

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**VELOCIDADE DE COLONIZAÇÃO DE ‘*Candidatus Liberibacter*
asiaticus’ EM LARANJEIRA VALÊNCIA, LIMOEIRO SICILIANO E
LIMEIRA ÁCIDA TAHITI**

Solange Celestino Costa

Engenheira Agrônoma

2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

VELOCIDADE DE COLONIZAÇÃO DE ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ EM LARANJEIRA VALÊNCIA, LIMOEIRO SICILIANO E LIMEIRA ÁCIDA TAHITI

Discente: Solange Celestino Costa

Orientador: Prof. Dr. Sílvio Aparecido Lopes

Co-orientador: Dr. Laudecir Lemos Raiol Júnior

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

C837v

Costa, Solange Celestino

Velocidade de Colonização de 'Candidatus Liberibacter asiaticus'
em Laranjeira Valência, Limoeiro Siciliano e Limeira ácida Tahiti /
Solange Celestino Costa. -- Jaboticabal, 2021

56 p. : il., tabs.

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

Orientador: Sílvio Aparecido Lopes

Coorientador: Laudecir Lemos Raiol Júnior

1. Citrus spp. 2. Floema. 3. Huanglongbing. 4. qPCR. 5.
Translocação. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: VELOCIDADE DE COLONIZAÇÃO DE *Candidatus Liberibacter asiaticus* EM LARANJEIRA VALÊNCIA, LIMOEIRO SICILIANO E LIMEIRA ÁCIDA TAHITI

AUTORA: SOLANGE CELESTINO COSTA

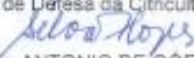
ORIENTADOR: SILVIO APARECIDO LOPES

COORDENADOR: LAUDECI R LEMOS RAIOL JÚNIOR

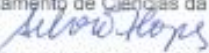
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL), pela Comissão Examinadora:



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



Prof. Dr. ANTONIO DE GÓES (Participação Virtual)
Departamento de Ciências da Produção Agrícola (Fitossanidade) / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Profa. Dra. NILVANIRA DONIZETE TEBALDI (Participação Virtual)
Universidade Federal Uberlândia-UFU / Uberlândia/MG

Jaboticabal, 09 de agosto de 2021

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

SOLANGE CELESTINO COSTA – nascida em 22 de janeiro de 1989, em Montes Claros - MG. Iniciou o curso de graduação em Engenharia Agrônômica, em outubro de 2013, na Universidade Federal de Uberlândia (UFU), concluindo-o em novembro de 2018. Durante a Graduação, atuei como monitora nas disciplinas de Nematologia Agrícola, Foi Bolsista de Iniciação Científica-FAPEMIG, 2016-0075-UFU. Em março de 2019, iniciou o curso de mestrado junto ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal) na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP - Jaboticabal), onde foi membra da Associação de Pós-graduandos, qualificou em março de 2021, sendo bolsista Capes.

E-mail: scelestinocosta@hotmail.com

“Apesar dos nossos defeitos, precisamos enxergar que somos pérolas únicas no teatro da vida e entender que não existem pessoas de sucesso ou pessoas fracassadas. O que existe são pessoas que lutam pelos seus sonhos ou desistem deles.”

Augusto Cury

Aos meus avós maternos, Senhorinha Rosa Celestino e Januário Cardoso Celestino, e paterno, Petronilho José da Costa, que me fizeram sentir amada, e estariam orgulhosos de participar deste momento da minha vida.

A minha mãe Hilda, por ter me apoiado todos os dias na caminhada para a realização deste sonho.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser tão maravilhoso e justo.

A Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Departamento de Fitossanidade e Fitopatologia pela oportunidade de realização do Mestrado.

Ao meu orientador Prof. Dr. Sílvio Aparecido Lopes, e ao meu coorientador Laudecir Lemos Raiol Júnior, pela orientação e confiança durante o mestrado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Ao Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus), pelo apoio e pela infraestrutura disponibilizada.

Aos Professores e Doutores Prof. Dr. Rouverson Pereira da Silva, Arthur Bernardes, Pedro Luís da Costa, Antônio de Góes e Rita de Cássia pela amizade, confiança, apoio, conselhos e ensinamentos.

A Waleska Carvalho por todo o companheirismo, amizade, por ter enfrentado todos os momentos intensos e por ter sido essencial em todas as etapas do mestrado.

Aos pesquisadores e funcionários Everton Carvalho, Hermes Teixeira, Wellington Santos, Fernanda Queiróz, Priscila Alves e Juan Camilo do Fundecitrus, que foram fundamentais em todas as etapas do trabalho, e por terem ajudado a tornar tudo mais leve.

Aos amigos que Jaboticabal me presenteou, Gilmar Nunes, Hágabo Honorato, Naum Collins, Kolima Peña, João de Deus, Juan Rocha, Paulo Henrique, Maricélio Souza, Ellen Nabiça, Bianca Cavalcante e Maria Alice que tornaram toda essa trajetória mais leve. Amo vocês. Em especial agradeço à Lígia Paulino e à dona Lucília que além da amizade incontestável me fizeram sentir que tinha uma família em Jaboticabal. A Mariele de Santi pela companhia de moradia e pelo apoio.

Aos membros da Associação de Pós-graduandos da Unesp, que além de parceiros no trabalho foram bons amigos.

Toda minha gratidão aos meus amigos de graduação, Fabiana Fraga, Raquel Pinheiro, Ivair Moraes, Ellen Vanelly, Débora Mendes, Zenóbia Cardoso, Nayara Sobral, Karina de Souza e Hutson Roger, Ana Flávia, Diego Lucas, Ana Karinne pela amizade, lealdade, apoio e inspiração, e a Lara Caroline pelos ensinamentos.

A minha avó Maura Elvira de Jesus, aos meus tios, tias, primos e primas pelo apoio nesta etapa. Aos meus irmãos Sandro e Suzete, e a minha cunhada Francelina, pelo apoio, conselhos e inspiração. Ao meu sobrinho Josué, e as minhas afilhadas Pollyana e Sophia que me tornam uma pessoa melhor a cada dia.

A minha mãe Hilda Rosa e ao meu pai Antenor Graciano, que foi meu apoio, minha torcida, que se preocupou e fez o possível para eu realizar esse sonho.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1. Citricultura geral	18
2.2. Huanglongbing (HLB).....	19
2.3. Sintomatologia	20
2.4. Colonização e movimentação de <i>Candidatus Liberibacter</i> spp.....	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1. Material vegetal	24
3.2. Inoculação de ' <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> '	24
3.3. Avaliações.....	25
3.3.1. Extração de DNA e qPCR.....	26
3.4. Análise dos dados	27
4. RESULTADOS	28
4.1. Colonização das plantas	28
4.1.1. Primeiro experimento.....	28
A. Colonização ascendente	28
4.1.2. Segundo experimento.....	31
A. Colonização ascendente	31
4.2. Frequência de detecção.....	34
4.3. População de ' <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> ' nos pontos amostrados	35
4.4. Velocidade de colonização.....	37
5. DISCUSSÃO	44
6. REFERÊNCIAS	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática dos pontos de amostragem utilizados para avaliação da colonização de plantas de citros por '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' (Las). As amostras consistiram em anéis completos de casca de 1 cm de largura, coletados aos 21, 28, 35, 42 e 49 dias após a inoculação a (A) 15 cm, (B) 10 cm, e (C) 5 cm acima e (D) 5 cm, (E) 10 cm, e (F) 15 cm abaixo do inóculo, além de raízes fibrosas e brotos conforme indicado.....26

Figura 2. Modelo monomolecular ajustado para a frequência de colonização de plantas de laranja doce 'Valência', limão Siciliano e lima ácida 'Tahiti' enxertadas em citrumelo 'Swingle por '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' acima e abaixo nos períodos de (A) janeiro a março e (B) setembro a novembro . O modelo foi ajustado com a média dos valores dos dois experimentos.35

Figura 3. Temperaturas mínimas (T °C Min), médias (T °C Média) e máximas (T °C Máx) registradas no período de janeiro a março **(A)** e de setembro a novembro **(B)** de 2020 dentro da casa de vegetação onde foi conduzido os experimentos para avaliar a velocidade de colonização de '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' em plantas de laranja 'Valência', limão 'Siciliano' e lima ácida 'Tahiti'.44

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Progresso de colonização e título bacteriano de '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' em plantas de laranja doce 'Valência', 'Siciliano' e 'Tahiti' acima e abaixo do ponto de inoculação a diferentes distâncias do inóculo durante o verão.30
- Tabela 2.** Progresso de colonização e título bacteriano de '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' em plantas de laranja doce 'Valência', limão 'Siciliano' e lima ácida 'Tahiti' acima e abaixo do ponto de inoculação a diferentes distâncias e em função do tempo na primavera.33
- Tabela 3.** Coeficientes do modelo monomolecular que descrevem a probabilidade de detecção de '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' em função do tempo após a data de inoculação e da distância do ponto de inoculação acima e abaixo em plantas de lima Tahiti.34
- Tabela 4.** Análise de variância do modelo linear generalizado da influência do tempo (dias após a data de inoculação) e da distância a partir do ponto de inoculação na probabilidade de detecção de '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' em plantas de laranjeira doce 'Valência', limão 'Siciliano' e lima ácida 'Tahiti'.38
- Tabela 5.** Coeficientes do modelo logístico que descreve a probabilidade de detecção de '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' em função do tempo, após a data de inoculação e da distância do ponto de inoculação em plantas de laranja 'Valência'.40
- Tabela 8.** Velocidade de movimentação de Las (cm dia⁻¹) em plantas de 'Valência', 'Tahiti' e 'Siciliano' acima e abaixo do ponto de inoculação dos experimentos do verão e primavera.43

**VELOCIDADE DE COLONIZAÇÃO DE PLANTAS DE LARANJA DOCE
'VALÊNCIA', LIMÃO 'SICILIANO' E LIMA ÁCIDA 'TAHITI' POR '*Candidatus*
Liberibacter asiaticus'**

RESUMO – Huanglongbing (HLB) é uma doença altamente destrutiva dos citros e está associada à infecção por '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' (Las), bactéria Gram-negativa, limitada ao floema e transmitida naturalmente no campo por psílídeos. O objetivo desta pesquisa foi avaliar a velocidade de movimentação de Las em plantas de laranjeira 'Valência', limeira ácida 'Tahiti' e limoeiro 'Siciliano', enxertados no citrumeleiro 'Swingle'. Para o estudo foram inoculadas 50 plantas de cada variedade, que apresentavam 60 cm de altura no momento da inoculação. A inoculação foi feita no caule, a 10 cm acima da linha de junção da copa e porta-enxerto, por meio de enxertia de segmento de ramo oriundo de plantas infectadas. A presença/ausência da bactéria foi determinada em anéis de casca do caule coletados 5, 10 e 15 cm acima e abaixo do ponto de inoculação, além de brotos e raízes fibrosas, e a detecção de Las foi feita com base na amplificação de DNA da bactéria por PCR quantitativo a partir de DNA genômico extraído e purificado das amostras coletadas. As coletas foram feitas aos 21, 28, 35, 42 e 49 dias após a data de inoculação. A pesquisa foi dividida em dois experimentos durante duas épocas do ano, 1) verão (janeiro a março) e 2) primavera (setembro a novembro). A porcentagem de plantas infectadas por Las foi maior em laranjeira 'Valência' e menor no limoeiro 'Siciliano'. A velocidade de movimentação ascendente e descendente de Las em 'Valência' no experimento 1 foi de 0,67 e 1,56 cm dia⁻¹ e no experimento 2 de 0,84 e 1,11 cm dia⁻¹. Na lima ácida 'Tahiti', a velocidade de movimentação foi 0,31 e 0,54 cm dia⁻¹ para o experimento 1 e 0,32 e 0,62 cm dia⁻¹ no segundo experimento. No limão 'Siciliano', a velocidade de movimentação no experimento 1 foi 0,47 e 0,74 cm dia⁻¹ e no experimento 2, 0,36 e 0,49 cm dia⁻¹. A rápida colonização sistêmica de Las comprova porque tentativas de curar a planta, como a poda de ramos sintomáticos e termoterapia não funcionam. Os resultados aqui obtidos permitiram inferir que a poda e a termoterapia também não deverão funcionar para a lima Tahiti e nem para o limoeiro Siciliano.

Palavras-chave: *Citrus* spp., floema, huanglongbing, qPCR, translocação.

