

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**INFLUÊNCIA DA DEFICIÊNCIA HÍDRICA NA BROTAÇÃO DE
LARANJEIRA ‘VALÊNCIA’ INFECTADA POR *Candidatus*
LIBERIBACTER ASIATICUS E NA AQUISIÇÃO DA
BACTÉRIA POR *Diaphorina citri***

Waleska Soares Gomes de Carvalho

Engenheira Agrônoma

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**INFLUÊNCIA DA DEFICIÊNCIA HÍDRICA NA BROTAÇÃO DE
LARANJEIRA ‘VALÊNCIA’ INFECTADA POR *Candidatus*
LIBERIBACTER ASIATICUS E NA AQUISIÇÃO DA
BACTÉRIA POR *Diaphorina citri***

Waleska Soares Gomes de Carvalho

Orientador: Prof. Dr. Silvio Aparecido Lopes

Coorientador: Dr. Juan Camilo Cifuentes-Arenas

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

C331i

Carvalho, Waleska Soares Gomes de

Influência da deficiência hídrica na brotação de laranjeira 'Valência' infectada por *Candidatus Liberibacter asiaticus* e na aquisição da bactéria por *Diaphorina citri* / Waleska Soares Gomes de Carvalho. -- Jaboticabal, 2022

66 p. : il., tabs., fotos

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

Orientador: Silvio Aparecido Lopes

Coorientador: Juan Camilo Cifuentes Arenas

1. Citrus spp.. 2. Huanglongbing. 3. Estresse hídrico. 4. Condições ambientais. 5. Psilídeo. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: INFLUÊNCIA DA DEFICIÊNCIA HÍDRICA NA BROTAÇÃO DE LARANJEIRA "VALÊNCIA" INFECTADA POR *Candidatus LIBERIBACTER ASIATICUS* E NA AQUISIÇÃO DA BACTÉRIA POR *Diaphorina citri*

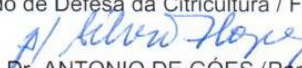
AUTORA: WALESKA SOARES GOMES DE CARVALHO

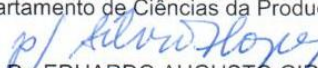
ORIENTADOR: SILVIO APARECIDO LOPES

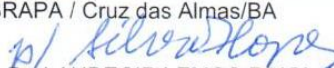
COORIENTADOR: JUAN CAMILO CIFUENTES ARENAS

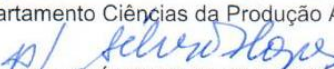
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL), pela Comissão Examinadora:


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


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


Prof. Dr. EDUARDO AUGUSTO GIRARDI (Participação Virtual)
EMBRAPA / Cruz das Almas/BA


Prof. Dr. LAUDECI R LEMOS RAIOL JÚNIOR (Participação Virtual)
Departamento Ciências da Produção Agrícola-FCAV/UNESP / Jaboticabal/SP


Profa. Dra. CLÁUDIA SALES MARINHO (Participação Virtual)
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro-UENF / Campos dos Goytacazes/RJ

Jaboticabal, 14 de fevereiro de 2022

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Waleska Soares Gomes de Carvalho - nascida em 27 de junho de 1991, no município de Campos do Goytacazes, Rio de Janeiro. Engenheira Agrônoma formada pela Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), em 2015. Durante a graduação foi bolsista de iniciação científica do CNPq atuando na área de Solos e Fruticultura (Fitotecnia). No ano de 2015, ingressou no Curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, na área de Fruticultura, pela mesma Universidade, concluindo-o em 2017. Em 2018, iniciou o Curso de Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal) pela Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho', Campus de Jaboticabal, atuando na área de Fitossanidade.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por toda saúde e forças para persistir nos meus objetivos;

Aos meus pais Marcos Gerardi e Regina Lúcia por todo amor, apoio, incentivo e por sempre estarem presentes em todos os momentos da minha vida;

Aos meus irmãos Wanessa e José Herbert, por todo amor e carinho por mim;

À minha avó Jocélia e tia-avó Jocenele, por todo amor e todas as orações de cada dia;

Ao meu orientador Prof. Dr. Silvio Aparecido Lopes, pela orientação, por todos os conselhos e ensinamentos fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao meu coorientador Dr. Juan Camilo Cifuentes-Arenas, pelos conselhos, ensinamentos, amizade, por todo auxílio na parte estatística e nos experimentos;

A Universidade Estadual Paulista (UNESP) e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal) pela oportunidade de realização do curso;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) – Código de Financiamento 001 - pela concessão da bolsa;

Ao Fundecitrus, pelo apoio técnico e financeiro;

A Fundação Coopercitrus Credicitrus pela realização do experimento de campo;

Ao ex-coordenador do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal) Prof. Dr. Rouverson Pereira de Silva e ao Prof. Dr. Pedro Luís da Costa Aguiar Alves pelas conversas e todos os preciosos conselhos que foram extremamente importantes para mim;

Ao Departamento de Fitossanidade, seus funcionários e aos Professores Dr. Antônio de Goes e Dr. Rita de Cássia Panizzi por permitir a utilização de suas instalações para realização do experimento, por todo apoio, assistência, preocupação e amizade;

A amiga Solange Celestino Costa, que a Pós-Graduação me presenteou, por toda ajuda nos experimentos, por sempre estender a mão quando precisei. Obrigada, acima de tudo, pela sua amizade;

A toda equipe do FUNDECITRUS, Fernanda, Priscila e Wellington pelas análises laboratoriais, todos os treinamentos, suporte no manejo dos experimentos e, pela amizade. Ao Hermes por toda amizade, por todo o auxílio nas avaliações dos

experimentos, por toda solidariedade. Ao Laudecir e Everton por todos os conselhos, amizade e por sempre estarem dispostos a ajudar;

Aos amigos de Jaboticabal, Gilmar, Lígia, Antônio Maricélio, Juan, Thayanne e Patrícia pelo auxílio nas avaliações, por tornar os dias mais animados e leves;

Aos amigos da minha cidade e que fiz ao longo da minha jornada, por todo incentivo, preocupação e carinho. E, em especial, agradeço ao meu amigo de muitos anos Vinícios, por sempre estar comigo em todos os momentos, por ouvir meus desabaços, me aconselhar, me apoiar e não me deixar desistir. Obrigada por tudo.

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

A todos aqueles que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho. Muito Obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO.....	xi
ABSTRACT	xiii
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Aspectos gerais da citricultura brasileira	3
2.2. Huanglongbing	4
2.3. <i>Diaphorina citri</i>	6
2.4. Controle do HLB.....	8
2.5. Déficit hídrico	9
3. REFERÊNCIAS	11
CAPÍTULO 2 - Impacto da temperatura do ar e déficit hídrico sobre brotações de plantas de laranja, multiplicação de <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> e aquisição da bactéria por <i>Diaphorina citri</i>	20
RESUMO.....	20
ABSTRACT	21
1. INTRODUÇÃO.....	22
2. MATERIAL E MÉTODOS	24
2.1. Experimento para determinar níveis de déficit hídrico.....	25
2.2. Delineamento experimental.....	26
2.3. Impacto na brotação.....	26
2.4. Impacto do déficit hídrico na aquisição de CLas por <i>D. citri</i>	28
2.5. Impacto na multiplicação CLas em brotos e na sua aquisição por <i>D. citri</i>	28
2.6. Análise dos dados	29
3. RESULTADOS	30

3.1. Determinação de níveis de déficit hídrico para uso nos experimentos	30
3.2. Condições ambientais experimentais.....	31
3.3. Impacto do déficit hídrico nas brotações.....	32
3.3.1. Tempo para surgimento dos brotos	32
3.3.2. Tempo para maturação dos brotos	33
3.3.3. Taxa de crescimento e tamanho final dos brotos.....	33
3.4. Impacto na multiplicação de CLas em brotos e na sua aquisição por <i>D. citri</i> .	37
3.4.1. Multiplicação no broto	37
3.4.2. Multiplicação e aquisição por <i>Diaphorina citri</i>	38
4. DISCUSSÃO	38
5. REFERÊNCIAS.....	42
CAPÍTULO 3 – Impacto da interrupção do déficit hídrico na ocorrência e desenvolvimento de brotos em laranjeiras sadias e afetadas por huanglongbing e na multiplicação de <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> em plantio no Norte do estado de São Paulo.....	47
RESUMO.....	47
ABSTRACT -	48
1. INTRODUÇÃO.....	49
2. MATERIAL E MÉTODOS	50
2.1. Condução do experimento	52
2.2. Surgimento, crescimento e desenvolvimento de brotos após a hidratação..	53
2.3. Título bacteriano em folhas maduras e brotos	53
2.4. Análise dos dados.....	53
3. RESULTADOS	54
3.1. Condições ambientais.....	54
3.2. Surgimento, crescimento e desenvolvimento de brotos após a hidratação ...	55
3.3. Título bacteriano nos brotos.....	57
4. DISCUSSÃO.....	58

5. REFERÊNCIAS.....	61
CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	65

INFLUÊNCIA DA DEFICIÊNCIA HÍDRICA NA BROTAÇÃO DE LARANJEIRA 'VALÊNCIA' INFECTADA POR *Candidatus* LIBERIBACTER ASIATICUS E NA AQUISIÇÃO DA BACTÉRIA POR *Diaphorina citri*

RESUMO – O Huanglongbing (HLB) é a doença mais devastadora dos citros. Está associada a bactérias de floema (*Candidatus* Liberibacter asiaticus, CLas) transmitidas por insetos (*Diaphorina citri*). Levantamentos anuais têm mostrado que a doença ocorre de forma irregular nas diferentes regiões do estado de São Paulo, com maiores incidências nas regiões centro-leste do que nas regiões norte, noroeste, sul e sudoeste. As causas podem estar no clima com impactos em todo o patossistema. Já foi comprovado que a temperatura afeta a planta, o patógeno e o inseto vetor. Neste trabalho procurou-se quantificar o impacto do déficit hídrico (DH). O estudo foi conduzido com mudas de 4 anos de laranja 'Valência' sobre o porta-enxerto citrumelo 'Swingle' em casa de vegetação e sala com fotoperíodo controlado no campus da UNESP-Jaboticabal (Capítulo 2) e plantas da mesma combinação copa/porta-enxerto, com 8 anos, em pomar no município de Bebedouro (Capítulo 3). Quantificou-se o impacto do DH na brotação de plantas sadias e doentes, na multiplicação e aquisição de CLas por *D. citri*. Em casa de vegetação e sala as plantas foram mantidas com substrato totalmente saturado de água (sem DH), e com quantidade de água de irrigação suficiente para manter as plantas com peso total dos vasos equivalentes a 75% (DH intermediário) e 55% (DH severo) do peso das plantas sem DH. Foi quantificado o tempo necessário para surgimento e desenvolvimento dos brotos até sua completa maturação, título de CLas, e aquisição de CLas por adultos de *D. citri* após confinamento de adultos por 72 h. O surgimento dos brotos foi mais rápido e o tempo de maturação menor no período de temperaturas mais elevadas (julho a setembro) do que de temperaturas mais baixas (abril a junho), em ambos os ambientes. O DH não afetou o tamanho final dos brotos, que foi menor em plantas doentes, e o título de CLas nos brotos e nos insetos. Porém, o DH afetou a aquisição da bactéria. As porcentagens de insetos com CLas variou de 9,84% em plantas sob DH intermediário, 15,38% em plantas sob DH severo e 36,36% em plantas sem DH. No campo, o trabalho foi conduzido em setembro a outubro de 2020, período em que as plantas estavam sob severo DH (folhas murchas) (etapa 1), e de setembro a novembro, quando surgiram as primeiras chuvas (etapa 2), com quatro plantas por tratamento. Na etapa 1, metade das plantas foram mantidas com DH e a outra metade irrigada sob a copa com uma lâmina de 68 mm de água. Na etapa 2 as plantas foram mantidas sem irrigação com a quebra do DH proporcionado pelas chuvas. Foram quantificados a emissão e crescimento dos brotos e título bacteriano antes e após a 'quebra' do DH pela irrigação ou chuvas. A irrigação recuperou a turgidez das folhas das plantas sintomáticas, mas não das assintomáticas. Somente as sintomáticas emitiram brotos. No entanto, com a chegada das chuvas no mês de outubro (de aproximadamente 80 mm), 49 dias após o início do experimento, todas as plantas brotaram. A irrigação e chuvas provocaram redução tanto na incidência de brotos com CLas como no título bacteriano – de log 6 a 7 por g de tecido nas plantas sob severo DH para log 3 a 4 após irrigação ou chuvas. Conclui-se que as menores incidências de HLB nas regiões norte e noroeste do estado de São Paulo podem ser o resultado,

ao menos parcial, da menor taxa de aquisição de CLas por *D. citri* antes e depois da quebra do DH, muito comum naquelas regiões.

Palavras chaves: *Citrus* × *sinensis*, Huanglongbing, título bacteriano, estresse abiótico, psílídeo

INFLUENCE OF WATER DEFICIT ON 'VALENCIA' ORANGE SHOOT INFECTED BY *Candidatus* LIBERIBACTER ASIATICUS AND BACTERIAL ACQUISITION BY *Diaphorina citri*

ABSTRACT – Huanglongbing (HLB) is the most devastating citrus disease. It is associated with phloem bacterium (*Candidatus* Liberibacter asiaticus, CLAs) transmitted by *Diaphorina citri*. Annual surveys have shown that the disease occurs irregularly in different regions of the state of São Paulo, with higher incidences in the central-east regions than in the north, northwest, south and southwest. The causes can be in the climate with impacts on the entire pathosystem. Temperature has already been proven to affect the plant, the pathogen and the insect vector. In this work we tried to quantify the impact of water deficit (WD) on 'Valencia' sweet orange plants grafted onto the 'Swingle' citrumelo rootstock in a greenhouse and room with controlled photoperiod at the UNESP-Jaboticabal campus (Chapter 2) and plants of the same scion/rootstock combination, 8 year old in an orchard in the municipality of Bebedouro (Chapter 3). The impact of WD on flushing of healthy and diseased plants, on the multiplication and acquisition of CLAs by *D. citri* was quantified. In the greenhouse and acclimatized room, the plants were maintained with a substrate fully saturated with water (without WD), and with sufficient amount of irrigation water to maintain the plants with a total weight of the pots equivalent to 75% (intermediate WD) and 55% (severe WD) from the weight of plants without WD. The time required for flush emergence and development until complete maturation, CLAs titer, and acquisition of CLAs by adults of *D. citri* after confinement of adults for 72 hours were quantified. The emergence of shoots was faster and the maturation time was shorter in the period of higher temperatures (July to September) than of lower temperatures (April to June), in both environments. WD did not affect final shoot size, which was smaller in diseased plants, and CLAs titer in shoots and insects. However, WD affected the acquisition of the bacterium. The percentages of insects with CLAs ranged from 9.84% in plants under intermediate WD, 15.38% in plants under severe WD and 36.36% in plants without WD. In the field, the work was carried out from September to October 2020, when the plants were under severe WD (wilted leaves) (step 1), and from September to November, when the first rains appeared (step 2), with four plants per treatment. In step 1, half of the plants were maintained with WD and the other half irrigated under the canopy with a water depth of 68 mm. In step 2, the plants were kept without irrigation with the drop in WD provided by the rains. The emission and growth of shoots and bacterial titers were quantified before and after the WD 'break' by irrigation or rainfall. Irrigation restored leaf turgidity in symptomatic plants, but not in asymptomatic ones. Only the symptomatic ones emitted buds. However, with the arrival of rains in October (approximately 80 mm), 49 days after the beginning of the experiment, all plants sprouted. Irrigation and rainfall reduced both the incidence of shoots with CLAs and bacterial titer – from log 6 to 7 per g of tissue in plants under severe WD to log 3 to 4 after irrigation or rainfall. It can be concluded that the lower incidences of HLB in

the north and northwest regions of the state of São Paulo may be the result, at least partially, of the lower rate of acquisition of CLas by *D. citri* before and after the WD break, very common in those regions.

Keywords: *Citrus × sinensis*, Huanglongbing, bacterial titer, abiotic stress, psyllid

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

A citricultura brasileira tem se destacado no cenário mundial e possui grande importância econômica para o país. O Brasil é o maior produtor de suco de laranja, responsável por 53% da produção mundial de suco concentrado (Barros et al., 2016). O estado de São Paulo é o maior produtor nacional, com estimativa de produção de aproximadamente 264 milhões de caixas de 40,8 kg para a safra 2021/22 (Fundecitrus, 2021a). Entre os meses de julho a dezembro de 2020 foi exportado 497 mil toneladas de suco concentrado (CitrusBR, 2021).

Os citros são afetados por diversas doenças e pragas que podem comprometer a produtividade dos pomares e qualidade das frutas (Martinelli et al., 2015). A grande vulnerabilidade se deve às grandes extensões de cultivo e perenidade da planta, e alta suscetibilidade das cultivares usadas como copa e porta-enxerto (Ghini e Hamada, 2008).

Umas das doenças que tem causado grande impacto é o Huanglongbing (HLB), considerada como o mais devastador problema fitopatológico em citros (Bové, 2006). No Brasil, a doença está presente nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Paraná e Mato Grosso do Sul, principais regiões citrícolas do país, não deixando de se constituir em ameaça a outras regiões produtoras ainda isentas da doença (Fundecitrus, 2018; Diário Oficial da União, 2019; Sulzbach et al., 2017). No último levantamento feito pelo FUNDECITRUS, em 2021, o número estimado de árvores com sintomas de HLB no cinturão citrícola de SP e Triângulo Mineiro foi de 43,4 milhões de laranjeiras, o que correspondeu a 22,37% do total de plantas cultivadas. (Fundecitrus, 2021). Em 2015, Sugayama et al. (2015) projetou para os 20 anos seguintes prejuízos na ordem de 13 a 20 bilhões de reais somente para o estado de São Paulo. A projeção foi baseada no potencial de redução da produtividade, na diminuição da densidade de pomares e na erradicação de plantas com HLB. No Brasil, um pomar de citros sem HLB possui vida útil de 18 a 25 anos, mas, com HLB, se medidas rigorosas de contenção da doença não são colocadas em prática, esse tempo pode ser reduzido para, no máximo, 7 a 10 anos (Stuchi e Girardi, 2010).

O HLB tem como principal agente causal, no Brasil e no mundo, a bactéria Gram-negativa *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), restrita ao floema e pertencente ao grupo das alfa-proteobactérias (Garnier et al., 1984; Jagoueix et al. 1984). No campo CLas é transmitida pelo inseto *Diaphorina citri* Kuawayama. Em condições experimentais CLas também pode ser transmitida por meio de enxertia de material infectado (Graça, 1991). Todas as espécies cítricas plantadas comercialmente são suscetíveis ao HLB e atrativas ao inseto vetor, e não existe cura para a doença. Por este motivo, torna-se necessária a adoção de medidas preventivas. Essas medidas envolvem o plantio de mudas sadias, eliminação de plantas doentes para a redução do inóculo e controle do inseto vetor (Belasque Jr. et al., 2010). O controle do vetor é feito por meio de aplicações de inseticidas, no tronco e em pulverizações da parte aérea em plantas de até dois anos de idade, e somente em pulverizações da parte aérea de plantas acima de dois anos. Os intervalos recomendados entre pulverizações variam de uma a duas semanas e é determinada principalmente pela presença ou não do inseto vetor e localização da quadra dentro da propriedade. Este esquema, quando realizado de forma regional e associado à eliminação de plantas doentes em áreas externas à propriedade, tem resultado em controle satisfatório da doença, mas também tem elevado os custos de produção e causa preocupação quanto à sustentabilidade do negócio citrícola (Bassanezi et al., 2020). Há, portanto, necessidade de ajustes, o que será possível somente com um melhor entendimento dos fatores envolvidos na disseminação do patógeno.

