Os sintomas foliares podem estar diretamente relacionados ao excessivo acúmulo de grânulos de amido com consequente rompimento dos cloroplastos (ETXEBERRIA et al., 2009). Em alguns estudos foi relatado que este excessivo acúmulo de amido poderia estar relacionado ao pequeno tamanho de *Ca. L. asiaticus* (2μ de comprimento e $0,1$ a $0,2\mu$ de diâmetro) podendo passar livremente pelas placas crivadas presentes nos elementos de tubos crivados (TANAKA et al., 2007; LAFLECHE; BOVÉ, 1970 apud TATINENE et al., 2008), formando aglomerados nessas placas impedindo o fluxo de fotoassimilados (TATINENE et al., 2008). Há alguns estudos também que relatam que o acúmulo de amido se deve a superexpressão de genes relacionados à síntese de amido e também à grande produção de calose, polímeros de alto peso molecular que podem promover a obstrução das placas crivadas. Porém, alguns pesquisadores relataram que *Ca. L. asiaticus* não pode se apresentar em forma de aglomerados nas células floemáticas e sim como células isoladas (KIM et al., 2009).

O tempo necessário para expressão dos sintomas nas plantas pode variar dependendo da forma de transmissão da bactéria. Se a infecção for feita através de

enxertia de segmentos de ramos doentes, o tempo mínimo necessário é de quatro meses (LOPES e FRARE, 2008). Se a infecção ocorrer através do inseto vetor o tempo mínimo é em geral de oito meses (HUNG et al., 2001). Este longo e variável período de incubação dificulta a detecção de plantas doentes no campo e a adoção das práticas de manejo (LOPES et al., 2006). Pesquisas indicam que esta dificuldade de detecção no campo está associada à distribuição da bactéria do HLB na copa. Mesmo sendo sistêmica, ela se distribui de forma irregular na copa e no sistema radicular (TATINENE et al., 2008; LI et al., 2009).

O HLB não provoca a morte das plantas porém, com o passar dos anos, as mesmas se tornam debilitadas e improdutivas. Em avaliações sobre o efeito da doença em diferentes regiões produtoras de citros do mundo, incluindo-se o Estado de São Paulo, observou-se que pomares adultos inteiros podem tornar-se inviáveis economicamente entre sete e dez anos após o aparecimento da primeira planta com sintomas, se medidas de controle não forem empregadas. Esse tempo é consideravelmente menor em pomares de até quatro anos (GOTTWALD et al., 2007).

Ainda não há medidas de controle totalmente efetivas e de baixo custo nem mesmo métodos curativos para a doença. Desta forma, impedir a infecção das plantas é fundamental para o controle do HLB que atualmente se baseia no plantio de mudas saudáveis, eliminação de plantas com sintomas e controle químico do inseto vetor. Tais medidas necessitam de tempo, recursos humanos e financeiros, e também da coordenação dos vários agentes envolvidos na produção de cítricos (produtores, governo e indústrias processadoras). Medidas adicionais também devem ser empregadas, quando possível, como a eliminação das plantas de murta (*Murraya exotica*), a qual foi erroneamente identificada em publicações anteriores a 2010 como *Murraya paniculata* (LOPES et al., 2010), pois é considerada hospedeira preferida de *D. citri* (HALBERT e MANJUNATH, 2004) e hospedeira de *Liberibacter* (LOPES et al., 2010; GASPAROTO, 2010).

Ainda não foram relatadas variedades comerciais, tanto usadas como copa como usadas como porta-enxerto, resistentes ao HLB, muito embora alguns autores tenham observado respostas diferenciadas de diversos genótipos quando inoculados com a bactéria. Segundo Garnier (1984) as laranjeiras doces [*Citrus*

sinensis (L.) Osbeck], as tangerineiras (*C. reticulata* Blanco) e seus híbridos são os mais severamente afetados. Os pomeleiros (*Citrus paradisi* Macfad.), as laranjeiras azedas (*C. aurantium* L.), e os limoeiros (*C. limon* L.) são moderadamente afetados. A limeira ácida 'Galego' (*C. aurantifolia* Christm. Swingle), as toranjeiras (*Citrus grandis* Osbeck) e os trifoliatas (*P. trifoliata* Raf.), incluindo seus híbridos, são considerados menos suscetíveis, porém não isentos de causar enormes prejuízos, como é o caso da limeira ácida Galego no México.

2.2. As bactérias do HLB

O HLB está associado a três espécies de bactérias fastidiosas que são denominadas de *Candidatus* Liberibacter asiaticus, *Ca. Liberibacter africanus* e *Ca. Liberibacter americanus* (JAGOUEIX et al., 1994; TEIXEIRA et al., 2005), sendo *Ca. L. asiaticus* a mais difundida no continente americano. São bactérias gram-negativas (GARNIER et al., 1984) pertencentes ao grupo das alfa-proteobactérias (JAGOUEIX et al., 1994), que se desenvolvem restritamente no floema das plantas e não são cultiváveis em meio de cultura aspecto que dificulta tanto o estudo desse grupo de bactéria quanto de todo o patossistema. O prefixo *Candidatus* é uma denominação temporária (MURRAY; SCHLEIFER, 1994) uma vez que a classificação taxonômica definitiva ainda não foi realizada. Por serem de difícil cultivo, mesmo após algumas tentativas recentes (SECHLER et al., 2009), a identificação e classificação destas espécies foi obtida com base em estudos de microscopia eletrônica (GARNIER; DANIEL; BOVÉ, 1984) e de comparações de sequências da região 16S do DNA ribossomal (JAGOUEIX; BOVÉ; GARNIER, 1994).

Até 2004 eram conhecidas apenas duas espécies - *Ca. L. asiaticus* e *Ca. Liberibacter africanus*. Contudo, no Brasil, ao avaliarem amostras com sintomas da doença os pesquisadores não detectaram *Ca. L. asiaticus* ou *Ca. L. africanus*. Diferenças ao nível de DNA confirmaram se tratar de uma nova espécie, denominada de *Ca. L. americanus*, que até o momento está restrita ao Brasil (TEIXEIRA et al., 2005).

A incidência de *Ca. L. americanus* tem diminuído progressivamente desde o momento em que plantas com sintomas passaram a ser eliminadas, chegando, nos

dias atuais, a menos de um por cento (contra mais de 99% para *Ca. L. asiaticus*) de todas as amostras positivas para *Liberibacter* analisadas no laboratório do Fundecitrus (NELSON WULFF, dados não publicados). Fatores ambientais e relacionados ao próprio comportamento das bactérias explicam a drástica redução na frequência de *Ca. L. americanus* e aumento na de *Ca. L. asiaticus*. *Candidatus L. asiaticus* é mais tolerante a altas temperaturas e atinge títulos mais altos nas plantas que *Ca. L. americanus* (LOPES et al., 2009).

Essas bactérias são disseminadas no campo por insetos vetores, sendo o psílídeo asiático dos citros, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae), o vetor de *Ca. L. asiaticus* e *Ca. L. americanus* (CAPOOR et al., 1967; YAMAMOTO et al., 2006), e o psílídeo africano *Trioza erytreae* (Del Guercio) (Hemiptera: Triozidae) o vetor de *Ca. L. africanus* (McCLEAN, et al., 1965). A transmissão dessas bactérias pode também ser feita experimentalmente por meio de enxertia de borbulhas infectadas (LOPES; FRARE, 2008; COLETTA-FILHO et al., 2010) ou da planta parasita *Cuscuta* spp. (GARNIER; BOVÉ, 1983). Todas as espécies de citros e suas variedades conhecidas são suscetíveis e uma vez infectada, a planta não pode ser curada nem com aplicações de antibióticos e nem por meio de poda dos ramos com sintomas (LOPES et al., 2007).

2.3. Bioecologia de *Diaphorina citri*

Diaphorina citri é o único vetor das bactérias associadas ao HLB em toda a Ásia, extremo Oriente e Américas (CATLING, 1970; PANDE, 1971; AUBERT, 1987; TSAI et al., 1988; YAMAMOTO et al., 2006). No Brasil *D. citri* foi relatado pela primeira vez em 1942 (COSTA LIMA, 1942). Por muito tempo sua presença nos pomares não causou preocupação, o que veio a acontecer após o relato da ocorrência de HLB nos pomares paulistas (COLETTA-FILHO et al., 2004). Esse inseto é originário do sul da Ásia (HOLLIS, 1987; HALBERT; MANJUNATH, 2004; BEATTIE; BARKLEY, 2009) apresentando distribuição geográfica mais ampla do que a das bactérias do HLB, uma vez que ocorre em países onde a doença ainda não foi relatada (EPPO, 2014).

Quando adulto o inseto mede cerca de 2 a 3 mm de comprimento, adquirindo quando jovem coloração marrom-clara, tornando-se mais escura à medida que envelhece (AUBERT, 1987; GALLO et al., 2002). Sua cabeça é ligeiramente mais estreita que o tórax, com antenas com dois segmentos basais de coloração castanha clara e pontas pretas e olhos castanho escuro. Seu corpo possui coloração marrom, coberto com secreção serosa sob a forma de pó esbranquiçado, com abdômen dorsalmente preto, e branco, esverdeado ou alaranjado no ventre. Os insetos saltam e voam a pequenas e longas distâncias, principalmente quando importunados. Geralmente são encontrados na face abaxial das folhas e, quando parados, formam um ângulo de 45° em relação à superfície em que se encontram (BLACKWELL, 2005; HALL, 2008).

Seu ciclo de vida é composto de três estágios de desenvolvimento: ovo, ninfa passando por cinco ínstaes (AUBERT, 1987), e adulto. Os ovos são depositados na superfície dos brotos em estágio inicial de desenvolvimento. Cada fêmea chega a colocar de 500 a 800 ovos durante toda a sua vida (TSAI e LIU, 2000; NAVA et al., 2007). As ninfas alimentam-se em brotos e folhas jovens, porém, na falta de brotações, fazem uso de folhas maduras. Excretam grande quantidade de substância açucarada, conhecida como “honeydew”, que favorece o desenvolvimento de bolor negro ou fumagina que recobrem as folhas prejudicando sua respiração, transpiração e fotossíntese, prejudicando também visualmente a qualidade dos frutos (TSAI e LIU, 2000).

O tempo de desenvolvimento varia de acordo com a temperatura. O tempo médio para o desenvolvimento da fase de ovo à fase adulta pode variar de 49,3 dias à 15°C a 14,1 dias à 28°C (TSAI e LIU, 2000). Não se desenvolvem em temperaturas acima de 33°C ou abaixo de 10°C. A temperatura adequada ao desenvolvimento está na faixa de 25 a 28°C.