SPEED OF COLONIZATION OF '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' IN PLANTS OF 'VALÊNCIA' SWEET ORANGE, 'SICILIAN' LEMON, AND 'TAHITI' ACID LIME

ABSTRACT – Huanglongbing (HLB) is a highly destructive disease of citrus cultivars associated with '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' (Las), Gram-negative bacteria, limited to phloem and transmitted in the field by psyllids. We aimed to evaluate the speed of movement of Las in plants of 'Valencia' sweet orange, 'Tahiti' acid lime tree, and 'Sicilian' lemon tree, grafted on the citrumelo 'Swingle'. For the study, 50 plants of each variety, 60 cm tall, were inoculated. Inoculation was performed on the stem, 10 cm above the junction line between the crown and the rootstock, by grafting a branch segment from infected plants. The detection of the bacterium was determined in stem bark rings, which were collected at 5, 10, and 15 cm above and below the inoculum, as well as fibrous buds and roots. The collections were made at 21, 28, 35, 42, and 49 days after the inoculation date. Las detection was made based on the amplification of the bacterium's DNA by quantitative PCR from plant genomic DNA. The research was performed in two experiments: 1) summer (January to March) and 2) spring (September to November). The percentage of plants infected by Las was higher in the 'Valencia' orange tree and lower in the 'Sicilian' lemon tree. The ascending and descending velocities of Las in 'Valencia' in the experiment 1 was 0.67 and 1.56 cm day⁻¹ and in the experiment 2 was 0.84 and 1.11 cm day⁻¹. In 'Tahiti' acid lime the speed of movement was 0.31 and 0.54 cm day⁻¹ in the experiment 1 and 0.32 and 0.62 cm day⁻¹ in the experiment 2. In 'Sicilian' lemon tree, the speed of movement in the experiment 1 was 0.47 and 0.74 cm day⁻¹ and in the experiment 2 was 0.36 and 0.49 cm day⁻¹. The rapid movement of Las proves why attempts of curing plants, such as pruning symptomatic branches do not work. The results obtained here allowed us to infer that pruning and thermotherapy should not work for 'Tahiti' acid lime or for 'Sicilian' lemon either.

Keywords: *Citrus* spp., huanglongbing, phloem, qPCR, translocation.

1. INTRODUÇÃO

‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ (Las) é uma bactéria Gram-negativa, restrita ao floema de *Citrus* spp. e de outras rutáceas e não cultivável em meios de cultura tradicionais (Garnier et al., 1984; Jagoueix et al., 1994; Bové, 2006) ou em diversos outros meios de cultura testados. Las está associada ao huanglongbing (HLB), considerada a doença mais grave e destrutiva dos citros, e está presente nas principais áreas citrícolas do mundo (Bové, 2006).

No Brasil, Las foi relatada pela primeira vez em 2004, no município de Araraquara, estado de São Paulo (Coletta-Filho et al., 2004). No campo a bactéria é transmitida pelo psílídeo *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) durante o processo de alimentação deste inseto em tecidos jovens da planta (Hall et al., 2013; Wu et al., 2016; Lopes & Arenas, 2021). A transmissão também pode ocorrer por meio da enxertia de segmentos de ramos de plantas doentes (Hilf et al., 2018; Lopes et al., 2009a) e através da planta parasítica *Cuscuta* sp. (Garnier et al., 1984).

O HLB provoca alterações fisiológicas (Boava et al., 2017) e anatômicas na planta cítrica (Kim et al., 2009; Achor et al., 2010) e reduz a produção de frutas (Bassanezi et al., 2011). A identificação de plantas doentes no campo é feita mais comumente através da observação visual dos sintomas expressos em folhas e frutos (Coletta-Filho et al., 2010). Inicialmente os sintomas aparecem nas folhas, que se destacam pela coloração amarela assimétrica do limbo (mosqueado). A nervura central também pode se apresentar espessa e saliente. Com o progresso da doença ocorre intensa desfolha nos ramos afetados que progride para seca dos ponteiros (Bové, 2006). Os sintomas de HLB nas folhas podem ser confundidos com a deficiência de zinco, cálcio e nitrogênio (ANR, 2010). Os sintomas progridem para toda a copa, levando a intensa queda de frutos, tornando a produção economicamente inviável (Dala-Paula et al., 2019). Os frutos dos ramos sintomáticos são pequenos, assimétricos, de coloração irregular, com sementes abortadas e normalmente caem prematuramente (Dala-Paula et al., 2019, Tatineni et al., 2008).

Todos os citros comerciais são suscetíveis ao HLB (Folimonova et al., 2009). A velocidade de expressão dos sintomas e severidade da doença em plantas jovens em casa de vegetação, variaram entre as espécies de citros (Folimonova et al., 2009), sendo mais lenta e menos severa em plantas de lima ácida e limão verdadeiro do que

em plantas de laranja doce. Também em plantas adultas no campo, observou-se que a evolução dos sintomas foi mais rápida nas laranjeiras doces e tangerinas do que nos limões verdadeiros e limas ácidas (Shokrollah et al., 2009). As possíveis causas dessas diferenças ainda não foram esclarecidas.

Entre os citros cultivados, a laranja doce têm sido as mais estudadas quanto a reação ao HLB e interação com Las. Independentemente do tipo ou variedade de citros, sabe-se que a infecção ocorre de forma sistêmica e irregular nos diferentes tecidos e órgãos da planta (Tatineni et al., 2008; Li et al., 2009; Teixeira et al., 2008). Danos no sistema radicular ocorrem antes mesmo do aparecimento dos sintomas nas folhas (Johnson et al., 2014). Além disso, após a inoculação da bactéria pelo inseto vetor *D. citri*, que ocorre quando este se alimenta em brotos jovens (Lopes e Cifuentes-Arenas et al., 2021), Las se move seguindo o fluxo da seiva do floema, indo de tecidos que são fontes de fotoassimilados como folhas maduras, em direção aos tecidos consumidores como folhas jovens em expansão, raízes e frutos (Hilf et al., 2018; Raiol-Junior et al., 2021a; Pandey et al., 2021).

Apesar dos esforços de se entender e quantificar a velocidade de movimentação e o efeito da temperatura no processo de colonização de Las em plantas de laranja doce (*Citrus × aurantium* var. *sinensis* L.) (Raiol-Junior et al., 2021b), a forma como a bactéria se movimenta internamente, entre vasos do floema e de uma parte à outra da planta, ainda não foram totalmente esclarecidas. As diferenças observadas na velocidade de ocorrência e severidade de expressão dos sintomas nas diferentes espécies de citros, cultivadas em vasos e no campo (Folimonova et al., 2009; Shokrollah et al., 2009), podem estar relacionados à variação na velocidade de colonização dessas plantas por Las. O esclarecimento desta questão poderá ser útil para o melhor entendimento do processo de infecção e aprimoramento das práticas de manejo do HLB. Sintomas do HLB na copa, folhas e ramos laterais da planta cítrica, significa que a bactéria já se distribuiu por todas as partes da planta, inclusive para as raízes, sendo assim, o uso da poda de ramos doentes em laranjeiras doces não é efetiva em restabelecer a sanidade da planta (Lopes et al. 2007), poderia, em tese, ser útil em cultivares nas quais a movimentação da bactéria seja mais lenta.

Assim, dada a carência de informações sobre este assunto e a grande importância comercial do limoeiro 'Siciliano' e da limeira ácida 'Tahiti' a nível de Brasil e mundial, o presente estudo teve como objetivo investigar esta questão, comparando-se a velocidade de movimentação e colonização de Las nessas duas cultivares com a velocidade de movimentação da bactéria em laranjeira doce, cultivar 'Valência', tanto no sentido ascendente como descendente a partir de um único ponto de inoculação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Citricultura geral

O gênero *Citrus* pertence à família Rutaceae, subfamília Aurantioideae, tribo Citreae e subtribo Citrineae que, por sua vez, é composta por cerca de 160 gêneros totalizando 2100 espécies e seus híbridos. Apesar da importância de espécies de outros gêneros dentro da família Rutaceae, como *Fortunella* e *Poncirus*, este último muito usado como porta-enxerto, a maioria das espécies de importância econômica estão dentro do gênero *Citrus* (Wu et al., 2018b).

Alguns citros são originários do sul ao leste da Ásia, como Malásia e Nova Caledônia, e da Austrália, mas se encontram amplamente distribuídos no mundo. Nas Américas, por exemplo, estão as áreas de produção mais significativas de laranjas doces, limões e limas ácidas, com destaque para o Brasil, Estados Unidos, México e Argentina. Nesses países os citros encontraram as condições ideais de cultivo e produção, pois se desenvolvem bem em regiões tropicais e subtropicais, entre as latitudes 40° N e 40° S (Dugrand-Judek et al., 2015; Wei et al., 2015). De forma geral, as plantas cítricas requerem temperaturas entre 23 e 32 °C. Quando a temperatura ultrapassa os 40 °C as plantas sofrem estresse conhecido por fotoinibição, causado por aumento excessivo de luz afetando o processo fotossintético. Sob temperaturas menores que 15° C, o metabolismo também é reduzido (Mattos Junior, 2005).

Dentre as culturas frutíferas os citros são os mais cultivados e economicamente mais importantes no mundo. Apesar da diversidade de tipos de frutas, o equivalente a 98% do que se consome concentra-se na laranja, tangerina, toranja e limão (FAO, 2017). A laranjeira 'Valência' (*Citrus* × *aurantium* var. *sinensis* L.) está entre as cultivares mais cultivadas, tendo sido produzidas no mundo 54,3 milhões de toneladas na safra 2018/19, contra 8,4 milhões de limão e lima (USDA, 2019). A produção só não é maior por causa das grandes perdas provocadas por pragas e doenças, que afetam tanto a produção como a qualidade das frutas (Liao e Burns, 2012). No caso da doença huanglongbing, o suco de frutas afetadas é amargo e mais ácido do que o suco de frutas sadias. A maior acidez é explicada pela menor quantidade de teor de sólidos solúveis totais (°Brix) e aumento da acidez titulável (Yao et al., 2020).

O Brasil é o maior produtor e exportador de suco concentrado congelado de laranja do mundo (Agrianual, 2016). Para a safra 21/22, foi estimada produção de 294,17 milhões de caixas de 48,8 kg, em uma área aproximada 379 mil hectares (Fundecitrus, 2021). O país também se destaca na produção mundial de limões e limas ácidas. Na safra 20/21 os estados de São Paulo e Minas Gerais produziram aproximadamente 423,65 mil toneladas de frutas cítricas (Hortifruti Brasil, 2021). No parque citrícola, que abrange o estado de São Paulo e a região do Triângulo/Sudoeste de Minas Gerais, os pomares que produzem limões e limas ácidas, ocupam em 2021, 39 mil hectares (8,8% do total de citros plantados), sendo destes 90% correspondente a área cultivada com lima ácida (Fundecitrus, 2021).

2.2. Huanglongbing (HLB)

O HLB foi relatado pela primeira vez em 1919, no Sul da China, e hoje se encontra amplamente disseminado na Ásia, África e Américas (Bové, 2006;). O t5gr HLB é associado a três espécies de bactérias fastidiosas, Gram-negativas denominadas de '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' (Las), '*Candidatus Liberibacter africanus*' (Laf) e '*Candidatus Liberibacter americanus*' (Lam) (Bové, 2006). Esses patógenos são disseminados naturalmente por insetos vetores, sendo o psílídeo asiático dos citros, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae), vetor de Las e Lam (Capoor et al., 1967; Yamamoto et al., 2006), e o psílídeo africano dos citros, *Trioza erytreae* (Hemiptera: Psyllidae), vetor de Laf (McClellan and Oberholzer, 1965). O termo '*Candidatus*' se refere taxonomicamente a organismos que são difíceis ou que não podem ser cultivados em meio de cultura (Firrao, 2005; Jagoueix, 1994).

Las é a espécie mais amplamente distribuída no mundo e, consequentemente, a mais estudada, e teve seu genoma completo sequenciado (Duan et al., 2009). A presença de Las nos vasos do floema de plantas infectadas reduz a produtividade, a qualidade dos frutos, com as plantas podendo tornar-se improdutivas em pouco tempo (Bassanezi et al., 2011). A produção é dependente da incidência de plantas afetadas, e o progresso da disseminação é rápido, a não ser que medidas de controle sejam adotadas com rigor, como o controle intensivo do inseto vetor sempre associado à eliminação de plantas sintomáticas (Bové, 2006; Bassanezi et al., 2020). O longo período de incubação, bem como a sazonalidade da expressão dos sintomas

dificultam a identificação de plantas doentes no campo e, conseqüentemente, o controle da doença (Bassanezi et al., 2010).

O psílídeo *Diaphorina citri* é originário do continente asiático. Esse inseto mede de 2 a 3 milímetros. *D. citri* foi encontrado pela primeira vez no Brasil em 1940 (Costa Lima, 1942) e sempre foi considerado uma praga secundária. Mas, a partir de 2004, quando o HLB foi encontrado, passou a ser tratado como enorme ameaça à sobrevivência do setor citrícola. A reprodução de *D. citri* depende da disponibilidade de novos brotos ou de folhas em expansão. Os estádios fenológicos V2 e V3 são os preferenciais para oviposição (Cifuentes-Arenas et al., 2018). Na fase adulta os insetos podem se alimentar e sobreviver por vários meses nas folhas totalmente desenvolvidas, mas é durante a alimentação em tecidos jovens que o vetor adquire e transmite a bactéria (Lopes e Cifuentes, 2021).

O período de incubação da doença é variável, pois depende de vários fatores ambientais, fenológicos e genéticos, como clima, idade e variedade da planta hospedeira (Belasque Junior et al., 2009). A confirmação ou não da presença de Las nas plantas ou no inseto vetor, é obtida por testes moleculares baseados na reação em cadeia da DNA polimerase (PCR) (Hartung et al., 2010).