Como se trata de uma doença sem cura, toda estratégia deve ser preventiva, ou seja, adotada a fim de se evitar infecção de novas plantas nos pomares. Dada a grande influência do ambiente sobre os componentes do HLB, pretendeu-se com esta pesquisa quantificar seu impacto sobre a bactéria, hospedeiro e vetor da doença. Tendo em vista as complexas interações existentes entre os componentes bióticos e sua interação com o ambiente, sobre os quais muito está ainda por ser desvendado, esta pesquisa pode ser definida como um estudo exploratório, com enfoque ao déficit hídrico (DH). Considerando-se que CLas é uma bactéria restrita aos vasos do floema, qualquer impacto do DH sobre a planta deve se refletir também sobre a bactéria (Lopes et al., 2017) e, provavelmente, sobre o inseto vetor. Como o DH é exacerbado pelo calor, a temperatura do ar também foi levada em consideração neste estudo.

Assim, o objetivo foi avaliar, em diferentes ambientes, o impacto do DH em plantas sadias e afetadas por HLB, quantificando-se (i) o surgimento, crescimento e desenvolvimento de novos brotos, (ii) multiplicação de CLas nas brotações e (iii) multiplicação e aquisição de CLas pelo inseto vetor.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aspectos gerais da citricultura brasileira

A citricultura é uma atividade de alto valor econômico para o agronegócio no Brasil. Sua área cultivada em 2020 era de aproximadamente 655 mil hectares (IBGE, 2020) oferecendo oportunidades de grande número de empregos. No ano de 2020 a citricultura foi responsável por mais de 38 mil admissões e no primeiro semestre da safra 2020/2021, mais de 17 mil vagas foram geradas, correspondendo a 7,64% do total no Brasil e 13% no estado de São Paulo (CitrusBR, 2021).

A produção de laranjas no Brasil é concentrada no cinturão citrícola, que compreende grande parte do estado de São Paulo e a região do Triângulo/Sudoeste Mineiro. A maior parte da produção de laranjas é destinada ao processamento pela indústria para extração e concentração do suco para fins de exportação (USDA, 2019).

Os pomares do estado de São Paulo são compostos, em sua grande maioria, por cultivares de laranjas doces (*Citrus × aurantium* var. *sinensis* L.), com 97% pelas cultivares Hamlim, Westin, Rubi, Valência, Valência Americana, Seleta, Pineapple, Pêra Rio, Folha Murcha e Natal (Fundecitrus, 2021b). Por atender tanto o mercado *in natura* quanto à indústria, a Pera Rio é a mais plantada, correspondendo a 43% do total de árvores em pomares recém implantados.

Além das cultivares usadas como copa, deve-se mencionar os porta-enxertos, também de grande importância pois afetam o vigor, produção, período de maturação e qualidade dos frutos, e resistência a pragas e doenças, entre outras características (Pompeu Junior, 2005). O limoeiro 'Cravo' (*Citrus x limonia* Osbeck var. *limonia*) é um dos mais utilizados (Pompeu Jr e Blumer, 2016). O aumento no seu emprego teve início em 1960 por conferir tolerância à tristeza, doença virótica que na época devastava inúmeros pomares (Grant, 1961; Coelho, 1993). Outras vantagens do

‘Cravo’ incluem alta compatibilidade com todas as cultivares de copa conhecidas, vigor e resistência à seca (Pompeu Junior, 2005; Stenzel e Neves, 2004). Entretanto, apresenta como desvantagem a suscetibilidade à morte súbita dos citros, doença identificada em 2001 no território brasileiro (Gimenes-Fernandes e Bassanezi, 2001), e ao declínio, doença de causa desconhecida (Yamamoto et al., 2003). O ‘Cravo’ foi substituído pelo citrumeleiro ‘Swingle’ [*Citrus x aurantium* var. *paradisi* ined. x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.], que em 2020 compunha 55,5% do total de mudas produzidas nos viveiros paulistas, contra 27% do ‘Cravo’ (Carvalho et al., 2019; CDA, 2020). Diferente do ‘Cravo’, o ‘Swingle’ resiste a morte súbita (Yamamoto et. al., 2011) e tolera baixas temperaturas, mas é menos tolerante à seca (Davies e Albrigo, 1994; Bastos et al., 2014).

A citricultura sempre foi ameaçada por doenças que levam a grandes prejuízos econômicos e sociais. As altas incidências de muitas doenças como o cancro cítrico, causado por *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, Clorose Variegada dos Citros, causada por *Xylella fastidiosa*, morte súbita e, mais recentemente o HLB, associado a bactérias de floema *Candidatus Liberibacter* spp., têm impactado sobremaneira o setor citrícola porque, além de exigir cuidados constantes com vistorias e controle de insetos vetores ou facilitadores de infecção, requer também a eliminação de plantas. Estima-se que no primeiro semestre de 2020, cerca de um milhão de plantas foram eliminadas no cinturão citrícola, somente em função do HLB (CDA, 2020).

2.2. Huanglongbing

O Huanglongbing (HLB) é considerada a doença mais destrutiva dos citros (Bové, 2006) e tem causado grande preocupação aos citricultores de todo o mundo. Sua rápida disseminação, ausência de cultivares resistentes, alto custo do manejo resultante da necessidade de se eliminar plantas doentes e de se proceder a frequentes aplicações de inseticidas (Bassanezi et al., 2020) fazem com que esta doença seja a mais temida entre os produtores.

O HLB foi relatado inicialmente na China, em 1919. Do chinês, huanglongbing significa doença do ramo amarelo (Reinking, 1919). A doença encontra-se distribuída

pelos países da Ásia, África e Américas (EPPO, 2022). No Brasil, o primeiro relato foi em São Paulo em 2004, nos anos seguintes, em Minas Gerais, Paraná e Mato Grosso do Sul (Coletta-Filho et al., 2004; Teixeira et al., 2005; Meneguim et al., 2008; Diário Oficial da União, 2019).

O HLB está associado a bactérias do gênero *Candidatus Liberibacter* spp., Gram-negativas, pertencentes ao grupo das alfa-proteobacterias, restritas ao floema (Garnier e Bové, 1983; Jagoueix et al., 1994). Não são cultiváveis em meios de cultura e por este motivo sua classificação taxonômica é baseada exclusivamente na sequência de nucleotídeos da região 16S do DNA ribossomal (Jagoueix et al., 1994). Existem três espécies: *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), *Candidatus Liberibacter americanus* (CLam) e *Candidatus Liberibacter africanus* (CLaf). CLas e CLam são transmitidas pelo psílídeo asiático *Diaphorina citri* Kuwayama (Capoor et al., 1974) e CLaf pelo psílídeo africano *Trioza erytreae* (McClean e Oberholzer, 1965). Além do psílídeo, o HLB pode ser transmitido por meio da enxertia de material infectado (Bové, 2006; Lopes et al. 2009; Wang e Trivedi, 2013) e por plantas parasitas do gênero *Cuscuta* (Graça, 1991).

CLas é a espécie mais disseminada (EPPO, 2021; Bové, 2006; Gottwald, 2010). Atualmente, é a responsável pela quase totalidade de plantas infectadas no Brasil (Bassanezi et al., 2020), situação oposta à de 2004 a 2006 quando predominava CLam. A inversão na ocorrência das espécies se deve, provavelmente, à maior resistência de CLas a altas temperaturas e aos maiores títulos que alcança nas plantas doentes favorecendo sua disseminação (Lopes et al., 2009).

Plantas hospedeiras de *Liberibacter* compreendem principalmente o gênero *Citrus* e gêneros próximos (Halbert e Manjunath, 2004; Felisberto et al., 2019). Até o presente momento não foram encontradas cultivares de citros resistentes ao HLB. Em trabalho recente realizado por Alves et al. (2021), *Eremocitrus glauca*, seus híbridos com *Citrus* e *Microcitrus* e algumas espécies de *Microcitrus* mostraram-se resistentes à bactéria, abrindo possibilidades de sua exploração como porta-enxertos ou como fontes de resistência em programas de melhoramento genético.

Em citros, os primeiros sintomas visíveis de HLB são amarelecimento das folhas, nervuras proeminentes e corticosas, e manchas cloróticas assimétricas, formando um mosqueado, o sintoma mais característico (Bové, 2006). Ocorre desfolha e morte dos

ponteiros na fase mais avançada da doença. Os frutos possuem tamanho reduzido, são deformados, assimétricos e suas sementes abortadas. Os frutos caem prematuramente à medida que aumentam os sintomas na copa. O HLB não leva à morte das plantas, entretanto, com o progresso da doença, as plantas tornam-se pouco produtivas (Belasque Junior et al., 2009; Bassanezi et al., 2009).

2.3. *Diaphorina citri*

Diaphorina citri tem origem na Ásia, hoje presente em todo o continente asiático e americano (Bové, 2006; Halbert e Nuñez, 2004). No Brasil, o inseto foi constatado em 1942 (Costa Lima, 1942) e hoje presente nas principais regiões citrícolas do país (Fundecitrus, 2021). Os adultos medem de 2,8 mm a 3,2 mm de comprimento e seu corpo é de coloração marrom claro, escurecendo à medida que envelhecem. São insetos muito ativos, que se movimentam saltando rapidamente quando perturbados (Gallo et al., 2002). Quando em repouso, permanecem em um ângulo de 45° em relação à superfície da planta em que se encontram (Hall et al., 2013). O ciclo de vida desse inseto é composto pelos estágios de ovo, ninfa e adulto (Aubert, 1987).

Assim como CLas, as plantas hospedeiras de *D. citri* também se restringem às Rutáceas. Em algumas pode ocorrer somente a oviposição sem o desenvolvimento de ninfas (Halbert e Manjunath, 2004; Silva et al., 1968; Aubert, 1987, Felisberto et al., 2019), com *Murraya paniculata* (L.) (falsa-murta) e *Bergera koenigii* L. as preferidas do inseto (Halbert & Manjunath, 2004). Várias espécies de rutáceas são comuns em florestas localizadas em áreas externas aos pomares, mas não atuam como hospedeiras de *D. citri* e nem da bactéria do HLB (Felisberto et al. 2019).

A rápida disseminação do HLB está intimamente ligada à alta capacidade dispersiva do vetor. Fatores ambientais podem interferir no deslocamento do inseto. Na ausência de luz sua atividade é reduzida (Wenninger e Hall, 2007), sendo o período da tarde o de maior atividade de voo (Sétamou et al., 2012). Os ventos também contribuem para a dispersão (Kobori et al. 2011). *D. citri* também é atraída por compostos orgânicos voláteis emitidos por plantas infectadas com CLas.

Substâncias voláteis são produzidos quando as plantas estão sob ataque de patógenos (Pare e Tumlinson, 1999; Holopainen, 2010) e insetos. O salicilato de metila é o composto emitido em maiores concentrações por plantas infectadas ou sob ataque de psílídeo. Os insetos se movem inicialmente para plantas infectadas e depois para aquelas não infectadas. A baixa qualidade nutricional das plantas infectadas também pode estimular a dispersão subsequente do inseto para plantas sadias (Mann et al., 2012).

Acasalamento e oviposição ocorrem somente nas brotações (Wenninger e Hall, 2008), com os primeiros estágios de desenvolvimento (V1 a V3) sendo os mais favoráveis para a oviposição, sobrevivência e desenvolvimento das ninfas e emergência do adulto (Cifuentes-Arenas et al., 2018). O ciclo de ovo a adulto dura de 12 a 40 dias, variando de acordo com o hospedeiro e condições meteorológicas (Bové, 2006; Grafton-Cardwell, 2013). De acordo com Nava et al. (2007), sob temperaturas mais baixas o ciclo biológico do psílídeo (ovo-adulto) é mais prolongado, chegando a 43 dias à 18°C, reduzindo para 17 e 12 dias à 25 e 30°C.

Monitoramento da população de psílídeos em pomares do cinturão citrícola, realizado há anos pelo Fundecitrus, tem mostrado que o clima afeta o desenvolvimento do inseto. Por causa das chuvas mais frequentes e temperaturas mais altas, que, além de favorecer a reprodução do inseto também favorecem o surgimento de brotações, os picos populacionais ocorrem normalmente entre os meses de agosto a outubro. No entanto, nos meses de julho e agosto de 2020, houve um aumento populacional de 207 e 307% em relação ao observado no ano de 2019. Isso foi atribuído às chuvas incomuns em junho e aumento também incomum da temperatura do ar nas semanas seguintes, as quais anteciparam o aparecimento de novos brotos e favoreceram a reprodução do inseto (Fundecitrus, 2021).

A aquisição e inoculação da bactéria se dá durante a ingestão da seiva do floema após poucos minutos de alimentação. Quando a aquisição da bactéria ocorre pelas ninfas, o adulto pode transmitir a bactéria logo após sua emergência (Pelz-Stelinski et al., 2010; Capoor et al., 1974; Hung et al., 2004). A aquisição ocorre de forma mais eficiente na fase ninfal do inseto vetor, provavelmente, por se alimentar de tecidos mais jovens (Inoue et al., 2009; Ammar et al., 2016). Lopes et al. (2017) verificaram que a taxa de aquisição por ninfas e adultos é diretamente proporcional à

concentração de bactéria nos brotos. Depois de ingerida, a bactéria se multiplica dentro do vetor e permanece nele por todo seu ciclo de vida (Inoue et al., 2009). Se a ingestão ocorre por adultos é necessário um período de 10 a 18 dias para o inseto ser capaz de transmitir a bactéria (Canale et al., 2017).

2.4. Controle do HLB

Dada a natureza sistêmica e rápida colonização das plantas pela bactéria, que acompanha o fluxo de crescimento e se movimenta para as extremidades como ramos e raízes (Tatineni et al., 2008; Raiol-Júnior et al., 2021), a poda de ramos sintomáticos, termoterapia das partes aéreas e aplicações de antibióticos não são eficazes em controlar a doença (Lopes et al., 2007; Bové, 2006, Hoffman et al., 2013; Yang et al., 2016). O que tem sido feito para redução da disseminação do HLB é a utilização de mudas sadias adquiridas de viveiros certificados, eliminação de plantas sintomáticas nos pomares para reduzir fontes de inóculo e controle do inseto vetor (Gottwald, 2010).

Uma característica importante que ajuda a entender o comportamento do vetor e disseminação do patógeno nos pomares é o efeito de borda, ou seja, ocorrência de maior concentração de plantas doentes na faixa de 100 a 200 m paralela às bordas dos talhões (Bassanezi et al., 2020), decorrentes da imigração de psílídeos oriundos de fora da propriedade (chácaras, quintais e pomares abandonados). São as denominadas infecções primárias e têm sido o principal entrave para o controle do HLB. Aplicações frequentes de inseticidas para controle do vetor e eliminação de plantas doentes, ambos de forma regional, são fundamentais para se evitar novas infecções (Gottwald et al., 2010; Bassanezi et al., 2009). Por lei é obrigatório o monitoramento do vetor e de viveiros de mudas de citros. A eliminação de plantas sintomáticas é obrigatória em pomares de citros até o oitavo ano após o plantio (Diário Oficial da União, 2021).

Como alternativa ao controle químico, foi estudada a possibilidade de uso da *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae) (Waterston, 1922), inimigo natural do vetor de CLas. A fêmea deste endoparasitoide coloca ovos na parte ventral de ninfas

do terceiro a quinto instares de *D. citri*. Além disso, podem se alimentar de ninfas jovens do inseto (Gómez Torres et al., 2006). Entretanto, o uso frequente de inseticidas para o controle do HLB tem levado à eliminação de inimigos naturais da *D. citri*, incluindo a *Tamarixia radiata* (Waterston) (Beloti et al., 2015). Sendo assim, seu uso se restringe a áreas abandonadas, chácaras e fundos de quintal.

2.5. Déficit hídrico

As plantas estão constantemente expostas a condições de múltiplos estresses abióticos que podem afetar seu desenvolvimento e produção (Taiz e Zeiger, 2013; Brito et al., 2012). Um exemplo é o estresse hídrico, que pode se dar tanto pelo excesso quanto pela falta de água disponível no solo, provocando alterações fisiológicas e bioquímicas (Ramegowda e Senthil- Kumar, 2014; Suzuki et al., 2014). No Brasil, nas regiões norte e noroeste do estado de São Paulo, importantes regiões produtoras de citros, as chuvas ocorrem comumente de forma mais irregular (concentradas nos meses mais quentes) sendo muitas vezes em intensidades inferiores às necessidades das plantas (Mattos Junior et al., 2005).

Para superar os impactos do DH, as plantas em geral adotam estratégias que visam a redução da perda de água, sendo algumas delas o fechamento estomático, aumento em profundidade do sistema radicular, emissão de maior número de vasos do xilema para favorecer a condução de água, flexibilização no ciclo de vida, e maior proporção de raiz em relação à parte aérea (Verslues et al., 2006; Pedroso et al., 2014). Além disso, o déficit hídrico em excesso pode levar ao abortamento de flores e frutos, afetando diretamente a produção (Zanini e Pavani, 1998). Na safra de 2020/21 foi registrada queda de 21,60% dos frutos, equivalentes a 74 milhões de caixas. As causas foram as altas temperaturas e o volume de chuvas inferior à média histórica em boa parte do cinturão citrícola (Fundecitrus, 2021).

O déficit hídrico associado a temperatura pode ser uma das causas das diferenças na incidência de doenças no parque citrícola (Fundecitrus, 2021). A clorose variegada dos citros (CVC), doença de grande importância entre os anos de 1999 e 2012, estava ocorrendo em maior intensidade na região Norte e Noroeste do Estado

de São Paulo enquanto que na região Sul, a intensidade era reduzida. Essa situação é inversa ao que se tem visto para o HLB, mostrando que a CVC é favorecida pelas altas temperatura e déficit hídrico (Coletta-Filho et al., 2020; Laranjeira et al., 2008).

O déficit hídrico pode também predispor ou indispor a planta a patógenos (Tippmann et al., 2006; Maxwell et al., 1997). No caso da CVC, de acordo com Laranjeira et al. (2003) maior número de plantas assintomáticas foi constatado na região Sul do estado de São Paulo, quando comparadas as regiões Noroeste e Centro. Entretanto, a concentração da bactéria não diferiu estatisticamente entre regiões. Em laranjeira Natal afetada pela CVC, os sintomas da CVC eram mais severos nas plantas sem irrigação (Machado et al. 2007). Habermann et al. (2009) também verificaram danos fisiológicos mais severos em plantas cultivadas em regiões frequentemente expostas ao déficit hídrico. Também foi observada influência do déficit hídrico sobre o inseto vetor da CVC. A taxa de sobrevivência e excreção de 'honeydew', usado para medir a quantidade de seiva ingerida pelo inseto, foi inferior em plantas submetidas a déficit hídrico quando comparadas àquelas sob capacidade de campo (Pereira et al., 2005). Em plantas de videira, a taxa de aquisição e transmissão de *X. fastidiosa* pela cigarrinha *Homalodisca vitripennis*, foi inversamente proporcional ao nível de déficit hídrico (Del Cid et al., 2018). Krugner e Backus (2014), estudando o vetor da CVC em videira, afirmam que as menores taxas de aquisição e transmissão se devem a menor preferência do inseto vetor por plantas submetidas ao déficit hídrico.

Para o HLB, foco do presente trabalho, há poucas informações a respeito do déficit hídrico sobre a concentração da bactéria na planta cítrica, e sua aquisição e transmissão pelo inseto vetor. Lopes et al. (2017) observaram uma alta correlação entre precipitação e concentração de CLas em brotos de plantas afetadas por HLB. Estes autores verificaram menores concentrações de CLas em plantas localizadas em áreas onde ocorreram baixas precipitações, reforçando-se a necessidade de estudos para confirmar ou não os resultados encontrados no campo. Martini et al. (2017) verificaram que plantas sob déficit se tornam menos atrativas a *D. citri* e a seu parasitoide *T. radiata*. Houve menor emissão de voláteis atrativos pelas plantas com restrição hídrica sugerindo menores possibilidades à aquisição e transmissão de CLas em regiões onde predomina o déficit hídrico.