A longevidade do adulto é em média de 80 a 90 dias sob condições de altas temperaturas. Já sob baixas temperaturas esse período de vida pode ser estendido por até nove meses (AUBERT, 1987; YANG, et. al., 2006). Sua maturidade reprodutiva é alcançada, para alguns autores, entre dois a três dias após a emergência do inseto adulto e a oviposição tem início um ou dois dias após o acasalamento (WENNINGER e HALL, 2007). Já para outros autores essa

maturidade pode ocorrer horas após a sua emergência (HUSAIN e NATH 1927; PANDE, 1971).

A flutuação populacional de *D. citri* está diretamente relacionada à presença de brotações e condições ambientais favoráveis ao seu desenvolvimento (GALLO et al., 2002; HALL, 2008). A contínua emissão de brotação em árvores jovens faz com que as mesmas se tornem mais atrativas para os psíldeos (CATLING, 1970).

As bactérias associadas a esta enfermidade mantêm uma relação persistente com o inseto vetor, ou seja, uma vez adquirida possui a capacidade de se replicar no sistema circulatório do inseto e, conseqüentemente, ser disseminada durante toda a vida do mesmo (XU et al., 1988; HUNG et al., 2004). De acordo com Ammar; Shatters e Hall (2011), as bactérias podem ser encontradas em vários órgãos internos de *D. citri* em diferentes concentrações, sendo que nas glândulas salivares a concentração bacteriana variou de 47 a 70%, enquanto que no canal alimentar o título da bactéria alcançou 80%. A ocorrência de transmissão ovariana foi relatada por Pelz-Stelinski et al. (2010), em níveis de 2 a 6%. Também foi relatada ocorrência de transmissão horizontal, ao redor de 4%, no qual machos com a bactéria transferiram-na para fêmeas durante a cópula (MANN et al., 2011). As baixas taxas de transmissão da bactéria são compensadas pela alta taxa de multiplicação do inseto na presença de fontes de alimento, levando a grandes taxas de inoculação. A eficiência da transmissão é maior com ninfas, especialmente se estas se multiplicaram em ramos com sintomas da doença (HUANG et al., 1984; YAMAMOTO, 2006; PELZ-STELINSKI et al., 2010).

Não estão totalmente claros os fatores que influenciam no desenvolvimento e alimentação de *D. citri*. Estudos comparativos sobre o potencial dos diferentes tipos de citros em multiplicar o inseto têm se limitado a um número reduzido de variedades ou espécies, com diferenças entre elas (ALVES et al., 2014; WESTBROOK et al., 2011; TSAGKARAKIS e ROGERS 2010; NAVA et al., 2007; NEHRU et al., 2004; TSAI e LIU 2000).

Nos estudos conduzidos por Nava et. al. (2007), a duração da fase de ovo no limoeiro 'Cravo' variou de 2,6 a 7,7 dias, e a ninfal de 9,4 a 35,8 dias às temperaturas de 18 e 32°C, respectivamente. No mesmo estudo, a duração do ciclo de ovo-adulto e a razão sexual não foram afetadas pelos hospedeiros murta,

limoeiro 'Cravo' e tangerineira 'Sunki'. A viabilidade dos ovos foi, no entanto, inferior na tangerineira 'Sunki' (44,6%) do que limoeiro 'Cravo' (82,35%) ou na murta (88,82%). Estudo similar foi conduzido por Alves et al. (2014) com as variedades de laranja doce 'Hamlin', 'Natal', 'Pêra', 'Ponkan', 'Valência' e com a murta. A duração da fase ovo foi significativamente maior em 'Natal' (média de 4,91 dias), que em 'Poncã' (4,24 dias). Maior viabilidade da fase ovo ocorreu em murta (85,7%) e 'Valência' (83,3%), e menor em 'Hamlin' (56,8%). Já a viabilidade da fase ninfal variou 57,4 a 79,1%, sem diferenças estatísticas entre os diferentes hospedeiros. Neste estudo, 'Valência' e murta foram os hospedeiros que proporcionaram as melhores condições. Esses dois hospedeiros diferiram estatisticamente apenas de 'Hamlin' que teve menor viabilidade total (32,6%) e é, por conseguinte, a variedade menos favorável ao desenvolvimento do inseto, talvez nutricionalmente menos apropriada ao desenvolvimento de *D. citri* (ALVES et al., 2014) conforme também sugerido por Teck et al. (2011).

2.4. Porta-enxertos comerciais de citros

Os porta-enxertos afetam muitas características hortícolas e fitopatológicas da cultivar copa, sendo seu uso essencial na citricultura (CASTLE et al., 1992). Com exceção da doença clorose variegada dos citros (CVC) que parece afetar somente a copa, muitos problemas fitopatológicos como a gomose, tristeza e declínio, estão relacionados à intolerância dos porta-enxertos (POMPEU JUNIOR et al., 1991).

Quando as vantagens de se utilizar plantas enxertadas foram demonstradas já no início do século XIX, a laranjeira 'Caipira' passou a ser o principal porta-enxerto na citricultura brasileira. Mas sua baixa tolerância à seca e à gomose de *Phytophthora*, levou a 'Caipira' a ser substituída pela laranjeira 'Azeda', que predominou até a década de 1940. Com o surgimento da tristeza, foi necessária nova mudança, com a laranjeira 'Azeda' sendo substituída por porta-enxertos tolerantes. Iniciou-se então o uso do *Poncirus trifoliata* e seus híbridos, principalmente os citranges 'Troyer' e 'Carrizo', bem como o limoeiro 'Cravo', o qual passou a ser o principal porta-enxerto utilizado no Brasil (CARLOS et al., 1997).

Por várias décadas o limoeiro 'Cravo' liderou significativamente a lista dos porta-enxertos utilizados, chegando a representar cerca de 70 a 80% dos porta-enxertos comerciais. Com o tempo novos problemas surgiram. O limoeiro 'Cravo' se mostrou suscetível à gomose de *Phytophthora* e ao declínio. Também suscetíveis ao declínio foram os limoeiros 'Volkameriano' e 'Rugoso', os citranges 'Troyer' e 'Carrizo' e *P. trifoliata*. O declínio estimulou então nova busca de porta-enxertos. Porém, as excepcionais características do limoeiro 'Cravo', compatibilidade com todas as variedades copa, produção precoce, altas produções de frutos de boa qualidade e grande resistência à seca, além da tolerância à tristeza, fizeram com que ele continuasse a predominar nos novos plantios, sendo até o final da década de 1990, o porta-enxerto de maior uso nos pomares comerciais no Estado de São Paulo (POMPEU JÚNIOR, 1991).

Com o surgimento da morte súbita dos citros, doença aparentemente associada a um complexo de vírus, observada, em 1999, no sudoeste de Minas Gerais e no norte de São Paulo (GIMENES-FERNANDES e BASSANEZI, 2001; MULLER, et al., 2002) a citricultura paulista voltou a diversificar os porta-enxertos. No ano de 2003 o limoeiro 'Cravo' passou a constituir apenas 39,8% do total de mudas produzidas, com tangerineira 'Cleópatra' 32,6 % e o citrumeleiro 'Swingle' 13,7% das mudas utilizadas nesse ano (POMPEU JÚNIOR et al., 2004; POMPEU JÚNIOR, 2005).

Em 2014, os porta-enxertos mais empregados na citricultura paulista eram o limoeiro 'Cravo' com 53%, o citrumeleiro 'Swingle' com 32%, a tangerineira 'Sunki' com 11%, a tangerineira 'Cleópatra' com 1,6%, o *Poncirus trifoliata* com 1,4%, e o limoeiro 'Volkameriano' com 0,7% (IAC, 2014).

Como se vê, a diversificação de porta-enxertos foi muito importante para o controle de algumas doenças importantes dos citros. Poderia o porta-enxerto impactar o controle do HLB?

Santos (2012), estudou a reação à *Ca. L. asiaticus* de laranjeira 'Valência' enxertada em 16 diferentes porta-enxertos: 'Clementina x trifoliata' (1615), HRS 643 [('Cleópatra x Swingle' (715)], 'Cleópatra x Swingle' (1614), 'Cleópatra x Rubidoux' (1600), HRS 702 [('Cleópatra x Christian' (712)], HRS 849 ['SFS x trifoliata Argentina' (1708)], citranges 'Troyer' e 'Carrizo' tetraplóides, triflolioteiro

'Flying Dragon', HRS 812 ('Sunki x Benecke'), 'Changsha x English Large', limoeiro 'Cravo', 'Rhode Red + Volkameriano' (híbrido somático), *Poncirus trifoliata*, tangerineira 'Sunki' e citrumeleiro 'Swingle'. Os níveis de bactéria encontrados na 'Valencia' sobre 'Carrizo' tetraplóide se apresentaram inferiores aos demais, mostrando esse genótipo como 'diferencial' ao HLB.

Albrecht e Bowman (2012) avaliaram a resposta de oito porta-enxertos (híbridos de *Poncirus trifoliata* US-802, US-812, US-897, e US-942, citrange 'Carrizo', trifoliata 'Benecke', 'Volkameriano', e 'Cleópatra') e observaram aos 12 meses após a inoculação variação na severidade dos sintomas foliares, mas em menor intensidade no US-897. Os autores classificaram o 'Carrizo', US-897, e US-942 como tolerantes, o US-802, US-812, e 'Volkameriano' como moderadamente tolerantes, e 'Cleópatra' como suscetível.

Diante do exposto, chega-se à conclusão de que o porta-enxerto poderia ser uma ferramenta com potencial de uso contra o HLB. Definitivamente não seriam os híbridos ou espécies já usadas comercialmente, os quais, em estudo já conduzidos, se mostraram altamente suscetíveis à colonização por *Ca. L. asiaticus* (LOPES et al, 2013).

