

**FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA
MESTRADO PROFISSIONAL EM
CONTROLE DE DOENÇAS E PRAGAS DOS CITROS**

LUIZ HENRIQUE MONTESINO

**Evolução dos sintomas de Huanglongbing em laranjeiras jovens:
relação com época do ano, fenologia das plantas, flutuação
populacional de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera:
Psyllidae) e medidas de controle do vetor**

Dissertação apresentada ao Fundo de Defesa da
Citricultura como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Fitossanidade

Orientador: Dr. Renato Beozzo Bassanezi

**Araraquara
Novembro 2011**

LUIZ HENRIQUE MONTESINO

**Evolução dos sintomas de Huanglongbing em laranjeiras jovens:
relação com época do ano, fenologia das plantas, flutuação
populacional de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera:
Psyllidae) e medidas de controle do vetor**

Dissertação apresentada ao Fundo de Defesa da
Citricultura, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Fitossanidade

Orientador: Dr. Renato Beozzo Bassanezi

**Araraquara
Novembro 2011**

LUIZ HENRIQUE MONTESINO

Evolução dos sintomas de Huanglongbing em laranjeiras jovens: relação com época do ano, fenologia das plantas, flutuação populacional de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) e medidas de controle do vetor

Dissertação apresentada ao Fundo de Defesa da
Citricultura, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Fitossanidade

Araraquara, 29 novembro de 2011.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Renato Beozzo Bassanezi
Fundo de Defesa da Citricultura – FUNDECITRUS, Araraquara

Dr. Sílvio Aparecido Lopes
Fundo de Defesa da Citricultura – FUNDECITRUS, Araraquara

Dra. Lilian Amorim
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - ESALQ/USP, Piracicaba

“...Saudade é amar um passado que ainda não passou,
É recusar um presente que nos machuca,
É não ver o futuro que nos convida...”

Pablo Neruda

Dedico

Aos meus amados pais, José Luiz Montesino e Maria das Graças Mochetti Montesino, por terem me concedido a oportunidade de viver. Pelo exemplo de vida e união. Sem vocês jamais seria ou estaria onde estou! Muito Obrigado!

Ofereço

A minha querida irmã Elisandra!

Aos meus sobrinhos Andrew, Alisson e Raul!

Aos meus cunhados Fábio, Elisandro e Giseli

Aos meus sogros Nelson e Lair

Aos meus adorados avós paternos José Montesino e Encarnação Garcia Montesino e maternos Alberto Mochetti e Maria do Carmo Primani Mochetti, de onde estiverem sempre estarão olhando por mim!

Agradeço

Agradeço a minha amada esposa Andréa, pela paciência e compreensão por estes anos que estamos juntos, sempre me apoiando e me amando em todas as horas. Seu apoio e amor são fundamentais.

TE AMO!!!

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Renato Beozzo Bassanezi pela orientação, ensinamentos, condições de trabalho e pela oportunidade de ter realizado este mestrado que contribuiu muito para minha vida profissional e pessoal, e, acima de tudo, pela confiança em mim depositada.

Aos Membros da banca examinadora, Dra. Lilian Amorim e Dr. Sílvio A. Lopes, pelas valiosas sugestões e contribuições para a redação final desta dissertação.

Ao Fundecitrus por meio do Gerente do Departamento Científico, MSc. Antônio Juliano Ayres, e especialmente ao pesquisador Dr. Pedro Takao Yamamoto, pela oportunidade de estágio durante minha graduação, que foi o responsável pelo meu primeiro contato com a citricultura.

A todos os pesquisadores do Departamento Científico, José Belasque, Marcel, Diva, Nelson, Silvio Lopes, Marcelo Miranda, Geraldo, Franklin e Newton e às secretárias do Departamento Científico, Célia e Priscilla, aos companheiros e ex-companheiros de trabalho, Marcos Rogério Felipe, Guilherme Fernando Frare, Júlio César Rodrigues, Denis Rogério Marin, Fabrício José Jaciani, Carlos Henrique Lopes, Michele do Carmo, Juliana Coelho, Mateus de Almeida Santos, Rodrigo Caldeira, Flavia Helena, André Luis Sanches, Tiago, Elaine, Daniel Perone, Paula, José Figueira, José Rodrigues, Marcela, Paschoal, Artur, Vitor, Gabriel Reis, Gabriel Rugno, Rodrigo Neves, Gustavo, Helber, Rodrigo Toloy, Juliana, Fernanda, Fernanda Polverari, Nivian, Alexandre, Maria Cândida, Silvia Aline, Ricardo, Mamprin, Edinei, Wellington, Rejane, Waner, Deividson, Eder, Sidnei, Thaís, Tamiris, Teresa, Ana Carolina, Daniela, Miguel, Ricardo Rafael, Jean, Rafael Garcia, Luis, Anélio, Daniel, Antônio, Vera, Renata, Marinete, Luis Canuto, Anderson e Luis Fernando.

A todos que fazem parte ou já fizeram parte da equipe de pesquisa da área de Epidemiologia, Gabriela Helena Rodrigues, Cláudio, Aldo, Paulo, Fábio, Carlos, José Luiz, Murilo, Adriano, Adriano Alves, Wanderson, José Carlos, Hermelindo, Marcelo e Roberto.

Ao proprietário da área cedida onde foi realizado o experimento e o administrador Romárcio, muito obrigado pelo apoio.

Aos Professores do curso de Mestrado Profissional em Controle de Doenças e Pragas dos Citros pelos ensinamentos passados, pois foi um privilégio ter acesso aos seus conhecimentos.

Aos amigos de Pós-Graduação, e à secretária e amiga da Pós-Graduação Cláudia Daniele de Souza por todo o apoio.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a concretização deste sonho.

**Evolução dos sintomas de Huanglongbing em laranjeiras jovens:
relação com época do ano, fenologia das plantas, flutuação
populacional de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera:
Psyllidae) e medidas de controle do vetor**

Autor: LUIZ HENRIQUE MONTESINO

Orientador: Prof. Dr. RENATO BEOZZO BASSANEZI

RESUMO

O Huanglongbing (HLB), de difícil controle, causa consideráveis danos na produção citrícola onde ocorre de forma endêmica. No estado de São Paulo há duas espécies de *Liberibacter* associadas ao HLB e transmitidas pelo psilídeo asiático dos citros, *Diaphorina citri*. Observações no campo sugerem que as plantas com HLB podem sofrer alterações na ocorrência e duração dos seus estádios fenológicos, podendo representar um fator a mais de atração aos psilídeos, aumentando as chances de aquisição da bactéria, conferindo às plantas doentes com ramos sintomáticos ou não uma maior importância para a epidemia. Um estudo do comportamento fenológico de plantas sintomáticas e da sua atratividade relativa aos psilídeos poderia confirmar ou não estas suspeitas. Adicionalmente, para o controle da doença é recomendada a eliminação de plantas sintomáticas após sua detecção no campo. Entretanto, os sintomas iniciais da doença em plantas jovens podem não ser típicos e gerar dúvidas na diagnose como também variar de acordo com a época de aparecimento ou estágio fenológico das plantas. Desta forma, é necessária a caracterização dos sintomas do HLB em plantas jovens em diversas épocas e estádios fenológicos da planta para auxiliar a identificação das plantas doentes no início da expressão dos sintomas no campo. Por fim, não se conhece o efeito da época do ano em que os sintomas são detectados e se desenvolvem e, nem das medidas de controle do inseto vetor, sobre a velocidade de progresso da severidade dos sintomas de HLB, necessitando serem quantificados. Assim, os objetivos desse estudo foram comparar a população de psilídeos em ramos de plantas doentes com e sem sintomas e em ramos de plantas aparentemente saudáveis; comparar os estádios fenológicos de plantas com sintomas e de plantas saudáveis em duas épocas do ano; caracterizar os sintomas da doença e relacioná-los com os estádios fenológicos das plantas no decorrer do ano; e avaliar a velocidade de progresso dos sintomas em plantas com e sem tratamento de inseticidas, em

duas épocas do ano. O estudo foi realizado no município de Motuca-SP, em uma área plantada em maio de 2006 com laranjeira ‘Valência’ enxertada sobre limoeiro ‘Cravo’, sendo metade das plantas tratadas com inseticidas para o controle de psilídeos e a outra metade sem aplicação de inseticidas. As avaliações foram feitas em dois períodos: junho a novembro de 2009 e dezembro de 2009 a junho de 2010. Não se observou maior preferência de *D. citri* pelas plantas com HLB em relação às plantas saudas; as plantas doentes apresentaram brotações adiantadas e maior número de floradas e brotações que as plantas saudas, e os frutos produzidos nestes florescimentos não chegaram a atingir a maturação. Quanto ao progresso dos sintomas, foi observado que sintomas foliares iniciaram-se com amarelecimento da nervura central evoluindo para mosqueado difuso assimétrico e que esse desenvolvimento aparentemente não dependeu do estágio fenológico; a deficiência de zinco foi relacionada ao aumento da severidade; a presença de plantas com frutos deformados ocorreu durante todo o ano numa frequência alta, sendo útil para a identificação de plantas com HLB, e que os frutos formados nas plantas doentes no segundo semestre tiveram maior chance de serem colhidos, enquanto os formados na florada seguinte tiveram maior índice de queda antes da colheita. A avaliação do progresso da severidade de HLB foi prejudicada pela desfolha e pela emissão de novas brotações nas plantas afetadas. Plantas doentes primeiramente detectadas em dezembro apresentaram maior severidade inicial dos sintomas de HLB que plantas detectadas em junho, mas a severidade inicial dos sintomas foi independente do controle do vetor em ambos os períodos. A velocidade de aumento da severidade no início do primeiro semestre foi maior que no início do segundo, entretanto, devido à desfolha, a severidade final nos dois períodos foi a mesma. Por sua vez, o controle do inseto vetor reduziu a velocidade de aumento da severidade de HLB em ambos os períodos.