3. REFERÊNCIAS

- Alves MN, Lopes SA, Raiol-Junior LL, Wulff NA, Girardi EA, Ollitrault P and Peña L (2021) Resistance to '*Candidatus Liberibacter asiaticus*,' the Huanglongbing Associated Bacterium, in Sexually and/or Graft-Compatible Citrus Relatives. **Front. Plant Science** 11:617664.
- 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.
- Aubert B (1987) *Trioza erytreae* Del Guercio and *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psylloidea), the two vectors of citrus greening disease: biological aspects and possible control strategies. **Fruits** 42:149-162.
- Bassanezi RB, Montesino LH, Stuchi ES (2009) Effects of huanglongbing on fruit quality of sweet orange cultivars in Brazil. **European Journal of Plant Pathology** 125:565-572.
- Bassanezi RB, Lopes SA, De Miranda MP, Wulff NA, Volpe HXL, Ayres AJ (2020) Overview of citrus huanglongbing spread and management strategies in Brazil. **Tropical Plant Pathology** 43:251-264.
- Barros JRM, Barros ALM, Cyprian, MP (2016) **O mercado da citricultura no Brasil e suas novas perspectivas**. São Paulo: CitrusBr, 63 p.
- Bastos DC, Ferreira EA, Passos OS, De Sá JF, Ataíde EM, Calgaro M (2014) Cultivares copa e porta-enxertos para a citricultura brasileira. **Embrapa Semiárido-Artigo em periódico indexado (ALICE)**.
- Belasque Junior J, Bassanezi RB, Yamamoto PT, Ayres AJ, Tachibana A, Violante AR, Tank Junior A, Di Giorgi F, Tersi FEA, Menezes GM, Dragone J, Jank Junior RH, Bové J M (2010) Lesson from huanglongbing management in São Paulo State, Brazil. **Journal of Plant Pathology** 32:285-302.
- Belasque Junior J, Bergamin Filho A, Bassanezi RB, Barbosa JC, Fernandes NG, Yamamoto PT, 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**, 34:137-145.
- Beloti VH, Alves GR, Araújo DFD, Picoli MM, Moral R de A, Demétrio CGB, Yamamoto PT (2015) Lethal and Sublethal Effects of Insecticides Used on Citrus, on the Ectoparasitoid *Tamarixia radiata*. **Plos One** 10:e0132128.
- Bové JM (2006) Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. **Journal of Plant Pathology** 88:7-37.

Bové JM, Ayres AJ (2007) Etiology of three recent diseases of citrus in São Paulo State: sudden death, variegated chlorosis and huanglongbing. **Life** 59:346–354.

Brito ME, Lauriane ADA, Fernandes PD, De Lima GS, Sá FVDS, De Melo AS (2012) Comportamento fisiológico de combinações copa/porta-enxerto de citros sob estresse hídrico. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias** 7:857-865.

Canale MC, Tomaseto AF, Haddad MDL, Coletta-Filho HD, Lopes JRS (2017) Latency and persistence of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ in its psyllid vector, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). **Phytopathology**, 107:264-272.

Carvalho SA de, Girardi EA, Mourão Filho F de AA, Ferrarezi RS, Coletta Filho H Della (2019) Advances in citrus propagation in Brazil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 41:1–36. [Costa Lima AM \(1942\) Insetos do Brasil, Homoptera. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Agronomia 3:101.](https://doi.org/10.1590/0100-29452019422Cifuentes-Arenas JC, De Goes A, De Miranda MP, Beattie GAC, Lopes SA (2018) Citrus flush shoot ontogeny modulates biotic potential of <i>Diaphorina citri</i>. PLoS One, 13:e0190563.</p>
</div>
<div data-bbox=)

Capoor SP, Rao DG, Viswanath SM (1974) Greening disease of citrus in the Deccan Trap Country and its relationship with the vector, *Diaphorina citri* Kuwayama. **Proc Sixth Conf IOCV**. pp 43–49.

CDA – Coordenadoria de Defesa Agropecuária (2020). Disponível em: < <https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/noticias/2020/relatorio-semesteral-mostra-a-dimensao-da-citricultura-do-estado-de-sao-paulo,1335.html> >. Acesso em: 23 mai. 2021.

CitrusBR - Associação Nacional dos Exportadores de Sucos Cítricos. (2021). Disponível em: <https://citrusbr.com/noticias/citricultura-gera-mais-de-38-mil-empregos-em-2020/>. Acesso em: 06 mai. 2021.

Coelho Y Da S (1993) **Lima ácida ‘Tahiti’ para exportação: aspectos técnicos da exportação**. Brasília: Embrapa. p. 9-10.

Coletta-Filho HD, Targon MLPN, Takita MA, De Negri JD, Pompeu Júnior J, Machado MA (2004) First report of the causal agent of huanglongbing (“*Candidatus Liberibacter asiaticus*”) in Brazil. **Plant Disease** 88:1382.

Coletta-Filho HD, Castillo AI, Laranjeira FF, de Andrade EC, Silva NT, de Souza AA, Bossi ME, Almeida RPP, Lopes JRS (2020) Citrus variegated chlorosis: an overview of 30 years of research and disease management. **Tropical Plant Pathology**. 45:175-191.

Davies FS, Albrigo LG, (1994) **Citrus**. CAB International, Wallingford, UK, pp. 254.

Del Cid C, Krugner R, Zeilinger AR, Daugherty MP, Almeida RP (2018) Plant water stress and vector feeding preference mediate transmission efficiency of a plant pathogen. **Environmental entomology** 47:1471-1478.

Diário Oficial da União (2019) Instrução Normativa N° 26, de 10 de setembro de 2019, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Diário Oficial da União (2021) Portaria N° 317, de 21 de maio de 2021, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

EPPO (2021) EPPO Global Database (available online). <https://gd.eppo.int>

Neves MF, Kalaki RB, Trombin VG (2010) O Retrato da Citricultura Brasileira. Ribeirão Preto: CitrusBR, 137p. Disponível em <http://issuu.com/CitrusBR/docs/retrato_citricultura_brasileira_marcos_fava_neves/1>. Acesso em 14 jul. 2018.

Felisberto PA de C, Girardi EA, Peña L, Felisberto G, Beattie GA, Lopes SA (2019) Unsuitability of indigenous South American Rutaceae as potential hosts of *Diaphorina citri*. **Pest management science** 75:1911-1920.

FUNDECITRUS (2021a) – PES. Disponível em:<https://www.fundecitrus.com.br/pdf/pes_relatorios/0222_Reestimativa_da_Safra_de_Laranja.pdf>. Acesso em: 29 mar 2022.

FUNDECITRUS (2021b) Levantamento da incidência de doenças dos citros. Disponível em:<https://www.fundecitrus.com.br/pdf/levantamentos/Relatorio_levantamento_de_doencas_2021-greening_CVC_e_cancro_citrico.pdf>. Acesso em: 08 dez. 2021.

Gallo D, Nakano O, Silveira Neto S, Carvalho RPL, Baptista GC, Berti Filho E, Parra JRP, Zucchi RA, Alves SB, Vendramim JD, Marchini LC, Lopes Jr S, Omoto C (2002) **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 920 p.

Garnier M, Bové JM (1983) Transmission of the organism associated with citrus greening disease from sweet orange to periwinkle by dodder. **Phytopathology** 73:1358–1363.

Garnier M, Danel N, Bové JM (1984) The greening organism is a gram negative bacterium. In: Conference of the International Organization of Citrus Virologists. **Proceedings of 9th Conference IOCV**, Riverside: University of California. p. 115-124.

Gimenes-Fernandes N, Bassanezi RB (2001) Doença de causa desconhecida afeta pomares cítricos no norte de São Paulo e sul do Triângulo Mineiro. **Summa Phytopathologica** 27:93.

Ghini R, Hamada E (2008) **Mudanças climáticas: impactos sobre doenças de plantas no Brasil**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente.

Gómez Torres ML, Nava DE, Gravena S, Costa VA, Parra JR (2006) Registro de *Tamarixia radiata* (Waterston) (Hymenoptera: Eulophidae) em *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) em São Paulo, Brasil. **Revista Agricultura** 81:112-117.

Gottwald TR (2010) Current epidemiological understanding of citrus huanglongbing. **Annual review of phytopathology** 48:119-139.

Graça JV da (1991) Citrus Greening Disease. **Annual Review of Phytopathology** 29:109-136.

Grafton-Cardwell EE, Stelinski LL, Stansly PA (2013) Biology and management of Asian citrus psyllid, vector of the huanglongbing pathogens. **Annual Review of Entomology** 58:413-432.

Grant TJ (1961) Citrus variety reaction to tristeza virus in Brazil when used in various rootstocks and scion combinations. **Plant Disease** 45:416-421.

Habermann G, Rodrigues J D (2009) Leaf gas exchange and fruit yield in sweet orange trees as affected by citrus variegated chlorosis and environmental conditions. **Scientia horticultrurae** 122:69-76.

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

Halbert S, Manjunath K (2004) Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: a literature review and assessment of risk in Florida. **Florida Entomologist** 87:330-353.

Halbert SE, Núñez CA (2004) Distribution of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Rhynchota: Psyllidae) in the Caribbean basin. **Florida Entomologist**, 87:401-402.

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.

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** 103:15-22.

Holopainen JK, Gershenzon J (2010) Multiple stress factors and the emission of plant VOCs. **Trends in plant Science** 15:176-184.

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.

Inoue H, Ohnishi J, Ito T, Tomimura K, Miyata S, Iwanami T, Ashihara W (2009) Enhanced proliferation and efficient transmission of *Candidatus Liberibacter asiaticus* by adult *Diaphorina citri* after acquisition feeding in the nymphal stage. **Annals of Applied Biology** 155:29-36.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2020). *Produção Agrícola Municipal* 2018. Brasília. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1613#resultado>>. Acesso em: 27 mar 2020.

Jagoueix S, Bové JM, Garnier M (1984) The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the α subdivision of the proteobacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology** 44:379-386.

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

Kobori Y, Nakata T, Ohto Y, Takasu FA (2011) Dispersal of adult Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae), the vector of citrus greening disease, in artificial release experiments. **Applied Entomology and Zoology**, 46:27-30.

Krugner R, Backus EA (2014) Plant water stress effects on stylet probing behaviors of *Homalodisca vitripennis* (Hemiptera: Cicadellidae) associated with acquisition and inoculation of the bacterium *Xylella fastidiosa*. **Journal of economic entomology**, 107:66-74.

Laranjeira FF, Bergamin Filho A, Amorim L, Lopes JR (2003) Comportamento sazonal da clorose variegada dos citros em três regiões do Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, 28:633-641.

Laranjeira FF, Silva LG, Fonseca E, Silva SXB, Rocha JB, Santos Filho HP, Ledo CAS, Hau B (2008) Prevalência, incidência e distribuição de clorose variegada dos citros na Bahia, Brasil. **Tropical Plant Pathology**, 33: 339-347

Lopes SA, Frare GF, Yamamoto PT, Ayres AJ, Barbosa JC (2007) Ineffectiveness of pruning to control citrus huanglongbing caused by *Candidatus Liberibacter americanus*. **European Journal of Plant Pathology** 119:463-468.

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

Lopes SA, Luiz FQBF, Martins EC, Fassini CG, Sousa MC, Barbosa JC, Beattie GAC (2013) "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" titers in citrus and acquisition rates by *Diaphorina citri* are decreased by higher temperature. **Plant Disease** 97:1563–1570.

Lopes SA, Luiz FQ, Oliveira HT, Cifuentes-Arenas JC, Raiol-Junior LL (2017) Seasonal Variation of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' Titers in New Shoots of Citrus in Distinct Environments. **Plant Disease**, 101: 583-590.

Machado EC, Oliveira RFD, Ribeiro RV, Medina CL, Stuchi ES, Pavani LC (2007) Deficiência hídrica agrava os sintomas fisiológicos da clorose variegada dos citros em laranja 'Natal'. **Bragantia** 66:373-379.

Mann RS, Ali JG, Hermann SL, Tiwari S, Pelz-Stelinski KS, Alborn HT, Stelinski LL (2012) Induced release of a plant-defense volatile 'deceptively' attracts insect vectors to plants infected with a bacterial pathogen. **PLoS Pathogens** 8:e1002610.

Mattos Júnior D, Negri JD, Pio RM, Pompeu Júnior J (2005) **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico e Fundag, 929p.

Martinelli F, Ibanez AM, Reagan RL, Davino S, Dekar AM (2015) Stress responses in citrus peel: Comparative analysis of host responses to Huanglongbing disease and puffing disorder. **Scientia Horticulturae** 192:409-420.

Martini X, Stelinski LL (2017) Drought stress affects response of phytopathogen vectors and their parasitoids to infection-and damage-induced plant volatile cues. **Ecological entomology** 42:721-730.

Manjunath KL, Halbert SE, Ramadugu C, Webb S, Lee RF (2008) Detection of "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" in *Diaphorina citri* and its importance in the management of citrus *huanglongbing* in Florida. **Phytopathology** 98:287-389.

Maxwell DL, Kruger EL, Stanosz GR (1997) Effects of water stress on colonization of poplar stems and excised leaf disks by *Septoria musiva*. **Phytopathology** 87:381-388.

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

Meneguim L, Buassi M, Vilas-Boas LA, Marques-Marçal VV, Paccola-Meirelles LD, Leite Jr RP (2008) Ocorrência de *Candidatus Liberibacter asiaticus* agente causal do huanglongbing no estado do Paraná. **Tropical Plant Pathology** 33:100.

Nava DE, Torres MLG, Rodrigues MDL, Bento JMS, Parra JRP (2007) Biology of *Diaphorina citri* (Hem., Psyllidae) on different hosts and at different temperatures. **Journal of Applied Entomology** 131:709–715.

Pare PW, Tumlinson JH (1997) De novo biosynthesis of volatiles induced by insect herbivory in cotton plants. **Plant Physiology** 114:1161–1167.

Pedroso FKJV, Prudente DA, Bueno ACR, Machado EC, Ribeiro RV (2014) Drought tolerance in citrus trees is enhanced by rootstock-dependent changes in root growth and carbohydrate availability. **Environmental and Experimental Botany** 101:26–35.

Pelz-Stelinski KS, Bransky RH, Ebert TA, Rogers ME (2010) Transmission parameters for *Candidatus Liberibacter asiaticus* by Asian citrus psyllid (Hemiptera: Psyllidae). **Journal of economic entomology** 103:1531-1541.

Pereira ÉF, Lopes JRS, Turati DT, Munhoz C, Corrente JE (2005) Influência das condições hídricas do solo e da temperatura na sobrevivência e alimentação de *Oncometopia facialis* (Hemiptera: Cicadellidae) em “seedlings” de citrus. **Arq. Inst. Biol.**, 72:343-351.

Pompeu Jr J (2005) Porta-enxertos. In: Mattos Junior D, Negri JD, Pio RM, Pompeu Junior J (Eds.). Citros. Cordeirópolis: Centro APTA Citros Sylvio Moreira, p.63-104.

Pompeu Jr J, Blumer S (2016) **Variedades porta-enxertos**. 23º Curso de Citricultura. Centro de Citricultura, Cordeirópolis. Mídia digital.

Raiol-Junior LL, Cifuentes-Arenas JC, Carvalho EV, Girardi EA, Lopes SA (2021) Evidence that ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ moves predominantly towards new tissue growth in citrus plants. **Plant disease** 105:34-42.

Ramegowda V, Senthil-Kumar M (2014) The interactive effects of simultaneous biotic and abiotic stresses on plants: Mechanistic understanding from drought and pathogen combination. **Journal of Plant Physiology** 176:47–54.

Reinking AO (1919) Diseases of economic plants in southern China. **Philippine Agriculturist**, 8:109–135.

Sétamou M, Sanchez A, Patt JM, Nelson SD, Jifon J, Louzada ES (2012) Diurnal Patterns of Flight Activity and Effects of Light on Host Finding Behavior of the Asian Citrus Psyllid. **Journal of Insect Behavior** 25: 264–276.

Stenzel NMC, Neves CSVJ (2004). Rootstocks for ‘Tahiti’ lime. **Scientia Agricola** 61:151–155.

Stuchi ES, Girardi EA (2010) **Utilização de práticas culturais na citricultura frente ao Huanglongbing**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura. 77 p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura. Documentos, 191).

Sugayama RL, Silva MD, Silva SDB, Ribeiro L, Rangel L (2015) **Defesa vegetal: fundamentos, ferramentas, política e perspectivas**. Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Defesa Agropecuária. 544p.

Sulzbach M, De Oliveira RP, Girardi EA, Schwarz SF, Bertolini E, Schneider LA, Gonzatto MP (2017) **Huanglongbing (HLB) dos citros e estratégias de manejo visando prevenção e controle**. *Embrapa Clima Temperado-Documentos (INFOTECA-E)*.

Suzuki N, Rivero RM, Shulaev V, Blumwald E, Mittler R (2014) Abiotic and biotic stress combinations. **New Phytologist**. 203:32–43

Taiz L, Zeiger E (2013) **Fisiologia Vegetal**, 5ª Edição. Editora Artmed, Porto Alegre, Brasil. 954p

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, D, Danet JL, Eveillard S, Martins EC, De Jesus Junior WC, Yamamoto PT, Bové JM (2005) Citrus huanglongbing in Sao Paulo State, Brazil: PCR detection of the ‘*Candidatus*’ *Liberibacter* species associated with the disease. **Molecular and cellular probes** 19:173-179.

Tippmann HF, Schlüter U E, Collinge DB (2006) Common themes in biotic and abiotic stress signalling in plants. **Floriculture ornamental and plant biotechnology** 52-67.

USDA - United States Department of Agriculture. (2019). *PSD Online*. Washington. Disponível em: <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/app/index.html#/app/advQuery>>. Acesso em: 27 mar 2020.

Verslues PE, Agarwal M, Katiyar-Agarwal S, Zhu J, Zhu JK (2006) Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. **The Plant Journal** 45:523-539.

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

Waterston J (1922) On the Chalcidoid Parasites of Psyllids (Hemiptera, Homoptera). **Bulletin of Entomological Research** 13:41-58.

Wenninger EJ, Hall D (2007) Daily timing of mating and age at reproductive maturity in *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). **Florida Entomologist** 90:715-722.

Wenninger EJ, Hall DG (2008) Importance of multiple mating to female reproductive output in *Diaphorina citri*. **Physiological Entomology** 33:316-321.

Yamamoto PT, Jesus Junior WC, Bassanezi RB, Sanches AL, Ayres AJ, Gimenes-Fernandes N, Bové JM (2003) Transmission of the agent inducing symptoms of citrus sudden death by graft-inoculation under insect-proof conditions. **Fitopatologia Brasileira** 28:S265.

Yamamoto PT, Bassanezi RB, Wulff NA, Santos MA, Sanches AL, Toloy RS, Gimenes-Fernandes N, Ayres AJ, Jesus Junior WC, Nagata T, Tanaka FAO, Kitajima EW, Bové JM (2011) Citrus sudden death is transmitted by graft-inoculation and natural transmission is prevented by individual insect-proof cages. **Plant Disease** 95:104-112.

Yang C, Powell CA, Duan Y, Shatters R, Fang J, Zhang M (2016) Deciphering the bacterial microbiome in huanglongbing-affected citrus treated with thermotherapy and sulfonamide antibiotics. **PLoS One** 11:e0155472.

Zanini JR., Pavani LC (1998) Irrigação em citros. Anais do Seminário Internacional Citros, 5, Campinas: Fundação Cargill, p.409-422.

CAPÍTULO 2 - Impacto da temperatura do ar e déficit hídrico sobre brotações de plantas de laranja, multiplicação de *Candidatus Liberibacter asiaticus* e aquisição da bactéria por *Diaphorina citri*

RESUMO - Huanglongbing (HLB) é a mais destrutiva doença dos citros. Há variações na incidência da doença nas diferentes regiões do cinturão citrícola do estado de São Paulo e Triângulo Mineiro. As menores incidências são em regiões localizadas ao norte e noroeste, de maior déficit hídrico e mais altas temperaturas quando comparadas às demais. O presente trabalho teve como objetivo avaliar, em plantas de 'Valência' enxertada sobre o citrumeleiro 'Swingle', sadias e afetadas por HLB, em diferentes ambientes e épocas do ano (abril-junho e julho-setembro), o impacto da temperatura e déficit hídrico sobre o surgimento e desenvolvimento dos brotos, e sobre a multiplicação de *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) e sua aquisição por adultos de *Diaphorina citri*. Plantas com 4 anos de idade foram mantidas sob condições de 100%, 75% e 55% de saturação de água do substrato. Para a aquisição de CLas, adultos de *D. citri* foram confinados nos brotos por 72 h e, posteriormente, brotos e psilídeos foram avaliados por PCR quantitativo. O surgimento dos brotos foi mais rápido e o tempo de maturação menor no período de temperaturas mais elevadas (julho a setembro) do que de temperaturas mais baixas (abril a junho), em ambos os ambientes. O DH não afetou o tamanho final dos brotos, que foi menor em plantas doentes, e o título de CLas nos brotos e nos insetos. Porém, o DH afetou a aquisição da bactéria. As porcentagens de insetos com CLas variou de 9,84% em plantas sob DH intermediário, 15,38% em plantas sob DH severo e 36,36% em plantas sem DH. Conclui-se que as menores incidências de HLB nas regiões norte e noroeste do estado de São Paulo podem ser o resultado, ao menos parcial, da menor taxa de aquisição de CLas por *D. citri*.