Diversos novos híbridos vêm sendo testados ou liberados para plantio ultimamente principalmente para satisfazer outras necessidades locais dos produtores como a redução do porte das copas visando minimizar os custos com a colheita das frutas. Por exemplo, a partir de 1960, a Estação Experimental Obispo Colombres iniciou um programa de melhoramento genético de porta-enxertos com a finalidade de obter materiais que satisfizessem as necessidades locais, tanto como na questão de resistência ou tolerância a enfermidades, como a condições ecológicas. Como resultado dos cruzamentos, 1859 híbridos foram levados a campo para serem avaliados. Como resultado dessa avaliação, foram selecionados para cultivo comercial os híbridos citrandarim 61AA3, citrumelo 75AB, 79AC ('Cleópatra' x citrumelo 'Swingle'), 81G220 e 81G6513 ('Volkameriano' x 'Cleópatra'). Esses porta-enxertos induziram menor desenvolvimento das copas, maior eficiência produtiva e melhor qualidade dos frutos. Contudo, nada se sabe sobre o comportamento desses híbridos de porta-enxertos frente à bactéria do HLB e ao inseto vetor.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Produção de seedlings

Sementes de laranja 'Valência' (*Citrus sinensis*), murta (*M. exotica*), dos porta-enxertos comerciais limoeiro 'Cravo' (*Citrus limonia*), citrumeleiro 'Swingle' (*Poncirus trifoliata* x *Citrus paradisi*), tangerineira 'Sunki' (*Citrus sunki*) e *Poncirus trifoliata* foram obtidas de viveiros comerciais certificados. Sementes dos híbridos de porta-enxertos [Códigos: 75AB - *Citrus paradisi* x *Poncirus trifoliata*, 79AC - *Citrus reshni* x (*Poncirus trifoliata* x *Citrus paradisi*), Código 61AA3 - *Citrus reshni* x *Poncirus trifoliata*, 81G220 e 81G513 - *Citrus volkameriana* x *Citrus reshni*] foram importadas da Estação Experimental Obispo Colombres, Argentina (Processo MAPA: 21052.003390/2014 – 48). As sementes foram semeadas em tubetes de 50 cm³, com formato cônico, contendo substrato Plantimax citros, e mantidas em casa de vegetação do Fundecitrus. Quando os seedlings atingiram três meses de idade foram transplantados para vasos de dois litros, contendo substrato Plantimax citros. Parte dos materiais foi transportada para casa de vegetação do Departamento de Fitossanidade da Universidade Estadual Paulista (FACV/UNESP), Câmpus de Jaboticabal-SP, onde todas as atividades experimentais relacionadas à multiplicação do inseto foram conduzidas.

A irrigação foi realizada 4 vezes por semana e, uma vez por semana, foi feito o manejo nutricional através de fertirrigação contendo os seguintes fertilizantes em g 1000L⁻¹ de água: nitrato de cálcio 900, nitrato de potássio 300, MAP 70, sulfato de magnésio 260, cobre-ácido etileno diamino tetracético (EDTA) (14,5% Cu) 10, Zinco-EDTA (14% Zn) 7, Manganês-EDTA (13% Mn) 5, ácido bórico 3,5, molibdato de amônio 0,3, ferro- ácido dietileno diamino hidróxidofenilacético (EDDHA) (6% Fe) 50.

3.2. Criação de *Diaphorina citri*

Os insetos foram criados em plantas de murta sadias em sala de criação segundo técnica desenvolvida por Gómez-Torres (2009). Insetos adultos foram

confinados em brotações para oviposição, envoltos em sacolas de “voil”, por sete dias. Após esse período, os insetos adultos foram retirados com o auxílio de um sugador manual e as plantas com ovos mantidas até a emergência dos adultos (Figura 1).



Figura 1. Criação de *Diaphorina citri* em ambiente fechado (sala).

Como nesse estudo previa-se o uso de fêmeas e machos virgens, esses foram separados assim que as ninfas se transformavam em adultos. Para tanto se adotou a técnica de Aubert (1987), que se baseia na observação da porção distal do abdômen (características físicas do aparelho genital), feita com o uso de um microscópio estereoscópio para aumento de 40 vezes (Figura 2).

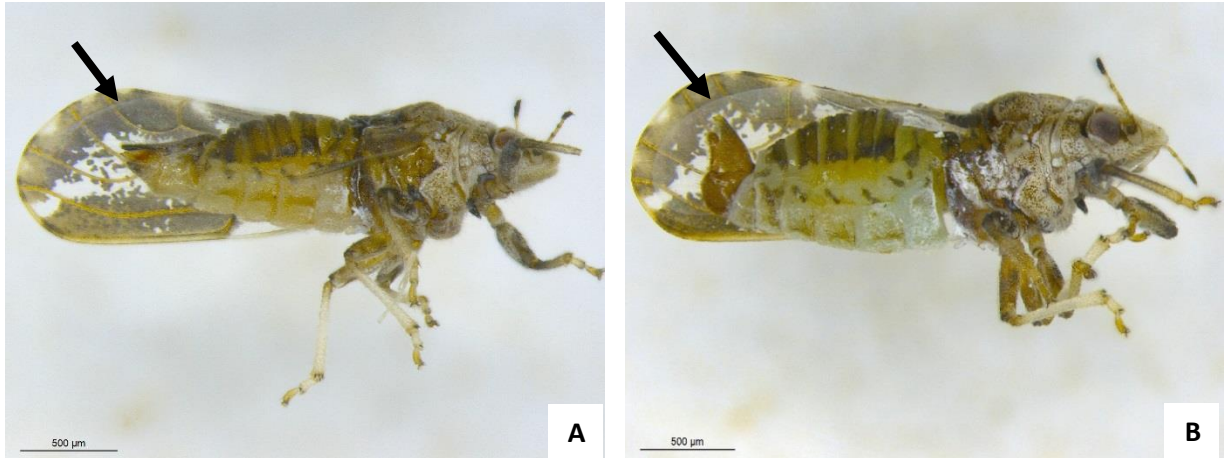


Figura 2. Características físicas do aparelho genital de fêmea (A) e de macho (B) de *Diaphorina citri*. A seta indica porção distal do abdômen mostrando o aparelho genital do macho e da fêmea.

3.3. Multiplicação de *Diaphorina citri* em diferentes hospedeiros

Depois de separados e de completarem aproximadamente 15 dias de vida (correspondente ao período de pré-oviposição) dois casais foram confinados por período de 72 a 144 horas, até que os ovos fossem visualizados nas plantas experimentais. Os insetos foram aprisionados em um broto por planta no interior de uma sacola de “voil” de 30 x 30 cm. Os brotos estavam no estágio V2 da escala de Stoller (STOLLER, 2014), determinado em outros experimentos como sendo um dos mais apropriados para oviposição (Figura 3). Após a oviposição, os casais foram retirados e os ovos contados com auxílio de uma lupa entomológica que permite aumento da imagem de aproximadamente 40 vezes.

Posteriormente, foram realizadas contagens de ninfas eclodidas e de fêmeas e machos adultos emergidos. As contagens de ninfas permitiram determinar a viabilidade de ovos e as contagens de adultos permitiram determinar a viabilidade das ninfas. Também se determinou a viabilidade total, feita com base no número de adultos emergidos em relação ao total de ovos, e a proporção entre machos e fêmeas. O experimento foi conduzido em estufa com temperatura de $26^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$, umidade relativa do ar de $69\% \pm 10\%$, e fotoperíodo de 14h. O delineamento foi o inteiramente casualizado, com números diferentes de repetições (Tabela 1).



Figura 3. Casais de *Diaphorina citri* confinados em diferentes porta-enxertos, laranjeira ‘Valência’ e murta.

3.4. Inoculação de *Candidatus Liberibacter asiaticus* por enxertia

As plantas foram inoculadas por enxertia utilizando o método da garfagem apical de ramos de plantas doentes (LI, 1997). Os “garfos” (fonte de inóculo) consistiram de segmentos de ramos apicais de plantas de citros da variedade ‘Valência’, com dois anos de idade, apresentando sintomas típicos de HLB nas folhas e com com confirmação prévia, por meio do teste PCR em tempo real ou quantitativo (qPCR), de estarem infectados por *Ca. L. asiaticus*.

Para a inoculação, com uma tesoura de poda, foi retirada a parte aérea dos porta-enxertos e da laranjeira ‘Valência’ que seria inoculada. A inoculação foi feita 15 cm acima do colo da planta. Com um bisturi esterilizado foi feita uma fenda longitudinal de 1 cm no caule na qual foi introduzido o garfo. Para preparo do enxerto, foram retirados ramos contendo 3 a 4 folhas, comprimento de aproximadamente 6 cm e diâmetro similar ao caule das plantas que seriam inoculadas (em torno de 5 mm), Cortes em forma de cunha foram realizados nos enxertos de modo que o comprimento fosse semelhante ao da profundidade da fenda feita no caule a ser inoculado. A fixação do enxerto foi feita enrolando parafilme em toda a região da enxertia. As plantas foram mantidas em câmara úmida (90% de U.R.) por cerca de 30 dias até o pegamento do garfo (Figura 4). Em

seguida as plantas inoculadas foram transferidas para bancadas da casa de vegetação no Fundecitrus.



Figura 4. Inoculação de *Candidatus Liberibacter asiaticus* por enxertia usando o método da garfagem apical de ramos de plantas doentes.

Foram inoculadas 12 plantas dos porta-enxertos citados em 3.1, além de plantas da laranjeira 'Valência'. A murta não foi usada neste estudo. As plantas foram observadas rotineiramente para avaliação de sintomas foliares usando como base a escala fotográfica de severidade dos sintomas desenvolvida por Mendonça (2015) (Figura 5). Após 4 meses da inoculação, amostras de folhas foram coletadas da fonte de inóculo (garfos) para extração de DNA. Em seguida, os garfos foram podados para emissão nos mesmos de novos fluxos vegetativos.



Figura 5. Escala fotográfica de severidade dos sintomas de HLB. Com relação ao mosqueado: (M1) folha predominantando a cor verde com leve mosqueado, (M2) folha com contraste marcante entre o verde e o amarelo, (M3) folha com limbo e nervura predominantando a cor amarela, e (M4) folha predominantando a cor amarela com nervuras salientes amareladas e/ou amarronzadas. Com relação à deficiência mineral: (D1) deficiência de zinco pouco intensa, (D2) deficiência de zinco com a cor amarela bem delimitada pelas nervuras secundárias, (D3) deficiência de zinco com amarelo mais intenso com menos delimitação das nervuras secundárias, e (D4) folha amarelada com círculos de cor verde.

Os novos brotos emitidos nos garfos após a poda foram coletados para análise por qPCR. Em seguida, todo o garfo foi removido cortando o caule das plantas inoculadas logo abaixo do ponto de enxertia. Após a remoção do inóculo os caules emitiram novos brotos, os quais também foram avaliados por qPCR, seis meses após a inoculação. Também foram avaliadas por qPCR o caule e a raiz, esta última removida dos vasos, separadas do substrato e lavadas cuidadosamente com água e sabão. A Figura 6 mostra a localização das amostras coletadas.