Palavras chave: Greening, *Candidatus Liberibacter asiaticus*, sintomatologia, psilídeo asiático dos citros, citros, severidade de doença, epidemiologia

Huanglongbing symptom progress in young sweet orange trees: relation with the season, plant phenology, population fluctuation of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), and vector control practices

Author: LUIZ HENRIQUE MONTESINO

Advisor: Prof. Dr. RENATO BEOZZO BASSANEZI

ABSTRACT

Huanglongbing (HLB), a citrus disease of difficult control, has caused substantial damages to citrus yield where it is endemic. There are two species of *Liberibacter* associated with HLB, both transmitted by the Asian citrus psyllid *Diaphorina citri*. Field observations suggest that plants affected by HLB may experience changes in the occurrence and duration of their phenological stages that could represent an additional factor to the attraction of psyllids, increasing the chances of bacterium acquisition and giving to the infected plant, with or without symptomatic branches, a major role in the epidemics. A study of the phenological behavior of symptomatic plants and the quantification of their relative attractiveness to psyllids could confirm or not these suspicions. In addition, it is recommended the elimination of symptomatic trees after their detection in the field to manage the disease. However, initial symptoms of young trees couldn't be typical and raise doubt on diagnosis and also be variable according to time of onset and tree phenological stage. Therefore the HLB symptoms characterization in young citrus trees in different seasons and tree phenological stages is necessary to help the identification of diseased trees at the early stages of symptoms expression in the field. Finally, the effect of season when the first symptoms are observed and developed and the effect of insect vector control on the rate of HLB-symptoms severity progress are not known and need to be quantified. Therefore, the aims of this study were to compare the psyllids population density in symptomatic and asymptomatic disease plants and "healthy" plants; to compare their phenological stages in two seasons; to characterize the symptoms of the disease and to relate them with plant phenological stages during the year; and to assess the rate of disease severity progress in plants with and without insecticide treatments in two seasons. The work was carried out in the municipality of Motuca-SP, in a grove of Valencia sweet orange grafted on Rangpur lime planted in May 2006. Half of the

plants were treated and the other half not treated with insecticides for psyllids control. Assessments were made in two seasons: from June to November 2009 and from December 2009 to June 2010. Disease and healthy trees did not differ in attractiveness to *D. citri*. Diseased plants had earlier vegetative fluxes and higher number of blossoms and shootings than healthy plants, and the fruit set on those off-season flowering did not mature. Concerning symptoms progress, it was observed that leaf symptoms began with yellow central vein and progress to leaf blotch mottling without any apparent relation to plant phenology stage. Zinc deficiency symptoms appeared when disease severity was higher. Lopsided fruits occurred all year long and at high frequency, being useful in HLB identification in the field. The fruit that set on diseased plants in the second semester had higher chance to remain until harvest, whereas the fruit that set in the next blossom had higher chance to fall before harvest. The assessment of HLB severity progress was prejudiced by defoliation and the appearance of new shootings in the diseased plants. Diseased plants first detected in December had higher initial HLB severity than those detected in June, but the initial severity was independent to insect vector control in both seasons. The diseased severity rate at the beginning of the first semester was higher than that assessed at the beginning of the second semester. However, because of defoliation the disease severities found at the end of both semesters were similar. The progress of HLB severity rates were reduced by insect vector control in both seasons.

Keywords: Greening, *Candidatus Liberibacter*, symptomatology, citrus Asian psyllid, citrus, disease severity, epidemiology

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	VI
ABSTRACT	VIII
1 INTRODUÇÃO	1
2 MATERIAL E MÉTODOS	4
2.1 Área experimental	4
2.2 Tratamentos para controle de pisilídeos	5
2.3 Seleção das plantas sadias e com HLB para as avaliações	5
2.4 Avaliações	7
2.5 Análise de dados	15
2.5.1 Comparação da densidade populacional de <i>Diaphorina citri</i> em plantas com e sem sintomas de HLB.....	15
2.5.2 Comparação dos estádios fenológicos de plantas com sintomas de HLB e de plantas assintomáticas em duas épocas do ano.....	16
2.5.3 Caracterização dos sintomas da doença em função da época do ano e do estágio fenológico das plantas com sintomas de HLB.....	16
2.5.4 Avaliação do progresso da severidade dos sintomas nas plantas doentes, em parcelas com e sem tratamento com inseticidas, em duas épocas do ano.....	16
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
3.1 Comparação da densidade populacional de <i>Diaphorina citri</i> em plantas com e sem sintomas de HLB	17
3.2 Comparação dos estádios fenológicos de plantas com sintomas de HLB e de plantas assintomáticas em duas épocas do ano	24
3.3 Caracterização dos sintomas da doença em função da época do ano e do estágio fenológico das plantas com sintomas de HLB	30
3.3.1 Progresso dos sintomas foliares e em ramos e relação com os estádios fenológicos das plantas.....	30
3.3.2 Progresso dos sintomas em frutos e relação com os estádios fenológicos das plantas.....	37
3.4 Progresso da severidade dos sintomas nas plantas doentes, em parcelas com e sem tratamento com inseticidas, em duas épocas do ano	40
4 CONCLUSÕES	44
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

1. INTRODUÇÃO

A citricultura é uma das atividades agrícolas de maior relevância no mundo, ocupando uma posição de destaque na economia brasileira, seja pela comercialização de frutos “in natura”, seja pela exportação de sucos concentrados. O Brasil é responsável por 26% da produção mundial de laranja e 53% do total de suco de laranja consumido no planeta, um dos mais importantes itens de exportação do país. O estado de São Paulo responde por três quartos da produção e da área dedicada à citricultura no país, sendo a principal zona de exportação de suco de laranja concentrado (FCOJ) do mundo (Neves, 2010).

Entretanto, nos últimos anos esta supremacia e competitividade da citricultura paulista vem sendo ameaçada pela ocorrência de diversas pragas e doenças nos pomares. Entre as diversas doenças que afetam a citricultura paulista, Huanglongbing (HLB ou Greening) é considerada uma das mais destrutivas. Os danos causados por HLB na produção são bastante consideráveis, sendo apontada em alguns países da Ásia e da África como a principal causa da perda de produção e de árvores (Da Graça, 1991; Aubert, 1992). Além disso, o seu controle é muito complexo, demanda muito esforço por parte dos citricultores e tem onerado os custos de produção de vários países onde ocorre de forma endêmica (Da Graça, 1991; Aubert, 1992; Bové, 2006).

Esta doença foi relatada pela primeira vez na China no final do século XIX, disseminando-se por vários países do Sudeste Asiático, e constatada na África do Sul no início do século XX, atingindo também diversos países do Leste Africano e do Oriente Médio (Da Graça, 1991). No início do século XXI, a doença foi relatada pela primeira vez no continente Americano, atingindo as principais regiões produtoras de citros do mundo, os estados de São Paulo no Brasil, e da Flórida nos EUA. Também se disseminou rapidamente para outros estados destes países e por diversos países da América Central e Caribe (Bové, 2006). No Brasil, a doença foi constatada em 2004 em diversos pomares do estado de São Paulo, principalmente na região central, próximos à Araraquara (Coletta-Filho *et al.*, 2004; Teixeira *et al.*, 2005). Após sua constatação, a doença rapidamente se disseminou por todas regiões cítricas do estado, atingindo em 2011, 53% dos talhões comerciais de laranjeira e 3,8% de plantas (Fundecitrus, 2011).

Em São Paulo, duas bactérias estão associadas aos sintomas de HLB: *Candidatus Liberibacter asiaticus* e *Ca. L. americanus* (Coletta-Filho *et al.*, 2004; Teixeira *et al.*, 2005), sendo a primeira espécie predominante nos pomares (Lopes *et al.*, 2009a). Adicionalmente, um fitoplasma do Grupo IX tem sido encontrado nos pomares associado a sintomas muito

similares aos de HLB, mas sua ocorrência nas amostras analisadas é inferior a 2% (Teixeira *et al.*, 2008).

As duas espécies de *Liberibacter* associadas ao HLB no estado de São Paulo são transmitidas pelo psilídeo dos citros, *Diaphorina citri* Kuwayama (Capoor *et al.*, 1967; Yamamoto *et al.*, 2006). Este psilídeo tem mais de 50 espécies hospedeiras conhecidas, todas da família Rutaceae (Halbert & Manjunath, 2004), mas as preferenciais são as plantas dos gêneros *Citrus* e *Murraya*, também hospedeiras das bactérias (Halbert & Manjunath, 2004; Lopes *et al.*, 2005; Lopes *et al.*, 2006).