O HLB está amplamente disseminado no parque citrícola. Em 2020, cerca de 20,87% das plantas, o que corresponde a aproximadamente 37,1 milhões de plantas infectadas, manifestavam sintomas (Fundecitrus, 2020). O Fundecitrus e agentes de governo têm reforçado a importância de se estabelecer estratégias rigorosas de controle do HLB, que compreende plantio de mudas sadias e, em nível regional, inspeção e erradicação de plantas sintomáticas nos pomares e em áreas externas próximas as propriedades, e monitoramento da população e controle rigoroso do psílídeo, que só é possível com aplicação frequentes de inseticidas (Belasque Jr et al., 2010; Bassanezi et al., 2020).

2.3. Sintomatologia

A colonização da planta cítrica por Las induz alterações fisiológicas, anatômicas e morfológicas que resultam em sintomas. Os fatores intrínsecos na relação Las-planta que provocam os sintomas característicos do HLB ainda não estão totalmente esclarecidos. Aparentemente, Las provoca a obstrução dos vasos do

floema ocasionando acúmulo de amido e colapso dos vasos em laranjas, porém esse sintoma não é tão específico em limão, já que folhas de limão totalmente verde apresentam títulos muito próximos dos encontrados em folhas amarelas, (Etxeberria et al., 2009; Achor et al., 2010).

No campo, a identificação das plantas doentes é realizada por meio da observação dos sintomas, que aparecem inicialmente em um ramo ou galho, que se destaca pela coloração amarelada assimétrica das folhas. Com o avanço da doença, há intensa desfolha nos ramos afetados e seca dos ponteiros. Os frutos dos ramos afetados são pequenos, assimétricos, com sementes abortadas e caem de forma prematura (Bové, 2006). Os frutos doentes também apresentam menor teor de sólidos solúveis totais (°Brix), maior acidez e sabor alterado (Bassanezi et al., 2009).

Maior incidência de plantas com sintomas é normalmente observada entre o final do verão e início da primavera, com máxima ocorrendo no outono e inverno (Bassanezi et al., 2010). A expressão mais intensa dos sintomas nesta época se deve as temperaturas mais baixas que também favorecem a multiplicação da bactéria nos tecidos das plantas (Lopes et al., 2009).

Há relatos de cultivares de porta-enxertos com tolerância ao HLB, principalmente o trifoliata *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. e seus híbridos, tais como o citrange 'Carrizo' [*C. sinensis* (L.) Osbeck x *P. trifoliata*] e US-897 (*C. reticulata* 'Cleopatra' x *P. trifoliata* 'Flying Dragon') e US-942 (*C. reticulata* 'Sunki' x *P. trifoliata* 'Flying Dragon') (Albrecht et al., 2012; Albrecht e Bowman, 2011).

A poda drástica da copa ou apenas de ramos sintomáticos foram testados com o objetivo de se eliminar todos os tecidos infectados. Todavia, sintomas específicos da doença reapareceram nos novos brotos. Isto ocorreu na maioria das plantas, independente de idade, variedade e tipo de poda usada, e indicou que quando se observa sintomas, a bactéria já colonizou toda a planta (Lopes et al., 2007).

A termoterapia foi demonstrada como uma estratégia de redução de títulos bacterianos de Las na parte aérea das plantas, onde as mudas de citros afetadas por HLB ficaram em exposição contínua a temperaturas acima de 40 °C por um período mínimo de 48 h (Hoffman et al., 2013). Entretanto, o método não foi eficaz devido à colonização da bactéria nas raízes. De mesmo modo, têm sido testados antibióticos para combater a infecção por Las. A resposta foi satisfatória na eliminação e redução

dos títulos bacterianos, indicado pela menor taxa de infecção em enxertos inoculados (Zhang et al., 2014). No entanto, nenhuma tentativa de curar a planta foi eficiente.

2.4. Colonização e movimentação de *Candidatus Liberibacter* spp.

A infecção de cultivares de citros por Las ocorre de forma irregular e sistêmica (Tatineni et al. 2008; Li et al., 2009). A bactéria pode ser encontrada em vários órgãos da planta como brotos, folhas, caule, partes da flor, frutos e raízes, com exceção apenas do endosperma da semente (Tatineni et al., 2008). O padrão de colonização na planta é variável. Condições ambientais como temperatura, podem influenciar a movimentação das bactérias (Lemoine et al., 2013; Raiol-Junior et al., 2021b).

Também ocorrem diferenças na expressão dos sintomas, que aparecem muitos meses após a infecção (Hung et al., 2001; Folimonova et al., 2009). O tempo para manifestação dos primeiros sintomas foliares varia conforme o modo de inoculação do patógeno, quatro meses quando a inoculação ocorre por enxertia de ramos doentes (Lopes e Frare, 2008), e oito meses quando a inoculação é feita por psílídeos infectivos (Hung et al., 2004). Essas diferenças podem estar relacionadas a diferenças na colonização e movimentação de Las.

Las é transmitida por *D. citri* durante o processo de alimentação em tecidos jovens (Hall et al., 2016; Lopes e Cifuentes-Arenas et al., 2021). Após a inoculação, a bactéria move para regiões de crescimento da planta (Raiol-Junior et al., 2021a), seguindo o fluxo de seiva, que é produzida em órgãos fontes de fotoassimilados, como folhas maduras, para órgãos em desenvolvimento ou de armazenamento, também chamados drenos, como flores, frutos, raízes em crescimento e brotos jovens. O predomínio do movimento passivo de Las foi sugerido por não ter sido observadas estruturas ativas de movimento como flagelo ou pili (Andrade et al., 2019; Hilf et al., 2013), apesar do genoma da bactéria apresentar genes que estão relacionados a produção dessas estruturas de movimento (Duan et al., 2009). O movimento ativo de células de Las também foi sugerido, mas os mecanismos envolvidos são desconhecidos (Pandey et al., 2021).

As diferenças em expressão de sintomas encontradas em diferentes espécies cítricas (Abdullah et al., 2009; Folimonova et al., 2009) podem estar relacionadas a movimentação e colonização da planta. Identificar espécies em que ocorre menor

colonização ou movimentação de Las, ajudará a identificar os mecanismos relacionados a resposta diferencial dos diferentes genótipos de citros ao HLB.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal

Foram utilizadas plantas de dois anos de idade de laranjeira ‘Valência’ (*Citrus* × *aurantium* var. *sinensis* L.), limoeiro ‘Siciliano’ (*C. × limon* var. *limon*) e limeira ácida ‘Tahiti’ [*C. × latifolia* var. *latifolia*] e, enxertadas em citrumeleiro ‘Swingle’ [*C. × aurantium* var. *paradisi* X *Poncirus trifoliata* (L.) Raf], adquiridas de viveiro cadastrado na Coordenadoria de Defesa Agropecuária da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do estado de São Paulo (CDA).

As plantas foram cultivadas em sacolas plásticas de 4L contendo substrato composto por 80% de casca de pinheiro, 15% de vermiculita e 5% de carvão, pH 6,8 e irrigadas semanalmente com uma solução nutritiva contendo, em miligramas por litro, 181,5 N-NO₃⁻, 12,0 N-NH₄⁺, 23,1 P-H₂PO₄⁻, 54,0 K⁺, 229,0 Ca²⁺, 40,0 Mg²⁺, 52,0 S-SO₄⁻, 1,4 Zn²⁺, 2,18 Cu²⁺, 0,98 Mn²⁺, 4,5 Fe²⁺, 0,22 MoO₄²⁻ e 0,61 B. Para os micronutrientes catiônicos foram utilizadas fontes quelatadas de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), exceto Fe, para o qual foi utilizado etilenodiamina-N (EDDHA). A cada 30 dias as plantas eram pulverizadas com inseticidas e acaricidas, com produtos recomendados para a cultura e descritos na lista Protecitrus (Produtos para Proteção da Citricultura) (Fundecitrus, 2021).

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação na Universidade Estadual Paulista ‘Júlio de Mesquita Filho’ (UNESP), Jaboticabal, São Paulo, Brasil, durante os meses de janeiro a março (verão), e setembro a novembro (primavera) de 2020. Durante todo o período de condução do experimento, um aparelho Data-logger (Log Box RHT LCD, Porto Alegre, RS), instalado no interior da casa de vegetação, registrou, de hora em hora, temperatura média do ar e umidade relativa.

3.2. Inoculação de ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’

Foram inoculadas 50 plantas de cada cultivar através da enxertia de segmentos de ramos infectados por Las (Lopes et al., 2008). Em cada planta, os ramos laterais foram podados, mantendo-se apenas o ramo principal, com altura de 60 cm a partir do nível do substrato. No caule, à 10 cm acima da linha de junção da copa com o porta-enxerto, foram enxertados dois segmentos de ramos (borbulhas), com

aproximadamente 5 cm de comprimento, 0,3 cm de espessura e 0,5 cm de largura. A enxertia foi feita à mesma altura e posicionados um de cada lado do caule. As borbulhas foram removidas de ramos de plantas sintomáticas de laranjeira 'Valência', com oito anos de idade, também enxertadas em citrumeleiro 'Swingle', e naturalmente infectadas por Las. As plantas estavam sendo cultivadas em pomar não irrigado da Fundação Coopercitrus Credicitrus, localizada em Bebedouro, SP. A comprovação da infecção por Las foi feita por análise de PCR em tempo real (qPCR) (Li et al., 2006). As plantas nas quais as borbulhas não sobreviveram foram removidas do experimento.

3.3. Avaliações

As avaliações foram realizadas em cinco datas, sendo a primeira realizada aos 21 dias após a data da inoculação (DAI), e as demais aos 28, 35, 42 e 49 DAI. Em cada DAI, foram selecionadas ao acaso oito plantas de cada variedade, sendo cada planta considerada uma repetição. Foram amostrados de forma destrutiva anéis completos de casca de 1 cm de largura, removidos a 45, 5, 10 e 15 e 40 cm acima e abaixo do ponto de inoculação, sendo que os pontos a 10 e 15 cm abaixo consistiram em amostras do caule do porta-enxerto, e os pontos 40 e 45 consistiram de raízes e brotos, respectivamente. Além das cascas do caule, foram coletadas amostras das raízes e de novas brotações que se desenvolveram no ápice das plantas após a inoculação (Figura 1). Os brotos se encontravam nos estágios V1 (primórdios foliares), V2 (alongamento inicial), V3 (expansão da lâmina foliar), V4 (desdobramento de todas as folhas), V5 (folhas totalmente expandidas, cor verde-amarelo claro), e V6 (folhas totalmente endurecidas e verde-escuras), os quais foram coletados e avaliados em número e tamanho. De algumas plantas os brotos não foram coletados por não existirem ou porque já haviam atingido o estágio V7 (folhas maduras). Para a coleta das raízes, as plantas foram removidas da sacola plástica e retirado o excesso do substrato. Foram coletadas as raízes fibrosas novas (indicado por sua coloração esbranquiçada) as quais foram removidas de forma aleatória de todas as partes do sistema radicular. Na ausência de raízes novas, coletou-se raízes mais velhas, indicado pela coloração marrom escura. As amostras de casca, raízes e brotos foram processadas e avaliadas por qPCR (Li et al., 2006).

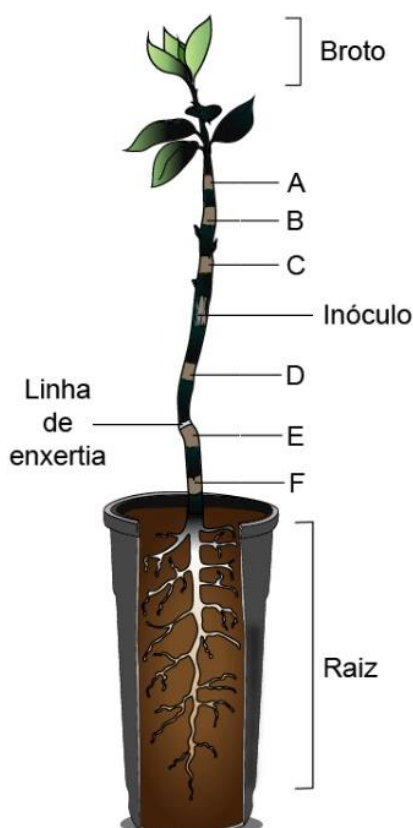


Figura 1. Representação esquemática dos pontos de amostragem utilizados para avaliação da colonização de plantas de citros por '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' (Las). As amostras consistiram em anéis completos de casca de 1 cm de largura, coletados aos 21, 28, 35, 42 e 49 dias após a inoculação a (A) 15 cm, (B) 10 cm, e (C) 5 cm acima e (D) 5 cm, (E) 10 cm, e (F) 15 cm abaixo do inóculo, (Raízes) 40 cm e (Brotos) 45 cm.