Palavras chave: *Citrus* spp., Huanglongbing, condições ambientais, disseminação do HLB, psilídeo

CHAPTER 2 - Impact of temperature and water deficit on sweet orange new shoots, multiplication of *Candidatus Liberibacter asiaticus* and bacterial acquisition by *Diaphorina citri*

ABSTRACT - Huanglongbing (HLB) is the most destructive citrus disease. There are variations in the incidence of the disease in the different regions of the citrus belt of the state of São Paulo and Triângulo Mineiro. The lowest incidences are in regions located to the north and northwest, with greater water deficit and higher temperatures when compared to the others. The present work aimed to evaluate, in healthy and HLB-affected 'Valencia' plants grafted on 'Swingle' citrumelo rootstock, in different environments and seasons (April-June and July-September), the impact of temperature and water deficit on the emergence and development of shoots, and on the multiplication of *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) and its acquisition by adults of *Diaphorina citri*. Under different conditions of substrate saturation (100%, 75% and 55% of substrate water saturation) 8 year old plants were maintained. For the acquisition of CLas, adults of *D. citri* were confined in shoots for 72 h and, later, shoots and psyllids were evaluated by quantitative PCR. The emergence of shoots was faster and the maturation time was shorter in the period of higher temperatures (July to September) than of lower temperatures (April to June), in both environments. WS did not affect final shoot size, which was smaller in diseased plants, and CLas titer in shoots and insects. However, WS affected the acquisition of the bacterium. The percentages of insects with CLas ranged from 9.84% in plants under intermediate WS, 15.38% in plants under severe WS and 36.36% in plants without WS. It is concluded that the lower incidences of HLB in the north and northwest regions of the state of São Paulo may be the result, at least partially, of the lower rate of acquisition of CLas by *D. citri*.

Keywords: *Citrus* spp., Huanglongbing, environmental conditions, HLB spread, psyllid

1. INTRODUÇÃO

Huanglongbing (HLB) é considerada a mais devastadora doença dos citros (Bové, 2006). A doença está associada às α -proteobactérias Gram-negativas e restritas ao floema, sendo elas *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), *Ca. L. americanus* (CLam) e *Ca. L. africanus* (CLaf) (Garnier e Bové 1983; Teixeira et al., 2005; Jagoueix et al., 1994), sendo CLas a espécie mais disseminada no Brasil e no mundo (Bové, 2006; Gottwald, 2010). No campo, CLas é transmitida somente pelo psílídeo *Diaphorina citri* Kuwayama (Capoor et al., 1974). Experimentalmente, pode também ser transmitida por meio de enxertia de material infectado (Lopes et al., 2009). No Brasil, CLas foi detectada no estado de São Paulo em 2004 (Coletta-Filho et al., 2004), Minas Gerais em 2005 (Teixeira et al., 2005), Paraná em 2006 (Meneguim et al., 2008) e Mato Grosso do Sul (Diário Oficial da União, 2019). O HLB se constitui em ameaça constante a outras regiões produtoras ainda isentas da doença. A produção e longevidade das plantas são reduzidas quando infectadas por HLB. Tentativas de cura de plantas doentes se mostraram ineficazes (Lopes et al., 2007; Hoffman et al., 2013; Yang et al., 2016) e por este motivo as medidas preventivas são necessárias para um controle eficiente, que só é possível se adotadas de forma regional (Bassanezi et al., 2020).

De acordo com o último levantamento de incidência feito pelo FUNDECITRUS, em 2021, o número estimado de árvores com sintomas de HLB no cinturão citrícola de SP e MG foi de 43,4 milhões de laranjeiras, o que corresponde a 22,37% do total de árvores cultivadas (FUNDECITRUS, 2021). Interessante notar que a incidência do HLB varia nas diferentes regiões. Municípios localizados no Centro e Leste do estado de São Paulo apresentam as maiores incidências, chegando a 67,0% de árvores sintomáticas na região de Brotas. As regiões Norte, Noroeste e Sudoeste detêm as menores incidências, alcançando valores máximos de 4,25% na região de Itapetininga (FUNDECITRUS, 2021). A variação na incidência de HLB está associada, entre outros fatores, ao clima que caracteriza cada região. O clima das regiões Norte e Noroeste é tropical, com temperaturas mais elevadas, inverno seco e poucas chuvas, com média anual diária de 24°C e 100 mm mensal de acumulado de chuva, chegando a no

máximo 15 mm no mês mais seco. Nos meses mais frios a temperatura média fica por volta dos 18°C. Por outro lado, o clima das regiões Centro, Sul e Sudoeste é subtropical, com temperaturas mais amenas e maior constância de chuvas, com média anual diária maior que 22°C no mês mais quente e de 15°C nos meses mais frios, e 125 mm por mês de acumulado de chuva, com valores máximos absolutos de 300 mm (Ribeiro et al., 2006; Rolim et al., 2007).

As causas da variação regional na incidência do HLB no parque citrícola não foram ainda totalmente esclarecidas. Maiores ou menores taxas de disseminação parecem depender do que acontece com bactéria, com o inseto vetor e com a planta hospedeira, todos influenciados pelo ambiente. De acordo com Davis e Albrigo (1994), os fluxos de brotações são influenciados pela temperatura e regime hídrico, no qual o aumento dessas variáveis leva ao incremento do número de brotações. Essas mesmas variáveis têm influência sobre a bactéria. À temperatura de 38°C, o título de CLas foi reduzido de log 7 de células por grama de tecido para log 3 em brotos de plantas jovens em condições de câmaras de crescimento (Lopes et al., 2013). No campo, condições de temperaturas acima de 30°C acompanhadas de pequeno volume de chuva também resultaram em menores títulos de CLas (Lopes et al., 2017). Os menores títulos afetaram negativamente a aquisição da bactéria por *D. citri*, o que também foi verificado por Wu et al. (2018). Para o vetor, além da importância das brotações para sua alimentação e reprodução (Cifuentes-Arenas et al., 2018), também foi verificada influência das variáveis ambientais. Temperaturas entre 25 e 28°C são mais favoráveis para o desenvolvimento do psíldeo (Liu e Tsai, 2000) e temperaturas acima de 32°C desfavoreceram o inseto (Nava et al., 2007). A proporção de psíldeos que adquiriram CLas foi maior quando mantidos a temperatura de 25°C quando comparados aqueles a 15° e 35°C (Wu et al., 2018). No mesmo sentido, Martini e Stelinski (2017) verificaram que plantas sob déficit hídrico se tornaram menos atrativas a *D. citri* e a seu parasitoide *T. radiata*, possivelmente devido à menor quantidade de voláteis atraentes emitidos pelas plantas, sugerindo que a disseminação do HLB seria menor e menos severa em regiões frequentemente expostas a déficit hídrico.

Pela inexistência de material resistente ao HLB, há necessidade de compreender as causas das grandes variações de incidência da doença para aprimorar o seu manejo. Neste sentido, este trabalho foi conduzido com o objetivo de

avaliar, sob condições experimentais de casa de vegetação e sala com fotoperíodo controlado e em diferentes épocas do ano, o impacto da temperatura e déficit hídrico sobre o surgimento, crescimento e desenvolvimento de brotos em plantas sadias e afetadas por HLB, e sobre a multiplicação de CLas e sua aquisição por adultos de *D. citri*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos em dois ambientes, um semiaberto (casa de vegetação telada com malha de abertura de 0,87 x 0,30 mm) e um fechado (sala com fotoperíodo controlado) adaptada com lâmpadas de LED (Figura.1) para simulação de fotoperíodo de 12 h de luz e 12 h de escuro. Os experimentos foram conduzidos nas dependências do Departamento de Ciências da Produção Agrícola da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, campus de Jaboticabal (SP), situados a 21°15'17" de latitude Sul e 48°19'20" de longitude Oeste, a 605 m acima do nível do mar, realizados em duas épocas, abril a julho e julho a setembro de 2020. A intensidade de luz em cada ambiente foi avaliada usando-se um quantômetro LP-80 AccuPar PAR/LA (Ceptometer Decagon Devices, INC.), que registrou valores médios de 110 e 125 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ na casa de vegetação e sala, respectivamente. Para registro da temperatura e umidade relativa do ar foram utilizados registradores LogBox-AA (NOVUS Produtos Eletrônicos Ltda, Porto Alegre, RS, Brasil). Nos experimentos das duas épocas avaliadas foram usadas mudas de laranjeira Valência (*Citrus × aurantium* var. *sinensis* L.) sobre o porta-enxerto o citrumeleiro 'Swingle' [*C. × aurantium* var. *paradisi* ined. x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.], sadias e infectadas com CLas, cultivadas em vasos de 4,7 L e substrato comercial Multiplant (Terra do Paraíso, Holambra-SP), que é composto por casca de pinus e vermiculita expandida. As mudas utilizadas tinham 4 anos de idade. As plantas foram inoculadas, por meio de enxertia, um ano antes de serem usadas nos experimentos. As plantas com HLB apresentavam sintomas de mosqueado em suas folhas.



Figura 1. Imagem das estruturas adaptadas com lâmpadas de LED para simulação do fotoperíodo (12h luz : 12h escuro) sobre plantas sadias ou afetadas por HLB, submetidas ou não a déficit hídrico, mantidas em sala localizada no departamento de Ciências da Produção Agrícola

2.1. Experimento para determinar níveis de déficit hídrico

Testes preliminares foram realizados com o intuito de se quantificar, ao longo do tempo, volumes de perda de água em plantas com e sem HLB e, desta forma, determinar os tratamentos que seriam usados neste trabalho. Dez vasos de plantas sadias e 10 de plantas doentes de tamanhos semelhantes foram selecionados e o peso de cada vaso foi padronizado em 2 kg. Posteriormente, cada vaso foi irrigado até a completa saturação do substrato. Após cessar a drenagem do excesso de água, os vasos foram pesados em balança digital (Prix 3 Fit, Toledo) e determinou-se o peso que indicava a capacidade de saturação do substrato. Na ausência de irrigação, as plantas continuaram a ser pesadas a cada 3 dias e os dados usados na determinação de curva de perda de água. O teste foi iniciado no dia 01/02/2020 e finalizado no dia 05/03/2020, quando as folhas das plantas sadias apresentavam sintomas de murchas.

2.2. Delineamento experimental

O experimento foi realizado em duas épocas do ano (abril a julho e julho a setembro de 2020) utilizando-se as mesmas plantas. Foram utilizadas 24 plantas sadias e 24 doentes em cada ambiente. Os diferentes níveis de déficit hídrico utilizados no presente trabalho foram baseados no experimento preliminar, como descrito no item 2.1. O delineamento foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3 x 2, no qual foram avaliados três níveis de déficit hídrico (100%, 75% e 55% de saturação do substrato) e dois estados de sanidade das mudas (com ou sem HLB), com 8 repetições, sendo uma planta por repetição. Para manutenção dos tratamentos (100%, 75% e 55% de saturação do substrato) pesava-se cada vaso e repunha-se o volume de água perdido por evapotranspiração referente a cada tratamento, nos 3 dias anteriores.

2.3. Impacto na brotação

Uma semana após atingirem os níveis de déficit desejados (100%, 75% e 55% de saturação do substrato), as plantas dos dois ambientes foram podadas para estimular a emissão de novos brotos (13/04/2020 e 10/07/2020, primeira e segunda época, respectivamente). Durante a poda procurou-se eliminar o mínimo de material vegetal, podando-se apenas as extremidades de cada ramo. Os brotos que surgiram após a poda foram avaliados ao longo do tempo quanto ao aumento de tamanho e mudanças de estádios fenológicos. Foram selecionados quatro brotos por planta e, com uma régua, foram medidos, a cada dois dias, seu comprimento, com início no momento de sua emissão (estádio V1) finalizando quando atingissem completo amadurecimento (estádio V6). Os demais brotos que surgiram foram mantidos na planta. Determinação dos estádios de desenvolvimento baseou-se na descrição proposta por Cifuentes-Arenas et al. (2018), como descrito na Figura 2. O registro de temperatura foi usado para determinar os graus dia de desenvolvimento dos brotos (GDD), considerando-se temperatura base de 9°C (Cifuentes-Arenas, 2017) e as

fórmulas propostas por McMaster (1997). O experimento foi conduzido duas vezes (abril a julho e julho a setembro de 2020) com as mesmas plantas.

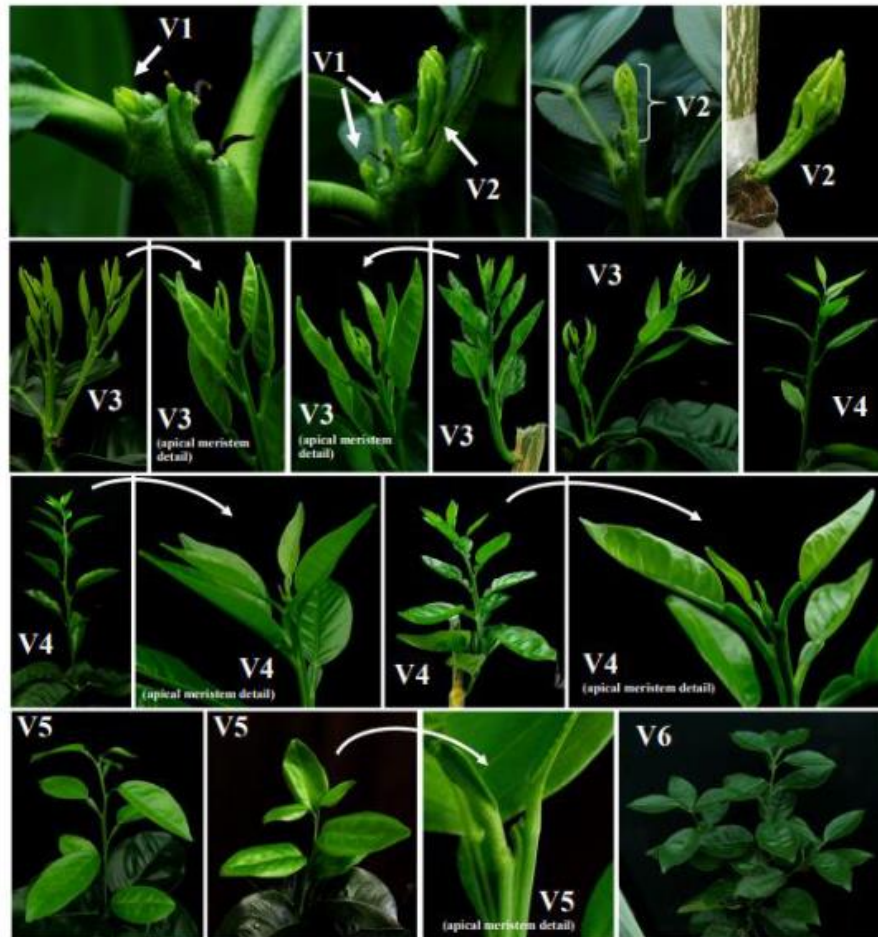


Figura 2. Estádios fenológicos de brotos de plantas de citros. V1: entumescimento da gema; V2: início da elongação do ramo; V3: expansão da folha e fluxo vegetativo; V4: abertura e definição do número de folhas; V5: folhas totalmente expandidas; V6: folha madura (Fonte: Cifuentes-Arenas et al., 2018).

2.4. Impacto do déficit hídrico na aquisição de CLas por *D. citri*

Broto em estádios V2 e V3 (Cifuentes-Arenas et al. 2018) emitidos após a poda das plantas doentes foram selecionados e envolvidos com sacos de voal, sendo um broto por planta. Dois casais de adultos de *D. citri*, isentos de CLas, obtidos do FUNDECITRUS, foram confinados em cada voal por 72 h para oviposição e avaliação da taxa de aquisição de CLas. Após esse tempo, os insetos foram retirados, transferidos para tubos Eppendorf e congelados para posterior extração de DNA e análise por qPCR.

2.5. Impacto na multiplicação CLas em brotos e na sua aquisição por *D. citri*

Os brotos onde os insetos foram confinados foram coletados e picados com uma lâmina. As amostras de DNA foram extraídas de 0,3 g de tecido vegetal picado ou de um psílídeo e colocadas em eppendorf de 2,0 e 1,5 mL, respectivamente. Adicionou-se 2 mL (Tecido vegetal) e 0,4 mL (psílídeo) de solução de tampão de extração concentrado de CTAB + β -mercaptoetanol (Murray e Thompson, 1980). Posteriormente o material foi macerado com triturador TissueLyser II (Qiagen) com frequência de 30 a 45 s. Em seguida, o material foi incubado em banho maria a 65°C por 30 min. Então, foram adicionados às amostras de psílídeo 0,4 mL de clorofórmico-isoamil 24:1. Todas as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 5 min (tecido vegetal) e 10 min (psílídeo) em temperatura ambiente. Foram recuperados 0,9 mL do sobrenadante e transferidos para um novo tubo eppendorf com 0,9 mL de clorofórmico-isoamil 24:1, homogeneizado em vortex e centrifugado a 12.000 rpm por 5 min. Volume de 0,8 e 0,3 mL de sobrenadante do tecido vegetal e psílídeo, respectivamente, foi recuperado e transferido para um tubo eppendorf com 0,48 mL (tecido vegetal) e 0,18 mL (psílídeo) de isopropanol para precipitar o DNA. A amostra foi incubada por 30 min a -20°C e centrifugadas por 20 min a 12.000 rpm em temperatura de 4°C, sendo descartado o sobrenadante. Posteriormente, houve a lavagem dupla da amostra com 0,9 mL de etanol 70% e centrifugação a 12000rpm por 10 min. O DNA foi desidratado por 8 minutos em speed-vac e ressuspensão em

0,05 mL (tecido vegetal) e 0,03 mL (psilídeo) de água Milli-Q auto clavada e deixada em “overnight” a 4°C (Teixeira et al., 2005). O DNA extraído do tecido vegetal foi quantificado e ajustado à concentração de 100 ng μ L, em seguida analisado por PCR em tempo real (qPCR), em volume final de 12 μ L contendo 9 μ L de master mix e 3 μ L de DNA (de Path ID Master Mix). Para análise do DNA do inseto, 3 μ L das amostras de DNA, sem qualquer diluição, foram adicionados a 9 μ L da master mix. A PCR foi realizada no termociclador StepOne Plus (Applied Biosystems) usando-se o protocolo descrito por Li et al. (2006). Os valores de Ct (cycle threshold) foram ajustados manualmente usando o software StepOne. Somente as amostras com Ct $\leq$ 34 foram consideradas positivas para presença de CLas (Lopes et al., 2013).