Quanto à preferência do psilídeo pelos órgãos da planta cítrica, sabe-se que o adulto pode se alimentar tanto em folhas novas e tenras como em folhas maduras, preferindo as brotações jovens onde se desenvolvem de ovo até a fase adulta (Paiva, 2009; Parra *et al.*, 2010). Observações preliminares em condições de laboratório indicam que plantas sintomáticas atraem mais os adultos de *D. citri* que plantas assintomáticas ou sadias pela possível emissão de voláteis atraentes pelas plantas doentes (Noronha Jr., 2010; Miranda *et al.*, 2011). Outros fatores também podem estar associados à maior atração de adultos pelas plantas com sintomas de HLB. Algumas observações preliminares no campo sugerem que as plantas afetadas pelo HLB podem sofrer alterações na sua fenologia, tanto nos ramos sintomáticos como nos ramos assintomáticos, como alteração do padrão vegetativo, com emissões de fluxos vegetativos amarelados e fora de época, ou alteração do padrão de amadurecimento dos frutos nos ramos afetados. A alteração no padrão vegetativo, poderia representar um fator a mais de atração, aumentando as chances de aquisição da bactéria por adultos e sua prole, conferindo às plantas doentes, com ramos sintomáticos ou não, uma maior importância para a epidemia de HLB. Assim, estudos sobre o comportamento fenológico de plantas sintomáticas e a quantificação da sua atratividade relativa aos psilídeos poderiam confirmar ou não estas suspeitas. Caso confirmada a maior atração do psilídeo pelas plantas sintomáticas, a eliminação imediata das mesmas, como prevê a Instrução Normativa 53, torna-se ainda mais importante para o manejo desta doença.

A eficiência do controle do HLB baseado na eliminação de plantas doentes exige o rápido e acurado reconhecimento dos sintomas iniciais da doença pelos inspetores. O sintoma que mais chama a atenção no campo é a presença de um ou mais ramos com as folhas amareladas, contrastando com a cor verde normal das folhas dos demais ramos. Com nervura central normalmente espessa e saliente, estas folhas apresentam mosqueado difuso e assimétrico entre as duas metades do limbo foliar divididas pela nervura central. É comum encontrar folhas com deficiência de zinco induzida pela doença. A partir dos ramos

inicialmente afetados, os sintomas podem progredir para toda a copa. Com a evolução dos sintomas, há intensa desfolha dos ramos afetados e seca dos ponteiros. Os frutos de ramos afetados são menores, deformados, assimétricos, a coloração da casca é irregular, com presença comum de sementes abortadas, e queda precoce (Da Graça, 1991; Aubert, 1992; Bové, 2006; Gottwald *et al.*, 2007). Entretanto, os sintomas iniciais podem não ser típicos e gerar dúvidas na diagnose como também variar de acordo com a época de aparecimento ou o estágio fenológico das plantas. Desta forma, um estudo que se faz necessário é a caracterização dos sintomas do HLB em diversas épocas e estádios fenológicos da planta para auxiliar as inspeções e melhorar a identificação das plantas doentes no início da expressão dos sintomas.

O aparecimento de novas plantas com sintomas tem se concentrado entre os períodos de outono e inverno, época considerada a mais favorável para a expressão dos sintomas, mesmo que a infecção tenha ocorrido em diferentes épocas (Gottwald *et al.*, 2007; Bassanezi *et al.*, 2010). Uma vez que os sintomas aparecem em plantas jovens, a evolução dos mesmos é rápida (Gottwald *et al.*, 2007; Bassanezi *et al.*, 2010). Entretanto, não se conhece o efeito da época do ano em que os sintomas são detectados visualmente e se desenvolvem sobre a velocidade de progresso da severidade dos sintomas de HLB, assim como o efeito das medidas de controle do inseto vetor.

Em função do exposto, este trabalho teve como objetivos, em condições de campo, (i) Comparar a densidade populacional de psílídeos em plantas com sintomas e em plantas assintomáticas; (ii) Comparar a ocorrência e duração dos estádios fenológicos de plantas com sintomas e de plantas assintomáticas em parcelas com aplicações de inseticidas para controle do inseto vetor em duas épocas do ano; (iii) Caracterizar os sintomas de HLB em função da época do ano e do estágio fenológico das plantas em parcelas com aplicações de inseticidas e (iv) Avaliar o progresso da severidade dos sintomas em plantas de parcelas com e sem aplicações de inseticidas, em duas épocas do ano.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Área experimental

O presente estudo foi realizado na Fazenda São José, localizada no município de Motuca-SP, entre junho de 2009 e junho de 2010.

A área utilizada para o estudo foi plantada em maio de 2006 com mudas de laranjeira ‘Valência’ [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] enxertada em limoeiro ‘Cravo’ (*Citrus limonia* Osbeck), no espaçamento de 6,65 m por 2,90 m, ocupando uma área de aproximadamente 26 ha. Este plantio foi feito para outro experimento maior para avaliar diferentes estratégias de controle do HLB baseadas em diferentes frequências de remoção de plantas doentes e de controle do vetor. A área era composta por 24 parcelas distribuídas aleatoriamente, sendo metade submetida à aplicação de inseticidas para o controle de psilídeos e a outra metade sem aplicação de inseticidas (Figura 1). Cada parcela, de aproximadamente 1,0 ha, era constituída por 18 linhas de plantio com 28 plantas cada (504 plantas/parcela).



Figura 1. Vista aérea da área experimental na Fazenda São José, município de Motuca-SP, indicando as parcelas com programa de controle de psilídeos (quadrados vermelhos) e sem aplicação de inseticidas (quadrados brancos). Imagem do Google Earth em 19/07/2007 (Latitude 21°35'52,69"S, longitude 48°10'41,17"O e altitude de visão de 1,38 km).

2.2 Tratamentos para o controle de psilídeos

Desde o plantio, nas parcelas com o controle de psilídeos, foi realizado um programa de aplicação foliar alternada de três inseticidas de diferentes grupos químicos (Imidacloprido 200 SC - Neonicotinóide, Dimetoato 400 CE – Organofosforado e Etofenproxi 300 CE - Norpiretro) e de dois inseticidas sistêmicos aplicados no solo ou em *drench* (Aldicarbe 150 G – Carbamato e Tiametoxam 10 GR ou 250 WG - Neonicotinóide) em esquema de calendário com intervalos de aplicação pré-definidos. Os inseticidas pulverizados sobre as folhas foram aplicados a cada 14 dias, do final de março ao final de novembro, sempre seguindo um rodízio entre os ingredientes ativos. Os inseticidas sistêmicos foram aplicados no solo ou em *drench* em intervalos de 56 dias, sendo uma aplicação no início de dezembro (nos três primeiros anos com Aldicarbe via solo e no quarto ano com Tiametoxam via *drench*) e outra no início de fevereiro (nos dois primeiros anos com Tiametoxam formulação GR via solo e nos dois anos seguintes com formulação WG via *drench*). No período de aplicação dos inseticidas via solo e em *drench*, não houve a aplicação de inseticidas por pulverização foliar.

Os inseticidas pulverizados nas folhas foram aplicados nos dois primeiros anos com aplicador do tipo “Pistola” com bico de cerâmica FMC n.6 sem difusor, na pressão de 50 a 90 lbf/pol² e, nos dois últimos anos, com turbopulverizador FMC 2000 acoplado a trator Massey Ferguson _MF 275, na velocidade de 3 a 4 km/h, segunda marcha reduzida alta, com 540 rpm na TDP e na pressão de 250 lbf/pol² e equipado com bicos de cerâmica FMC n.6 e difusores cerâmicos de dois e de três furos alternados na barra de pulverização.

As aplicações dos inseticidas sistêmicos no solo e em *drench* foram da seguinte forma: (i) Aplicação de granulados no solo feita com matraca Mebuki com capacidade de 4 kg regulada para dividir a dose do produto em duas batidas por planta no primeiro ano e em quatro batidas por planta no segundo e terceiro anos; (ii) Aplicação no colo da planta em *drench* com equipamento dosador automático acoplado à saída do tanque de pulverização.

2.3 Seleção das plantas sadias e com HLB para as avaliações

Nas parcelas cuja erradicação de plantas com sintomas de HLB era realizada a cada seis meses (três com controle de psilídeo e três sem controle de psilídeo) foram selecionadas ao acaso 30 plantas aparentemente sadias (sem sintomas) e 30 plantas com sintomas iniciais de HLB. As plantas com sintomas foram aquelas encontradas na primeira inspeção visual realizada imediatamente após a última erradicação de plantas com HLB. O acompanhamento das plantas selecionadas ocorreu por um período de seis meses até sua erradicação, conforme a programação do experimento principal.

O experimento foi executado em duas épocas, nas quais novas plantas foram selecionadas: Primeiro período, com plantas sintomáticas e assintomáticas encontradas em 08 de junho de 2009 e erradicadas em 26 de novembro de 2009, e segundo período, com plantas sintomáticas e assintomáticas encontradas em 24 de novembro de 2010 e erradicadas em 19 de maio de 2010.