3.3.1. Extração de DNA e qPCR

Para extração de DNA foram utilizados 0,3 gramas de tecido vegetal, que foi picado com o auxílio de uma lâmina de barbear sobre papel toalha, em seguida foi transferido para um microtubo de 2,0 mL. Posteriormente, o material foi macerado durante 45 segundos com triturador Tissue Lyser II (Qiagen), ao qual foi adicionado solução tampão de extração concentrado de CTAB + 0,2% de β -mercaptoetanol (Murray e Thompson 1980) até completar o volume de 2 mL. Em seguida as plantas foram incubadas em banho maria a 65°C por 30 min. A extração do DNA foi conduzida como descrito por Teixeira et al. (2005). Para a quantificação do título de Las utilizou-se a técnica da qPCR como descrito por Li et al. (2006) e Teixeira et al. (2008). A qPCR foi conduzida no equipamento StepOne Plus thermocycler (Applied

Biosystems). Todas as plantas foram diluídas a 100 ng/μL antes de uso em reações de qPCR que foram conduzidas em volume final de 12 μL, resultado da adição de 3 μL de DNA das plantas e 9 μL de Path ID Master Mix (Ambion) contendo 0,5 μM dos primers específicos para Las e sonda HLBaspr (Li et al. 2006). Os valores de Cycle threshold (Ct) foram ajustados automaticamente pelo software StepOne. As plantas foram consideradas positivas para a presença de Las quando os valores do Ct eram menores ou iguais a 34,0, os quais foram convertidos em $\log_{10}$ do número de genomas de Las por grama de tecido, usando-se a curva de quantificação definida por Lopes et al. (2013).

3.4. Análise dos dados

A frequência de plantas infectadas foi calculada a partir do número de plantas positivas, dividindo pelo total de plantas avaliadas em cada data dentro de cada cultivar. O progresso da colonização das plantas por Las, a diferentes distâncias do inóculo, foi determinado pelo modelo matemático monomolecular, os quais foram ajustados à frequência de detecção ao longo do tempo. O modelo é descrito pela fórmula $y(t) = y_{max} - y_{max} - y_0 \cdot \exp(-r \cdot t)$, onde $y(t)$ é a frequência pontos positivos para Las ao longo do tempo t , y_{max} a frequência máxima de pontos positivos, y_0 o inóculo inicial, r taxa de infecção, e t o tempo em dias após a data de inoculação (Madden et al., 2007). Os parâmetros das equações foram comparados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Foi utilizada a linguagem Python 3.6 para ajuste do gráfico.

Os dados da probabilidade de detecção positiva de Las (pLas), que consiste na proporção de amostras positivas pelo total de amostras analisadas, foram submetidos à análise de regressão logística com os coeficientes dos modelos obtidos pelo ajuste binomial de modelos lineares generalizados (Generalized Linear Model, GLM). Para as avaliações da movimentação de Las, o modelo estimou pLas em diferentes pontos acima e abaixo do ponto de inoculação, em função do Tempo e da Distância para cada uma das combinações de copa e porta-enxerto utilizadas. pLas é dado pela equação $p(Las) = \frac{1}{1 + e^{-(\beta_0 + \beta_1 \cdot Tempo + \beta_2 \cdot Distancia)}}$, onde *Tempo* é o número de dias após a data de inoculação e *Distância* é representada pelos diferentes pontos de amostragem acima e abaixo do ponto de inoculação. A movimentação de Las foi

estimada pela equação $Distância = \frac{1}{\beta_2} [-\beta_0 - \beta_1 * Tempo]$, com a relação $\frac{\beta_1}{\beta_2}$ representando a inclinação da reta ou a velocidade da movimentação da bactéria (Raiol-Junior et al., 2021b).

Os coeficientes dos modelos foram interpretados em termos de razão de chance (odds ratio, OR), onde o acréscimo ($OR > 1$), decréscimo ($OR < 1$) ou sem efeito ($OR = 1$) em $pLas$ ocorre em função das variáveis independentes (significativo se $1 \notin \pm 95\% \text{ CI}$) (Hilbe, 2009; Peng et al., 2020). A acurácia geral dos modelos foi avaliada pelo valor do $pseudo-R^2$ de McFadden (Hilbe, 2009). As análises de regressão logística foram feitas pelo software R (R Development Core Team, 2015).

4. RESULTADOS

4.1. Colonização das plantas

4.1.1. Primeiro experimento

A. Colonização ascendente

No primeiro experimento, a 5 cm de distância acima do local de inoculação, em Valência, *Las* só foi detectada em 38% das plantas aos 28 DAI, e, aos 49 DAI, em todas as plantas. No limão Siciliano, à mesma distância do inóculo, *Las* foi detectada aos 21 DAI e em 75% das plantas, porém, ao longo das datas de avaliação, *Las* foi observada em menores porcentagens nos pontos positivos (63% aos 28, 38% aos 35, 50 aos 42 e 49 dias, respectivamente). Em Tahiti, *Las* havia colonizado 38% das plantas avaliadas aos 21 DAI, chegando a 63% aos 42 DAI, permanecendo assim até o 49 DAI. A 10 cm de distância acima do inóculo, *Las* foi detectada aos 21 DAI em 13, 38 e 50% das plantas de Valência, Tahiti e Siciliano, respectivamente. Na ‘Valência’ e no ‘Tahiti’, foi observado aumento na porcentagem de plantas infectadas ao longo do tempo, chegando a 100 e 75% aos 49 DAI, respectivamente. No ‘Siciliano’ a porcentagem de plantas colonizadas por *Las* não ultrapassou os 50% observados nos 21 DAI. A 15 cm de distância acima do inóculo, *Las* foi detectada aos 21 DAI em 13, 25 e 38% das plantas de ‘Valência’, ‘Siciliano’ e ‘Tahiti’, respectivamente (Tabela 1).

A 15 cm do ponto de inoculação foi observado um aumento progressivo da porcentagem de plantas infectadas nas três cultivares avaliadas. ‘Valência’ 100% aos

49 dias, no 'Siciliano', alcançou 63% aos 42 DAI, e no 'Tahiti' 88% aos 49 DAI. Durante as avaliações o número de brotos variou entre 1 e 11. Aos 28 DAI Las foi detectada na 'Valência' em 25% dos brotos. Aos 45 cm Las foi detectada pela primeira vez aos 35 DAI em 'Siciliano' e 'Tahiti' em 13 e 38% das plantas, respectivamente. A porcentagem de plantas infectadas alcançou 100% aos 49 DAI na Valência, 50% aos 42 DAI no Siciliano e Tahiti (Tabela 1).

B. Colonização descendente

No primeiro experimento, a 5 cm de distância abaixo do local de inoculação, Las foi detectada aos 28 DAI em 50% das plantas de laranja 'Valência', chegando a 100% aos 49 DAI. No 'Siciliano', a 5 cm, Las estava presente em 50% das plantas aos 28 DAI, chegando a 63% aos 49 DAI. No 'Tahiti', Las havia colonizado 50% das plantas aos 21 DAI, chegando a 63% aos 35 DAI, permanecendo assim até os 49 DAI.

A 10 cm de distância do inóculo, Las foi detectada aos 28 DAI em 38 e 25% das plantas de laranja 'Valência' e limão Siciliano, respectivamente. Na 'Valência' e no 'Tahiti', houve progressivo aumento do número de plantas infectadas ao longo do tempo, chegando a 100 e 75%, respectivamente, aos 49 DAI. No limão 'Siciliano' a porcentagem de plantas infectadas não ultrapassou os 50% já observados nos 35 DAI.

A 15 cm de distância abaixo do inóculo, Las foi detectada aos 35 e 28 DAI 'Valência' e Siciliano em 13% e 38% das plantas, e no 'Tahiti' aos 21 DAI e em 50% das plantas. Aos 49 DAI, Las havia colonizado 100, 50 e 63% das plantas de 'Valência', 'Siciliano' e 'Tahiti', respectivamente.

A colonização das raízes ocorreu de forma mais lenta que dos caules e brotos. A primeira observação da presença de Las neste órgão ocorreu aos 35 DAI para as três cultivares, com taxa de 13% (Tabela 1). As maiores porcentagens de plantas infectadas foram observadas em 'Valência' aos 42 DAI com 38%, enquanto que no limão 'Siciliano' e no 'Tahiti' aos 49 DAI em 38 e 63% das plantas, respectivamente.

Tabela 1. Progresso de colonização e título bacteriano de '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' em plantas de laranja doce 'Valência', 'Siciliano' e 'Tahiti' acima e abaixo do ponto de inoculação a diferentes distâncias do inóculo durante o verão.

Distância (cm) e direção do inóculo	21 DAI ^a			28 DAI			35 DAI			42 DAI			49 DAI		
Porcentagem de plantas infectadas aos 5,10, 15, 40 e 45 cm do ponto de inoculação, ascendente e descendente															
inóculo	Val ^b	Sic ^c	Tah ^d	Val	Sic	Tah	Val	Sic	Tah	Val	Sic	Tah	Val	Sic	Tah
5, acima	nd ^e	75	38	38	63	38	88	38	25	75	50	63	100	50	63
10, acima	13	50	38	25	50	50	88	50	25	63	50	63	100	38	75
15, acima	13	25	38	13	38	50	88	38	25	50	63	75	100	38	88
45, Brotos	nd	nd	nd	25	nd	nd	50	13	38	50	50	50	100	50	nd
5, abaixo	nd	nd	50	50	50	25	88	63	63	88	50	63	100	63	63
10, abaixo	nd	nd	63	38	25	63	75	50	25	75	38	75	100	50	75
15, abaixo	nd	nd	50	nd	13	38	38	63	50	63	13	50	100	50	63
40, Raízes	nd	nd	nd	nd	nd	nd	13	13	13	38	13	25	13	38	63
Título médio e erro padrão de ' <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> ' por grama de tecido amostrado															
5, acima	nd	3,1±0,35	4,5±0,14	3,2±0,41	3,0±0,31	2,9±0,29	4,4±0,26	3,9±0,36	3,0±0,65	3,9±0,31	4,0±0,35	3,5±0,25	4,8±0,13	4,2±0,50	4,2±0,40
10, acima	2,4	3,2±0,53	4,4±0,20	2,4±0,12	3,0±0,46	2,7±0,16	4,1±0,28	3,5±0,38	3,1±0,22	3,8±0,34	4,1±0,41	3,5±0,36	4,8±0,14	4,8±0,12	4,1±0,43
15, acima	2,7	3,9±0,56	4,0±0,46	2,2	3,1±0,45	3,1±0,42	3,7±0,37	3,6±0,64	3,0±0,13	3,5±0,40	3,8±0,53	3,3±0,30	4,7±0,13	4,6±0,20	4,0±0,38
45, Brotos	nd	nd	nd	4,1±0,18	nd	nd	3,7±0,50	3,2	4,9±0,39	2,5±0,12	3,0±0,22	3,3±0,51	5,1±0,35	3,6±0,18	nd
5, abaixo	nd	nd	4,1±0,43	3,6±0,53	2,8±0,24	3,6±0,75	4,1±0,25	3,1±0,43	3,2±0,12	3,5±0,30	3,3±0,59	3,6±0,21	4,6±0,16	4,2±0,49	4,2±0,19
10, abaixo	nd	nd	3,5±0,39	2,7±0,10	2,6±0,15	3,2±0,33	3,3±0,31	3,2±0,57	3,2±0,68	3,7±0,31	3,0±0,61	3,7±0,25	4,0±0,19	4,3±0,20	3,7±0,41
15, abaixo	nd	nd	3,7±0,27	nd	2,5	3,6±0,36	3,4±0,19	2,8±0,41	2,6±0,26	3,4±0,39	3,4	3,4±0,12	3,7±0,20	3,9±0,34	3,5±0,20
40, Raízes	nd	nd	nd	nd	nd	nd	2,5	3,7	2,6	2,7±0,16	4,3	4,7±0,34	2,6	3,6±0,24	3,5±0,41

^aDAI: dias após inoculação. ^bVal: Laranja 'Valência'. ^cSic: limão 'Siciliano'. ^dTah: lima ácida 'Tahiti'. ^end: não detectado.

4.1.2. Segundo experimento

A. Colonização ascendente

No segundo experimento, a 5 cm de distância acima do local de inoculação, Las só foi detectada em 13% das plantas de Valência aos 21 DAI, e, aos 49 DAI, em 63% das plantas desta cultivar. No limão Siciliano, à mesma distância do inóculo, Las foi detectada aos 21 DAI, em 25% das plantas, diminuindo para 13% nos dias 42 e 49 DAI. Em 'Tahiti', Las havia colonizado 50% das plantas avaliadas aos 21 DAI, porém, essa porcentagem foi diminuindo ao longo dos dias.

A 10 cm de distância acima do inóculo, Las foi detectada aos 21 DAI em 25, 13 e 38% das plantas de 'Valência', 'Siciliano' e 'Tahiti', respectivamente. Em 'Valência', foi observado aumento na porcentagem de plantas infectadas ao longo do tempo, chegando a 75% aos 49 DAI, no Siciliano, a porcentagem de plantas colonizadas iniciou com 13% aos 21 DAI, chegando aos 49 com 25%, enquanto que no 'Tahiti' a porcentagem foi diminuindo, chegando aos 49 DAI com 13%.

A 15 cm de distância acima do inóculo, Las foi detectada aos 21 DAI em 50, 13 e 63% das plantas de laranja 'Valência', 'Siciliano' e 'Tahiti', respectivamente (Tabela 2).

Foi observado uma variação na da porcentagem de plantas infectadas nas três cultivares avaliadas. Na laranja 'Valência', alcançou 100% aos 49 DAI e no Siciliano e 'Tahiti' 25 e 50%, respectivamente. Na laranja 'Valência', Las foi detectada pela primeira vez aos 42 DAI em 50% das plantas, enquanto em Siciliano Las não foi detectada em nenhuma das avaliações. Aos 21 DAI Las foi detectada no Tahiti em 38% dos brotos. (Tabela 2).