2.6. Análise dos dados

O software R e nível de probabilidade de 5% foram usados para todas as análises. A perda de água de plantas doentes e sadias foram analisadas por meio de regressão linear simples. Para análise do crescimento dos brotos, determinou-se o comprimento longitudinal (cm) gerado em função do acúmulo de graus-dia de desenvolvimento (GDD) a partir do momento da poda. O tempo necessário para início das brotações foram determinados a partir da média do número de brotos de cada tratamento. Os dados foram ajustados ao modelo de crescimento populacional de Gompertz, que é dado pela fórmula $y=a*\exp(-b*\exp(-c*x))$ (Tjorve e Tjorve, 2017; Kurnianto et al. 1998), onde y: crescimento do broto; a: tamanho final do broto; b: ajuste de dados; c: taxa de crescimento do broto. Este modelo foi selecionado após análise de comparativa de R^2 e o critério informativo de Akaike – AIC (Akaike, 1998) gerados por outros modelos. O modelo de Gompertz resultou em maior R^2 e menor AIC. Foi, portanto, o que melhor se ajustou aos dados. Os parâmetros a (amplitude ou tamanho final) e c (taxa de crescimento) foram submetidos à análise de variância (ANOVA) por meio de um modelo linear generalizado (GLM) com distribuição Gaussiana, com o status de infecção por CLas (doente e sadia) e o status de déficit hídrico (100%, 75% e 55% de saturação do substrato) considerados como fatores. Quando foram detectados efeitos significativos, a separação de médias foi feita por

meio do teste de Tukey. Os ambientes foram analisados separadamente. Os dados de proporção de adultos de *D. citri* contendo CLAs, após confinamento 72 h para aquisição, e os títulos bacterianos em insetos e brotos foram submetidos à ANOVA ajustando-se os dados a um modelo GLM binomial e gaussiano, respectivamente. Quando a ANOVA detectou diferenças significativas, prosseguiu-se com o teste de Tukey para a separação de médias.

3. RESULTADOS

3.1. Determinação de níveis de déficit hídrico para uso nos experimentos

A perda de água se deu de forma mais acentuada nas plantas sadias do que nas doentes e nas mantidas na casa de vegetação do que na sala (Figura 3).

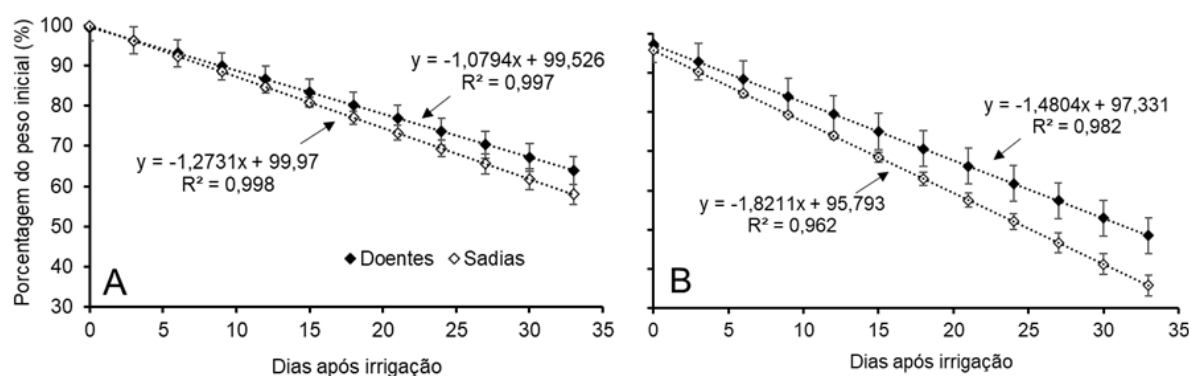


Figura 3. Porcentagem de redução no peso dos vasos de plantas de laranja 'Valência' enxertadas sobre citrumeleiro 'Swingle' ao longo do tempo mantidas em sala com fotoperíodo controlado (A) e casa de vegetação (B), durante o mês de março de 2020. Os valores correspondem às médias de porcentagem de 10 vasos de plantas e as barras verticais ao erro padrão.

A perda de água média diária no ambiente fechado (sala) foi de 1,27% e 1,08% em plantas sadias e doentes, respectivamente (Figura 3 A), equivalentes a um volume médio de perda de água, por vaso, de 28,7 e 26,0 mL dia⁻¹. De forma semelhante à sala, porém mais acentuada, os vasos das plantas sadias mantidas em ambiente semiaberto de casa de vegetação tiveram redução de peso diário de 1,82% e as plantas doentes de 1,48% (Figura 3 B), equivalentes a 48,4 e 38 mL dia⁻¹, respectivamente.

O início dos sintomas associados ao déficit hídrico (murchamento de folhas com perda de brilho foliar) aconteceu quando a perda de peso atingiu aproximadamente 50% do peso dos vasos saturados em água, nos dois ambientes. Estas determinações preliminares permitiram estabelecer os tratamentos a que as plantas seriam submetidas nos experimentos seguintes, ou seja, adotou-se como nível severo de déficit 55% de saturação do substrato e, como nível intermediário, 75%. Substrato completamente saturado (100%) foi estabelecido como controle.

3.2. Condições ambientais experimentais

No campo as plantas podem estar expostas a condições que levem a estresses hídricos causados por ausência/insuficiência de chuvas sob diferentes condições de temperatura. Assim, mesmo que de forma artificial, procurou-se avaliar o impacto do déficit hídrico nos dois ambientes mencionados e em duas épocas do ano. Dados de temperatura e umidade relativa nesses ambientes nas duas épocas são apresentados na Tabela 1.

A variação de temperatura dentro da sala climatizada de abril a setembro foi baixa, sendo a mínima de 21,5 e alcançando o valor máximo de 25,7 °C. Para a casa de vegetação, a amplitude térmica foi maior, de 13,2 a 32,4 °C, no período de abril a setembro. Os meses em que ocorrem as maiores temperaturas foi julho a setembro, em ambos os ambientes.

Tabela 1. Dados de temperatura máxima (TMax), mínima (TMin), média (TMed) e umidade relativa do ar (UR) dos experimentos realizados em sala com fotoperíodo controlado (Sala) e casa de vegetação (C. V.) em duas épocas avaliadas.

	Abril a Julho				Julho a Setembro			
	TMax±EP	TMin±EP	TMed±EP	UR±EP	TMax±EP	TMin±EP	TMed±EP	UR±EP
Sala	23,5±0,1	21,5±0,1	22,4±0,1	61,0±0,7	25,7±0,1	23,5±0,2	24,5±0,1	57,5±0,5
C.V.	29,7±0,2	13,2±0,2	20,4±0,2	73,3±0,5	32,4±0,3	14,4±0,2	22,5±0,1	61,8±0,6

EP = erro padrão

3.3. Impacto do déficit hídrico nas brotações

3.3.1. Tempo para surgimento dos brotos

Para as plantas que estavam na sala foi verificado que, em média, as brotações ocorreram mais rapidamente no período de julho a setembro. Não houve diferença significativa entre as plantas sadias e doentes na primeira época avaliada. Nesse mesmo período também não houve diferença entre os níveis de déficit hídrico. Para a segunda época avaliada (julho a setembro), as plantas sadias submetidas ao déficit hídrico brotaram mais rapidamente quando comparadas àquelas sem déficit hídrico. Enquanto que as plantas doentes não diferiram entre si quanto aos níveis hídricos (Tabela 2).

Para as plantas que estavam em casa de vegetação na primeira época avaliada, verificou-se que as brotações se deram mais rapidamente nas plantas doentes do que as sadias, em média. Entre os níveis hídricos, o tempo para emissão de brotações não diferiu estatisticamente entre as plantas em ambos os períodos avaliados (Tabela 2).

Tabela 2. Tempo (dias) para o surgimento de brotos de laranja 'Valência' em sala com fotoperíodo controlado e casa de vegetação (C.V.), sob diferentes níveis de déficit hídrico

Fotoperíodo controlado e casa de vegetação (C.V.), sob diferentes níveis de densidade							
Ambiente	Tratamentos ¹	Abril a Julho			Julho a Setembro		
		sadia	doente	média	sadia	doente	média
----- Dias±EP ² -----							
Sala	100% SAT	32±5,1	21±4,6	26,5±5,5	20±0,5 Aa	12±1,7 Ba	16±4,0
	75% SAT	13±5,7	21±4,4	17±4,0	13±0,7 Ab	12±0,8 Aa	12,5±0,5
	55% SAT	27±4,9	19±5,3	23±4,0	10±0,6 Ab	10±0,4 Aa	10±0,0
	Média	24±5,7 A	20,3±0,7 A	22,1±1,8	14,3±3,0	11,3±0,7	12,8±1,5
C.V.	100% SAT	24±3,0	10±0,7	17±7,0	23±0,8	21±1,6	22±1,0
	75% SAT	16±0,8	10±0,9	13±3,0	27±2,2	22±1,4	24,5±2,4
	55% SAT	20±2,7	10±1,4	15±5,0	25±0,9	17±1,1	21±4,0
	Média	20±2,3 A	10±0,0 B	15±5,0	25±1,1 A	20±1,1 A	22,5±2,5

¹ SAT: saturação do substrato; ²Erro Padrão. Letras maiúsculas correspondem as comparações entre o status fitossanitário dentro de cada nível de déficit. Letras minúsculas correspondem as comparações entre os níveis de déficit.

3.3.2. Tempo para maturação dos brotos

Houve tendência de menor tempo para maturação dos brotos na segunda época avaliada, para os dois ambientes estudados. Em relação aos níveis de déficit hídrico, os valores se mostraram, de forma geral, similares nos dois ambientes e duas épocas. O tempo para maturação entre plantas saudas e doentes diferiu estatisticamente para aquelas avaliadas na segunda época e ambos ambientes. Neste caso, as plantas doentes emitiram brotações mais rapidamente em relação as saudas (Tabela 3).

Tabela 3. Tempo (dias) para a maturação de brotos de laranjeira 'Valência', em Sala com fotoperíodo controlado e Casa de Vegetação (C.V.), sob diferentes níveis de déficit hídrico

Ambiente	Tratamentos ¹	Abril a Julho			Julho a Setembro		
		sadia	doente	Média	sadia	doente	média
----- Dias±EP -----							
Sala	100% SAT	69±2,3 Aa	63±1,6 Aa	66±2,6	60±2,4	54±2,4	57±3,0
	75% SAT	49±2,9 Ba	80±2,1 Aa	65,5±5,2	53±2,9	54±2,6	53,5±0,5
	55% SAT	61±2,5 Aa	67±1,3 Aa	64±2,4	52±2,4	44±1,2	48±4,0
	Média	59,7±3,4	70±3,5	65,2±2,6	55±2,5 A	50,7±3,3 B	52,8±2,6
C.V.	100% SAT	79±3,3	73±2,1	76±2,8	63±1,2	65±1,8	64±1,0
	75% SAT	80±2,4	73±3,0	76,5±1,3	65±2,6	60±2,6	63,5±2,5
	55% SAT	74±1,7	76±1,8	75±2,2	65±1,5	59±1,9	62±3,0
	Média	77,7±1,2 A	74±1,7 A	75,9±1,5	64,3±0,6A	61,3±1,8 B	63,2±1,5

¹ Saturação do substrato; ²Erro Padrão. Letras maiúsculas correspondem as comparações entre o status fitossanitário dentro de cada nível de déficit. Letras minúsculas correspondem as comparações entre os níveis de déficit.

3.3.3. Taxa de crescimento e tamanho final dos brotos

A. Período de abril a julho

De abril a julho de 2020, a taxa média de crescimento dos brotos foi de 0,012 ± 0,001 cm GDD⁻¹ na sala, não sendo influenciada significativamente pelo déficit hídrico (F = 1,3388, df = 2, P = 0,2858) nem pela presença da bactéria (F = 1,4881, df = 1, P = 0,2374) (Figura 4). Ao contrário da sala, na casa de vegetação a taxa de crescimento foi significativamente influenciada pelo déficit hídrico (F = 5,2131, df = 2, P = 0,0108) e pela infecção por CLas (F = 29,5359, df = 1, P < 0,0001). Na casa de vegetação, a taxa de crescimento foi em média 24% maior nas plantas doentes que

nas sadias e 17% maior em plantas submetidas a déficit hídrico severo quando comparadas com as plantas sem déficit.

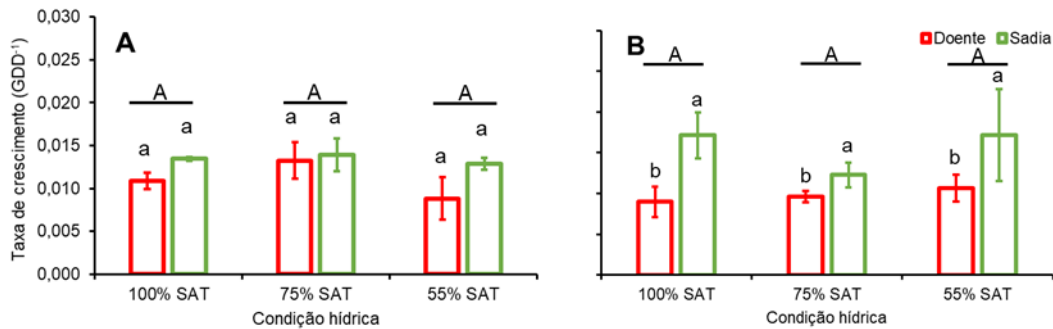


Figura 4. Taxa de crescimento de brotos em sala com fotoperíodo controlado (A) e casa de vegetação (B) no período de abril a julho. Os valores correspondem às médias do tamanho de brotos em 8 plantas, medidos a cada 2 dias, seguidas do erro padrão. Letras maiúsculas correspondem as comparações entre os níveis de déficit. Letras minúsculas correspondem as comparações entre o status fitossanitário dentro de cada nível de déficit. SAT = Saturação do substrato.

No mesmo período, o tamanho final dos brotos (Figura 5 A e B), tanto na sala quanto na casa de vegetação, não apresentaram diferença significativa entre os níveis de déficit hídrico (Sala: $F = 1,6219$, $df = 2$, $P = 0,2237$; Casa de vegetação: $F = 0,4991$, $df = 2$, $P = 0,6116$). Porém, a presença de CLas influenciou significativamente o tamanho em ambos os ambientes (Sala: $F = 29,9397$, $df = 1$, $P < 0,0001$; Casa de vegetação: $F = 6,8756$, $df = 1$; $P = 0,0131$), sendo que nas plantas sadias os brotos foram em média 136% e 60% maiores do que os das plantas doentes na sala e casa de vegetação, respectivamente.

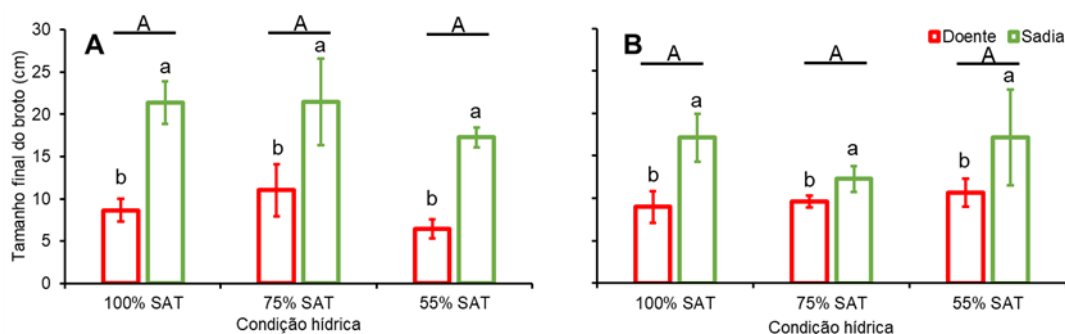


Figura 5. Tamanho final de brotos de plantas de laranja ‘Valência’ enxertadas sobre citrumeleiro ‘Swingle’ em sala com fotoperíodo controlado (A) e casa de vegetação (B). Os valores correspondem às médias ($\pm$ erro padrão) de 8 plantas avaliadas a cada 2 dias. Letras maiúsculas e minúsculas correspondem, respectivamente, às comparações entre os níveis de déficit e entre os status fitossanitários dentro de cada nível de déficit. SAT = Saturação do substrato.

B. Período de julho a setembro

No período de julho a setembro, a taxa de crescimento dos brotos não foi influenciada pelo status fitossanitário (Sala: $F = 0,0640$, $df = 1$, $P = 0,8016$; Casa de vegetação: $F = 2,3476$, $df = 1$, $P = 0,1350$) ou de déficit hídrico (Sala: $F = 0,1275$, $df = 2$, $P = 0,8806$; Casa de vegetação: $F = 0,9729$, $df = 2$, $P = 0,3885$) tanto na sala (Figura 6 A) quanto na casa de vegetação (Figura 5 B). Em média, a taxa de crescimento na sala foi $0,013 \pm 0,001$ cm GDD⁻¹, enquanto que na casa de vegetação de $0,015 \pm 0,003$ cm GDD⁻¹.

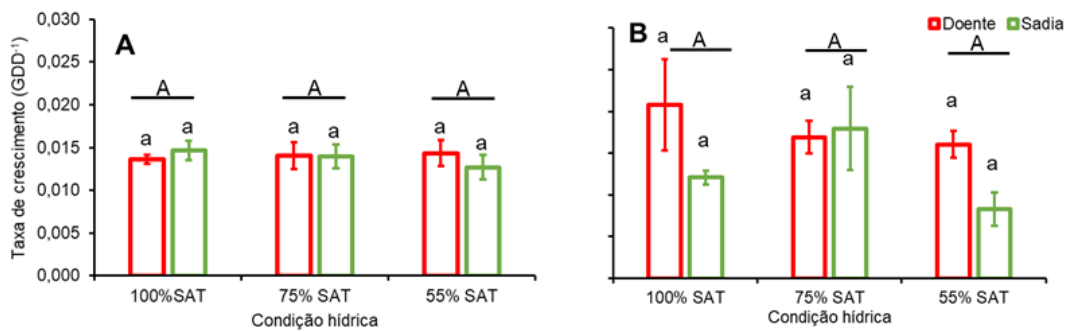


Figura 6. Taxa de crescimento de brotos em sala com fotoperíodo controlado (a) e casa de vegetação (B) no período de abril a julho. Os valores correspondem às médias ($\pm$ erro padrão) de 8 plantas a cada 2 dias. Letras maiúsculas e minúsculas correspondem, respectivamente, às comparações entre os níveis de déficit e entre os status fitossanitários dentro de cada nível de déficit. SAT = Saturação do substrato.

No mesmo período, não houve influência significativa do déficit hídrico no tamanho final do broto em plantas mantidas na sala ($F = 1,1298$, $df = 2$, $P = 0,3332$) ou casa de vegetação ($F = 1,8712$, $df = 2$, $P = 0,1699$) (Figura 7 A e B), os quais apresentaram média geral de $12,64 \pm 1,51$ cm e $11,22 \pm 1,83$ cm, respectivamente. De forma semelhante ao período anterior (abril a julho), a infecção por CLas nas plantas reduziu significativamente o tamanho dos brotos em 125% e 102% tanto na sala ($F = 42,7830$, $df = 1$, $P < 0,0001$) quanto na casa de vegetação ($F = 29,3372$, $df = 1$, $P < 0,0001$), respectivamente.

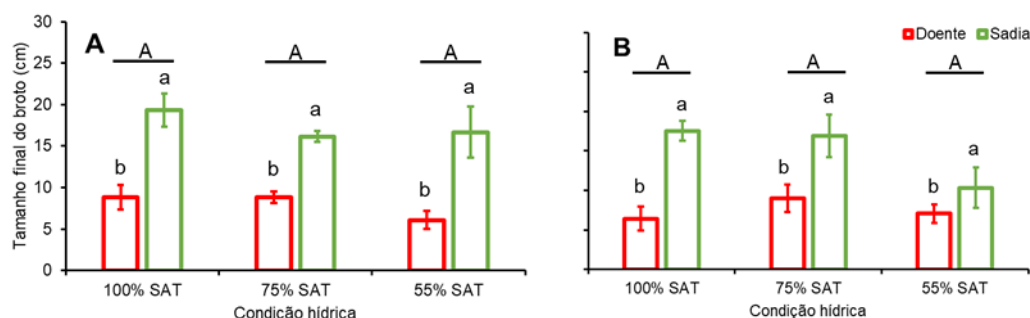


Figura 7. Tamanho final de brotos de plantas de laranjeira 'Valência' enxertadas sobre citrumeleiro 'Swingle' em sala com fotoperíodo controlado (A) e casa de vegetação (B). Os valores correspondem às médias ($\pm$ erro padrão) de 8 plantas a cada 2 dias. Letras maiúsculas correspondem, respectivamente, às comparações entre os níveis de déficit e entre os status fitossanitários dentro de cada nível de déficit. SAT = Saturação do substrato.