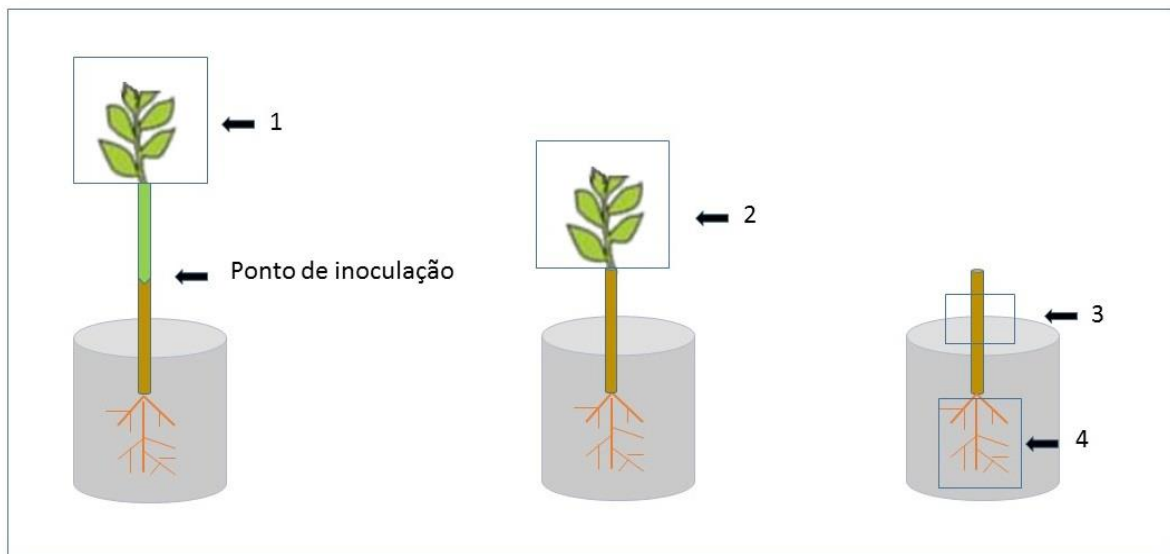


Figura 6. Esquema representativo de uma muda mostrando o ponto de inoculação de *Candidatus Liberibacter asiaticus* e os locais de amostragem sendo (1) brotação da fonte de inóculo (garfo), (2) brotação das plantas inoculadas, (3) casca do caule das plantas inoculadas e (4) raiz das plantas inoculadas.

3.5. Detecção e quantificação de *Candidatus Liberibacter asiaticus* por qPCR

3.5.1. Extração de DNA do material vegetal

Amostras de DNA foram extraídas de broto (estádio V2), do caule e da raiz das plantas. Os brotos, foram picados sobre papel toalha com lâmina, o equivalente ao volume de 1 mL do tubo eppendorf de 2 mL, ao qual foi adicionado tampão de extração (CTAB 20g, NaCl 82g, PVP 10000 20g, água 400 mL, e 100 mL de Tris 0,1 M pH 8,0 e EDTA 0,5 M pH 8,0, adicionado β -mercaptoetanol em uma proporção de 0,2%) até o volume de 2 mL. Para caule e raiz foi pesado 0,1 g de material vegetal, picados sobre papel toalha com lâmina e colocados em tudo eppendorf de 2 mL. Foi adicionado 1,5 mL de tampão de extração. O material vegetal (broto, caule ou raiz) foi macerado em nitrogênio líquido com pistilo e, em seguida, incubado em banho maria a 65°C por 2 horas. As amostras foram centrifugadas a 15000 x g por 5 minutos. Volume de 900 μ L do sobrenadante foi recuperado e transferido para outro tubo eppendorf de 2,0 mL. Posteriormente foram adicionados 900 μ L de clorofórmio álcool isoamil (24:1), homogeneizado por inversão do tubo, e centrifugado a 15294g por 5 minutos. Foram recuperados 800 μ L do sobrenadante e transferidos para

tubos eppendorf de 1,5 mL. O DNA foi então precipitado pela adição 480 μ L de isopropanol (equivalente a 0,6 vezes o volume original), homogeneizando levemente pela inversão dos tubos e mantidos a -4°C por 30 minutos ou 'overnight'. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 15294g durante 20 minutos para formação do precipitado, e depois foram lavados duas vezes com 0,9 mL de etanol 70%, e centrifugado a 15000 x g por 10 min. O DNA foi desidratado por 6 minutos em speed-vac e ressuspendido em 50 μ L de água Milli-Q autoclavada e armazenado a 4°C .

3.5.2. PCR quantitativo (qPCR)

As amostras foram confirmadas sendo positivas através do método qPCR, considerada mais sensível que a PCR convencional para a detecção da bactéria (LI et al., 2006; TEIXEIRA et al., 2008). Para os brotos usou-se 1 μ L de DNA, master mix [1x], 0,5 μ M dos primers RPL AS forward) e RPL AS reverse e 0,2 μ M da sonda RPL AS NED, em um volume final de reação igual a 12 μ L. Para caule e raiz foi utilizado 3 μ L do DNA genômico. Para amplificação do DNA, o programa utilizado consistiu em 95°C por 10 min e 45 ciclos de 95°C por 15s e 58°C por 60s. As leituras da fluorescência foram realizadas no equipamento 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems) a cada ciclo de amplificação e, posteriormente analisados pelo StepOne™ Software v2.3. O ponto que detecta o ciclo na qual a reação atinge o limiar da fase exponencial é denominado de Cycle Threshold (CT), ponto que permite melhor estimativa da quantidade de fluorescência de cada amostra (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004). As amostras que obtiveram Ct igual ou abaixo de 34 foram consideradas positivas.

3.6. Tratamentos, delineamento experimental e análise dos dados

Em todos os experimentos o delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com cada planta representando uma repetição e cada tipo de citros ou a murta o tratamento. Os dados referentes à bactéria (porcentagem de infecção e título bacteriano) e os dados referentes ao inseto (taxa de oviposição, número de

ninfas eclodidas e adultos emergidos, viabilidade de ovos e ninfas, e tempo de ovo a adulto) foram submetidos à análise de variância (teste F) com as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os dados referentes aos insetos foram analisados quanto a sua normalidade e transformados em Log (x+5) antes de serem submetidos à análise estatística. Para todas as análises foram empregados os programas SAS (STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM, 2003) e Statgraphics Centurion XVI (STATPOINT TECHNOLOGIES INC., 2010). Para armazenamento dos dados e construção de gráficos foram utilizados os programas Excel e para a construção do dendrograma o aplicativo Statistica 7.0 (STATSOFT, 2004). O dendrograma foi feito para complementar os resultados das análises estatísticas. Para tal, foi feita análise exploratória multivariada por meio de análise de agrupamento com o método hierárquico. Para medir a semelhança entre os centróides de cada tratamento utilizou-se a distância euclidiana (medida de dissimilaridade) para o conjunto das 11 variáveis, e como estratégia de agrupamento adotou-se o método de Ward (Hair, et al., 2005).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Multiplicação de *Diaphorina citri* em hospedeiros de citros

Neste estudo foi avaliado o potencial de novos porta-enxerto híbridos em multiplicar *D. citri*. Porta-enxertos comerciais, laranjeira 'Valência' e murta foram incluídos para comparação. As plantas hospedeiras estudadas variaram quanto ao nível de influência sobre o desenvolvimento e reprodução do inseto. Com base nas diferenças entre médias, observa-se a existência de três grupos distintos. No híbrido 81G513 se encontrou maior quantidade de ovos (média de 110,8), porém não diferiu do grupo formado pelos porta-enxertos tangerineira 'Sunki', citrumeleiro 'Swingle', laranjeira 'Valência', 79AC, 61AA3, 75AB, limoeiro 'Cravo' e murta, com médias de 30,0 a 87,0. *Poncirus trifoliata* foi o que apresentou menor média (17,4) (Tabela 1).

Tabela 1. Médias \pm erro padrão do número de ovos, ninfas, adultos e razão sexual de *Diaphorina citri* em diferentes hospedeiros.

Hospedeiros	n	Fases de desenvolvimento de <i>D. citri</i>			Razão sexual	
		Ovo	Ninfa	Adulto	n	(♀/♀+♂)
Limão 'Cravo'	11	44 \pm 7,85 ab	11,5 \pm 2,91 a	5,8 \pm 2,29 ab	3	0,74 \pm 0,12
Tangerina 'Sunki'	8	87 \pm 33,30 ab	33,6 \pm 14,68 a	6,5 \pm 3,11 ab	7	0,74 \pm 0,08
Citrumelo 'Swingle'	11	71,8 \pm 24,35 ab	42,1 \pm 23,37 a	10,3 \pm 4,79 ab	6	0,74 \pm 0,09
<i>Poncirus trifoliata</i>	11	17,4 \pm 6,49 b	7,1 \pm 3,21 a	4,8 \pm 2,23 ab	7	0,74 \pm 0,13
61AA3	9	62,7 \pm 16,91 ab	32,6 \pm 10,66 a	15,4 \pm 6,01 ab	6	0,74 \pm 0,05
75AB	8	55,5 \pm 19,69 ab	36,8 \pm 20,28 a	4,1 \pm 1,79 ab	8	0,74 \pm 0,11
79AC	10	65,8 \pm 17,76 ab	36,3 \pm 12,56 a	3,6 \pm 1,82 b	5	0,75 \pm 0,12
81G220	8	41,6 \pm 14,15 ab	34,6 \pm 14,68 a	9,6 \pm 4,07 ab	5	0,73 \pm 0,04
81G513	8	110,8 \pm 28,67 a	51,1 \pm 15,49 a	8,9 \pm 5,96 ab	5	0,73 \pm 0,11
Laranja 'Valência'	8	68,5 \pm 12,23 a	40,4 \pm 11,14 a	17,9 \pm 2,86 a	6	0,73 \pm 0,06
Murta	10	30 \pm 19,32 ab	5,4 \pm 2,78 a	4,3 \pm 2,12 ab	7	0,75 \pm 0,01
F		2,86	2,36	1,95		0,7307
P		0,0039	0,0156	0,0476		0,69

(n) Número de repetições; (F) Teste F; (P) Probabilidade. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Com base na quantidade de ninfas eclodidas calculou-se a viabilidade dos ovos. Houve variação nas taxas de viabilidade dos ovos (médias entre 38 a 67%) que, devido à grande variação entre os valores obtidos dentro de cada material estudado (F 0,51; P 0,8751), não permitiu comparar médias (Tabela 2). As médias do número de ninfas por sua vez foram estatisticamente similares para todos os materiais estudados.

Da mesma forma que calculado para ovos, o número de adultos emergidos permitiu calcular tanto a viabilidade das ninfas como a viabilidade total (relação entre adultos e ovos). Ninfas sobreviveram e atingiram a fase adulta em maiores porcentagens de ovos colocados em murta e *P. trifoliata*, que de ovos colocados no híbrido 79AC. Quando se compara a viabilidade total, no entanto, todos os insetos apresentaram comportamentos estatisticamente similares com as médias de viabilidade oscilando entre 8 e 42%.

Tabela 2. Médias \pm erro padrão de sobrevivência de *Diaphorina citri* em diferentes hospedeiros.