B. Colonização descendente.

No segundo experimento, a 5 cm de distância abaixo do local de inoculação, Las foi detectada aos 21 dias em 25% das plantas de laranja 'Valência', chegando a 50% aos 42 DAI. No limão 'Siciliano' estava presente aos 21 dias em 13% das plantas, chegando em 25% aos 49 DAI. Na lima ácida 'Tahiti', Las havia colonizado 63% das plantas avaliadas aos 21 DAI, chegando a 75% aos 49 DAI.

A 10 cm de distância do inóculo, Las foi detectada aos 21 DAI em 50, 38% das plantas de 'Valência' e 'Siciliano', respectivamente. Na laranja 'Valência', observa-se aumento progressivo no número de plantas infectadas ao longo do tempo, chegando a 100 aos 49 DAI. No limão 'Siciliano', a porcentagem de plantas infectadas iniciou em 38% aos 21 DAI, foi variável ao longo do tempo, mas chegou aos 49 DAI com 38%. O 'Tahiti' iniciou com 50% aos 21 DAI, e chegou aos 49 DAI com 75% das plantas infectadas.

A 15 cm de distância abaixo do inóculo, Las foi detectada aos 21 DAI com 38% em plantas de 'Valência', e novamente foi observada aos 35 DAI com 100% de plantas infectadas. O 'Siciliano' iniciou com 13% aos 21 DAI, e foi detectada aos 42 DAI com 13%, chegando aos 49 DAI com 38%. O Tahiti iniciou com 75%, teve uma variação ao longo do tempo, mas chegou aos 49 DAI com 75%.

A colonização das raízes ocorreu de forma lenta, sendo observado a presença de Las na 'Valência' aos 35 DAI em 25% das plantas, no 'Siciliano' no dia 21 com 25% de plantas infectadas, e no 'Tahiti' aos 35 DAI com 13% (Tabela 2)

Tabela 2. Progresso de colonização e título bacteriano de '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' em plantas de laranja doce 'Valência', limão 'Siciliano' e lima ácida 'Tahiti' acima e abaixo do ponto de inoculação a diferentes distâncias e em função do tempo na primavera.

Distância (cm) e direção do inóculo	21 DAI ^a			28 DAI			35 DAI			42 DAI			49 DAI		
Porcentagem de plantas infectadas aos 5,10, 15, 40 e 45 cm do ponto de inoculação, ascendente e descendente															
inóculo	Val ^b	Sic ^c	Tah ^d	Val	Sic	Tah	Val	Sic	Tah	Val	Sic	Tah	Val	Sic	Tah
5, acima	13	25	50	nd	nd	38	25	25	25	nd	13	nd	63	13	25
10, acima	25	13	38	nd	nd	38	13	13	nd	25	nd	nd	75	13	13
15, acima	50	13	63	nd	nd	38	38	25	nd	13	nd	nd	100	25	50
45, Brotos	nd ^e	nd	38	nd	nd	nd	nd	nd	nd	50	nd	50	100	nd	13
5, abaixo	25	13	63	13	nd	38	50	nd	63	50	25	50	nd	25	75
10, abaixo	50	38	50	nd	nd	63	50	nd	25	38	13	50	100	38	75
15, abaixo	38	13	75	nd	nd	25	100	nd	50	100	13	50	100	38	75
40, Raízes	nd	25	nd	nd	nd	nd	25	nd	13	38	nd	25	13	nd	38
Título médio e erro padrão de ' <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> ' por grama de tecido amostrado															
5, acima	nd	1,4±0,9	3,9±0,64	nd	nd	2,5	2,3	4,6	3,6±1,00	nd	2,8	nd	4,6±0,37	3,3	2,8±0,01
10, acima	5,0	4,9	4,9±0,17	nd	nd	nd	nd	3,3	nd	2,5±0,34	nd	nd	4,4±0,48	3,8	2,4
15, acima	nd	4,9	4,9±0,05	nd	nd	2,8	5,9	3,7	nd	3,1	nd	nd	4,2±0,34	3,7	3,1±0,21
45, Brotos	nd	nd	6,2±0,09	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	2,6±0,13
5, abaixo	nd	4,7	4,4±0,31	nd	nd	3,9±0,59	4,9±0,55	nd	3,7±0,16	4,2±0,43	2,5	4,2±0,29	5,0±0,13	4,0	4,8±0,21
10, abaixo	nd	5,5	5,3±0,13	nd	nd	2,90,28	4,3±0,75	nd	3,5±0,31	3,1±0,15	3,2	4,2±0,26	4,5±0,134	3,5	4,7±0,13
15, abaixo	nd	5,2	4,8±0,43	nd	nd	3,4	3,8±1,33	nd	2,9±0,28	2,9±0,40	2,4	3,9±0,22	3,9±0,38	3,0	4,8±0,21
40, Raízes	nd	3,2±0,16	nd	nd	nd	nd	3,0	nd	2,7	3,1±0,51	nd	2,6±0,33	2,5	nd	2,1±0,22

^aDAI: dias após inoculação. ^bVal: Laranja 'Valência'. ^cSic: limão 'Siciliano'. ^dTah: lima ácida 'Tahiti'. ^end: não detectado.

4.2. Frequência de detecção

Os resultados estimaram que em plantas de 'Valência', a probabilidade de detecção da bactéria foi maior nos pontos localizados acima do inóculo, e uma menor probabilidade foi observada nos pontos abaixo do inóculo durante o verão, essa probabilidade ocorreu de forma inversa durante a primavera. Em Tahiti e Siciliano, a maior probabilidade de detecção ocorreu acima do inóculo durante a primavera, enquanto que nos demais pontos as probabilidades foram similares. (Tabela 3).

Tabela 3. Coeficientes do modelo monomolecular que descrevem a probabilidade de detecção de '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' em função do tempo após a data de inoculação e da distância do ponto de inoculação acima e abaixo em plantas de lima Tahiti.

Cultivar	Acima do ponto de inoculação		Abaixo do ponto de inoculação	
	Verão	Primavera	Verão	Primavera
'Valência'	0,038	0,020	0,027	0,035
'Tahiti'	0,026	0,011	0,025	0,027
'Siciliano'	0,023	0,005	0,020	0,022

O modelo monomolecular permitiu inferir uma maior frequência de colonização de Las em 'Valência' em ambos os experimentos nos pontos acima e abaixo do inóculo. No 'Siciliano', a constatação da bactéria foi menor em todos os pontos, e no 'Tahiti' a detecção foi similar em ambos os experimentos (Figura 2).

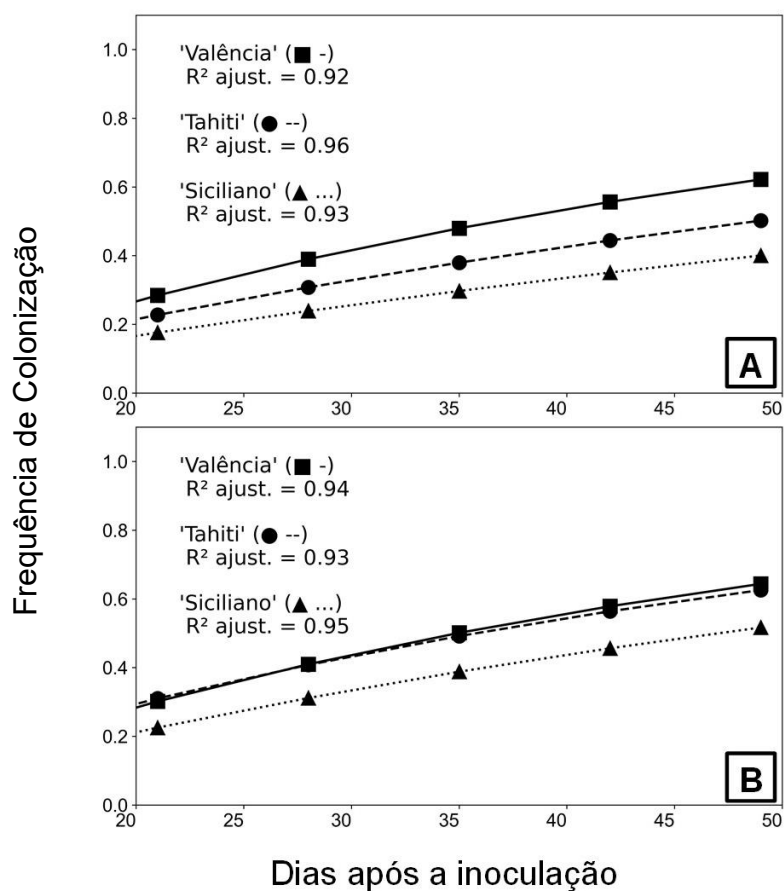


Figura 2. Modelo monomolecular ajustado para a frequência de colonização por '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' em plantas 'Valência', 'Siciliano' e 'Tahiti', enxertadas em citrumelo Swingle acima e abaixo do inóculo no verão e na primavera de 2020.

4.3. População de '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' nos pontos amostrados

O título é a população da bactéria nos pontos amostrados, sendo expressa em logaritmo do número de células de Las por grama de tecido (casca, brotos ou raiz) que, por sua vez, foi estimado com base no número de cópias do DNA alvo da bactéria amplificado por PCR.

No verão, os títulos de Las em laranja 'Valência' aumentaram em todos os pontos à medida em que o tempo entre a data de amostragem se distanciou da data de inoculação. No caule, a 10 e 15 cm, os títulos médios variaram entre log 2,4 a 2,7 de células por grama de tecido na primeira data de avaliação, feita aos 21 dias após inoculação (DAI), e de $3,7 \pm 0,20$ a $5,1 \pm 0,35$ aos 49 DAI (Tabela 1). Os brotos

iniciaram com título de $4,1 \pm 0,18$ aos 28 DAI chegando a $5,1 \pm 0,35$ aos 49 DAI. Nas raízes, observou-se título de 2,5 aos 35 dias, chegando a 2,6 aos 49 dias.

Em 'Siciliano' os títulos de Las variaram de $3,1 \pm 0,35$ a $3,9 \pm 0,56$ no dia 21, data em que Las ainda não havia colonizado os tecidos abaixo do inóculo, somente sendo encontrada a partir de 28 DAI, com títulos de 2,5 a $2,8 \pm 0,24$. No 49 DAI, observou-se títulos de $3,9 \pm 0,34$ a $4,8 \pm 0,12$, data em que os maiores valores foram observados. Nos brotos, os títulos variaram de $3,0 \pm 0,22$ a $3,6 \pm 0,18$ e, nas raízes, de $3,6 \pm 0,24$ a 4,3.

No 'Tahiti', todos os pontos da casca já haviam sido colonizados aos 21 DAI, enquanto em brotos e raízes isso foi observado apenas aos 35 DAI. Em amostras de cascas do caule, os títulos foram maiores quando comparados com 'Valência' e 'Siciliano'. Aos 21 DAI, os títulos variaram entre $3,5 \pm 0,39$ a $4,5 \pm 0,14$, valores normalmente observados a partir de 49 DAI para as demais cultivares. Porém, nos dias subsequentes os títulos foram reduzidos. Nos brotos, apesar dos altos títulos ($4,9 \pm 0,39$ e $3,3 \pm 0,51$) Las foi detectada neste órgão somente aos 35 e 42 DAI. Nas raízes, os títulos variaram entre 2,6 e $4,7 \pm 0,34$, observado inicialmente a partir de 35 DAI (Tabela 1).

Na primavera, em plantas de laranja 'Valência', os títulos médios de Las na casca do caule variaram de 2,3 a 5,9 log de células de Las g^{-1} de tecido, observados 21 e 49 DAI, respectivamente (Tabela 2). Nos brotos, Las não foi observada em nenhuma data de avaliação. Nas raízes, Las foi observada inicialmente aos 35 DAI com título de 3,0 e aos 49 DAI apresentou título de 2,5.

Os títulos de Las em 'Siciliano' variaram de $1,4 \pm 0,9$ a 5,5 aos 21 DAI, e aos 49 DAI observou-se títulos de 3,8 a 4,0 log de células de Las g^{-1} de tecido. Nos brotos, Las não foi detectada em nenhuma data de avaliação. Nas raízes Las foi observada apenas aos 21 DAI, com títulos de $3,2 \pm 0,16$.

No 'Tahiti', todos os pontos da casca e nos brotos já haviam sido colonizados aos 21 dias, enquanto nas raízes isso aconteceu apenas aos 35 DAI, com título de 2,7 (Tabela 2).

4.4. Velocidade de colonização

Os dados das proporções de plantas positivas para Las foram submetidos à análise de regressão logística, a fim de se estimar a probabilidade de detecção de Las (*p*Las) nos diferentes pontos amostrados, bem como a velocidade que Las se moveu acima e abaixo do ponto de inoculação. De modo geral, *p*Las acima e abaixo foi significativamente influenciada pelo tempo em dias após a data de inoculação e pela distância a partir do ponto de inoculação (Tabela 4).

Tabela 4. Análise de variância do modelo linear generalizado da influência do tempo (dias após a data de inoculação) e da distância a partir do ponto de inoculação na probabilidade detecção de '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' em plantas de laranjeira doce 'Valência', limão 'Siciliano' e lima ácida 'Tahiti'.