3.4. Impacto na multiplicação de CLas em brotos e na sua aquisição por *D. citri*

3.4.1. Multiplicação no broto

O título bacteriano em brotos não foi influenciado significativamente pelo déficit hídrico ($F = 0,0127$; $df = 1$; $P = 0,9107$), nem pelo ambiente ($F = 1,0944$; $df = 1$; $P = 0,3019$) ou interação déficit hídrico x ambiente ($F = 0,9411$; $df = 1$; $P = 0,3380$). Em média o título de CLas foi de 5,92 e 4,5 log de células por grama de tecido em sala com fotoperíodo controlado e casa de vegetação, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4. Títulos de *Candidatus Liberibacter asiaticus* em brotos de laranjeira 'Valência', sob diferentes níveis de déficit hídrico

Tratamentos	Sala		Casa de vegetação	
	Log	$\pm$ EP ²	Log	$\pm$ EP ²
100% SAT ¹	5,93	$\pm$ 0,19	3,08	$\pm$ 1,19
75% SAT ¹	5,71	$\pm$ 0,25	4,76	$\pm$ 0,70
55% SAT ¹	6,12	$\pm$ 0,09	5,69	$\pm$ 0,34
Média	5,92	$\pm$ 0,18	4,51	$\pm$ 0,74

¹ Saturação do Substrato.

² Log₁₀ de células de CLas por grama de tecido $\pm$ erro padrão.

3.4.2. Multiplicação e aquisição por *Diaphorina citri*

O déficit hídrico influenciou significativamente a proporção de adultos que adquiriram CLas após 72h de confinamento ($X^2 = 14,66$; $df = 2$; $P = 0,0007$) (Tabela 5). Porém, esta proporção não foi influenciada pelo ambiente ($X^2 = 0,63$; $df = 1$; $P = 0,4280$) nem pela interação déficit hídrico x ambiente ($X^2 = 5,12$; $df = 2$; $P = 0,0775$). Em plantas bem irrigadas mais adultos foram capazes de adquirir CLas (36,36%) do que em plantas com déficit hídrico intermediário (9,84%) ou severo (15,38%).

O título de CLas nos insetos confinados não foi significativamente influenciado pelo status hídrico da planta ($F_{2,32} = 4,49$; $P = 0,4985$), nem pelo ambiente ($F_{1,32} = 0,6099$; $P = 0,6630$), ou pela interação déficit hídrico x ambiente ($F_{2,32} = 1,15$; $P = 0,8334$). Em média, o título de CLas foi de 2,38 log de células de CLas por grama de tecido.

Tabela 5. Frequência e títulos de *Candidatus Liberibacter asiaticus* em psíldeos confinados por 72 h em laranjeira ‘Valência’ doente submetidas a diferentes níveis de déficit hídrico.

Tratamentos	Aquisição	Sala		Casa de vegetação	
	CLas+ ³	Log	± EP ²	Log	± EP ²
100% SAT ¹	36,36%	2,58	± 0,23	2,37	± 0,23
75% SAT ¹	9,84%	2,30	± 0,15	2,40	± 0,08
55% SAT ¹	15,38%	2,47	± 0,28	2,15	± 0,07
Média		2,45	± 0,22	2,30	± 0,12

¹ Saturação do Substrato.

² Log₁₀ de células de CLas por grama de tecido ± erro padrão.

³ Porcentagem de insetos que adquiriram CLas. As médias foram calculadas sobre amostras qPCR positivas.

4. DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo avaliar os possíveis efeitos do déficit hídrico e temperatura sobre brotações de plantas cítricas e na aquisição de CLas por *D. citri*. O patossistema HLB é composto pela bactéria, hospedeiros e psíldeo (Wang et al., 2017). O estudo permitiria elucidar se as diferenças de incidências da doença que vêm ocorrendo no parque citrícola estariam associadas a variações no déficit hídrico afetando o desenvolvimento dos brotos e aquisição de CLas pelo inseto vetor.

Isto porque as brotações têm papel fundamental na disseminação do HLB, pois fornecem alimento e atuam como local de reprodução do inseto (Cifuentes-Arenas et al., 2018). Ao servir como fontes de alimento, os brotos favorecem os processos de aquisição e transmissão de CLas por *D. citri* (Sétamou et al., 2016; Hall et al., 2016). As brotações são altamente influenciadas pela temperatura do ar e disponibilidade de água (Syvertsen et al., 1981). O déficit hídrico, que frequentemente atinge os pomares de citros do país (Sentelhas, 2005) poderia também ter efeito negativo sobre os brotos.

No presente trabalho, verificou-se que as plantas doentes se mostraram menos propensas à perda de água quando comparadas às sadias, em ambos os ambientes testados, porém, a perda se deu de forma mais acentuada na casa de vegetação. No estudo de Hamido et al. (2017), o conteúdo de água total disponível no solo foi maior em plantas de 'Valência' infectadas por HLB, sendo 15% maior nas doentes do que nas sadias. Já o fluxo de seiva foi menor em 56% nas plantas com HLB do que nas sadias. Os autores sugerem que a absorção de água em plantas infectadas é menos eficiente em relação às plantas sadias devido a menores áreas de raiz e copa. De acordo com Johnson et al. (2014) e Kadyampakeni et al. (2014) a densidade de raízes de laranjeiras infectadas por HLB foi menor quando comparadas às sadias. No presente trabalho, a menor perda de água em plantas doentes também poderia estar relacionada a uma menor taxa de transpiração. De acordo com Nehela et al. (2018) a infecção por HLB aumenta os níveis de ABA em folhas de citros e este hormônio está associado ao fechamento estomático (Schroeder et al., 2001).

Foi observado no presente trabalho que o déficit acelerou as taxas de crescimento dos brotos das plantas que estavam em casa de vegetação na primeira época avaliada. O crescimento celular é muito sensível ao déficit hídrico. Quando a planta está submetida a estresse hídrico ela tende a ativar mecanismos para superar o déficit, como encurtamento ou prolongamento do ciclo (Chaves e Oliveira, 2004). Neste caso, o encurtamento pode ocorrer para que as plantas completem seu ciclo antes que a umidade em seus tecidos diminua (Kramer, 1995), sendo uma possível explicação para os resultados aqui relatados.

A temperatura é uma variável importante para o desenvolvimento de brotações (Davis e Albrigo, 1994). Foi visto neste estudo que, em ambos os ambientes, o tempo necessário para o completo desenvolvimento dos brotos nas plantas cultivadas de

julho a setembro foi menor do que nas plantas cultivadas de abril a junho. Isto pode ter ocorrido devido às temperaturas mais elevadas no decorrer do experimento conduzido de julho a setembro.

Já foi demonstrado que *D. citri* prefere os estádios iniciais de desenvolvimento dos brotos (V1 a V3) e que na sua ausência cessam-se temporariamente a oviposição (Cifuentes-Arenas et al., 2018). Assim, o encurtamento do ciclo pode desfavorecer o vetor. Ao amadurecer mais rápido, pode reduzir o período de tempo de exposição a *D. citri*, reduzindo assim tempo total de alimentação e de reprodução.

Com relação as brotações, verificou-se que as plantas doentes alcançaram menores tamanhos de brotos quando comparadas às sadias, em ambos ambientes e épocas avaliadas. De acordo com Etxeberria et al. (2009) o HLB leva ao acúmulo de calose no sistema vascular das plantas em resposta a infecção, levando ao bloqueio do fluxo de seiva que naturalmente ocorre da fonte para o dreno. O impedimento de os fotoassimilados alcançarem os órgãos das plantas compromete o desenvolvimento do vegetal (Giaquinta, 1983). Não foram observadas diferenças entre os títulos bacterianos de brotos entre os tratamentos e ambientes estudados. Isto se deve, provavelmente, à não ocorrência de extremos de temperatura durante o experimento. De acordo com Lopes et al. (2013), a redução do título bacteriano em brotos ocorreu quando estes foram expostos a temperatura de 38°C e em nenhum momento a temperatura atingiu esse valor nos experimentos.

O déficit hídrico afetou a aquisição de CLas por insetos adultos. Uma menor proporção de insetos adultos foi capaz de adquirir CLas quando se alimentaram de brotos de plantas submetidas tanto ao déficit intermediário como severo. Essa menor proporção de insetos que adquiriram a bactéria pode estar ligada a um menor tempo de alimentação dos insetos nas plantas (Del Cid et al., 2018), devido a um baixo status nutricional (Hijaz et al., 2013) ou alterações na concentração de seiva (Huberty e Denno, 2004). O HLB leva a alterações nutricionais nas plantas. Reduções nas concentrações de Ca, Mg, Fe, Mn, Zn e Cu e aumento de K foram observados em plantas infectadas (Ranulfi et al., 2017; Nwugo et al., 2013). Razi et al. (2011) verificou, além disso, redução na concentração de nitrogênio em plantas doentes. Esse nutriente é de grande importância para o desenvolvimento e reprodução de insetos. O amino ácido glutamina, disponível na seiva do floema, é a principal fonte de

nitrogênio para insetos sugadores de floema (Karley et al., 2002) e esse composto se encontra em baixas concentrações em folhas maduras (Douglas, 1993). Com relação às alterações na concentração da seiva, Huberty e Denno (2004) verificaram que o déficit leva ao aumento da concentração de açúcares, viscosidade da seiva, pressão osmótica e diminuição da turgescência. Isto também pode estar ligado a menor proporção de insetos que adquiriam CLas do presente trabalho.

No trabalho de Ammar et al. (2016), os autores mostraram a importância da multiplicação de CLas dentro dos insetos para uma transmissão eficiente. No entanto, a multiplicação dentro de insetos adultos de psíldeos ocorre de forma lenta e em menores concentrações. Para alcançar maiores títulos, o adulto necessita de maior período de aquisição em plantas doentes. Isto mostra que plantas com bom status hídrico podem favorecer uma maior permanência dos insetos e com isso aumenta a probabilidade de aquisição.

Del Cid et al. (2018) estudaram o efeito do déficit hídrico sobre o vetor de *Xylella fastidiosa* em videira (*Vitis vinífera*) e sugeriram que as interações vetor-planta e patógeno-planta são impactadas negativamente pelo estresse hídrico. Quando os insetos têm a chance de escolha entre uma planta infectada sob estresse e outra saudável e bem hidratada, estes evitam as plantas infectadas sob estresse hídrico, o que leva a menores visitas as plantas e/ou mais curtas e menos frequentes picadas de provas do xilema, e consequentemente a menores taxas de aquisição do patógeno. Martini et al. (2017) observaram que laranjeiras afetadas por HLB eram menos atrativas a *D. citri* devido a uma menor emissão de voláteis atrativos pelas plantas. Isso nos mostra que o déficit hídrico poderia estar comprometendo o desempenho do vetor de forma direta ou indireta.

No presente trabalho demonstrou-se que o déficit hídrico e o status de sanidade das plantas podem afetar o desenvolvimento dos brotos e taxa de aquisição de CLas por *D. citri*. O efeito na aquisição parece estar ligado ao comportamento alimentar do inseto visto que os títulos de CLas não se alteraram. De qualquer maneira, quando adicionados aos já publicados, os resultados ajudam a explicar as diferenças de incidência de HLB no parque citrícola do Brasil. As elevadas temperaturas e déficit hídrico acentuado, características das regiões Norte e Noroeste do parque citrícola, reduzem o período de tempo para a maturação das brotações e de aquisição de CLas

por *D. citri*, reduzindo, conseqüentemente, a taxa de reprodução do vetor e eficiência de transmissão de CLAs. Essa poderia ser uma das causas para as diferentes incidências entre regiões quem vêm ocorrendo no parque citrícola.

5. REFERÊNCIAS

Akaike, H (1998) Information theory and an extension of the maximum likelihood principle. In Parzen E, Tanabe K, Kitagawa G. (Eds.), **Selected Papers of Hirotugu Akaike** (pp. 199–213). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-1694-0_15

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.

Bassanezi RB, Lopes SA, de Mira MP, Wulff NA, Volpe HXL, Ayres AJ (2020) Overview of citrus huanglongbing spread and management strategies in Brazil. **Tropical Plant Pathology**. 45:251-264.

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

Capoor SP, Rao DG, Viswanath SM (1974) Greening disease of citrus in the Deccan Trap Country and its relationship with the vector, *Diaphorina citri* Kuwayama. In **International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings**. 6:43–49.

Chaves MM, Oliveira MM (2004) Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. **Journal of experimental botany**. 55:2365-2384.

Cifuentes-Arenas JC (2017) **Huanglongbing e *Diaphorina citri*: Estudos das relações patógeno-vetor-hospedeiro** [FCAV/UNESP]. <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/151391>

Cifuentes-ARENAS JC, De Goes A, De Mira MP, Beattie, GAC, Lopes SA (2018) Citrus flush shoot ontogeny modulates biotic potential of *Diaphorina citri*. **PLoS One**, 13:e0190563.

Coletta-Filho HD, Targon MLPN, Takita MA, De Negri JD, Pompeu Júnior J, Machado MA (2004) First report of the causal agent of huanglongbing ("*Candidatus liberibacter asiaticus*") in Brazil. **Plant Disease**. 88:1382.

Davies FS, Albrigo LG (1994) Citrus. In: Crop Production Science in Horticulture Series, CAB International, Wallington. 134-135.

Del Cid C, Krugner R, Zeilinger AR, Daugherty MP, Almeida RP (2018) Plant water stress and vector feeding preference mediate transmission efficiency of a plant pathogen. **Environmental entomology**. 47:1471-1478.

Douglas AE (1993) The nutritional quality of phloem sap utilized by natural aphid populations. **Ecological Entomology**. 18:31-38.

Ettxeberria 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.

FUNDECITRUS (2020) Levantamento da incidência de doenças dos citros. Disponível em:<
https://www.fundecitrus.com.br/pdf/levantamentos/Relatorio_levantamento_de_doencas_2021-greening_CVC_e_cancro_citrico.pdf>. Acesso em: 28 dez. 2021.

Garnier M, Bove JM (1983) Transmission of the organism associated with citrus greening disease from sweet orange to periwinkle by dodder. **Phytopathology**. 73:1358–1363.

Giaquinta RT (1983) Phloem loading of sucrose. **Annual Review of Plant Physiology**. 34:347-387.

Gottwald TR (2010) Current epidemiological understanding of citrus Huanglongbing. **Annual review of phytopathology**. 48:119-139.

Hall DG, Albrecht U, Bowman KD (2016) Transmission rates of ‘Ca. Liberibacter asiaticus’ by Asian citrus psyllid are enhanced by the presence and developmental stage of citrus flush. **Journal of Economic Entomology**. 109:558-563.

Hamido SA, Morgan KT, Kadyampakeni DM (2017) The effect of Huanglongbing on young citrus tree water use. **HortTechnology**. 27:659-665.

Hijaz F, El-Shesheny I, Killiny N (2013) Herbivory by the insect *Diaphorina citri* induces greater change in citrus plant volatile profile than does infection by the bacterium, *Candidatus Liberibacter asiaticus*. **Plant signaling & behavior**. 8:e25677.

Huberty AF, Denno RF (2004) Plant water stress and its consequences for herbivorous insects: a new synthesis. **Ecology** 85:1383–1398.

Inoue H, Ohnishi J, Ito T, Tomimura K, Miyata S, Iwanami T, Ashihara W (2009) Enhanced proliferation and efficient transmission of *Candidatus Liberibacter asiaticus* by adult *Diaphorina citri* after acquisition feeding in the nymphal stage. **Annals of Applied Biology**. 155:29-36.

Jagoueix S, Bové JM, Garnier M (1984) The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the α subdivision of the proteobacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 44:379-386.

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

Kadyampakeni DM, Morgan KT, Schumann AW, Nkedi-Kizza P (2014) Effect of irrigation pattern and timing on root density of young citrus trees infected with Huanglongbing disease. **HortTechnology**. 24:209-221.

Karley AJ, Douglas AE, Parker WE (2002) Amino acid composition and nutritional quality of potato leaf phloem sap for aphids. **Journal of Experimental Biology** 205:3009-3018.

Kramer PJ, Boyer JS (1995) Water relations of plants and soils. San Diego: **Academic Press**.

Kurnianto E, Shinjo A, Suga D (1998) Analysis of growth in intersubspecific crossing of mice using Gompertz model. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**,. 11:84-88, 1998. 11(1), 84–88. <https://doi.org/10.5713/ajas.1998.84>

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

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

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

Lopes SA, Luiz FQBF, Martins EC, Fassini CG, Sousa MC, Barbosa JC, Beattie GAC (2013) "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" titers in citrus and acquisition rates by *Diaphorina citri* are decreased by higher temperature. **Plant Disease**. 97:1563–1570.

Lopes SA, Luiz FQ, Oliveira HT, Cifuentes-Arenas JC, Raiol-Junior LL (2017) Seasonal Variation of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' Titers in New Shoots of Citrus in Distinct Environments. **Plant Disease**. 101:583-590.

Mcmaster G (1997) Growing degree-days: one equation, two interpretations. **Agriculture and Forest Meteorology**. 87:291–300. [https://doi.org/10.1016/S0168-1923\(97\)00027-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1923(97)00027-0)

Martini X, Stelinski LL (2017) Drought stress affects response of phytopathogen vectors and their parasitoids to infection-and damage-induced plant volatile cues. **Ecological Entomology**.42:721-730.

Meneguim L, Buassi M, Vilas-Boas LA, Marques-Marçal VV, Paccola-Meirelles LD, Leite Jr RP (2008) Ocorrência de *Candidatus Liberibacter asiaticus* agente causal do Huanglongbing no estado do Paraná. **Tropical Plant Pathology**. 33:100.

Mann RS, Ali JG, Hermann SL, Tiwari S, Pelz-Stelinski KS, Alborn HT, Stelinski LL (2012) Induced release of a plant-defense volatile 'deceptively' attracts insect vectors to plants infected with a bacterial pathogen. **PLoS pathogens**. 8:e1002610.

Murray MG, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**. 8:4321–4326.

Nwugo CC, Lin H, Duan Y, Civerolo EL (2013) The effect of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' infection on the proteomic profiles and nutritional status of pre-symptomatic and symptomatic grapefruit (*Citrus paradisi*) plants. **BMC plant biology**. 13:59.

Nava DE, Torres MLG, Rodrigues MDL, Bento JMS, Parra JRP (2007). Biology of *Diaphorina citri* (Hem., Psyllidae) on different hosts and at different temperatures. **Journal of Applied Entomology**. 131:709–715. doi:10.1111/j.1439-0418.2007.01230.x

Nehela Y, Hijaz F, Elzaawely AA, El-Zahaby HM, Killiny N (2018) Citrus phytohormonal response to *Candidatus Liberibacter asiaticus* and its vector *Diaphorina citri*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. 102:24–35. doi:10.1016/j.pmpp.2017.11.004

Ranulfi AC, Romano RA, Magalhaes AB, Ferreira EJ, Villas-Boas PR, Milori DMBP (2017) Evaluation of the nutritional changes caused by Huanglongbing (HLB) to citrus plants using laser-induced breakdown spectroscopy. **Applied spectroscopy**. 71:1471-1480.

Razi MF, Khan IA, Jaskani MJ (2011) Citrus plant nutritional profile in relation to Huanglongbing prevalence in Pakistan. **Pakistan Journal of Agricultural Sciences**. 48:299-304.

Ribeiro RV, Machado EC, Brunini O (2006) Ocorrência de condições ambientais para a indução do florescimento de laranjeiras no Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Fruticultura**. 28:247-253.

Rolim GDS, Camargo MBPD, Lania DG, Moraes JFLD (2007) Classificação climática de Köppen e de Thornthwaite e sua aplicabilidade na determinação de zonas agroclimáticas para o estado de São Paulo. **Bragantia**. 66:11-720.

Schroeder JI, Allen GJ, Hugouvieux V, Kwak JM, Waner D (2001) Guard cell signal transduction. **Annual review of plant biology**. 52:627–658.

Syvertsen JP, Smith ML, Allen JC (1981) Growth Rate and Water Relations of Citrus Leaf Flushes. *Annals of Botany*, 47:97–105. doi:10.1093/oxfordjournals.aob.a086004

Teixeira DC do, Danet JL, Eveillard S, Martins EC, De Jesus Junior WC, Yamamoto PT, Bové JM (2005) Citrus huanglongbing in Sao Paulo State, Brazil: PCR detection of the ‘*Candidatus*’ Liberibacter species associated with the disease. **Molecular and cellular probes**. 19:173-179.