Hospedeiros	n	Viabilidade (%)		
		Ovo	Ninfa	Total
Limão 'Cravo'	11	38 \pm 9,49 a	45 \pm 8,36 ab	19 \pm 9,39 a
Tangerina 'Sunki'	8	46 \pm 16,76 a	36 \pm 13,87 ab	8 \pm 2,37 a
Citrumelo 'Swingle'	11	52 \pm 11,76 a	41 \pm 7,28 ab	15 \pm 3,09 a
<i>Poncirus trifoliata</i>	11	47 \pm 12,91 a	79 \pm 7,46 a	37 \pm 9,34 a
61AA3	9	57 \pm 10,75 a	57 \pm 13,67ab	39 \pm 12,19 a
75AB	8	62 \pm 16,69 a	31 \pm 13,91 ab	9 \pm 1,01 a
79AC	10	60 \pm 8,79 a	19 \pm 6,48 b	11 \pm 4,03 a
81G220	8	67 \pm 16,76 a	49 \pm 16,73 ab	20 \pm 4,92 a
81G513	8	42 \pm 10,25 a	33 \pm 10,42 ab	13 \pm 4,69 a
Laranja 'Valência'	8	62 \pm 10,92 a	57 \pm 10,96 ab	32 \pm 8,11 a
Murta	10	48 \pm 10,91 a	92 \pm 7,01 a	42 \pm 12,27 a
F		0,51	2,93	2,06
P		0,8751	0,0046	0,0418

(n) Número de repetições; (F) Teste F; (P) Probabilidade. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A grande variação observada na postura e viabilidade de ovos e ninfas resultou em número variável de adultos entre os materiais estudados, sendo a maior média encontrada em 'Valência' e a menor em 79AC, as quais não diferiram dos demais. Em todos os materiais estudados não houve influência na razão sexual de *D. citri*, havendo predominância de fêmeas em todos os materiais, evidenciando o grande potencial de reprodução.

Análise de agrupamento (Figura 7) permitiu separar os diferentes tratamentos em três grupos distintos a uma distância euclidiana de 35. O primeiro, composto pelas variedades ou híbridos 81G220, 61AA3 e laranjeira 'Valência', o segundo por 81G513, tangerineira 'Sunki', 79AC, 75AB e citrumeleiro 'Swingle' e o terceiro por limoeiro 'Cravo', *P. trifoliata* e murta. De acordo com o desempenho do inseto para os parâmetros avaliados, o grupo que reúne 81G220, 61AA3 e laranjeira 'Valência' foi superior aos demais, podendo esses materiais serem considerados como os mais adequados ao desenvolvimento do inseto, e inferiores se consideramos o potencial de contribuir na disseminação do HLB. Por outro lado, 81G513, tangerineira 'Sunki', 79AC, 75AB e citrumeleiro 'Swingle' foram considerados os menos adequados para

o psilídeo. A variedade limoeiro ‘Cravo’, *P. trifoliata* e murta comportaram-se como intermediárias para o desenvolvimento de *D. citri*.

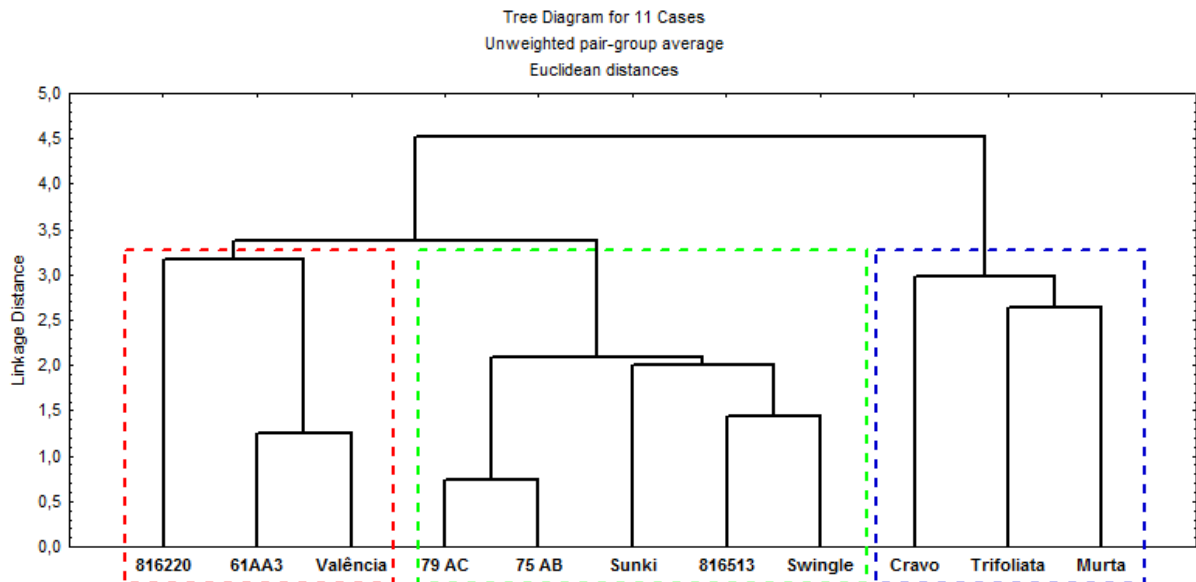


Figura 7. Dendrograma gerado com base nos parâmetros biológicos de *Diaphorina citri* avaliados em onze hospedeiros

A variedade ou híbrido preferida para oviposição não é necessariamente aquela que vai promover o melhor desenvolvimento do inseto (MAYHEW, 2001; WISE et al., 2008). Isto pode ser explicado pela presença de compostos no hospedeiro que pode prejudicar o desenvolvimento do inseto nas fases seguintes, sem, no entanto, afetar seu comportamento de escolha para alimentação e oviposição (WESTBROOK et al., 2011). Isto ocorreu com o híbrido 81G513 e com a laranja ‘Valência’, que foram os mais atrativos à oviposição mas com viabilidade de ovos e ninfas similar aos demais materiais.

Varição entre espécies cítricas quanto a capacidade de multiplicar *D. citri* tem sido relatada na literatura. Alves et al. (2014), encontraram maior número médio de ovos em murta e nas variedades ‘Ponkan’ e laranja ‘Valência’ do que em ‘Hamlin’. Tsagkarakis, et al. (2010) encontraram menor número de ovos em tangerineira ‘Cleópatra’ (24,1) que em laranja ‘Azeda’ (80,2). Da mesma maneira que Alves et al. (2014), Nava et al. (2007) também encontraram maior número de ovos em murta (348,4) e limoeiro ‘Cravo’ (265,1) do que na tangerineira ‘Sunki’ (166,2). No presente estudo, no entanto, nas diferentes etapas de desenvolvimento,

D. citri se comportou em murta e nos demais hospedeiros de forma similar. Vale ressaltar que neste estudo os insetos foram confinados em um único broto, diferente dos trabalhos citados que envolveram mais de um broto por planta, oferecendo portanto maiores chances de posturas de ovos. Essa grande variação encontrada entre estudos pode, segundo Nava et al. (2007), estar relacionada a muitos fatores como hospedeiro e técnicas usadas para criar e manter *D. citri* em condições de laboratório.

Variação entre hospedeiros para viabilidade de ovos e ninfas também tem sido relatada na literatura. Alves et al. (2014) encontraram maior viabilidade de ovos colocados em murta (85,7%) e 'Valência' (83,3%), do que em 'Hamlin' (56,8%). Já a viabilidade da fase ninfal variou de 57,4 a 79,1%, sem diferenças estatísticas entre os diversos grupos. Nava et al. (2007) também observaram maior viabilidade ninfal em murta (88,82%) do que em 'Cravo' (82,35%) ou 'Sunki' (44,6%). Tsagkarakis et al. (2010) comparando a variedade 'Cleópatra' (*C. reshni* Hort. ex Tanaka) com a laranjeira 'Azeda' (*C. aurantium*) observaram viabilidade de ovo a adulto menor em 'Cleópatra' (4,38%) e maior em 'laranja azeda' (62,21%). Tsai e Liu (2000) relataram maior viabilidade do desenvolvimento total do inseto sobre 'Toranja' (*C. paradisi*) (84%) do que em 'laranja azeda' (*C. aurantium*) (65,5%).

Os materiais deste estudo comuns aos demais citados são a 'Valência', a murta, o limoeiro 'Cravo' e a tangerineira 'Sunki'. No estudo de Alves et al. (2014), a viabilidade de ovos foi de 83 e 86% para 'Valência' e murta, respectivamente, contra 62 e 48% para os mesmos materiais em nossos estudos. No que diz respeito a viabilidade de ninfas, Nava et al. (2007) encontrou 89, 44 e 82% para murta, 'Sunki' e 'Cravo', contra 92, 36 e 45% para os mesmos materiais em nossos estudos. Assim como no caso da postura de ovos, as diferenças encontradas podem estar relacionadas a fatores do ambiente e a fatores associados ao hospedeiro como nutrição e estágio de desenvolvimento das plantas e dos brotos.

4.2. Multiplicação de *Candidatus Liberibacter asiaticus* em diferentes hospedeiros

Nesse estudo foi avaliada a possível influência de porta-enxertos híbridos na multiplicação de *Ca. L. asiaticus*. Porta-enxertos comerciais também foram incluídos para comparação. Os resultados referentes a sobrevivência e presença de *Liberibacter* nos garfos (material usado como inóculo) são mostrados na tabela 3.

Tabela 3. Sobrevivência e resultado da análise por qPCR de ramos de 'Valência' (garfos) usados na inoculação de *Candidatus Liberibacter asiaticus* em porta-enxertos e laranja 'Valência'.

Variedade	Total ^a	Sobreviventes ^b	%	Com brotos ^c	%	PCR+ ^d	%	Título médio ^e
81G513	9	6	67	4	67	4	100	4,21 ± 0,93 a
61AA3	12	12	100	7	58	6	86	6,29 ± 0,13 b
75AB	12	8	67	4	50	2	50	5,72 ± 0,17 ab
Limão 'Cravo'	12	10	83	8	80	7	88	4,87 ± 0,23 ab
<i>Poncirus trifoliata</i>	13	13	100	11	85	11	100	5,84 ± 0,23 ab
Tangerina 'Sunki'	12	11	92	9	82	9	100	5,29 ± 0,31 ab
Citrumelo 'Swingle'	12	12	100	12	100	11	92	5,41 ± 0,33 ab
Laranja 'Valência'	10	8	80	7	88	6	86	5,62 ± 0,28 ab
F								2,53
P								0,0265

(^a) Total de plantas inoculadas; (^b) Número de garfos que sobreviveram; (^c) Garfos que emitiram broto; (^d) Número de brotos que resultaram positivo ($Ct \leq 34$) após análise de qPCR; (^e) Média do \log_{10} do número estimado de células de *Ca. L. asiaticus* por grama de tecido. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A sobrevivência dos garfos variou entre os materiais estudados sendo 100% para *P. trifoliata*, citrumeleiro 'Swingle' e o híbrido 61AA3, 83% para limoeiro 'Cravo', 80% para laranjeira 'Valência', 67% para os híbridos 81G513 e 75AB, 33% para o híbrido 79AC e 11% para 81G220.