Parâmetro	'Valência'				'Tahiti'				'Siciliano'			
	Acima		Abaixo		Acima		Abaixo		Acima		Abaixo	
	χ^2	P	χ^2	P	χ^2	P	χ^2	P	χ^2	P	χ^2	P
Experimento 1												
Tempo	37,99	<0,0001	35,73	<0,0001	15,82	<0,0001	13,64	<0,0001	11,89	<0,0001	29,03	<0,0001
Distância	7,24	<0,001	29,76	<0,0001	17,11	<0,0001	18,61	<0,0001	16,75	<0,001	18,97	<0,0001
Experimento 2												
Tempo	23,95	<0,0001	27,61	<0,0001	14,77	<0,0001	13,89	<0,0001	12,41	<0,0001	13,58	<0,0001
Distância	16,74	<0,0001	8,34	<0,001	8,23	<0,001	11,61	<0,0001	7,29	<0,001	8,45	<0,001

Para a laranja 'Valência', o modelo explicou 75% e 74% da variação dos dados no experimento 1 e 71% e 71% no experimento 2, para a *pLas* acima e abaixo, respectivamente. No experimento 1, cada dia após a data de inoculação aumenta a *pLas* em 17% e 33%, acima e abaixo, respectivamente, enquanto que a cada centímetro mais distante do ponto de inoculação *pLas* diminui em 10% e 43% acima e abaixo. Para o experimento 2, cada dia após a data de inoculação *pLa* aumenta em 11% e 21%, acima e abaixo respectivamente, enquanto a cada centímetro mais distante do ponto de inoculação *pLas* diminui em 10% e 23% acima e abaixo (Tabela 5).

Para o limão 'Siciliano', o modelo explicou 73% e 70% da variação dos dados no experimento 1 e 74% e 71% no experimento 2, para a *pLas* acima e abaixo, respectivamente. No experimento 1, a cada dia após a data de inoculação *pLas* aumenta em 6% e 13%, acima e abaixo respectivamente, enquanto que a cada centímetro mais distante do ponto de inoculação *pLas* diminui em 14% e 17% acima e abaixo. Para o experimento 2, cada dia após a data de inoculação aumenta a *pLas* em 7% e 10%, acima e abaixo respectivamente, enquanto que a cada centímetro mais distante do ponto de inoculação diminui *pLas* em 13% e 14% acima e abaixo (Tabela 6).

Para a lima ácida 'Tahiti', o modelo explicou 75% e 76% da variação dos dados no experimento 1 e 70% e 71% no experimento 2, para *pLas* acima e abaixo, respectivamente. No experimento 1, cada dia após a data de inoculação *pLas* aumenta a em 7% e 8%, acima e abaixo respectivamente, enquanto que a cada centímetro mais distante do ponto de inoculação diminui *pLas* em 13% e 14% acima e abaixo. Para o experimento 2, cada dia após a data de inoculação *pLas* aumenta em 6% e 7%, acima e abaixo respectivamente. Enquanto, que a cada centímetro mais distante do ponto de inoculação *pLas* diminui em 9% e 11% acima e abaixo (Tabela 7).

Tabela 5. Coeficientes do modelo logístico que descreve a probabilidade de detecção de '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' em função do tempo, após a data de inoculação e da distância do ponto de inoculação em plantas de laranja 'Valência'.

Valência	Parâmetro estimado (± EP) ^a	Razão de chance (95% IC) ^b	Estatísticas do modelo ^c	
			<i>P</i> > <i>X</i> ²	<i>pseudo-R</i> ²
Experimento 1				
Acima				
Intercepto	-3,85 ± 0,87	--		
Tempo	0,16 ± 0,02	1,17 (1,11 – 1,23)	<0,0001	0,7512
Distância	-0,10 ± 0,03	0,90 (0,83 – 0,97)		
Abaixo				
Intercepto	-4,78 ± 1,12	--		
Tempo	0,29 ± 0,04	1,33 (1,21 – 1,47)	<0,0001	0,7376
Distância	-0,43 ± 0,07	0,64 (0,55 – 0,75)		
Experimento 2				
Acima				
Intercepto	-6,69 ± 1,58	--		
Tempo	0,11 ± 0,02	1,11 (1,07 – 1,16)	<0,0001	0,7114
Distância	-0,09 ± 0,03	0,90 (0,84 – 0,96)		
Abaixo				
Intercepto	- 3,02 ± 0,80	--		
Tempo	0,19 ± 0,04	1,21 (1,12 – 1,31)	<0,0001	0,7090
Distância	-0,23 ± 0,05	0,79 (0,77 – 0,88)		

^a Coeficientes dos parâmetros obtidos pela análise de GLM. ^b Significativo se 1 $\notin$ 95% IC. ^c Significância geral do modelo.

Tabela 6. Coeficientes do modelo logístico que descreve a probabilidade de detecção de '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' em função do tempo após a data de inoculação e da distância do ponto de inoculação em plantas de limão 'Siciliano'.

Siciliano	Parâmetro estimado ($\pm$ EP) ^a	Razão de chance (95 % IC) ^b	Estatísticas do modelo ^c	
			$P > \chi^2$	$pseudo-R^2$
Experimento 1				
Acima				
Intercepto	-0,47 $\pm$ 0,71	--		
Tempo	0,06 $\pm$ 0,02	1,06 (1,02 – 1,10)	<0,0001	0,7299
Distância	-0,14 $\pm$ 0,04	0,87 (0,80 – 0,92)		
Abaixo				
Intercepto	-3,01 $\pm$ 0,84	--		
Tempo	0,12 $\pm$ 0,03	1,13 (1,08 – 1,18)	<0,0001	0,7073
Distância	-0,17 $\pm$ 0,04	0,84 (0,77 – 0,91)		
Experimento 2				
Acima				
Intercepto	-0,88 $\pm$ 1,10	--		
Tempo	0,07 $\pm$ 0,03	1,07 (1,01 – 1,12)	<0,0001	0,7391
Distância	-0,13 $\pm$ 0,05	0,86 (0,77 – 0,96)		
Abaixo				
Intercepto	- 0,72 $\pm$ 0,95	--		
Tempo	0,09 $\pm$ 0,05	1,10 (1,04 – 1,14)	<0,0001	0,7071
Distância	-0,14 $\pm$ 0,03	0,85 (0,82 – 0,93)		

^a Coeficientes dos parâmetros obtidos pela análise de GLM. ^b Significativo se 1 $\notin$ 95% IC. ^c Significância geral do modelo.

Tabela 7. Coeficientes do modelo logístico que descreve a probabilidade de detecção de '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' em função do tempo após a data de inoculação e da distância do ponto de inoculação em plantas de lima ácida 'Tahiti'.

Tahiti	Parâmetro estimado ($\pm$ EP) ^a	Razão de chance (95 % IC) ^b	Estatísticas do modelo ^c	
			$P > \chi^2$	<i>pseudo-R</i> ²
Experimento 1				
Acima				
Intercepto	-0,83 $\pm$ 0,72	--		
Tempo	0,06 $\pm$ 0,02	1,07 (1,03 – 1,12)	<0,0001	0,7529
Distância	-0,13 $\pm$ 0,03	0,87 (0,81 – 0,93)		
Abaixo				
Intercepto	-0,39 $\pm$ 0,82	--		
Tempo	0,07 $\pm$ 0,01	1,08 (1,03 – 1,11)	<0,0001	0,7593
Distância	-0,14 $\pm$ 0,06	0,86 (0,80 – 0,92)		
Experimento 2				
Acima				
Intercepto	-1,27 $\pm$ 0,77	--		
Tempo	0,05 $\pm$ 0,02	1,06 (1,02 – 1,10)	<0,0001	0,6991
Distância	-0,09 $\pm$ 0,03	0,91 (0,84 – 0,97)		
Abaixo				
Intercepto	- 0,75 $\pm$ 0,71	--		
Tempo	0,07 $\pm$ 0,03	1,07 (1,03 – 1,11)	<0,0001	0,7098
Distância	-0,11 $\pm$ 0,02	0,89 (0,84 – 0,95)		

^a Coeficientes dos parâmetros obtidos pela análise de GLM. ^b Significativo se 1 $\notin$ 95% IC. ^c Significância geral do modelo.

O modelo de regressão logística também permitiu estimar a velocidade de movimentação de Las em função do tempo e da distância. A velocidade de movimentação ‘Valência’ no verão foi de 0,67 e 1,56 cm dia⁻¹ acima e abaixo, respectivamente. Na primavera, Las se moveu a 0,84 e 1,11 cm dia⁻¹ acima e abaixo, respectivamente. Para o limão ‘Siciliano’, a velocidade de movimentação de Las no verão foi 0,47 e 0,74 cm dia⁻¹ acima e abaixo, respectivamente. Na primavera, Las se moveu a 0,36 e 0,49 cm dia⁻¹ acima e abaixo, respectivamente. Na lima ácida ‘Tahiti’, a velocidade de movimentação de Las foi 0,31 e 0,54 cm dia⁻¹ acima e abaixo, respectivamente, no verão. Na primavera, Las se moveu a 0,32 e 0,62 cm dia⁻¹ acima e abaixo, respectivamente (Tabela 8).

Tabela 6. Velocidade de movimentação de Las (cm dia⁻¹) em plantas de ‘Valência’, ‘Tahiti’ e ‘Siciliano’ acima e abaixo do ponto de inoculação dos experimentos do verão e primavera.

Experimentos	Direção em relação ao ponto de inoculação	‘Valência’	‘Siciliano’	‘Tahiti’
Verão	Acima	0,67	0,47	0,31
	Abaixo	1,56	0,74	0,54
Primavera	Acima	0,84	0,36	0,32
	Abaixo	1,11	0,49	0,62

No verão, durante o período de avaliação, as plantas foram expostas a temperatura média do ar de 25,5 °C (máx. 33,0 °C; mín. 19,9°C) e umidade relativa média de 82,7% (máx. 98,5 %; mín. 57,4%) (Figura 3A), e, na primavera, à temperatura média 26 °C (máx 34,2 e mín 18,7) e umidade relativa média de 59,3% (máx. 64,5%; mín. 53,5%) (Figura 3B).

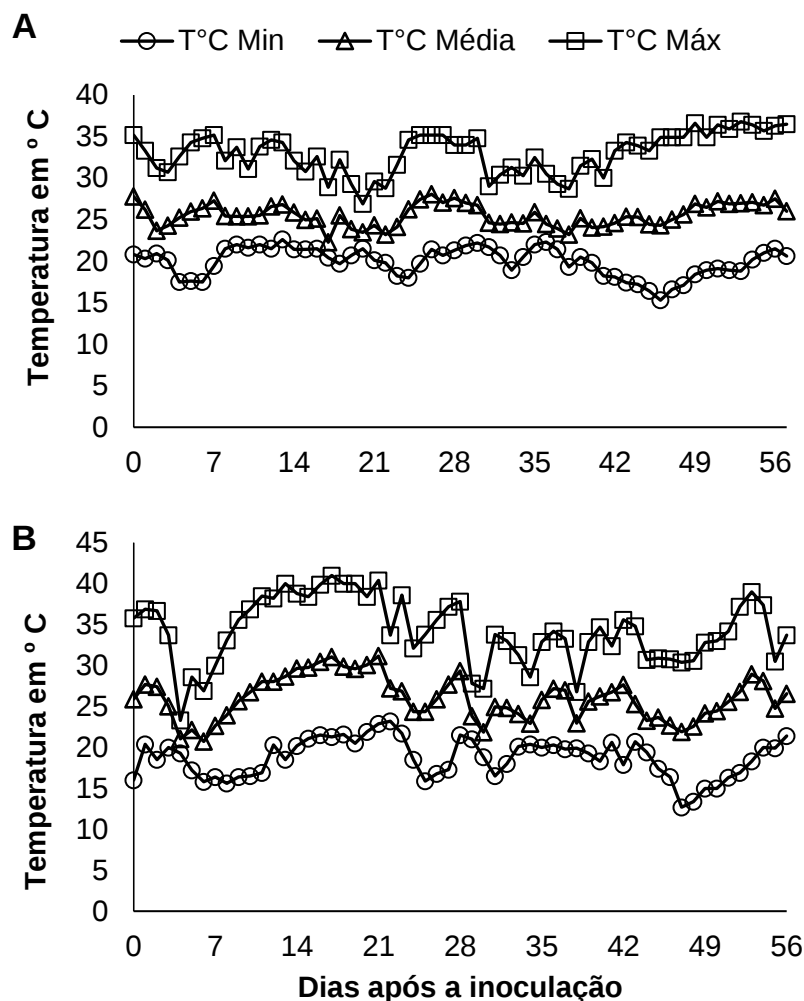


Figura 3. Temperaturas mínimas (T °C Min), médias (T °C Média) e máximas (T °C Máx) registradas no período de janeiro a março **(A)** e de setembro a novembro **(B)** de 2020 dentro da casa de vegetação onde foi conduzido os experimentos para avaliar a velocidade de colonização de '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' em plantas de laranja 'Valência', limão 'Siciliano' e lima ácida 'Tahiti'.