Todas as plantas com sintomas foram posteriormente analisadas por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para confirmação da sua infecção pelas bactérias associadas ao HLB seguindo o protocolo descrito a seguir. Amostras de DNA foram extraídas de nervuras e pecíolos das folhas pelo método envolvendo CTAB, modificado de Murray & Thompson (1980). Meio grama de tecido vegetal fresco foi picado em papel toalha com auxílio de uma lâmina, reduzindo o tecido em pequenos fragmentos e colocados em tubos eppendorf de 2 ml, sobre os quais foi acionado 1,0 ml do tampão de extração (CTAB 0,053 M, NaCl 1,4 M, PVP 10000 2%, Tris 0,1 M pH 8,0 e EDTA 0,25 M pH 8,0, adicionando b-mercaptoetanol a 0,2%). A seguir, todas as amostras foram incubadas em banho-maria à 65°C por 30 min. As amostras foram, então, submetidas à centrifugação (Eppendorf Centrifuge 5804R) por 5 min. a 956g e 22°C, e 800µl do sobrenadante obtido foi transferido para um novo tubo eppendorf de 2 ml. Posteriormente, foram adicionados 800µl de clorofórmio: isoamilálcool (24:1), e a fase aquosa (700 µl) obtida por centrifugação a 20.817g por 5 min. a 22°C, transferida para um novo tubo eppendorf de 1,5 ml. O DNA foi precipitado pela adição de 0,6 volume (420 µl) de isopropanol e incubação a -20°C por 30 min. As amostras foram centrifugadas a 20.817g durante 20 min. para formação do pelete, o qual foi lavado duas vezes com etanol 70% e centrifugado a 20.817g por 10 min. A seguir, o DNA foi desidratado por 6 min. em *speed-vac* e ressuspenso em 50 µl de água ultra pura (MilliQ). Para a detecção de *Ca. L. americanus* e ou *Ca. L. asiaticus* foram realizadas as reações de PCR com os seguintes oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) GB1 (5' AAG TCG AGC GAG TAC GCA AGT ACT 3') e GB3 (5' CCA ACT TAA TGA TGG CAA ATA TAG 3') específicos para *Ca. L. americanus* que permite amplificação de 1.027 pares de bases (pb) da região 16S do DNA ribossomal (Teixeira *et al.*, 2005), e RPLA2 (5' TATAAAGGTTGACCTTTCGAGTTT 3') e RPLJ5 (5' ACAAAGCAGAAATAGCACGAACAA 3') para *Ca. L. asiaticus* que amplificam um segmento de 703 pb da região beta operon (Hocquellet *et al.*, 1999). As reações de PCR duplex foram feitas em 40 µl contendo 0,5 mM de cada *primer* (PCR duplo – *primers* GB1, GB3 e RPLA2, RPLJ5 juntos na mesma reação), 0,2 mM de dNTP, 0,5 mM de MgCl₂, Tampão 1X, 1,5U de Taq polimerase e 1 µl de DNA genômico das plantas em estudo. As reações foram realizadas no termociclador (Mastercycler Gradient – Eppendorf) e para as

amplificações utilizaram-se 34 ciclos de 94°C por 30 s, 62°C por 45 s, 72°C por 90 s, seguindo-se de 72°C por 5 min. e 15°C por tempo indeterminado. Cada 20 µl dos produtos de PCR (amplicons) foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose 1,2% em tampão TAE 1X (TAE 50X: Tris, Ácido acético glacial e EDTA) e corados com brometo de etídeo (0,1 µg/mL). A visualização dos produtos de PCR foi feita em transiluminador UV e registrada pelo sistema de fotodocumentação.

2.4 Avaliações

As seguintes avaliações foram efetuadas a cada 14 dias em cada planta selecionada:

- **População de psíldeos.** Dando preferência para as vegetações mais novas da planta, foram escolhidos aleatoriamente seis ramos por planta doente (três ramos sintomáticos e três assintomáticos) e três ramos por planta sadia para avaliar o número de ovos, ninfas e adultos de *Diaphorina citri* (Figura 2).

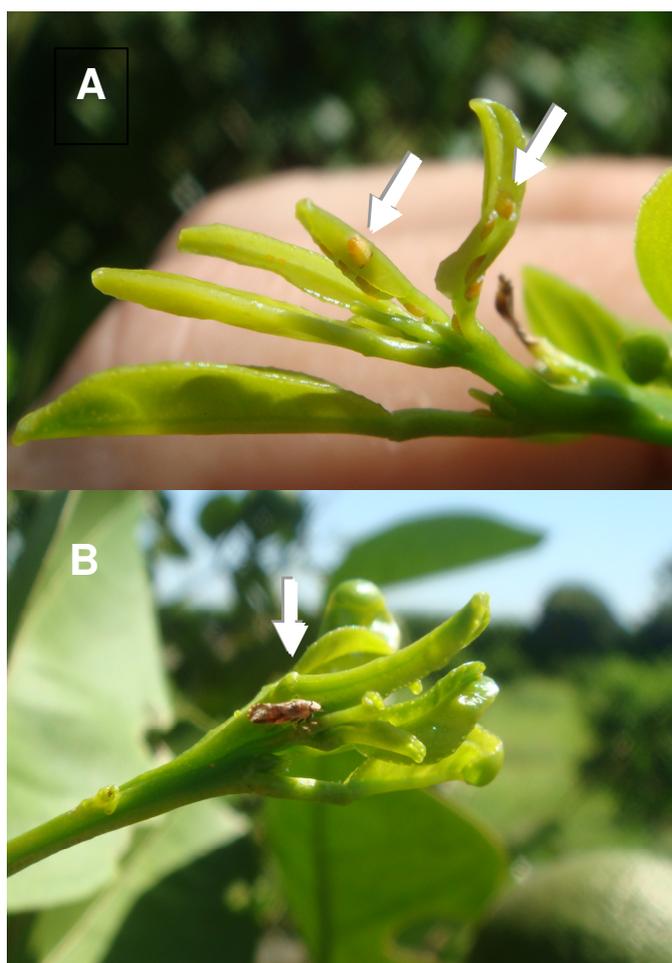


Figura 2. Ninfas (A) e adulto (B) do psíldeo asiático dos citros, *Diaphorina citri*, em brotações de laranjeiras.

- **Estádios fenológicos das plantas.** Foi avaliada a presença de determinado estágio fenológico de florescimento, frutificação e vegetação nas plantas com e sem sintomas de HLB com auxílio da chave descritiva da Stoller® (Figuras 3 a 5), observando-se a planta toda. Em seguida, foi feita a contagem das brotações (estádios V2 a V4) e dos ramos vegetativos (estádios V5 e V6) em nos mesmos seis ramos das plantas doentes (três ramos sintomáticos e três assintomáticos) e três ramos por planta sadia avaliados para a população de psilídeo.

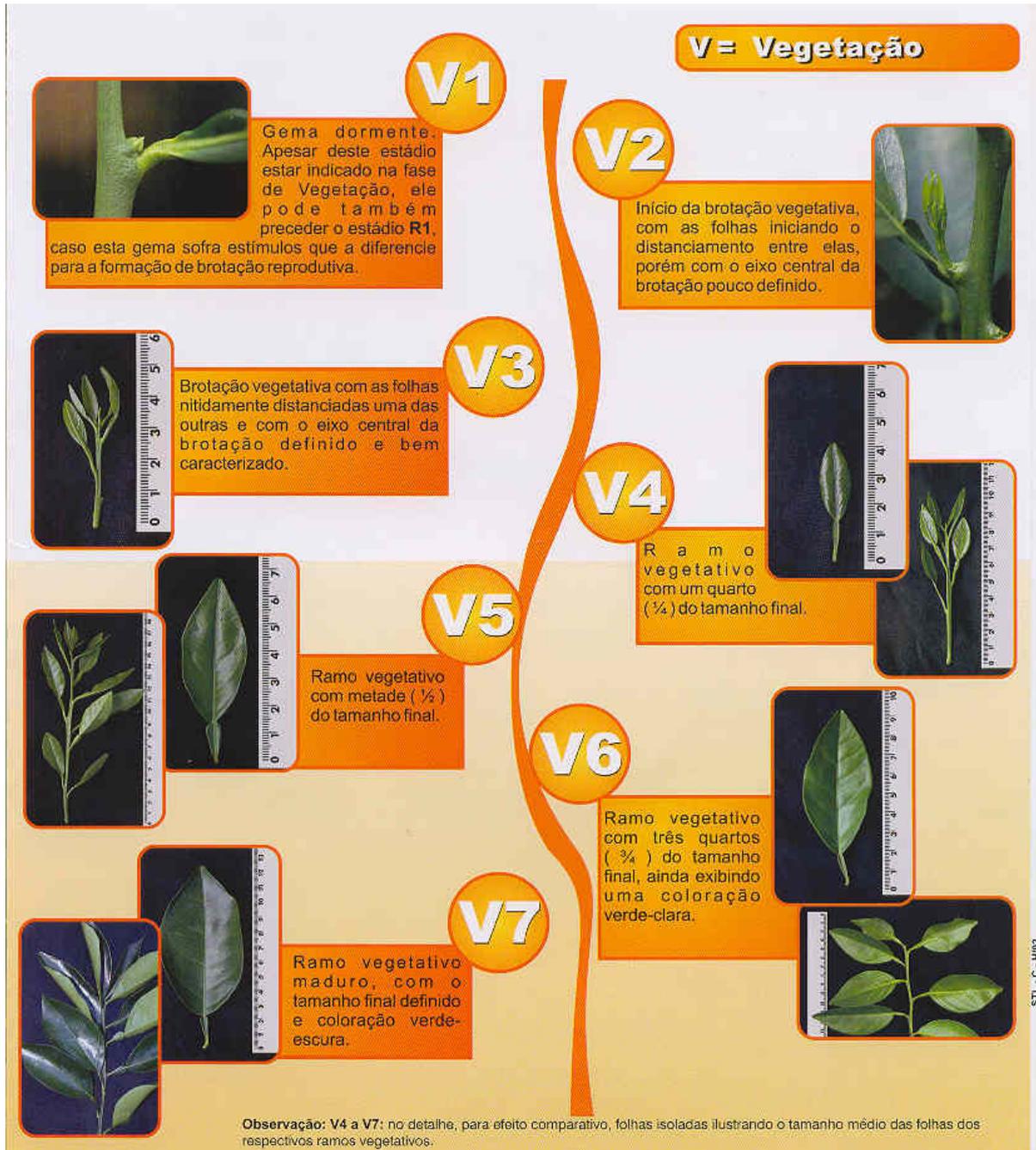


Figura 3. Chave descritiva para a avaliação dos estádios fenológicos de vegetação em citros, Stoller®.