Sentelhas PC (2005) Agrometeorologia dos citros. In: Mattos Junior D, De Negri JD, Pio RM, Pompeu Junior J (Eds.) **Citros**, cap. 11..

Sétamou M, Simpson CR, Alabi OJ, Nelson SD, Telagamsetty S, Jifon JL (2016) Quality matters: influences of citrus flush physicochemical characteristics on population dynamics of the Asian citrus psyllid (Hemiptera: Liviidae). **PLoS One**. 11:e0168997.

Tjørve KMC, Tjørve E (2017) The use of Gompertz models in growth analyses, and new Gompertz-model approach: An addition to the Unified-Richards family. **PloS One**. 12:e0178691. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178691>

Uechi N, Iwanami T (2012). Comparison of the ovarian development in *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) in relation to the leaf age of orange jasmine, *Murraya paniculata* (L.) Jack. **Bulletin of the NARO Institute of Fruit Tree Science**. 13:39-42.

Wang N, Pierson EA, Setubal JC, Xu, J, Levy JG, Zhang Y, Li J, Rangel LT, Martins, J. Jr. (2017). The *Candidatus* Liberibacter-host interface: insights into pathogenesis mechanisms and disease control. **Annual Review of Phytopathology**. 4:451-482.

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

CAPÍTULO 3 – Impacto da interrupção do déficit hídrico na ocorrência e desenvolvimento de brotos em laranjeiras sadias e afetadas por huanglongbing e na multiplicação de *Candidatus Liberibacter asiaticus* em plantio no Norte do estado de São Paulo

RESUMO - Muitas regiões produtoras de citros do Brasil passam por longos períodos de seca que pode impactar o desenvolvimento e reduzir a produtividade dos pomares. A região norte do estado de São Paulo é caracterizada por apresentar relativamente longos períodos de deficiência hídrica. Nessa região, as plantas estão sujeitas não só ao estresse abiótico, mas também, à infecção e colonização pela bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), considerada a causa da mais devastadora doença dos citros. Trabalho de campo sugeriu que plantas infectadas por HLB submetidas a restrição hídrica apresentaram menores títulos de CLas. Isto nos levou a investigar os efeitos da interrupção da deficiência hídrica sobre os citros e a bactéria CLas, em pomar de laranja 'Valencia' enxertadas em citrumeleiro 'Swingle', irrigado ou não, localizado no município de Bebedouro, no norte do estado de São Paulo. O delineamento foi inteiramente casualizado, dois estados de sanidade das mudas (sintomáticas e assintomáticas), sob irrigação com 4 repetições, uma planta por repetição. O mesmo delineamento foi realizado para a área não irrigada. Foram quantificados a emissão e crescimento dos brotos e título bacteriano antes e após a 'quebra' do DH pela irrigação ou chuvas. A irrigação recuperou a turgidez das folhas das plantas sintomáticas, mas não das assintomáticas. Somente as sintomáticas emitiram brotos. No entanto, com a chegada das chuvas no mês de outubro (de aproximadamente 80 mm), 49 dias após o início do experimento, todas as plantas brotaram. A irrigação e chuvas provocaram redução tanto na incidência de brotos com CLas como no título bacteriano – de log 6 a 7 por g de tecido nas plantas sob severo DH para log 3 a 4 após irrigação ou chuvas. Conclui-se que as menores incidências de HLB nas regiões norte e noroeste do estado de São Paulo podem ser o resultado, ao menos parcial, da menor taxa de aquisição de CLas por *D. citri* antes e depois da quebra do DH, muito comum naquelas regiões.

Palavras chave: título bacteriano, *Citrus × sinensis*, estresse abiótico

CHAPTER 3 - Impact of the interruption of the water deficit on the occurrence and development of shoots in healthy orange trees affected by huanglongbing and on the multiplication of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in planting in the North of the State of São Paulo

ABSTRACT - Many citrus producing regions in Brazil experience long periods of drought that can impact development and reduce orchard productivity. The northern region of the state of São Paulo is characterized by relatively long periods of water deficit. In this region, plants are subject not only to abiotic stress, but also to infection and colonization by *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), considered the cause of the most devastating citrus disease. Field work suggested that HLB-infected plants subjected to water restriction had lower CLas titers. This led us to investigate the effects of water deficit (WD) interruption on citrus and CLas bacterium, in 'Valencia' orange orchard grafted on 'Swingle' citrumelo rootstock, irrigated or not, located in the municipality of Bebedouro, in the north of the state of São Paulo. The design was completely randomized, with two seedling health states (symptomatic and asymptomatic), under irrigation with 4 replications, one plant per replication. The same design was carried out for the non-irrigated area. The emission and growth of shoots and bacterial titers were quantified before and after the WD 'break' by irrigation or rainfall. Irrigation restored leaf turgidity in symptomatic plants, but not in asymptomatic ones. Only the symptomatic ones emitted shoots. However, with the arrival of rains in October (approximately 80 mm), 49 days after the beginning of the experiment, all plants sprouted. Irrigation and rainfall reduced both the incidence of shoots with CLas and bacterial titer – from log 6 to 7 per g of tissue in plants under severe WD to log 3 to 4 after irrigation or rainfall. It is concluded that the lower incidences of HLB in the north and northwest regions of the state of São Paulo may be the result, at least partially, of the lower rate of acquisition of CLas by *D. citri* before and after the WD break, very common in those regions.

Keywords: bacterial titer, *Citrus × sinensis*, abiotic stress

1. INTRODUÇÃO

A citricultura é uma atividade de grande importância para o agronegócio brasileiro (CitrusBR, 2021; Bastos et al., 2016). De acordo com o inventário realizado pelo Fundecitrus, 69,86% dos pomares do cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo Mineiro não são irrigados, correspondendo a 270 mil hectares, ou seja, na maior parte dos pomares o provimento de água se dá, exclusivamente, pelas chuvas (Fundecitrus, 2021; Medina et al., 2008). De acordo com Donato et al. (2007) a quantidade de água requerida pela cultura dos citros varia de 900 a 1200 mm por ano. Entretanto, por causa das irregularidades na ocorrência de chuvas no território brasileiro, muitas regiões produtoras passam por longos períodos de seca, o que leva ao comprometimento da produção (Sentelhas, 2005; Peixoto et al., 2006).

O estado de São Paulo, maior produtor nacional, possui regiões onde as plantas cítricas estão sujeitas a deficiência hídrica (Sentelhas, 2005). A região Norte do estado, por exemplo, é caracterizada por temperaturas elevadas e baixa incidência de chuvas, havendo períodos de deficiência hídrica (Ribeiro et al., 2006; Rolim et al., 2007). A restrição de água para as plantas cítricas pode levar ao comprometimento do desenvolvimento e das atividades fisiológicas das plantas. Redução das trocas gasosas, da condutância estomática, da fotossíntese, do número de brotações e produtividade são algumas das consequências da deficiência hídrica sobre as plantas (Syvertsen et al., 1998; Gomes et al., 2004; García-Sánchez et al., 2007; Reuther, 1973).

Além de sofrerem com a restrição hídrica, os citros têm sido acometidos pelo Huanglongbing (HLB), considerado uma das mais destrutivas doenças dos citros (Bové, 2006). HLB é uma doença bacteriana, cujo agente causal, a bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus*, é restrita aos vasos do floema (Jagoueix et al., 1994). A bactéria é disseminada pelo psílídeo *Diaphorina citri* Kuwayama (Capoor et al., 1974), inseto altamente dependente de brotações para alimentação e reprodução (Cifuentes-Arenas et al., 2018).

Lopes et al. (2017) verificaram que em plantas infectadas com HLB expostas a temperaturas acima de 30°C e períodos de ausência ou baixas precipitações pluviométricas a população bacteriana em suas brotações era menor do que nas

plantas expostas a temperaturas mais baixas e períodos de maior disponibilidade hídrica. Silva et al. (2021) também observaram menor concentração de CLas em brotos em plantas expostas a irrigação deficitária. Coincidentemente, em regiões mais quentes e secas do maior parque citrícola brasileiro a incidência de HLB tem sido historicamente mais baixa. Pela importância que poderia ter para a definição de um zoneamento climático para o HLB, essa observação nos estimulou a dar sequência aos estudos. O objetivo foi avaliar o impacto do déficit hídrico em laranjeiras doentes de 'Valência' enxertada em citrumelo 'Swingle' em pomar localizado na região Norte do estado de São Paulo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na Fundação Coopercitrus Credicitrus (FCC), no Município de Bebedouro-SP, situado na latitude 20°53'16" Sul e na longitude 48°28'11" Oeste, a 600 metros de altitude, em pomar de 8 anos de laranjeira Valência (*Citrus × aurantium* var. *sinensis* L.) sobre o porta-enxerto citrumelo 'Swingle' [*C. × aurantium* var. *paradisi* × *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.], espaçadas 2,0 m entre plantas e 6,0 m entre linhas, sem irrigação e sob forte estresse hídrico - folhas curvadas, opacas, perda de folhas. Nas plantas doentes estes sintomas eram observados somente na parte assintomática para HLB da copa. A porcentagem de sintomas dessas plantas era de 50 a 100% da copa. E como controle foram selecionadas plantas assintomáticas (Figura 1). Dados meteorológicos foram coletados diariamente e obtidos a partir do Sistema de Medição e Controle CR10 (Campbell Scientific Inc), instalado na FCC.



Figura 1. Aspecto das plantas sintomáticas (A) e assintomáticas (B) de laranjeira 'Valência' enxertadas em citrumeleiro 'Swingle' antes do início do experimento na Fundação Coopercitrus Credicitrus.

2.1. Condução do experimento

O experimento foi dividido em duas partes. Na primeira, realizada no período de setembro a outubro de 2020, o delineamento foi o inteiramente casualizado. Foram avaliados dois estados de sanidade (com ou sem HLB), com 4 plantas, cada planta uma repetição. Cada planta recebeu um volume de água equivalente a uma chuva de 68 mm por 40 min, aproximadamente, transportada até o local por um trator e tanque (Figura 2). Foi feita uma “coroa” ao redor de cada planta, na projeção da copa, para garantir que todo o volume de água aplicado não percolasse e fosse completamente absorvido pelas plantas.



Figura 2. Trator com tanque de 6.500 L acoplado para irrigação de plantas sadias e doentes de laranjeira ‘Valência’ enxertadas em citrumeleiro ‘Swingle’ na Fundação Coopercitrus Credicitrus.

A segunda parte, conduzida entre setembro e novembro de 2020, seguiu o mesmo delineamento anterior, porém, as plantas não receberam irrigação - o fornecimento de água foi pelas chuvas que ocorreram nas semanas seguintes.

2.2. Surgimento, crescimento e desenvolvimento de brotos após a hidratação

As plantas foram observadas quanto ao seu aspecto antes e após o restabelecimento de água pela irrigação e/ou chuvas. Em cada planta foram selecionados 8 ramos maduros de 50 cm de comprimento, distribuídos em 8 quadrantes, para avaliação da emissão das brotações, a cada 3 a 4 dias (duas vezes por semana). Nesses mesmos 8 ramos foram selecionados 10 brotos, distribuídos nos quadrantes, para avaliação do crescimento e desenvolvimento. As medições foram feitas a cada 3 dias, com auxílio de uma régua, desde a sua emissão até o completo amadurecimento, segundo a classificação proposta por Cifuentes-Arenas et al. (2018). Essas avaliações foram realizadas nas duas partes do experimento.

2.3. Título bacteriano em folhas maduras e brotos

Em cada planta sintomática foram selecionados 10 ramos, distribuídos pela copa, que estivessem expressando os sintomas de HLB. Antes de iniciar os tratamentos, coletaram-se 10 segmentos de cada ramo selecionado para posteriormente determinar o título através de análise de qPCR, como descrito no capítulo anterior. Neste caso, utilizaram-se amostras de folhas maduras devido à ausência de brotações. Depois de iniciados os tratamentos [irrigação (parte 1) e chuvas (parte 2)] foi feita uma nova coleta, agora neste caso de brotos em estádios V2 e V3 (Cifuentes-Arenas et al., 2018). A coleta foi realizada nos mesmos ramos selecionados anteriormente, para serem analisados por qPCR.

2.4. Análise dos dados

O título de CLas nas folhas (antes da irrigação e chuvas) e nos brotos (depois da irrigação e chuvas) foram submetidos a análise de variância comparando o grupo de plantas que recebeu a irrigação com o grupo de plantas em condição de sequeiro. A frequência de amostras positivas para CLas foi comparada por meio do teste chi-

quadrado. Os dados de crescimento do broto foram submetidos a regressão linear simples. Nível de probabilidade de 5% foi usado nas análises.

3. RESULTADOS

3.1. Condições ambientais

O período que antecedeu o início do experimento foi marcado por pouca incidência e baixa intensidade de chuvas, com valores inferiores a 10 mm nos meses de junho, julho e agosto (Figura 3). Além de estarem expostas a um severo déficit hídrico, as plantas também estavam sujeitas à elevadas temperaturas. Os meses de setembro e outubro registraram temperaturas máximas mais altas, com média de 33,6°C, alcançando temperaturas acima de 38°C por mais de 7 dias seguidos.

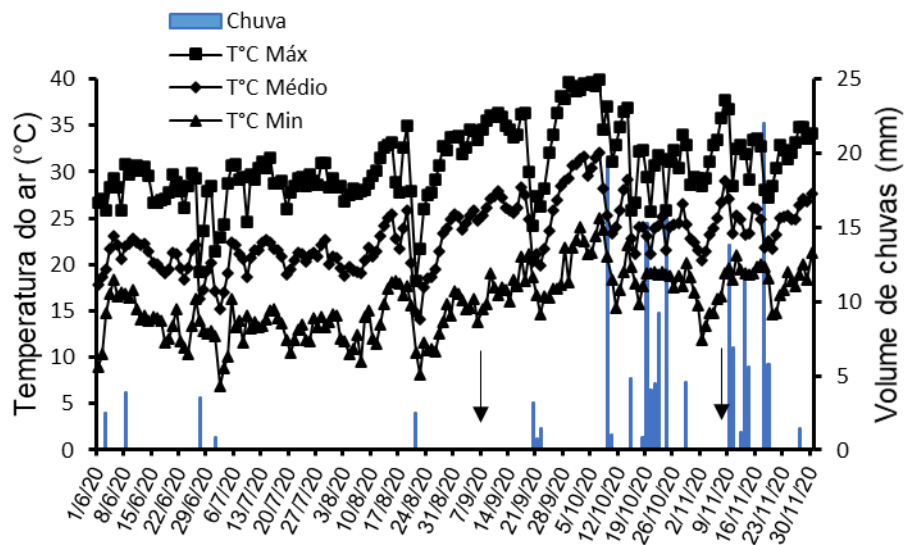


Figura 3. Temperatura máxima, média, mínima e volume de chuvas registradas no período avaliado (setembro a novembro de 2020) em Bebedouro, SP. As setas indicam o início e o fim do experimento.

3.2. Surgimento, crescimento e desenvolvimento de brotos após a hidratação

Uma semana após a irrigação, as plantas sintomáticas já haviam se recuperado da deficiência hídrica na parte assintomática da copa. As folhas se mostravam túrgidas. A parte sintomática dessas plantas não apresentava sinais de murcha antes da irrigação e permaneceram com o mesmo aspecto depois de hidratadas (Figura 4 A). Das plantas assintomáticas, metade havia se recuperado e outra metade permanecia com folhas murchas (Figura 4 B e C).



Figura 4. Plantas sintomáticas recuperadas do déficit hídrico (A), assintomáticas apresentando murcha (B) e recuperadas do déficit hídrico (C) de laranjeira ‘Valência’ enxertadas em citrumeleiro ‘Swingle’ 7 dias após a aplicação da irrigação na Fundação Coopercitrus Credicitrus.

Também se observou que a irrigação induziu brotação somente nas plantas sintomáticas (Figura 5 A), ao contrário das plantas assintomáticas, nas quais mesmo aquelas que se recuperaram após a irrigação, não houve emissão de brotos. Porém, para a segunda parte do experimento, a respostas das plantas foi diferente em relação as plantas da primeira parte. Com a chegada das chuvas no mês de outubro, que no final do mês havia acumulado 80 mm, houve recuperação da turgidez das folhas e emissão de brotos em todas as plantas, tanto nas assintomáticas quanto na parte assintomática das doentes (Figura 5 B).

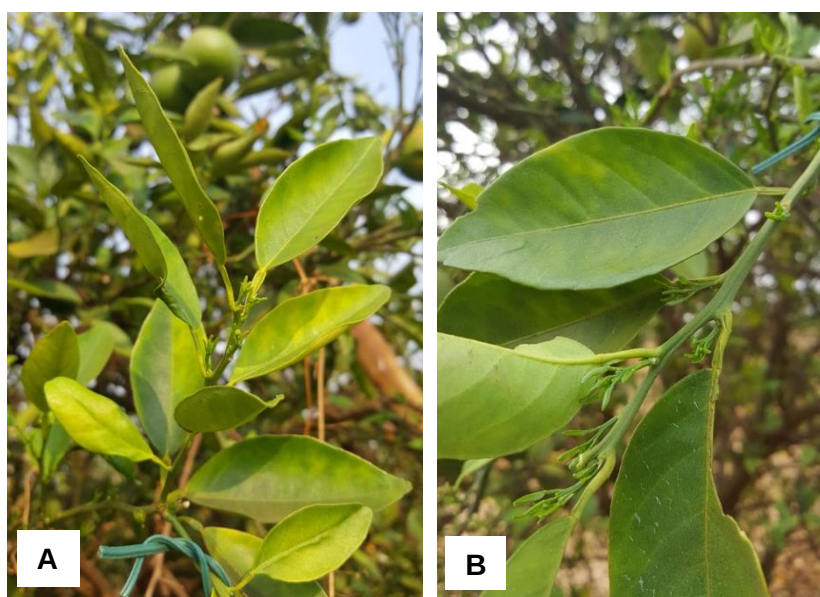


Figura 5. Brotações emitidas em plantas sintomáticas da área que recebeu irrigação¹ (A) e da área não irrigada² (B) do experimento em laranjeira ‘Valência’ enxertadas em citrumeleiro ‘Swingle’ após a irrigação e chuvas na Fundação Coopercitrus Credicitrus.

Os brotos de plantas sintomáticas em área não irrigada (parte 2) cresceram 11% menos do que os brotos de plantas assintomáticas (Figura 6 A). Em plantas assintomáticas irrigadas (parte 1) não foi possível realizar a medição em brotos de porque estas não emitiram brotações mesmo após a irrigação (Figura 6 B). Os brotos das plantas assintomáticas da área não irrigada alcançaram um valor médio de 15,66 cm e as sintomáticas 14,82 cm. Na área irrigada, as plantas sintomáticas alcançaram 14,64 cm de comprimento de broto, em média.