Os materiais inoculados que apresentaram menores porcentagens de plantas com brotos foram os híbridos 79AC, 75AB e 61AA3, variando de 0 a 58%. Desses brotos, a maioria foi positiva por qPCR (85 a 100%), com exceção dos híbridos 75AB (50%) e híbrido 81G220, no qual a bactéria não foi detectada. O híbrido 79AC não foi avaliado por não ter emitido brotos.

Com base nas diferenças entre as médias de título da bactéria agruparam-se os materiais em três grupos. No primeiro encontra-se o híbrido 61AA3, que apresentou maior título, com log médio de 6,29 células por grama de tecido, não diferindo do grupo formado pelo 'Cravo', 'Sunki', 'Swingle', 'Valência', 75AB e *P.*

trifoliata, com médias variando entre 4,87 a 5,84. Por fim encontra-se o híbrido 81G513, com log médio de 4,21. Os híbridos 81G220 e 79AC não entraram na comparação devido à alta mortalidade dos garfos.

Os resultados referentes a sobrevivência e multiplicação de *Liberibacter* nos brotos emitidos nos caules das plantas inoculadas são mostrados na Tabela 4.

Tabela 4. Sobrevivência e resultado da análise por qPCR de brotos emitidos nos caules das plantas inoculadas com *Candidatus Liberibacter asiaticus* e na laranja 'Valência'.

Variedade	Sobreviventes ^b	%	Com brotos ^c	%	PCR+ ^d	%	Título médio ^e
81G513	6	67	4	67	4	100	3,91 ± 0,54
61AA3	10	83	4	40	3	75	4,69 ± 0,42
Limão 'Cravo'	10	83	7	70	7	100	4,02 ± 0,34
<i>Poncirus trifoliata</i>	11	85	11	100	10	83	3,58 ± 0,17
Tangerina 'Sunki'	9	75	7	78	6	86	4,60 ± 0,30
Citrumelo 'Swingle'	10	83	10	100	7	70	3,38 ± 0,36
Laranja 'Valência'	8	80	6	75	6	100	4,03 ± 0,31
F							2,17
P							0,0683

(^a) Número de plantas inoculadas que sobreviveram; (^b) Plantas inoculadas que emitiram broto; (^c) número de brotos que resultaram positivo ($Ct \leq 34$) após análise de qPCR; (^d) Média do Log_{10} do número estimado de células de *Ca. L. asiaticus* por grama de tecido.

Após a retirada do garfo muitas plantas morreram. O nível de sobrevivência variou entre 8% das plantas no 81G220, 58% no 75AB, 75% na tangerineira 'Sunki', 83% nas plantas do 61AA3 e de 'Swingle' e 85% nas de *P. trifoliata*. Todas as plantas dos demais materiais sobreviveram.

Os materiais com maiores porcentagens de plantas com brotos foram os porta-enxertos 81G513 com 67%, limoeiro 'Cravo' com 70%, 'Valência' com 75%, 'Sunki' com 78%, e 'Swingle' e *P. trifoliata* com 100%. Os materiais com menores porcentagens de plantas com brotos foram o 75AB e 61AA3, com 29 e 40% respectivamente. Os híbridos 81G220 e 79AC não emitiram brotos. Na maioria dos brotos a bactéria foi detectada, variando de 70 a 100%, com exceção do híbrido 75AB com a bactéria detectada em 50% dos brotos avaliados. Com relação ao título médio, não foi observada diferença entre os materiais avaliados (F 2,17; P 0,06). Os híbridos 81G220 e 79AC não permitiram comparação de médias devido à alta mortalidade.

Os resultados referentes a sobrevivência e presença de *Liberibacter* na casca dos caules das plantas inoculadas são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5. Sobrevivência e resultado da análise por qPCR dos caules das plantas inoculadas com *Candidatus Liberibacter asiaticus* e da 'Valência'.

Variedade	Sobreviventes ^b	%	PCR+ ^c	%	Título médio ^d
81G513	3	33	3	100	6,24 ± 0,12 bc
61AA3	10	83	10	100	4,95 ± 0,38 abc
75 AB	6	50	5	83	4,85 ± 0,18 abc
Limão 'Cravo'	7	58	7	100	5,46 ± 0,11 abc
<i>Poncirus trifoliata</i>	11	85	11	100	4,90 ± 0,12 ac
Tangerina 'Sunki'	9	75	8	89	6,04 ± 0,10 b
Citrumelo 'Swingle'	10	83	10	100	4,55 ± 0,21 a
Laranja 'Valência'	7	70	7	100	5,46 ± 0,51 abc
F					4,12
P					0,0011

(^a) Número de plantas inoculadas que sobreviveram; (^b) número de cascas dos caules que resultaram positivo (Ct ≤ 34) após análise de qPCR; (^c) Média do Log₁₀ do número estimado de células de *Ca. L. asiaticus* por grama de tecido. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Candidatus Liberibacter asiaticus foi detectada em 100% das plantas dos híbridos 81G513 e 61AA3, do limoeiro 'Cravo', de *P. trifoliata*, citrumeleiro 'Swingle' e da laranjeira 'Valência', em 89% da tangerineira 'Sunki' e em 83% do 75AB.

Com relação ao título de *Ca. L. asiaticus*, os maiores valores foram encontrados nos caules das plantas do híbrido 81G513 e da tangerineira 'Sunki', com médias de 6,24 e 6,04 respectivamente. O menor título foi encontrado no porta-enxerto citrumeleiro 'Swingle', com média de 4,55.

Os resultados referentes à sobrevivência e multiplicação de *Liberibacter* nas raízes das plantas inoculadas são mostrados na Tabela 6.

Tabela 6. Sobrevivência e resultado da análise por qPCR das raízes das plantas inoculadas com *Candidatus Liberibacter asiaticus* e da 'Valência'.

Variedade	PCR+ ^c	%	Título médio ^d
81G513	3	100	5,51 ± 0,11 bc
61AA3	9	90	5,67 ± 0,15 c
75AB	5	83	3,88 ± 0,29 a
Limão 'Cravo'	7	100	3,86 ± 0,41 a
<i>Poncirus trifoliata</i>	11	100	3,93 ± 0,14 a
Tangerina 'Sunki'	7	78	4,07 ± 0,18 ab
Citrumelo 'Swingle'	10	100	3,63 ± 0,27 a
Laranja 'Valência'	5	71	5,49 ± 0,28 c
F			11,24
P			0,0000

(^a) Número de amostras de raízes que resultaram positivo ($Ct \leq 34$) após análise de qPCR; (^b) Média do \log_{10} do número estimado de células de *Ca. L. asiaticus* por grama de tecido. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Nas raízes *Ca. L. asiaticus* foi detectada em 100% das plantas do porta-enxerto 81G513, 61AA3, do limoeiro 'Cravo', de *P. trifoliata*, do citrumeleiro 'Swingle' e da laranjeira 'Valência', em 89% das plantas da tangerineira 'Sunki', e em 83% das plantas do 75AB.

Quando comparados os títulos médios, os menores valores foram encontrados em citrumeleiro 'Swingle' (log médio de 3,63), limoeiro 'Cravo' (3,86), 75AB (3,88) e *P. trifoliata* (3,93), e os maiores valores em laranjeira 'Valência' (5,49) e 61AA3 (5,67). O híbrido 81G513 (5,51) e a tangerineira 'Sunki' (4,06) não diferiram estatisticamente dos dois primeiros grupos avaliados.

A baixa sobrevivência limitou análise mais detalhada da influência dos materiais incluídos neste estudo em multiplicar a bactéria do HLB. Os porta-enxertos 81G220, 79AC e o 81G513 apresentaram alta mortalidade. Não foi possível identificar a possível causa. Acredita-se que pode estar associada a incompatibilidade da variedade usada como inóculo com a variedade inoculada. Também pode ser devida a alta sensibilidade à colonização pela bactéria, como ocorre com a laranjeira 'Azeda', alguns limoeiros verdadeiros, o limoeiro 'Galego', certos pomeleiros e a laranjeira 'Pêra' em relação ao vírus da tristeza dos citros (FEICHTENBERGER et al., 2005).

Reação de incompatibilidade entre porta-enxerto e copas tem sido relatada na literatura. Oliveira et al. (2012) observaram que o citrumeleiro 'Swingle' apresentou

maior grau de incompatibilidade com as copas de laranjeiras 'Pera B', 'Cara-Cara', 'Westin' e tangeleiro 'Page'. Segundo Stuchi et al., (2002) a tangerineira 'Cleópatra' apresenta incompatibilidade com algumas variedades como a tangerineira 'Satsuma' e os limoeiros 'Eureka' e 'Lisboa'.

Todos os relatos na literatura apontam para uma não existência de fontes de resistência à *Ca. Liberibacter* dentro do gênero *Citrus* e até mesmo em outros gêneros da família Rutaceae (HALBERT e MANJUNATH, 2004). Contudo, trabalhos recentes sugerem que os porta-enxertos podem ter influência na incidência e severidade do HLB, como é o caso do cultivar 'Carrizo', da tangerineira 'Sunki' e de *P. trifoliata*.

No presente estudo demonstrou-se que houve influência dos porta-enxertos na multiplicação de *Ca. L. asiaticus*, no qual o híbrido 81G513 foi o que proporcionou menores concentrações da bactéria em brotações da fonte de inóculo. O citrumeleiro 'Swingle' apresentou menores valores tanto no caule como na raiz, seguido dos porta-enxertos limoeiro 'Cravo', 75AB e de *P. trifoliata*. Porém, não se pode afirmar que se trata de resistência porque a bactéria multiplicou em altas taxas em todos os materiais estudados e em todas as partes avaliadas. Há que se ressaltar, no entanto, que os dados obtidos neste trabalho se referem a avaliação de plantas inoculadas por enxertia, situação que não ocorre em condições naturais, onde o vetor é a única forma de transmissão.

Variação na capacidade de multiplicar *Liberibacter* também ocorreu nos estudos feitos por Boscariol-Camargo et al. (2010), ao avaliarem diferentes genótipos de citros e gêneros próximos. Após a inoculação por borbulhas infectadas a bactéria foi detectada em todos os genótipos avaliados, mas em menores valores na limeira da 'Pérsia', *P. trifoliata* e 'Atalantia'. Albrecht et al. (2012), avaliando a influência de diferentes porta-enxertos nas copas de laranjeiras doce a nível de campo, também observaram que os porta-enxertos não afetam a incidência da doença e que as árvores em todos os porta-enxertos foram danificadas consideravelmente por HLB.

A tolerância de *P. trifoliata* e seus híbridos, muito citada na literatura, não se confirmou no presente estudo. Marengo (2009) encontrou menor taxa de infecção e mais lenta multiplicação da bactéria. O mesmo foi encontrado por Albrecht et al.