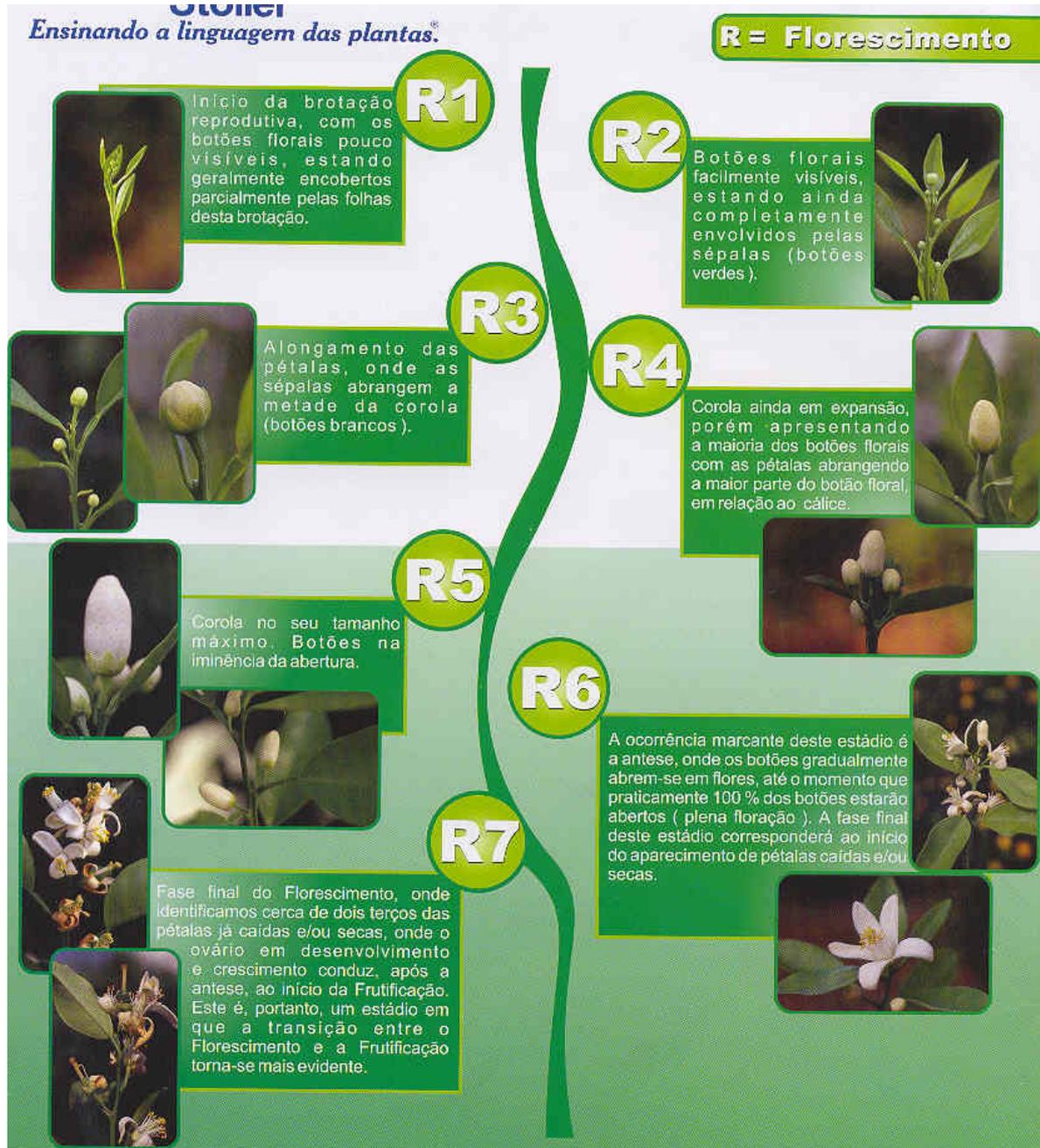


Figura 4. Chave descritiva para a avaliação dos estádios fenológicos de florescimento em citros, Stoller®.

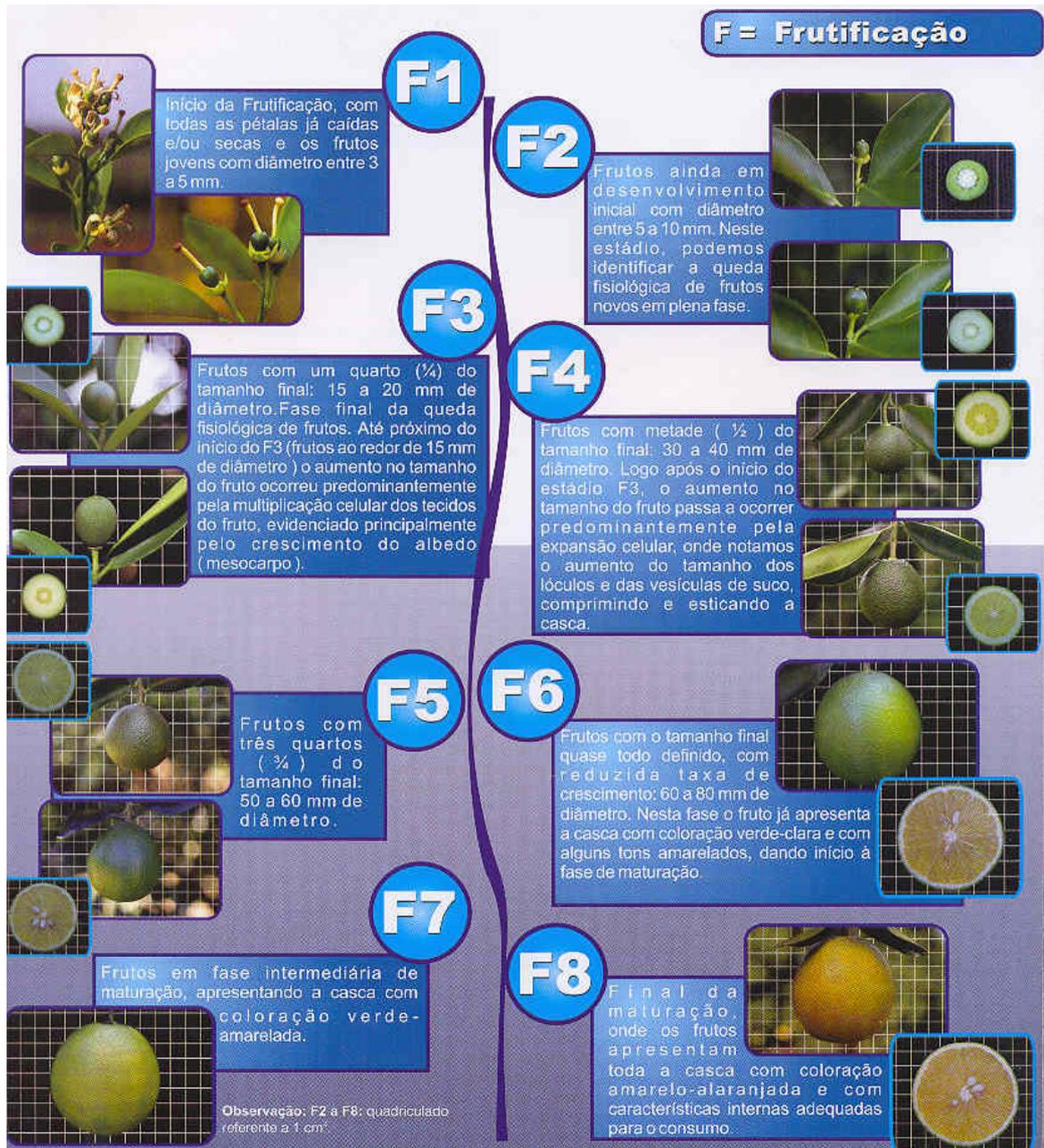


Figura 5. Chave descritiva para a avaliação dos estádios de frutificação em citros, Stoller®.

- **Sintomas de HLB.** Foi avaliada a presença de determinado tipo de sintoma observando-se a planta toda, considerando o órgão da planta (folhas, ramos e frutos) no qual o sintoma foi observado, segundo os critérios abaixo:

- a) *Sintomas em folhas:* Ausência ou presença de folhas apenas com nervuras amarelas, salientes e/ou corticosas (Figura 6A); com cloroses assimétricas ou mosqueado sugestivo e nervuras amarelas, salientes e/ou corticosas (Figura 6B); com mosqueado difuso assimétrico típico e nervuras amarelas, salientes e/ou corticosas (Figura 6C); com amarelecimento generalizado do limbo (Figura 6D) e de tamanho reduzido e com clorose internerval pela deficiência de zinco (Figura 6E).