5. DISCUSSÃO

Essa pesquisa foi realizada com o objetivo de buscar informação sobre a velocidade de movimentação que Las utiliza para atingir os brotos e as raízes das em três cultivares de citros. Foi empregado a técnica de qPCR para determinar a presença ou ausência de Las ao longo do tempo nos tecidos das plantas. Las possui maior tolerância a altas temperaturas, e só é afetada a partir de 38 °C (Lopes et al., 2009b). Portanto, a exposição diária a temperatura média de 25,7 °C, com uma máxima de

34,2 °C não impediu o estabelecimento, infecção e posterior colonização das plantas por Las.

Neste estudo, ao longo do tempo diferentes pontos da copa e do porta-enxerto localizados a diferentes distâncias do inóculo, o que permitiu estimar o tempo necessário para a bactéria atingir o topo da parte aérea (brotações) e o sistema radicular. A confirmação de Las baseada em qPCR, nos brotos, cascas do caule e raízes cítricas é um processo destrutivo (Li et al., 2006), portanto, as mudanças nas populações bacterianas não puderam ser monitoradas durante o tempo de avaliação no mesmo grupo de plantas.

Observou-se que Las se distribui de forma irregular nas plantas, confirmando estudos anteriores com laranjas doces e toranjas (Li et al., 2009; Tatineni et al., 2008). Independentemente da cultivar, Las invadiu primeiro as partes mais próximas do ponto de inoculação, e de forma mais rápida nas plantas de laranjeira 'Valência'. Os experimentos em duas épocas, mostraram que, independentemente de as amostras estarem próximos ou distantes do inóculo, elas podem apresentar alto títulos bacterianos.

Apesar do HLB ser a doença mais destrutiva dos citros (Bové, 2006), diferentes respostas têm sido observadas entre cultivares (Folimonova et al., 2009). Neste estudo, verificou-se que o aumento do número de plantas infectadas ocorreu de forma diferente entre as cultivares, sendo que os maiores títulos foram verificados na laranja 'Valência' quando comparados com o 'Siciliano'. Abdullah et al. (2009) e Folimonova et al. (2009) também observaram diferenças na infecção entre cultivares cítricas. Quando inoculada na planta, Las se movimenta e estabelece infecção sistêmica. Essa infecção segue a direção da translocação da seiva do floema, movendo-se das áreas de produção de fotoassimilados (exemplo: folhas maduras) para tecidos em crescimento (Wang et al., 2017). No presente trabalho, Las foi detectada nos órgãos em crescimento, tais como, brotos e raízes, confirmando que Las segue os fluxos em desenvolvimento. A velocidade de movimentação de Las foi maior no sentido ascendente, chegando a se movimentar 45 cm em 49 dias. Um modelo proposto por Andrade et al. (2019) mostra que durante o período de latência, Las não tem dificuldades para se adaptar às mudanças ambientais de dentro do floema, iniciando a multiplicação nos tecidos jovens, e, com o amadurecimento desses

órgãos, Las se movimenta para outros órgãos ainda não infectados. Este estudo também permitiu estimar a velocidade com que Las se moveu nas três cultivares, apresentando uma movimentação muito rápida em plantas de laranja Valência.

Os experimentos no verão e na primavera, mostraram diferentes incidências de infecções e valores de títulos bacterianos ao longo das datas avaliadas, ou seja, a movimentação da bactéria no floema ocorreu de diferentes intensidades nas duas épocas do ano. A movimentação da bactéria foi mais rápida nos meses de janeiro a março, ou seja, durante o verão. Este estudo confirma que a infecção se dá de forma irregular. A presença da bactéria nas raízes 35 e 21 dias após a inoculação, nas duas épocas, sugerem rápida movimentação no sentido descendente.

Conforme citado, os resultados, quando analisados separadamente, mostram possível influência do ambiente na movimentação de Las. O experimento realizado no verão, a taxa de movimentação média foi estimada em 0,48 cm dia⁻¹ acima e 0,94 cm dia⁻¹ abaixo do inóculo, quando as médias das temperaturas mínimas e máximas foram registradas em 19,9 e 33,3 °C, respectivamente, e a umidade relativa média variou entre 57,4 e 98,5% dentro da casa de vegetação (Figura 3A e B). O experimento realizado na primavera, a taxa de movimentação média foi estimada 0,50 cm dia⁻¹ acima e 0,74 cm dia⁻¹ abaixo do inóculo, quando as médias das temperaturas mínimas e máximas foram 18,7 e 34,2 °C, respectivamente, e a umidade relativa média variou entre 53,5 e 64,5%, valores inferiores aos encontrados por Raiol-Junior et al. (2021b), estimados em 2,9 e 5,0 cm dia⁻¹. Essas diferenças podem estar relacionadas ao ambiente, principalmente a temperatura, que parece influenciar a multiplicação e a colonização de citros por Las (Lopes et al., 2013). Foi observado que mesmo com avaliações em diferentes estações do ano, onde o verão é conhecido como a estação mais quente e a primavera com temperaturas mais amenas, nada impediu a colonização de Las.

Verificamos também neste estudo que para a colonização total das plantas de Valência por Las foram necessários 49 dias, enquanto, após esse período, nas demais cultivares Las não havia colonizado a totalidade das plantas, mostrando que, em relação ao 'Siciliano' e 'Tahiti', a laranja 'Valência' é mais suscetível. Diferenças foram encontradas na taxa de colonização das plantas, sendo maior em laranjeira 'Valência'

e menor no limoeiro 'Siciliano'. No campo, diferenças na sintomatologia em limoeiros verdadeiros têm sido relatadas (Mendoza-Peña et al., 2018).

O modelo monomolecular permitiu estimar a taxa de colonização por Las nas diferentes cultivares, o que demonstrou aumento na frequência de colonização ao longo do tempo para todas as cultivares. Aos 35 dias Las estava presente em todos os tecidos das três cultivares, incluindo os brotos no ápice do caule e as raízes, comprovando a rápida movimentação e colonização das plantas pela bactéria. A colonização rápida das raízes já foi observada em outros estudos, chegando a 45 dias nos estudos de Raiol-Junior et al. (2021a). A colonização sistêmica rápida comprova porque tentativas de curar a planta, como a poda de ramos sintomáticos (Lopes et al., 2007) e termoterapia (Doud et al., 2017; Hoffman et al., 2013), não funcionam. Os estudos conduzidos anteriormente envolveram apenas laranjeiras. Estudos mostram que as folhas novas que surgiram após a poda, foram infectadas logo nos primeiros 30 dias, e os títulos bacterianos aumentaram durante o desenvolvimento das folhas. Os resultados aqui obtidos permitem inferir que a poda e a termoterapia também não deverão funcionar para o 'Siciliano' e 'Tahiti'.

6. REFERÊNCIAS

Achor DS, Etxeberria E, Wang N, Folimonova SY, Chung KR, Albrigo LG (2010) Sequence of Anatomical Symptom Observations in Citrus Affected with Huanglongbing Disease. **Plant Pathology Journal** 9: 56-64.

Achor D, Welker S, Ben-Mahmoud S, Wang C, Folimonova SY, Dutt M, Gowda S, Levy A (2020) Dynamics of *Candidatus* Liberibacter asiaticus movement and sieve-pore plugging in citrus sink cells. **Plant Physiology** 182: 882-891.

Ajene, IJ, Khamis, FM, van Asch B, Pietersen G, Seid N, Rwomushana I, Ombura FLO, Momanyi G, Finyange P, Rasowo BA, Tanga CM, Mohammed S, Ekesi S (2020) Distribution of *Candidatus* Liberibacter species in Eastern Africa, and the first report of *Candidatus* Liberibacter asiaticus in Kenya. **Scientific Reports** 10: 3919

Albrecht U, Bowman, KD (2011). Tolerance of the trifoliolate citrus hybrid US-897 (*Citrus reticulata* Blanco × *Poncirus trifoliata* L. Raf.) to Huanglongbing. **HortScience** 46:16-22.

Albrecht U, Mccollum G, Bowman K D (2012) Influence of rootstock variety on huanglongbing disease development in field-grown sweet orange (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck) trees. **Scientia Horticulturae** 138: 210-220.

Albrigo LG, Valiente JI, Beck HW (2002) Flowering expert system development for a phenology based citrus decision support system. **Acta Horticultural**, v.584, p.247-254.

Ammar ED, Ramos JE, Hall DG, Dawson WO, Shatters Jr RG (2016) Acquisition, replication and inoculation of *Candidatus* Liberibacter asiaticus following various acquisition periods on huanglongbing-infected citrus by nymphs and adults of the asian citrus psyllid. **PLoS ONE** 11: e0159594.

Andrade MO, Pang Z, Achor DS, Wang H, Yao T, Singer BH, Wang N (2019) The flagella of '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' and its movement in planta. **Molecular Plant Pathology** 21: 109-123.

ANR, 2007. Citrus bacterial canker disease and huanglongbing (citrus greening). Publication 8218. California, USA: University of California, **Agriculture and Nature Resources**. <https://anrcatalog.ucanr.edu/pdf/8218.pdf>

Bassanezi RB, Montesino LR, Stuchi ES (2009) Effects of huanglongbing on fruit

quality of sweet orange cultivars in Brazil. **European Journal of Plant Pathology** 125:565–72.

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

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

Belasque Jr J, Bergamin A, Bassanezi RB, Barbosa JC, Fernandes NG, Yamamoto PT, Lopes AS, Machado MA, Leite Junior RP, Ayres AJ, Massari CA (2009) Base científica para a erradicação de plantas sintomáticas e assintomáticas de Huanglongbing (HLB, Greening) visando o controle efetivo da doença. **Tropical Plant Pathology**, Vol: 34, Issue: 3, Page: 137-145.

Belasque Jr J, Yamamoto PT, Miranda MP, Bassanezi RB, Ayres AJ, Bové JM (2010) Controle do *huanglongbing* no estado de São Paulo, Brasil. **Citrus Research & Technology** 31: 53–64.

Blaustein RA, Lorca GL, Teplitski M (2018) Challenges for managing *Candidatus Liberibacter* spp. (Huanglongbing disease pathogen): Current control measures and future directions. **Phytopathology** 108: 424–35.

Boava LP, Cristofani-Yaly M, Machado MA (2017) Physiologic, Anatomic, and Gene Expression Changes in Citrus sunki, Poncirus trifoliata, and Their Hybrids After ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ Infection. **Phytopathology** 107: 590-599.

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

Coletta-Filho HD, Targon MLPN, Takita MA, De Negri JD, Pompeu Jr J, Machado MA, Amaral AM, Muller GW (2004) First Report of the Causal Agent of Huanglongbing (“*Candidatus Liberibacter asiaticus*”) in Brazil. **Plant Disease** 88:1382-1382.

Capoor S., Rao D; Viswanath S (1967) *Diaphorina citri* Kuwayama, a vector of the greening disease of citrus in India. **The Indian Journal of Agricultural Sciences** 37:572–579.

Coletta-Filho HD, Carlos EF (2010) Ferramentas para diagnóstico de huanglongbing e detecção de agentes associados: dos sintomas aos ensaios de laboratório. **Citrus**

Research & Technology, Cordeirópolis, v.31, n.2, p.129-143.

Costa L (1942) Ordem Homoptera. In: **Insetos do Brasil**. 3° tomo. Rio de Janeiro, ENA, n. 4, p. 7-35, 327p,

Cifuentes-Arenas JC, Beattie GAC, Lopes SA, Peña L (2019) *Murraya paniculata* and *Swinglea glutinosa* as short-term transient hosts of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' and implications for the spread of Huanglongbing. **Phytopathology** 109: 2064-2073.

Dala-Paula BM, Plotto A, Bai J, Manthey JA, Baldwin EA, Ferrarezi RS, Gloria MBA (2019) Effect of Huanglongbing or Greening Disease on Orange Juice Quality, a Review. **Frontiers in Plant Science**, 9: 1-19.

Ding F, Duan Y, Paul C, Bransky RH, Hartung JS (2015) Localization and Distribution of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' in citrus and periwinkle by direct tissue blot immuno assay with an anti-ompA polyclonal antibody. **PLoS ONE** 10: 1–17.

Doud MM., Wang Y., Hoffman MT., Latza CL., Luo W., Armstrong C M., Gottwald T. R., Dai L., Luo F., Duan Y (2017). Solar thermotherapy reduces the titer of *Candidatus Liberibacter asiaticus* and enhances canopy growth by altering gene expression profiles in HLB-affected citrus plants. *Horticulture Research*, 4, 17054

Duan Y, Zhou L, Hall DG, Li W, Doddapaneni H, Lin H, Liu L, Vahling CM, Gabriel DW, Williams KP, Dickerman A, Sun Y, Gottwald T (2009) Complete genome sequence of citrus Huanglongbing bacterium, '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' obtained through metagenomics. **Molecular and Plant-Microbe Interactions** 22: 1011-1020.

Dugrand-Judek A, Orly A, Hehn A, Costantino G, Ollitrault P, Froelicher Y, Bourgaud F (2015) The distribution of coumarins and furanocoumarins in *Citrus* species closely matches *Citrus* phylogeny and reflects the organization of biosynthetic pathways. **PLoS ONE** 10: e0142757.