(2011) em mudas de US-897 [híbrido de *P. trifoliata* e tangerineira 'Cleópatra' (*C. reticulata* Blanco)].

O mesmo ocorreu com a tangerineira 'Sunki' que apesar de também ter sido citada como tolerante à bactéria do HLB (Marengo, 2009), neste estudo, apresentou títulos similares ao dos demais materiais. Lopes et al. (2013), avaliando padrões de colonização e distribuição de *Ca. L. asiaticus* em diferentes porta-enxertos de citros também não encontrou diferenças no título encontrado na tangerineira 'Sunki' em relação ao limoeiro 'Cravo' e ao citrumeleiro 'Swingle'.

Embora diferenças estatísticas significativas nos valores de log tenham sido encontradas, não só na raiz como em todas as partes avaliadas, estas diferenças não foram grandes o suficiente que permitam separar os materiais estudados em suscetíveis e resistentes.

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente estudo pode-se concluir:

- 1) Que ao limitar a multiplicação de *D. citri* nas brotações, o híbrido 79AC pode ter alguma importância em reduzir a população de *D. citri* em pomares, se esta característica for transportada para a copa das árvores enxertadas sobre este porta-enxerto;
- 2) Que ao permitir a multiplicação e colonização de *Ca. L. asiaticus* em todas as partes avaliadas, nenhum dos híbridos estudados apresenta qualquer resistência à bactéria do HLB;
- 3) Que novos estudos devem ser conduzidos para verificar se a influência em limitar o desenvolvimento do inseto em pé-franco se repete em mudas tendo como copas laranjas ou outras variedades/espécies exploradas comercialmente.

6. REFERÊNCIAS

- AGRIANUAL: anuário da agricultura brasileira. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio, 2014. 267p.
- ALBRECHT, U.; BOWMAN, K.D. Tolerance of the Trifoliolate Citrus Hybrid US-897 (*Citrus reticulata* Blanco x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) to Huanglongbing. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.46, n.1, p.16–22, 2011.
- ALBRECHT, U.; BOWMAN, K.D. Tolerance of trifoliolate citrus rootstock hybrids to *Candidatus Liberibacter asiaticus*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.147, p.71–80, 2012.
- ALBRECHT, U.; MCCOLLUM, G.; BOWMAN, K. D. Influence of rootstock variety on Huanglongbing disease development in field-grown sweet orange (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck) trees. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.138, p.210–220, 2012.
- ALVES, G. R.; DINIZ, A. J. F.; PARRA, J. R. P. Biology of the Huanglongbing Vector *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) on Different Host Plants. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.107, p.691-696, 2014.
- AMMAR, E.; SHATTERS, R. G.; HALL, D. G. Localization of *Candidatus liberibacter asiaticus* associated with huanglongbing in various organs of its psyllid vector using FISH and Q-PCR. **Phytopathology**, St. Paul, v.101, p.56, 2011
- AUBERT, B. *Trioza erytrae* Del Guercio and *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae), the two vectors of citrus greening disease: biological aspects and possible control strategies. **Fruits**, Paris, v.42, p.149-62, 1987.
- BASSANEZI, R.B.; MONTESINO, L.H. Yield loss caused by huanglongbing in different sweet orange cultivars in São Paulo, Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.130, p.577-586, 2011.
- BEATTIE, G. A. C.; BARKLEY, P. **Huanglongbing and its vectors: a pest-specific contingency plan for the citrus and nursery and garden industries**. Sydney: Horticulture Australia, 2009. 272p.
- BELASQUE Jr, J.; BERGAMIN FILHO, A.; BASSANEZI, R. B.; et al. Base científica para a erradicação de plantas sintomáticas de assintomáticas de Huanglongbing (HLB, greening) visando o controle efetivo da doença. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v.34, p.137-145, 2009b.
- BLACKWELL, P. *Diaphorina citri*. **EPPO Bulletin**, Oxford, v.35, n.2, p.331-3, 2005.
- BOSCARIOL-CAMARGO, R. L.; CRISTOFANI-YALY, M.; MALOSSO, A.; COLETTA-FILHO, H. D.; MACHADO, M. A. Avaliação de diferentes genótipos de citros à infecção por *Candidatus Liberibacter asiaticus*. **Revista Citrus Research e Technology**, Cordeirópolis, v.31, n. 1, p.85-90, 2010.

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

CAPOOR, S. P.; RAO, D. G.; VISWANATH, S. M. *Diaphorina citri* Kuwayama, a vector of greening disease of citrus in India. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, New Dehli, v.37, p.572-576, 1967.

CAPOOR, S. R.; RAO, D. G.; VISWANATH, S. M. Greening disease of citrus in the Deccan Trap Country and its relationship whit the vector, *Diaphorina citri* Kuwayama In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGIST, 6., 1974, Richmond. **Proceedings...** p.43-49.

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

CASTLE, W. S.; TUCKER, D. P.H., KREZDORN, A. H., et al. **Rootstocks**. Gainesville: University of Florida. 1992. Disponível em: <<http://www.hammock.ifas.ufl.edu>>. Acesso em: 06 junho 2014

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

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

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

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

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

EPPO. **Database on Quarantine pest. *Diaphorina citri***. 2014. Disponível em <[http://www.eppo.int/QUARANTINE/insects/Diaphorina_citri/pm752\(1\)%20DIA%20web.pdf](http://www.eppo.int/QUARANTINE/insects/Diaphorina_citri/pm752(1)%20DIA%20web.pdf)>. Acesso em: 20 jun. 2014.

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

FEICHTENBERGER, E.; BASSANEZI, R. B.; SPÓSITO, M. B.; BELASQUE Jr. Doenças dos citros. In: KIMATI, H.; AMORIN, L.; BERGAMIN FILHO, A.;

CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v.2, p.239-269.

FLOYD, J.; KRASS, C. **Huanglongbing citrus greening disease. New pest response guidelines**. United States Department of Agriculture, 2006. p.84. Disponível em: <http://www.aphis.usda.gov/plant_health/plant_pest_info/citrus_greening/downloads/pdf_files/hlb-pubversion.pdf>. Acesso em: 05 maio 2014.

FUNDECITRUS. **Fundo de defesa da citricultura**. Levantamento amostral. 2013. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/Pagina/Levantamentoamostral,106>>. Acesso em: 30 jan. 2014.

GALLO, D. et al. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920p.

GARNIER M.; BOVÉ J. M. Transmission of the organism associated with citrus greening disease from sweet orange to periwinkle by dodder. **Phytopathology**, St. Paul, v.73, p.1358-1363, 1983.

GARNIER, M.; DANIEL, N.; BOVÉ, J. M. Etiology of citrus greening disease. **Annales de Microbiologie**, Paris, v.153A, p.169-179, 1984.

GASPAROTO, M. C. G. **Epidemiologia comparativa entre ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ e ‘*Candidatus Liberibacter americanus*’ em ambiente controlado**. 2010. 109 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

GIMENES-FERNANDES, N.; BASSANEZI, R. B. Doença de causa desconhecida afeta pomares cítricos no norte de São Paulo e sul do Triângulo Mineiro. **Summa Phytopatologica**, Botucatu, n. 27, p.93, 2001.

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

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

GOTTWALD, T. R. Current epidemiological understanding of citrus huanglongbing. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.48, p.119 - 139, 2010.

HAIR, J.F., BLACK, W., BABIN, B., ANDERSON, R.E., e TATHAM, R.L. (2005). **Multivariate data analysis** (5th ed.). Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall.

HALBERT S. E. The discovery of huanglongbing in Florida. INTERNATIONAL CITRUS CANCKER AND HUANGLONGBING RESEARCH WORKSHOP, 2., 2005, Florida. **Proceedings...** Orlando: Citrus Mutual, 2005. H-3.

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

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

HOLLIS, D. A new citrus-feeding psyllid from the Comoro Islands, with a review of the *Diaphorina amoena* species group (Homoptera). **Systematic Entomology**, Oxford, v.12, p.47-61, 1987.

HUANG, C. H., TSAI, M. Y.; WANG, C. L. Transmission of citrus likubin by a psyllid, *Diaphorina citri*. **Journal of Agricultural Research**, Washington, v.33, p.65-72, 1984.

HUNG, T. H.; HUNG, S. C.; CHEN, C. N.; HSU, M. H.; SU, H. J. Detection by PCR of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the bacterium causing citrus huanglongbing in vector psyllids: application to the study of vector–pathogen relationships. **Plant Pathology**, Oxford, v.53, p.96–102, 2004.

HUNG, T. H.; WU, M. L.; SU, H. J. Identification of Chinese box orange (*Severinia buxifolia*) as an alternative host of the bacterium causing citrus Huanglongbing. **European Journal of Plant Pathology**, Amsterdam, n. 107, p.183-189, 2001.

HUSAIN, M.A.; NATH, D. The citrus psylla (*Diaphorina citri* Kuw.) [Psyllidae: Homoptera]. **Memoirs of the Department of Agriculture in India, Entomology Series**, Calcutta, v.10, p.5–27, 1927.

IAC. **Instituto Biológico de Campinas**. 2014. Disponível em: <<http://www.iac.sp.gov.br/>>. Acesso em: 20 maio 2014.

JAGOUÉIX, S.; BOVÉ, J. M.; GARNIER, M. The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the a subdivision of the proteobacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v.44, p.397–486, 1994.

KIM, J. S.; SAGARAM, U. S.; BURNS, J. K.; LI, J. L.; WANG, N. Responses of sweet orange (*Citrus sinensis*) to ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ infection: microscopy and microarray analyses. **Phytopathology**, Saint Paul, v.99, p.50-57, 2009.

LAFLÈCHE, D.; BOVÉ, J. M. Structures de type mycoplasme dans les feuilles d’orangers atteints de la maladie du greening. **Comptes rendus de l’Académie des Sciences**, Series D, Paris, v.270, p.455-465, 1970.

LI, W. B. **Avaliação do comportamento de variedades de copas e porta-enxertos à clorose variegada dos citros**. 1997. 55 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1997.

LI, W. B., J. S. HARTUNG, AND L. LEVY. Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus

huanglongbing. **Journal Microbiological Methods**, Amsterdam, v.66, p.104-115, 2006.

LI, W.; LEVY, L.; HARTUNG, J. S. Quantitative distribution of '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' in plants with citrus huanglongbing. **Phytopathology**, Saint Paul, v.99, p.139-144, 2009.

LIN, K. H. Yellow shoot of citrus. Symptomatology. Investigations in the cause of huanglongbing. Natural transmission and spread. General conclusions. **Acta Phytopathologica Sinica**, Beijing, v.2, p.1-42, 1956.