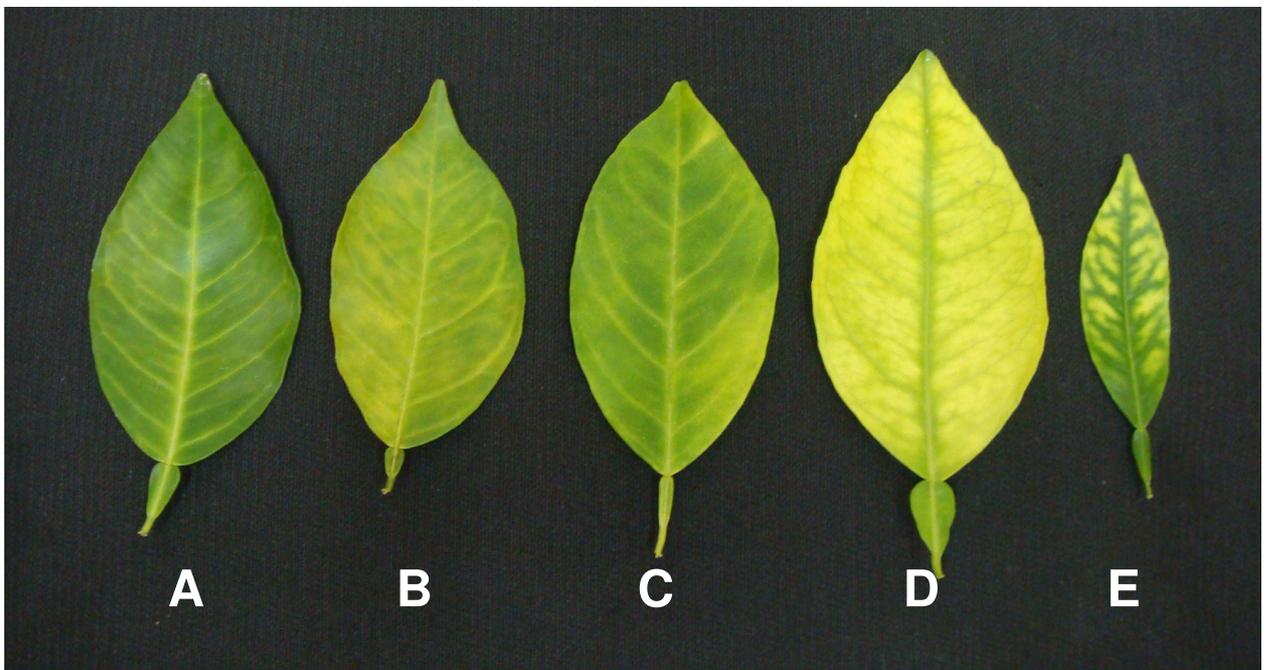


Figura 6. Escala diagramática dos tipos de sintomas encontrados em folhas de plantas infectadas por *Ca. L. asiaticus*. (A) Folha apenas com nervuras amarelas, salientes e/ou corticosas; (B) Folha com cloroses assimétricas ou mosqueado sugestivo e nervuras amarelas, salientes e/ou corticosas; (C) Folha com mosqueado difuso assimétrico típico e nervuras amarelas, salientes e/ou corticosas; (D) Folha com amarelecimento generalizado do limbo; e (E) Folha de tamanho reduzido e com clorose internerval pela deficiência de zinco.

- b) *Sintomas em ramos*: Ausência ou presença de ramos com folhas amareladas (Figura 7); presença ou ausência de ramos com internódios curtos (Figura 8); ausência ou presença de ramos desfolhados (Figura 9).



Figura 7. Ramo de laranjeira com folhas amareladas em função do Huanglongbing.



Figura 8. Ramo de laranjeira com internódios curtos em função do Huanglongbing.



Figura 9. Ramos de laranjeira com desfolha em função do Huanglongbing.

- c) *Sintomas em frutos*: Ausência ou presença de frutos deformados (Figura 10); ausência ou presença de frutos caídos (Figura 11).



Figura 10. Fruto de laranjeira deformado pelo Huanglongbing. Notar na foto à direita que a columela do fruto fica deslocada devido ao desenvolvimento desuniforme das partes do fruto.



Figura 11. Queda de frutos de laranjeira em função do Huanglongbing.

- **Progresso da Severidade.** As plantas foram divididas em oito setores, sendo quatro na metade superior e quatro na metade inferior da copa (Figura 12). Para cada setor foi atribuída nota 0, 1, 2, 3, 4 ou 5 correspondentes a 0, 20, 40, 60, 80 ou 100% de área do setor afetada pelos sintomas, respectivamente (Gottwald *et al.*, 1989).

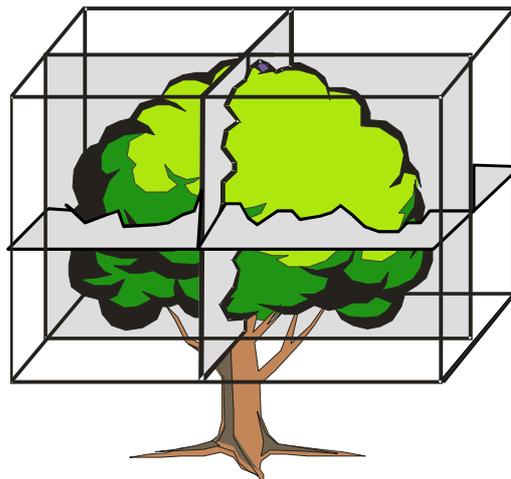


Figura 12. Esquema para a avaliação da severidade de HLB em plantas. Divisão em oito setores nos quais foram atribuídas atribuída nota 0, 1, 2, 3, 4 ou 5 correspondentes a 0, 20, 40, 60, 80 ou 100% de área do setor afetada pelos sintomas, respectivamente (Gottwald *et al.*, 1989).

Adicionalmente às avaliações nas plantas marcadas, foram coletados dados de precipitação pluviométrica e temperaturas mínima, média e máxima durante os períodos de avaliação. A precipitação pluviométrica diária foi medida com o auxílio de um pluviômetro tipo cunha, localizado a 50 m da área experimental. Os dados de temperatura foram obtidos por meio do serviço do CIIAGRO de Monitoramento Climático (<http://www.ciiagro.sp.gov.br/ciiagroonline/Listagens/MonClim/LMClimLocal.asp>) para o município de Araraquara.

2.5 Análise dos dados

2.5.1 Comparação da densidade populacional de *Diaphorina citri* em plantas com e sem sintomas de HLB e sua relação com o estágio fenológico de vegetação

Inicialmente, foram calculadas as médias do número de psilídeos (adultos, ovos e ninfas), brotações e ramos vegetativos para cada uma das 30 plantas assintomáticas (sadia) e sintomáticas (ramos sintomáticos e assintomáticos) durante todo o período de avaliação. Considerando cada planta avaliada como uma repetição, realizou-se, após verificar a normalidade dos dados, a análise de variância (ANOVA) e, quando o valor de F foi significativo, aplicou-se o teste de Tukey por meio do programa STATISTICA 7.1 (Statsoft, Tulsa, OK) para a comparação das médias de cada variável avaliada entre diferentes tipos de ramos.

Em seguida, a coincidência (C) entre os períodos de ocorrência de adultos, ninfas e ovos de *D. citri* em cada avaliação com a presença de brotações ou de ramos vegetativos na mesma data para cada um dos tipos de ramos avaliados (ramo sintomático de planta sintomática, ramo assintomático de planta sintomática e ramo de planta assintomática) foi calculada em função da proporção de avaliações realizadas em que a presença ou ausência de ambas as variáveis avaliadas coincidiu pela equação: $C = (PP + AA)/n$, onde PP é o número de avaliações com presença do psilídeo e presença do estágio fenológico, AA é o número de avaliações com ausência de psilídeo e ausência do estágio fenológico e n é o número total de avaliações realizadas no período.

Finalmente, os coeficientes de correlação entre o número médio de adultos, ninfas e ovos de *D. citri* em cada avaliação com o número médio de brotações e de ramos vegetativos nas avaliações correspondentes foram determinados por meio do programa STATISTICA 7.1 (Statsoft, Tulsa, OK) para cada um dos tipos de ramos avaliados.

2.5.2 Comparação dos estádios fenológicos de plantas com sintomas de HLB e de plantas assintomáticas em duas épocas do ano

A comparação dos estádios fenológicos de plantas com sintomas de HLB e de plantas assintomáticas foi feita apenas com os dados referentes às plantas das parcelas com controle de psilídeo, uma vez que nas parcelas sem aplicação de inseticidas houve ataque de outras pragas, como minador dos citros e pulgões, afetando as brotações das plantas e podendo influenciar o comportamento fenológico das mesmas.

Para cada avaliação em cada um dos períodos avaliados e tipo de planta (sintomática e assintomática), foi calculada a porcentagem de plantas que estavam em um determinado estágio fenológico de vegetação, florescimento e frutificação. Estes dados foram então apresentados na forma de gráficos (porcentagem de planta em determinado estágio fenológico vs tempo) para a comparação da frequência e do período de ocorrência de cada estágio fenológico entre as plantas assintomáticas (sadias) e as plantas sintomáticas (doentes).