Etcheberria E.; Gonzalez P.; Achor D.; Albrigo G (2009) Anatomical distribution of abnormally high levels of starch in HLB-affected Valencia orange trees. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 74:76–83.

Firrao G, Gibb K, Streten C (2005) Short taxonomic guide to the genus '*Candidatus phytoplasma*' **Journal of Plant Pathology** 87: 249-263.

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

1354.

Folimonova SY, Achor DS (2010) Early events of citrus greening (huanglongbing) disease development at the ultrastructural level. **Phytopathology** 100: 949–58.

Fundecitrus (2017) Fundo de Defesa da Citricultura: **Identificação de HLB em limão é mais difícil.** Disponível em: <https://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/noticias/integra/identificacao-de-hlb-em-limao-e-mais-dificil/501>. Acesso em: 31 de janeiro de 2021.

Fundecitrus (2018) Fundo de Defesa da Citricultura. **Levantamento da incidência das doenças dos citros: Greening, CVC e cancro cítrico no cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro.** Araraquara - SP. Disponível em: Acesso em: <https://www.fundecitrus.com.br/pdf/levantamentos/LevantamentoDeDoencas2018-greening-cvc-cancroCitrico.pdf>. Acesso em: 28 de novembro de 2020.

Fundecitrus 2020: Fundo de Defesa da Citricultura. **Tree inventory and 2020-2021 orange crop forecast for the São Paulo and west-southwest Minas Gerais citrus belt.** Araraquara, SP, 141 p. Available on: < https://www.fundecitrus.com.br/pdf/pes_relatorios/2020_06_25_Tree_Inventory_and_Orange_Crop_Forecast_2020-2021.pdf>. Acesso em: 12 de fevereiro de 2021.

Fundecitrus (Araraquara). Fundo de Defesa da Citricultura: **Contém informações institucionais, técnicas, notícias, projetos, publicações e serviços.** Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br>>. Acesso em: 22 jan. 2021.

Fundecitrus: Fundo de Defesa da Citricultura: Estimativa da safra de laranja 2021/22. São Paulo e Triângulo/Sudoeste de Minas Gerais 2021-2022 orange crop forecast - São Paulo and West-Southwest Minas Gerais citrus belt. https://www.fundecitrus.com.br/pdf/pes_relatorios/2021_05_27_Sum%C3%A1rio_Executivo_da_Estimativa_da_Safra_de_Laranja_2021-2022.pdf. Acesso em: 10 jun. 2021.

Garnier M, Danel N, Bové JM (1984) Etiology of citrus greening disease. **Annales de Microbiologie** 153:169-179.

Gottwald TR, Irey MS, Gast T, Parnell SR (2010) Spatio-temporal analysis of an HLB epidemic in Florida and implications for spread. **Proceedings of the 17 th Conference of International Organization of Citrus Virologists (1957-2010)** 17: 84–97.

- Hall DG, Richardson ML, Ammar ED, Halbert SE (2013) Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, vector of citrus huanglongbing disease. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 146:207-223.
- Hartung JS, Paul C, Achor D, Bransky RH (2010) Colonization of dodder, *Cuscuta indecora*, by ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ and ‘*Ca. L. americanus*’”. **Phytopathology** 100: 756–62.
- Hilf ME (2011) Colonization of citrus seed coats by ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’: Implications for seed transmission of the bacterium. **Phytopathology** 101: 1242–50.
- Hilbe JM (2009) Logistic Regression Models. In Carlin BP, Faraway JJ, Tanner M, Zidek J (Eds.), **Text in Statistical Science**. Chapman & Hall/CRC.
- Hilf ME, Luo W (2018) Dynamics of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ colonization of new growth of citrus. **Phytopathology** 108: 1165-1171.
- Hoffman MT, Doud MS, Williams L, Zhang MQ, Ding F, Stover E, Hall D, Zhang S, Jones L, Gooch M, Fleites L, Dixon W, Gabriel D, Duan YP (2013) Heat treatment eliminates ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ from infected citrus trees under controlled conditions. **Phytopathology** 2: 2–6.
- Hong Y, Luo Y, Yi L, He L, Dai L, Yi T (2019) Screening nested-PCR primer for ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ associated with citrus Huanglongbing and application in Hunan, China. **PLoS ONE** 14: 1–15.
- Hortifruti Brasil, Anuário 2020-2021. Edição Especial – ano 19 – nº207 – Dez/2020 – Jan/2021. <https://www.hfbrasil.org.br/br/revista/acessar/completo/retrospectiva-2020-perspectivas-2021.aspx>. Acesso em: 10 jun. 2021.
- Hung TH, Wu ML, Su HJ (2001) Identification of the Chinese box orange (*Severinia buxifolia*) as an alternative host of the bacterium causing citrus huanglongbing. **European Journal of Plant Pathology** 107: 183–189.
- Hung TH, Hung SC, Chen CN, Hsu MH, Su HJ (2004) Detection by PCR of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the bacterium causing citrus huanglongbing in vector psyllids: application to the study of vector–pathogen relationships. **Plant Pathology** 53: 96–102.
- Jagoueix S, Bové JM, Garnier M (1994) The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the α subdivision of the *Proteobacteria*. **International Journal of Systematic Bacteriology** 44: 379-386.

Killiny N, Jones SE (2018) Metabolic alterations in the nymphal instars of *Diaphorina citri* induced by *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the putative pathogen of huanglongbing. **PLoS ONE** 13: e0191871.

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

Lemoine R, Camera SL, Atanassova R, Dédaldéchamp F, Allario T, Pourtau N, Bonnemain JL, Laloi M, Coutos-Thévenot P, Maurousset L, Faucher M, Girousse C, Lemonnier P, Parrilla J, Durand M (2013) Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. **Frontiers in Plant Science** 4: 272.

Liao H-L, Burns JK (2012) Gene expression in *Citrus sinensis* fruit tissues harvested from huanglongbing-infected trees: comparison with girdled fruit. **Journal of Experimental Botany** 63: 3307–3319.

Li W, Levy L, Hartung JS (2009) Quantitative distribution of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” in citrus plants with citrus huanglongbing. **Phytopathology** 99: 139–144.

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

Lopes SA, Frare GF, Yamamoto PT, Ayres JA, Barbosa JC (2007) Ineffectiveness of pruning to control citrus huanglongbing caused by *Candidatus Liberibacter americanus*. **European Journal of Plant Pathology** 119: 463–68.

Lopes SA.; Frare GF (2008) Graft Transmission and Cultivar Reaction of Citrus to “*Candidatus Liberibacter americanus*” **Plant Disease** 92:21–24.

Lopes SA, Bertolini E, Frare GF, Martins EC, Wulff NA, Teixeira DC, Fernandes, NG, Cambra M (2009b) Graft transmission efficiencies and multiplication of *Candidatus Liberibacter americanus* and *Candidatus Liberibacter asiaticus* in citrus plants. **Phytopathology** 99: 301-306.

Lopes SA, Frare GF, Bertolini E, Cambra M, Fernandes NG, Ayres AJ, Marin DR, Bové JM (2009a) Liberibacters associated with citrus huanglongbing in Brazil: 19 *Candidatus Liberibacter asiaticus* is heat tolerant, *Candidatus Liberibacter americanus* is heat sensitive. **Plant Disease** 93: 257-262.

Lopes SA (2020) Importância do HLB para a lima ácida Tahiti. **Revista Técnica do Limão Tahiti**, Fundecitrus p: 38-43.

Lopes SA, Cifuentes-Arenas JC (2021) A protocol for successful transmission of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' from citrus to citrus using *Diaphorina citri*. **Phytopathology**. Doi: 10.1094/PHYTO-02-21-0076-R [Epub ahead of print].

Madden LV, Hughes G, van den Bosch F (2007) The Study of Plant Disease Epidemics. **APS Press**, St Paul, MN.

Martinelli F et al. (2013) Gene regulatory networks elucidating huanglongbing disease mechanisms. **PLoS ONE** 8: e74256.

Mattos Junior D, Negri JD, Pio RM, Pompeu Junior J (2005) **Citros**. Campinas: **IAC**, 929 p.

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

Mendoza-Peña E, Cibrián-Tovar J, Velázquez-González J, Felipe Tafoya-Rangel F, Azuara-Domínguez A (2018) Volatile compounds of Persian and Mexican lime associated with HLB (Huanglongbing) symptoms. **Revista Colombiana de Entomología** 44: 19-24.

Monzo C, Stansly PA (2017) Economic injury levels for Asian citrus psyllid control in process oranges from mature trees with high incidence of huanglongbing. **PLoS ONE** 12: e0175333.

Shankar PS, Wang N (2019) Targeted early detection of citrus huanglongbing causal agent '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' before symptom expression. **Phytopathology** 109: 952–59.

Soares Filho WS et al. (2003) Programa de Melhoramento Genético de Citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura: obtenção de híbridos. Cruz das Almas: **Embrapa Mandioca e Fruticultura**, 37p.

Pandey SS, Vasconcelos FNC, Wang N (2021) Spatiotemporal dynamics of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' colonization inside citrus plant and Huanglongbing disease development. **Phytopathology**. Doi: 10.1094/PHYTO-09-20-0407-R [Epub ahead of print].

Peng CYJ, Lee KL, Ingersoll GM (2002) An introduction to Logistic regression analysis and reporting. **The Journal of Educational Research** 96: 3-14.

Penjor T, Yamamoto M, Uehara M, Ide M, Matsumoto N, Matsumoto R, Nagano Y (2013) Phylogenetic relationships of citrus and its relatives based on *matK* gene sequences. **PLoS ONE** 8: e62574.

Qureshi JA, Kostyk BC, Stansly PA (2014) Insecticidal suppression of asian citrus psyllid *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) vector of huanglongbing pathogens. **PLoS ONE** 9: e112331.

Raiol-Junior LL, Cifuentes-Arenas JC, Carvalho EV, Girardi EA, Lopes AS (2021a) Evidence That ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ Moves Predominantly Toward New Tissue Growth in Citrus Plants. **Plant Disease** 105: 34-42.

R Core Team R 2015: **A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Raiol-Junior LL, Cifuentes-Arenas JC, Cuniffe NJ, Turgeon R, Lopes SA (2021b). Modelling ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ movement within citrus plants. **Phytopathology**. Doi: 10.1094/PHYTO-12-20-0559-R [Epub ahead of print].

Shokrollah H, Abdullah TL, Sijam K, Siti Nor AA (2009) Determination of the presence of huanglongbing in seeds and movement of the pathogen in *Citrus reticulata*. **American Journal of Applied Sciences** 6: 1180–85.

Taiz L, Zeiger E, Møller IM, Murphy A (2017) **Plant physiology and development**. Porto Alegre: Artmed, 858 p

Tatineni S, Sagaram US, Gowda S, Robertson CJ, Dawson WO, Iwanami T, Wang N (2008) In planta distribution of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ as revealed by polymerase chain reaction (PCR) and real-time PCR. **Phytopathology** 98: 592-599.

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

Teixeira DC, Saillard C, Couture C, Martins EC, Wulff NA, Eveillard-Jagoueix Set al. Distribution and quantification of ‘*Candidatus Liberibacter americanus*’, agent of huanglongbing disease of citrus in São Paulo State, Brasil, in leaves of an affected sweet orange tree as determined by PCR. **Molecular and Cell Probes** 22: 139–150, 2008.

USDA - United States Department of Agriculture. Foreign Agricultural Service. **Citrus:**

World Markets and Trade. Nov. 2019. Disponível em: <<https://www.fas.usda.gov/data/citrus-world-markets-and-trade>>. Acesso em: 10 maio. 2020.

Wei L, Xiang X-G, Wang Y-Z, Li Z-Y (2015) Phylogenetic relationships and evolution of the androecia in Ruteae (Rutaceae). **PLoS ONE** 10: e0137190.

Wang N, Pierson EA, Setubal JC, Xu J, Levy JG, Zhang Y, Li J, Rangel LT, Martins JrJ (2017) The Candidatus Liberibacter–Host Interface: Insights into Pathogenesis Mechanisms and Disease Control. **Annual Review of Phytopathology** 55:451–82

Wu F, Huang J, Xu M, Fox EGP, Beattie GAC, Holford P, Cen Y, Deng X (2018a). Host and environmental factors influencing ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ acquisition in *Diaphorina citri*. **Pest Management Science** 74: 2738-2746.

Wu GA, Terol J, et al. (2018b) Genomics of the origin and evolution of Citrus. **Nature** 554: 311-316.

Yamamoto PT.; Felipe MR.; Garbim LF.; Coelho JHC.; Ximenes NL.; Martins EC (2006) *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera: Psyllidae): vector of the bacterium *Candidatus Liberibacter americanus*. In Proceedings of the Huanglongbin — Greening International Workshop, Ribeirão Preto, SP, p. 96.

Yao L, Yu Q, Huang M, Song Z, Grosser J, Chen S, Wang, Gmitter Jr FG (2020) Comparative iTRAQ proteomic profiling of sweet orange fruit on sensitive and tolerant rootstocks infected by ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*. **PLoS ONE** 15: e0228876.

Zhang M, Guo Y, Powell CA, Doud MS, Yang C, Duan Y (2014) Effective antibiotics against ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ in HLB-affected citrus plants identified via the graft-based evaluation”. **PLoS ONE** 9: 17–21.