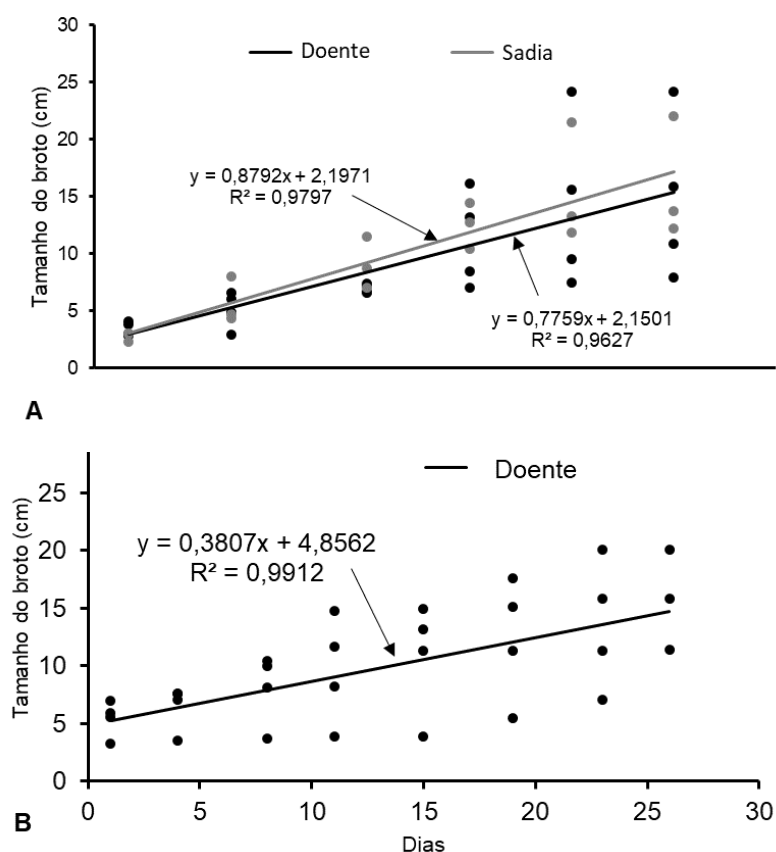


Figura 6. Crescimento de broto de plantas não irrigadas (A) (27/10/20 – 12/11/20) e irrigadas (B) (21/09/20 – 16/10/20) em laranjeira ‘Valência’ enxertadas em citrumeleiro ‘Swingle’ na Fundação Coopercitrus Credicitrus.

3.3. Título bacteriano nos brotos

Os títulos de CLas não diferiram entre plantas irrigadas e não irrigadas tanto antes como depois da irrigação e chuvas (Figura 7). Porém, a frequência de amostras positivas foi significativamente maior ($X^2 = 38,39$, $p < 0,001$) em plantas que não receberam irrigação e que brotaram apenas depois das chuvas (aproximadamente 49 dias depois de iniciado o experimento). Além disso, em amostras de brotos (depois da irrigação e chuva), a concentração da bactéria foi relativamente baixa.

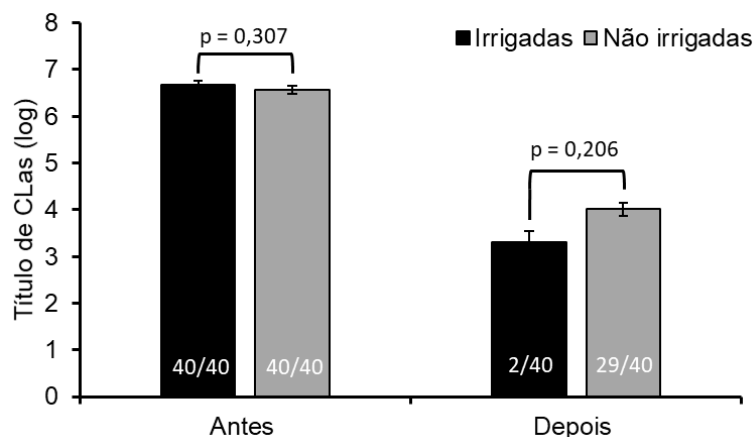


Figura 7. Título de *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) em folhas maduras (Antes) e brotos (Depois) de laranjeira 'Valência' enxertadas em citrumeleiro 'Swingle' e frequência de amostras positivas sobre o total de amostras (números na base das barras) antes e depois da irrigação e chuva.

4. DISCUSSÃO

Neste trabalho avaliamos o comportamento de plantas sintomáticas e assintomáticas de laranjeiras 'Valência' enxertadas em citrumeleiro 'Swingle' quanto a sua recuperação após a irrigação de 68 mm de água, emissão de novos brotos e título de CLas. A recuperação completa foi maior e mais rápida nas plantas sintomáticas do que nas assintomáticas. A infecção por HLB leva a redução do sistema radicular e consequentemente redução na absorção de água (Johnson et al. 2014). Mesmo com a capacidade de absorção comprometida, as plantas sintomáticas conseguiram recuperar a turgescência. Outra característica de plantas com HLB sintomáticas é o acúmulo de amido em todas as células fotossintéticas (Etxeberria et al., 2009), reduzindo, dessa forma, a fotossíntese nesses tecidos afetados. Quanto menor a taxa fotossintética, menor a absorção de água por esses tecidos. Além disso, Nehela et al. (2018) constataram que plantas afetadas por HLB tem maiores concentrações de ABA, que está relacionado ao fechamento estomático (Schroeder et al., 2001). Isso também levaria a menor absorção de água. Ou seja, plantas com

grande parte da sua copa expressando sintomas de HLB teriam elevado volume de tecido com suas funções alteradas, absorvendo menos água de forma geral. Então, o suprimento de água de uma planta sintomática poderia ser menor quando comparado a plantas assintomáticas.

Além de favorecer a recuperação da turgidez das folhas de plantas sintomáticas, a irrigação estimulou a emissão de brotos. É sabido que plantas expostas a deficiência hídrica tendem a lançar brotações novas quando há, novamente, disponibilidade de água. No entanto, no presente trabalho, as plantas assintomáticas não tiveram o mesmo comportamento das plantas sintomáticas. Nas plantas assintomáticas, apesar do fornecimento de água pela irrigação (68 mm), nenhuma delas emitiram brotos, mesmo naquelas onde houve recuperação da turgidez foliar. Uma possível explicação é a de que a deficiência hídrica das plantas assintomáticas era mais severa do que as sintomáticas, mesmo que visualmente umas e outras apresentassem aspectos semelhantes.

A diferença na resposta à irrigação de plantas assintomáticas e sintomáticas pode ser interessante do ponto de vista de manejo do pomar. A adição de irrigação, utilizando-se a quantidade de água ideal nos pomares poderia contribuir para o aprimoramento das medidas de controle e reduzir o avanço da doença, visto que as plantas assintomáticas não emitiram brotações e que o psílídeo é dependente dos novos brotos para alimentação e reprodução (Cifuentes-Arenas et al., 2018). No trabalho de Martini e Stelinski (2017), os autores verificaram que em plantas com 35-43% da capacidade de retenção de água do substrato foram menos atrativas a *D. citri* que as sadias. Nalam et al. (2020) em seu trabalho avaliando o comportamento alimentar do psílídeo da batata, com a presença ou não de *Candidatus Liberibacter solanacearum*, observaram redução da fase de salivação e ingestão de seiva do floema em plantas sob deficiência hídrica, independente da infecção. Além disso, o manejo adequado para as plantas afetadas por HLB levaria a uma maior conservação de água e contribuiria para redução de perdas de nutrientes (Kadyampakeni e Morgan, 2017).

Tanto as plantas sadias quanto as sintomáticas brotaram após a chegada das chuvas. Isso mostra que a disponibilidade hídrica é uma variável importante para emissão de brotos. Oliveira (2017) avaliou a dinâmica de brotações em diferentes

variedades de citros em área irrigada e não irrigada, e observou que a relação temperatura e precipitações pluviais exerciam maior influência sobre as brotações de laranjeira da área não irrigada em relação a irrigada. A emissão de brotações acontece naturalmente após as plantas passarem por um período de repouso vegetativo durante o outono e inverno e, a quebra de dormência ocorre quando há o aumento de temperatura associado ao início das chuvas da primavera (Davies e Albrigo, 1994).

Com relação ao crescimento dos brotos na área irrigada, este foi inferior nas plantas sintomáticas do que nas assintomáticas. Em plantas afetadas por HLB, a condutância estomática e a transpiração são reduzidas com consequente redução da taxa fotossintética (Silva et al. 2021). Além disso, a infecção causa obstrução dos vasos do floema pela deposição de calose ocasionando acúmulo de amido (Etxeberria et al., 2009). Isto resulta em um menor fornecimento de fotoassimilados para os novos brotos, comprometendo seu desenvolvimento.

Analizando o título bacteriano nos brotos, pode ser verificado que a população bacteriana estava em menores concentrações nos brotos novos após um período de deficiência hídrica. Isto ocorreu em brotos tanto na área irrigada quanto na não irrigada. Interessante notar que a frequência de amostras positivas em brotos foi mais baixa na área que recebeu irrigação em relação a área não irrigada. A redução no título bacteriano em brotos também foi observada por Lopes et al. (2017). Neste trabalho, a associação entre temperaturas acima de 30°C e baixa precipitação pluviométrica resultaram em menores concentrações de CLas em plantas de citros. A redução do título bacteriano pode estar relacionada a menores taxas de respiração (Cruz-Munoz et al., 2018), teores de amido (Silva et al., 2021) em plantas sob irrigação deficitária e impacto direto da temperatura sobre a célula bacteriana. Cruz-Munoz et al. (2018) sugerem que o citrato, produto do ciclo do ácido tricarboxílico (envolvido na respiração celular), é a principal fonte de energia para CLas. Altas concentrações de citrato foram encontradas na hemolinfa de psíldeo infectado com HLB e no floema de citros, reforçando a importância do citrato para CLas (Killiny, 2017; Killiny et al., 2017). Silva et al. (2021) verificaram altas taxas de respiração em plantas com HLB completamente irrigadas. Os autores sugerem que utilizando-se a irrigação deficitária, menor seria a taxa respiratória e, consequentemente, menor crescimento bacteriano. Esses mesmos autores observaram uma associação entre teor de amido e população

bacteriana. Plantas de citros com HLB submetidas a irrigação deficitária exibiram menores concentrações de amido e apresentaram redução da população bacteriana quando comparadas a plantas com HLB completamente irrigadas. No presente estudo, a não ocorrência de amostras positivas para HLB ocorreu quase que exclusivamente nas plantas na área irrigada. Isto pode ter acontecido devido as temperaturas mais elevadas no período de realização desse experimento (setembro-outubro) em comparação ao período do experimento não irrigado. A associação entre temperaturas elevadas e déficit hídrico pode ter favorecido a redução da população bacteriana nos brotos assim como foi observado por Lopes et al. (2017).

A partir do presente trabalho podemos inferir que a hidratação de plantas sintomáticas, previamente expostas a déficit hídrico severo favorecem a emissão de brotos. Mas isto reduz a probabilidade de que estes brotos estejam atuando como fonte de inóculo para disseminação da bactéria para plantas sadias, pois, a frequência de brotos com CLas foi baixa, como visto nesse trabalho, e dessa forma, desfavoreceria a aquisição da bactéria pelo psilideo e, conseqüentemente, a sua transmissão para plantas sadias. Além disso, os novos brotos que foram positivos para CLas continham baixa concentração da bactéria e isso também levaria a redução da aquisição pelo inseto vetor.

5. REFERÊNCIAS

Barros JRM, Barros ALM, Cyprian, MP (2016) **O mercado da citricultura no Brasil e suas novas perspectivas**. São Paulo: CitrusBr, 63 p.

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

Capoor SP, Rao DG, Viswanath SM (1974) Greening disease of citrus in the Deccan Trap Country its relationship with the vector, *Diaphorina citri* In: **International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings**. 43–49.

Cifuentes-Arenas JC, De Goes A, De Mira MP, BeattiemG AC, Lopes SA (2018) Citrus flush shoot ontogeny modulates biotic potential of *Diaphorina citri*. **PLoS One**, 13: e0190563.

CitrusBR - Associação Nacional dos Exportadores de Sucos Cítricos. (2021). Disponível em: <https://citrusbr.com/noticias/citricultura-gera-mais-de-38-mil-empregos-em-2020/>. Acesso em: 06 mai. 2021.

Cruz-Munoz M, Petrone JR, Cohn AR, Munoz-Beristain A, Killiny N, Drew JC, Triplett EW. (2018). Development of chemically defined media reveals citrate as preferred carbon source for *Liberibacter* growth. *Frontiers in microbiology*, 9, 668.

Davies FS, Albrigo LG (1994) Citrus. In: **Crop Production Science in Horticulture Series**, CAB International, Wallington. 134-135

Donato SLR, Pereira CS, Barros Z De J, Siqueira DL De E, Salomão LCC (2007) Respostas de combinações de variedades copa e porta-enxerto de citros à deficiência hídrica (Nota). **Pesquisa Agropecuária brasileira**. 42:1507-1510.

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.

FUNDECITRUS (2021) – PES. Disponível em:< https://www.fundecitrus.com.br/pdf/pes_relatorios/1221_Reestimativa_da_Safra_de_Laranja.pdf>. Acesso em: 20 dez 2021.

García-Sánchez F, Syvertsen JP, Gimeno V, Botía P, Perez-Perez JG (2007) Responses to flooding and drought stress by two citrus rootstock seedlings with different water-use efficiency. **Physiologia Plantarum**. 130:532-542.

Gomes MMA, Lagoa AMMA, Medina CL, Machado EC, Machado MA (2004) Interactions between leaf water potential, stomatal conductance and abscisic acid content of orange trees submitted to drought stress. **Brazilian Journal of Plant Physiology**. 16:155–166.

Hamido SA, Morgan KT, Kadyampakeni DM (2017) The effect of Huanglongbing on young citrus tree water use. **HortTechnology**. 27:659-665.

Jagoueix S, Bové JM, Garnier M (1984) The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the α subdivision of the proteobacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 44:379-386.

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

Kadyampakeni DM, Morgan KT (2017) Irrigation scheduling and soil moisture dynamics influence water uptake by Huanglongbing affected trees. **Scientia Horticulturae**. 224:272–279. doi: 10.1016/j.scienta.2017.06.037

Killiny N (2017) Metabolite signature of the phloem sap of fourteen citrus varieties with different degrees of tolerance to *Candidatus Liberibacter asiaticus*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. 97:20-29.

Killiny N, Hijaz F, El-Shesheny I, Alfaress S, Jones S E, Rogers ME (2017). Metabolomic analyses of the haemolymph of the Asian citrus psyllid *Diaphorina citri*, the vector of huanglongbing. **Physiological Entomology**. 42:134-145.

Köppen W, Geiger R (1928) *Klimate der Erde*. Gotha: Verlag Justus Perthes. 1928. Wall-map 150cmx200cm.

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

Lopes SA, Luiz FQ, Oliveira HT, Cifuentes-Arenas JC, Raiol-Junior LL (2017) Seasonal Variation of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' Titers in New Shoots of Citrus in Distinct Environments. **Plant Disease**. 101:583-590.

Martini X, Stelinski LL (2017) Drought stress affects response of phytopathogen vectors and their parasitoids to infection-and damage-induced plant volatile cues. **Ecological Entomology**. 42:721-730.

Medina CL, Castro PRC, Kluge RA, Sestari I (2008) Citros. In: castro, PRC, Kluge, RA, Sestari, I (Ed.). **Manual de fisiologia vegetal: fisiologia de cultivos**. Piracicaba: Ceres. 864.

Murray MG, Thompson W F (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**,. 8:4321–4326.

Nalam VJ, Han J, Nachappa P, Szczepaniec, A (2020) Drought stress and pathogen infection alter feeding behavior of a phytopathogen vector. **Entomologia Experimentalis et Applicata**. 168:588-598.

Nehela Y, Hijaz F, Elzaawely AA, El-Zahaby HM, Killiny N (2018) Citrus phytohormonal response to *Candidatus Liberibacter asiaticus* and its vector *Diaphorina citri*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. 102:24–35. doi:10.1016/j.pmpp.2017.11.004

Oliveira HT (2017) **Dinâmica de brotação em diferentes combinações de copa e porta-enxerto de citros em área irrigada e não irrigada**. 37 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Controle de Doenças e Pragas dos Citrus) - Fundecitrus, Araraquara-SP.

Peixoto CP, Cerqueira EC, Soares Filho WS, Castro Neto MT, Ledo CAS, Matos FS, Oliveira JG (2006). Análise de crescimento de diferentes genótipos de citros cultivados sob déficit hídrico. **Revista Brasileira de Fruticultura**. 28:439-443, 2006.

Pérez-Pérez, JG, Robles JM, Botía, P (2009) Influence of deficit irrigation in phase III of fruit growth on fruit quality in 'lane late' sweet orange. ***Agricultural Water Management***, 96:969-974.

Reuther W (1973) Climate and citrus behavior In *The Citrus Industry*, Vol III. Ed. W Reuther. Univ. California, Div. Agric. Sci, California, USA.

Ribeiro RV, Machado EC, Brunini O (2006) Ocorrência de condições ambientais para a indução do florescimento de laranjeiras no Estado de São Paulo. ***Revista Brasileira de Fruticultura***. 28:247-253.

Schroeder JI, Allen GJ, Hugouvieux V, Kwak JM, Waner D (2001) Guard cell signal transduction. ***Annual review of plant biology***. 52:627–658.

Silva JRD, Boaretto, RM, Lavoretti JAL, Dos Santos BCF, Coletta-Filho HD, Mattos Jr D (2021) Effects of Deficit Irrigation and Huanglongbing on Sweet Orange Trees. ***Frontiers in plant science***, 2228.

Syvertsen JP, Lloyd J, Kriedemann PE (1988) Salinity and drought stress effects on foliar ion concentration, water relations, and photosynthetic characteristics of orchard citrus. ***Australian Journal of Agricultural Research***. 39:19-627.

Teixeira DCD, Danet L, Eveillard S, Martins EC, De Jesus Junior WC, Yamamoto PT, Bové, JM (2005) Citrus huanglongbing in Sao Paulo State, Brazil: PCR detection of the 'Candidatus' Liberibacter species associated with the disease. ***Molecular and cellular probes***, 19:173-179.

CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

O Huanglongbing (HLB) é a doença mais importante dos citros por impactar negativamente todas as cultivares comerciais existentes que, em vista da necessidade de adoção de medidas drásticas de manejo, tem levado à eliminação de dezenas de milhões de árvores sintomáticas e consequente perdas de produção. Neste estudo procuramos entender, ao menos em parte, como o déficit hídrico (provocado por irrigação deficitária ou chuvas escassas) poderia estar influenciando a ocorrência e desenvolvimento de brotos (locais preferidos do inseto vetor para alimentação e reprodução), multiplicação da bactéria causadora do HLB e aquisição da mesma pelo inseto vetor, e como isto poderia explicar as variações observadas nas taxas de disseminação da doença, historicamente menores no extremo norte do parque citrícola. O que nos levou conduzir este estudo foram as evidências detectadas em estudos anteriores que indicavam haver forte influência do déficit hídrico (associado a altas temperaturas) na redução da população bacteriana em brotos, explicando as diferenças marcantes na incidência da doença em todo o parque citrícola. O estudo foi conduzido com mudas e plantas adultas de laranjeira ‘Valência’ sadias e doentes, em ambiente fechado (sala com fotoperíodo controlado), semiaberto (casa de vegetação) e aberto (campo), em duas épocas do ano de 2020.

De forma geral, não houve impacto significativo do déficit hídrico sobre os parâmetros avaliados nos ambientes fechado e semiaberto, com exceção da taxa de aquisição da bactéria do HLB, que foi menor nas plantas sob déficit. Maior impacto sobre os parâmetros exerceu a própria doença que, independentemente do nível de déficit, estimulou a ocorrência de brotos (que surgiram mais rápido nas doentes), o seu crescimento e desenvolvimento (mais rápido nas doentes), e tamanho final (menor nas doentes). No campo, no norte de SP, a ‘quebra’ do déficit por meio de irrigação e depois por chuvas, e em período de altas temperaturas, estimulou a ocorrência de brotos, mas em maior quantidade em plantas doentes. Porém, os brotos que surgiram nessas plantas apresentaram baixa incidência da bactéria quando comparado com a incidência antes da ‘quebra’, quando as plantas manifestavam sintomas severos de déficit hídrico. Dessa forma, se os resultados deste estudo refletem em sua totalidade o que ocorre no campo, é de se esperar que o déficit hídrico

(e sua quebra) esteja afetando a disseminação do HLB, atuando mais diretamente sobre o tamanho da população do inseto vetor infectivo do que nos demais componentes do patossistema. Ao provocar menores taxas de aquisição e, com sua 'quebra', levar a menores frequências de brotos com a bactéria, provoca por consequência, menores populações do inseto capazes de disseminar a doença. Como nas regiões norte e noroeste do parque citrícola as incidências de HLB sempre foram menores que nas demais, podemos concluir que estas menores incidências poderiam ter resultado das menores populações de psílídeos infectivos, resultado de (i) menores populações da bactéria nos brotos (observado em estudos anteriores, onde as altas temperaturas eram significativamente maiores que as testadas neste estudo) e (ii) menores habilidades do inseto em adquirir a bactéria.