2.5.3 Caracterização dos sintomas da doença em função da época do ano e do estágio fenológico das plantas com sintomas de HLB

Pelas razões expostas no item anterior, foram utilizados apenas os dados referentes às plantas das parcelas com controle de psilídeo para a caracterização do progresso dos sintomas e para a observação de relação entre os sintomas e os estádios fenológicos.

Para cada avaliação, em cada um dos períodos avaliados, foi calculada a porcentagem de plantas que apresentavam um determinado tipo de sintoma de HLB relacionado às folhas, ramos e frutos. Estes dados foram então apresentados na forma de gráficos (porcentagem de plantas com determinado sintoma vs tempo) para a verificação do progresso do quadro sintomatológico a partir dos sintomas iniciais e sua relação com os estádios fenológicos.

2.5.4 Avaliação do progresso da severidade dos sintomas nas plantas doentes, em parcelas com e sem tratamento com inseticidas, em duas épocas do ano.

Os valores médios de severidade dos sintomas de HLB, obtidos em cada avaliação, dentro de cada um dos períodos avaliados, para as plantas das parcelas com e sem controle do psilídeo foram inicialmente apresentados na forma de gráficos (severidade dos sintomas vs tempo) para a descrição do progresso da severidade dos sintomas em cada tratamento e período do ano e verificação da relação das variações da severidade dos sintomas com os estádios fenológicos e condições climáticas (temperatura e precipitação pluviométrica).

Em seguida foram calculadas as seguintes variáveis: severidade inicial (S_i), severidade final (S_f), velocidade de aumento da severidade da doença (VS) e a área da curva de progresso da severidade da doença ($AACPSD$). A VS foi estimada pela equação: $VS = (S_f - S_i)/n$, onde n é o número total de dias no período de avaliação e VS representa o aumento de pontos percentuais na severidade de doença por dia. A $AACPSD$ foi estimada pelo método de integração trapezoidal descrito por Campbell & Madden (1990).

Posteriormente, após a verificação da normalidade dos dados, foi realizada a comparação das médias das variáveis estimadas pela análise de variância (ANOVA) e pelo teste de Tukey considerando-se um delineamento ao acaso fatorial 2 x 2, onde o fator “Época do ano” tinha dois níveis (primeiro e segundo períodos) e o fator “Controle do vetor” tinha dois níveis (com e sem controle do vetor), e cada planta avaliada representou uma repetição (30 repetições por tratamento). As análises foram feitas por meio do programa STATISTICA 7.1 (Statsoft, Tulsa, OK).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Comparação da densidade populacional de *Diaphorina citri* em plantas com e sem sintomas de HLB

Adultos de *D. citri* foram observados tanto nas plantas com como sem controle do inseto vetor no primeiro período (de junho a novembro de 2009) apenas na última avaliação no final de novembro 2009 e em menos de seis das 30 plantas avaliadas por tratamento. Tanto nas plantas com controle do psíldeo como nas plantas sem controle, as médias de adultos em três ramos/planta/avaliação em todos os tratamentos foram muito baixas (0,058, 0,025 e 0,008, respectivamente para os setores sintomáticos de plantas sintomática, assintomático de planta sintomática e assintomático de plantas assintomáticas tratadas com inseticidas e 0,058, 0,022 e 0,011 respectivamente para os setores sintomático de plantas sintomáticas, assintomático de planta sintomática e setor assintomático de plantas assintomática sem tratamento com inseticidas).

No segundo período, nas plantas com controle do inseto vetor foram observados adultos em apenas quatro avaliações e em menos da metade das 30 plantas avaliadas por tratamento (0,031, 0,025 e 0,058 respectivamente para os setores sintomático de plantas sintomáticas, assintomático de planta sintomática e assintomático de plantas assintomática). Nas parcelas sem controle do inseto vetor, adultos de *D. citri* foram observados em 10 das 12

avaliações realizadas e em mais de 19 e 10 plantas com e sem sintomas, respectivamente, das 30 plantas avaliadas por tratamento.

Ninfas e ovos de *D. citri* somente foram constatados nas avaliações nas plantas das parcelas sem controle do inseto vetor do segundo período (de novembro 2009 a junho 2010). Neste período, das 12 avaliações realizadas, a presença de ninfas e ovos foi constatada respectivamente em nove e seis avaliações em mais de 19 e 10 plantas das 30 plantas avaliadas com e sem sintomas respectivamente.

Devido à baixíssima densidade populacional de psilídeos nas parcelas com aplicação de inseticidas nos dois períodos e nas parcelas sem controle do inseto vetor no primeiro período, foram comparados apenas os dados referentes às parcelas sem controle do inseto vetor no segundo período de avaliação.

No segundo período, maior número de adultos foi observado durante todo o mês de dezembro de 2009, todo mês de janeiro, segunda quinzena de março e primeira quinzena de abril de 2010 (Figura 13). Neste período, maior número de ovos ocorreu na segunda quinzena de dezembro de 2009, todo mês janeiro e março de 2010 (Figura 14), enquanto que maior quantidade de ninfas ocorreu um pouco depois, em todo o mês de janeiro e segunda quinzena de março de 2010 (Figura 15). Desta forma, acredita-se que as populações de ovos e ninfas observadas a partir da segunda quinzena de dezembro de 2009 tenham sido originadas a partir dos adultos de dezembro de 2009 e que os adultos observados na primeira quinzena de abril de 2010 tenham sido originados a partir das ninfas observadas até a segunda quinzena de março de 2010.

Em média, a presença e a ausência de adultos de *D. citri* coincidiram respectivamente com a presença e a ausência de brotações (Figura 16) e ramos vegetativos (Figura 17) em 53% e 72% das avaliações, respectivamente (Tabela 1). Também, não houve correlações significativas entre o número de adultos com o número de brotações e de ramos vegetativos, independente da presença ou não de sintomas nas plantas (Tabela 2). Estes resultados indicam que a ocorrência e a densidade populacional de psilídeos adultos no pomar não dependem somente das condições fenológicas das plantas (brotação e ramos vegetativos), podendo-se ter populações significativas em períodos em que a planta não esteja emitindo novos fluxos vegetativos. Estas populações podem ser resultantes da migração de psilídeos adultos provenientes de outros pomares, como também da sua manutenção no pomar alimentando-se de folhas menos tenras e já expandidas ou mesmo mais maduras no estágio V7 (Yamamoto *et al.*, 2001; Tsai *et al.*, 2002).

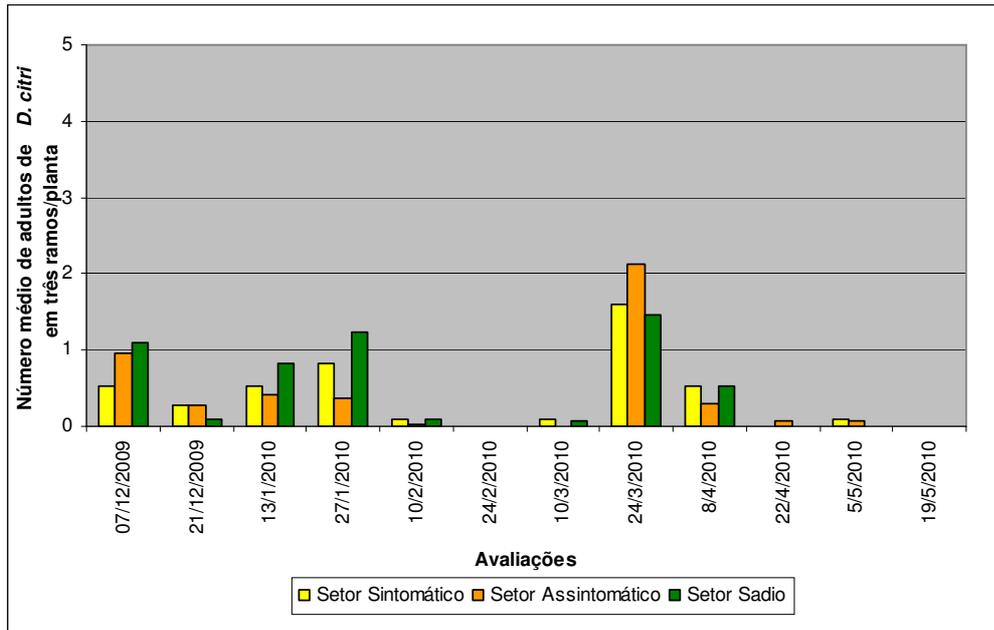


Figura 13. Dinâmica populacional de adultos de *Diaphorina citri* em ramos sintomáticos e assintomáticos de plantas sintomáticas e em ramos de plantas assintomáticas, nas parcelas sem o controle do psíldeo, no período de dezembro de 2009 a maio de 2010.