LLAUGER, R.; LUIS, M.; COLLAZO, C.; TEIXEIRA, D. C.; MARTINS, E. C.; PENA, I.; LÓPEZ, D.; BATISTA, L.; PRIETO, D.; RIANO, R.; BORROTO, A.; CUETO, J.; AYRES, J.; BOVÉ, J. M. PCR detection of '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' associated with Citrus Huanglongbing in Cuba. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v.33, p.S93, 2008.

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

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

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

LOPES, S. A.; FRARE, G. F.; YAMAMOTO, P. T.; AYRES, A. J.; BARBOSA, J. C. Ineffectiveness of pruning to control citrus huanglongbing caused by '*Candidatus* Liberibacter americanus'. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.119, p.463-468, 2007.

LOPES, S. A.; LUIZ, F. Q. B. F.; STUCHI, E. S. Colonization and distribution patterns of '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' in distinct citrus rootstocks. In: INTERNATIONAL RESEARCH CONFERENCE ON HLB, 3., 2013, Orlando. **Proceedings...**

LOPES, S. A.; FRARE, G. F.; MARTINS, E. C. Plantas hospedeiras de Liberibacter no Brasil. In: HUANGLONGBING GREENING INTERNATIONAL WORKSHOP, 2006, Ribeirão Preto. **Anais...** p.27

LUIZ, M.; COLLAZO, C.; LLAUGER, R.; BLANCO, E.; PEÑA, I.; LÓPEZ, D.; GONZÁLEZ, C.; CASÍN, J. C.; BATISTA, L.; KITAJIMA, E.; TANAKA, F. A. O.; SALAROLI, R. B.; TEIXEIRA, D. C.; MARTINS, E. C.; BOVÉ, J. M. Occurrence of citrus huanglongbing in Cuba and association of the disease with '*Candidatus* Liberibacter asiaticus'. **Journal of Plant Pathology**, Pisa, v.91, n.3, p.709-712, 2009.

MANN, R. S.; PELZ-STELINSKI, K.; HERMANN, S. L.; TIWARI, S.; STELINSKI, L. L. Sexual transmission of a plant pathogenic bacterium, *Candidatus Liberibacter asiaticus*, between, conspecific insect vector during mating. **Plos One**, San Francisco, v.6, n. 12, 2011.

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

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

MAYHEW, P.J. Herbivore host choice and optimal bad motherhood. **Trends In Ecology e Evolution**, London, v.16, p.165-167, 2001.

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

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

MENDONÇA, W. J. Q. F. **Evolução da infecção por *Candidatus Liberibacter asiaticus* e dos sintomas de huanglongbing em plantas cítricas no sul do Triângulo Mineiro e região central do Estado de São Paulo**. 2015. 45 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Controle de Doenças e Pragas dos Citros) – Fundo de Defesa da Citricultura, Araraquara, 2015.

MULLER, G. W.; NEGRI, J. D.; VILDOSO, C. I. A.; MATTOS, J. R. D.; POMPEU JR, J.; TEÓFILO SOBRINHO, J.; CARVALHO, S. A.; GIROTTO, L. F.; MACHADO, M. A. Morte súbita dos citros: uma nova doença na citricultura brasileira. **Laranja**, Cordeirópolis, v.23, n. 2, p.371-386, 2002.

MURRAY, R. G. E, SCHLEIFER, K. H. Taxonomics notes: a proposal for recording the properties of putative taxa of prokaryotes. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v.44, p.174-176, 1994.

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

NEHRU, R. K.; BHAGAT, K. C.; KOUL, V.K. Influence of citrus species on the development of *Diaphorina citri*. **Annals of Plant Protection Sciences**, New Dehli, v.12, n.2, p.436-438, 2004.

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

OBERHOLZER, P.C. J.; HOFMEYR, J. D. J. **The nature control of clonal senility in commercial varieties of citrus in South Africa**. Pretoria: Faculty of Agriculture, University of Pretoria, 1955. p.46.

OLIVEIRA, E. R. M.; SOUZA, E. S.; GIRARDI, E. A.; SOARES, W. S.; SANTOS, M. G.; PASSOS, O. S. Incompatibilidade de combinações copa e porta-enxerto de citros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 22., 2012, Bento Gonçalves. **Anais...**

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

PANTOJA, M. L.; CORDERO, C. C.; RIVERON, R. L.; et al. Huanglongbing in Cuban Citriculture.. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 11., 2008, Wuhan, China. **Book of Program and Abstracts...** p.50-51, 2008.

PELZ-STELINSKI, K. S.; BRLANSKY, R. H.; EBERT, T. A.; ROGERS, M. E. Transmission parameters for *Candidatus Liberibacter asiaticus* by Asian citrus psyllid (Hemiptera: Psyllidae). **Journal of Economical Entomology**, Lanham, v.103, p.1531-1541, 2010.

POMPEU JUNIOR J. Porta-enxertos. In: MATTOS JUNIOR, D., NEGRI, J. D, PIO, R. M; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Cordeirópolis: Centro APTA Citros Sylvio Moreira, 2005. p.63-104.

POMPEU JÚNIOR, J. Porta-enxertos. In: RODRIGUEZ, O., VIEGAS, F. C. P., POMPEU JÚNIOR, J., et al. **Citricultura brasileira**. 2.ed. Campinas: Fundação Cargill, 1991. v.1, p.265-280.

POMPEU JUNIOR, J.; SALVA, R.; BLUMER, S. Copas e porta-enxertos nos viveiros de mudas cítricas no Estado de São Paulo. **Laranja**, Cordeirópolis, v.25, n. 2, p.413-426, 2004.

RAYCHAUDHURI, S. P.; NARIANI, T. K.; LELE, V.C.; SINGH, G. R. Greening and citrus decline in India. In: CONFERENCE OF THE NATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 5., 1972. Swaziland. **Proceedings...** p.35-37.

REINKING, O. A. Diseases of economic plants in southern China. **Philippine Agriculturist**, Los Baños, v.8, p.109-135, 1919.

SANTOS, M. **Reação de 16 porta-enxertos sob laranjeira ‘Valência’ ao agente causal, *Candidatus Liberibacter asiaticus***. 2013. 52 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias,. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2013.

SAPONARI M.; DE BAC, G.; BREITHAUPT, J.; LOCONSOLE, G.; YOKOMI, R. K.; CATALANO, L. First Report of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ Associated with

Huanglongbing in Sweet Orange in Ethiopia. **Plant Disease**, St. Paul, v.94, n.4, p.482, 2010.

SAS INSTITUTE. **SAS system**: SAS/STAT version 9.1. Cary, 2003.

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

STATGRAPHICS CENTURION XVI. **Statpoint technologies**. Warrenton, 2010.

STATSOFT. **Estatistica**: data analysis software system: version 7.0. Tulsa, 2004.

STOLLER. **Guia de fases dos citros**. 2014. Disponível em: <<http://www.stoller.com.br/guias/guia-de-fases>>. Acesso em: 8 fev.2014.

STUCHI, E. Incompatibilidade: uma questão importante na escolha do porta-enxerto. **Citricultura Atual**, Cordeirópolis, v.5, n.26, p.8-9, 2002.

SUTTON, B; DUAN, Y; HALBERT, S; SUN, X; SCHUBERT, T; DIXON, W. Detection and identification of citrus huanglongbing (greening) in Florida, USA. In: INTERNATIONAL CITRUS CANCKER AND HUANGLONGBING RESEARCH, 2., 2005, Orlando. **Proceedings....** Orlando: Citrus Mutual, 2005. p.59.

TANAKA, F. A. O.; COLETTA-FILHO, H. D.; ALVES, K. C. S.; SPINELLI, M.O.; MACHADO, M. A.; KITAJIMA, E. W. Detection of de "*Candidatus Liberibacter americanus*" in phloem vessels of experimentally infected *Catharanthus roseus* by scanning electron microscopy. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.32, n.6, p.519, 2007.

TATINENI, S.; SAGARAM, U. S.; GOWDA, S.; ROBERTSON, C. J.; DAWSON, W. O.; IWANAMI, T.; WANG, N. In planta distribution of '*Candidatus liberibacter asiaticus*' as a revealed by polymerase chain reaction (PCR) and Real-time PCR. **Phytopathology**, Saint Paul, v.98, p.592-599, 2008.

TECK, S. L. C.; FATIMAH, A.; BEATTIE, A.; HENG, R. K. J.; KING, W. S. Influence of host plant species and flush growth stage on the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama. **American Journal of Agricultural and Biology Sciences**, Vails, v.6, p.536-543, 2011.

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

TEIXEIRA, D. C.; SAILLARD, C.; COUTURE, C.; MARTINS, E. C.; WULFF, N. A.; EVEILLARD-JAGOUÉIX, S.; YAMAMOTO, P. T.; AYRES, A. J.; BOVE, J. M.

Distribution and quantification of *Candidatus Liberibacter americanus*, agent of huanglongbing disease of citrus in Sao Paulo State, Brazil, in leaves of an affected sweet orange tree as determined by PCR. **Molecular and Cellular Probes**, London, v.22, p.139-150, 2008.

TSAGKARAKIS, A. E.; ROGERS, M. E. Suitability of 'Cleopatra' mandarin as a host plant for *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). **Florida Entomologist**, Gainesville, v.9, p.451-453, 2010.

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

TSAI, J. H.; CHEN, Z. Y.; SHEN, C. Y., JIN, K. X. **Mycoplasmas and fastidious vascular prokaryotes associated with tree diseases in China**. Edmonton: University of Alberta Press, 1988. p.69-77.

VAN, M. A. J., ANDERSEN, F. G. Chromium and manganese toxicity. Is it important in Transvaal citrus greening? **Farming South Africa**, Pretoria, v.12, p.439-440, 1937.

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

WENNINGER, E. J.; HALL, D. G. Daily timing of mating and Age at Reproductive Maturity in *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). **Florida Entomologist**, Gainesville, v.90, n. 4, p.715-722, 2007.

WESTBROOK, C. J.; HALL , D. G.; STOVER, E.; DUAN, Y. P.; LEE, R. F. Colonization of citrus and citrus-related germplasm by *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). **HortScience**, Alexandria, v.46, p.997-1005, 2011.

WISE, M. J.; PARTELOW, J. M.; EVERSON, K. J.; ANSELMO, M. K.; ABRAHAMSON, W. G. Good mothers, bad mothers, and the nature of resistance to herbivory in *Solidago altissima*. **Oecologia**, Heidelberg, v.155, p.257-266, 2008.

XU, C. F.; XIA, Y. H.; LI, K. B.; E, K. C. Further study of the transmission of citrus huanglongbing by a psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 10., 1986, Valencia. **Proceedings...** Riverside: University of California, 1988.

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

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

ZHAO, X.Y. Citrus yellow shoot disease (Huanglongbing) – a review. In: INTERNATIONAL SOCIETY OF CITRICULTURE, 1., 1981, Tokyo. **Proceedings...** p.466-469.