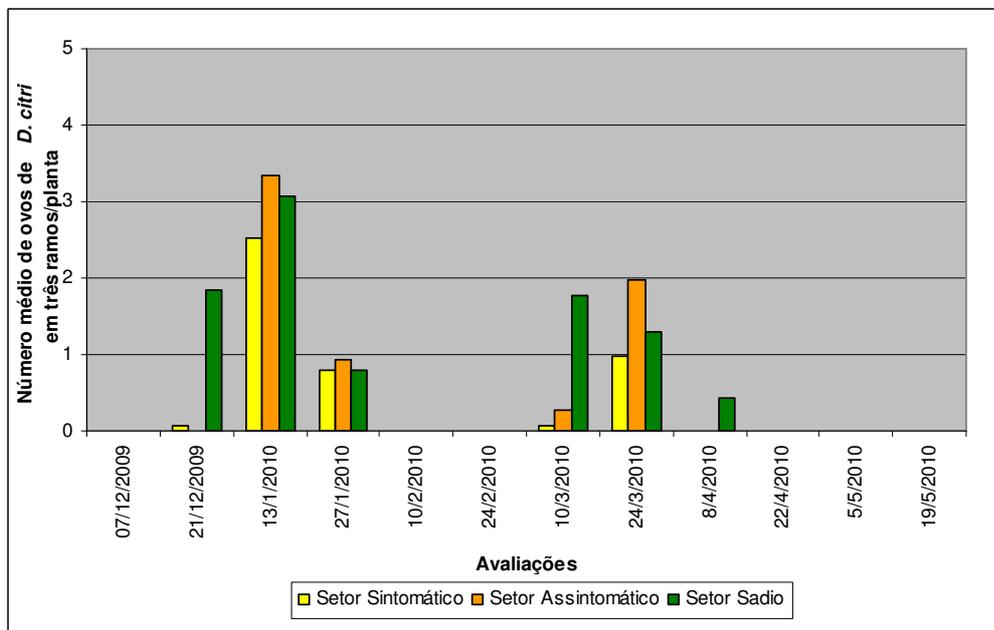


Figura 14. Dinâmica populacional de ovos de *Diaphorina citri* em ramos sintomáticos e assintomáticos de plantas sintomáticas e em ramos de plantas assintomáticas, nas parcelas sem o controle do psíldeo, no período de dezembro de 2009 a maio de 2010.

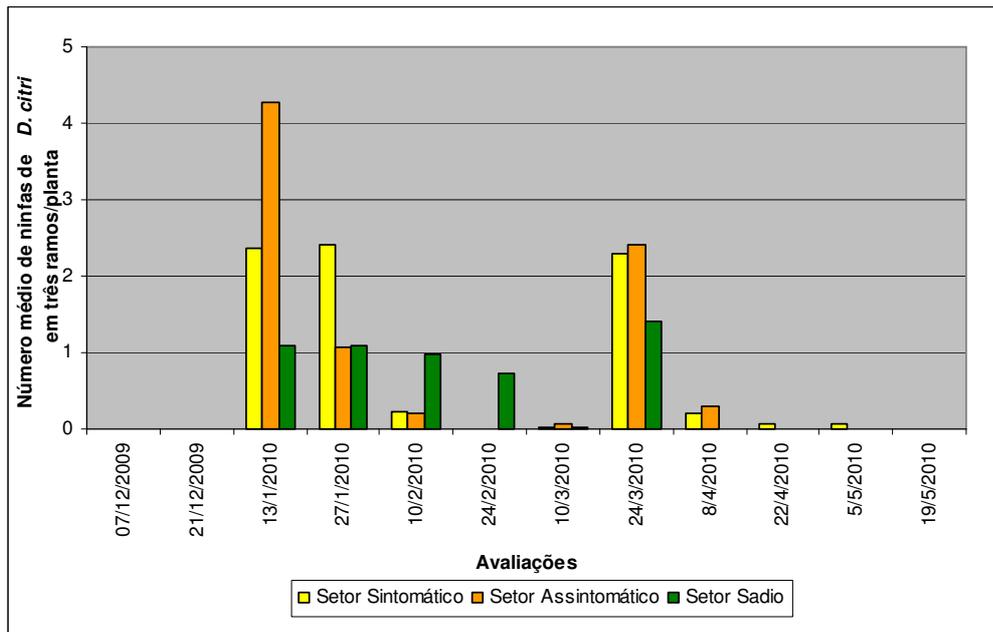


Figura 15. Dinâmica populacional de ninfas de *Diaphorina citri* em ramos sintomáticos e assintomáticos de plantas sintomáticas e em ramos de plantas assintomáticas, nas parcelas sem o controle do psíldeo, no período de dezembro de 2009 a maio de 2010.

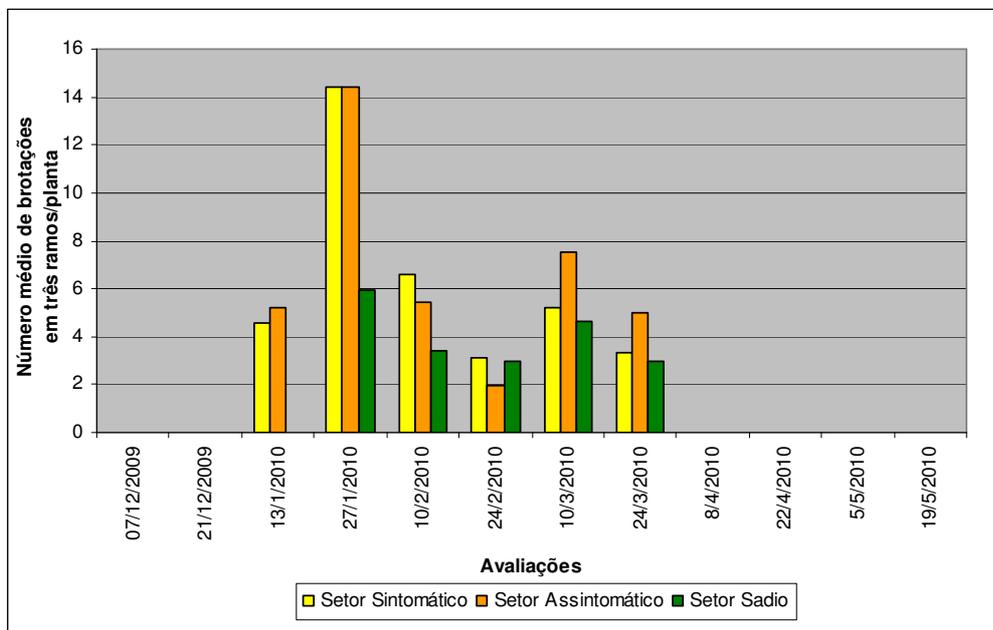


Figura 16. Dinâmica de brotações (estádios V2 a V4) em ramos sintomáticos e assintomáticos de plantas com sintomas de Huanglongbing e em ramos de plantas assintomáticas, nas parcelas sem controle do psíldeo, no período de dezembro de 2009 a maio de 2010.

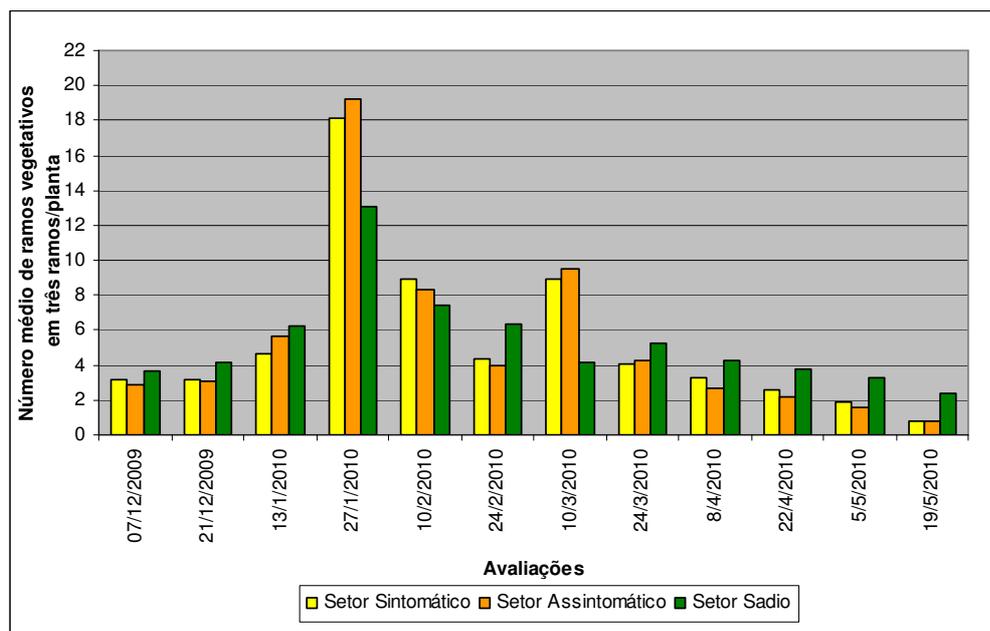


Figura 17. Dinâmica de ramos vegetativos (estádios V5 e V6) em ramos sintomáticos e assintomáticos de plantas com sintomas de Huanglongbing e em ramos de plantas assintomáticas, nas parcelas sem controle do psíldeo, no período de dezembro de 2009 a maio de 2010.

Tabela 1. Coincidência* entre a presença de diferentes fases de *Diaphorina citri* com a presença dos estádios de brotação (estádio V2 a V4) e de ramos vegetativos (estádios V5 e V6) em ramos com e sem sintomas de Huanglongbing em plantas sintomáticas e assintomáticas, nas parcelas sem controle do psíldeo, no período de dezembro de 2009 a maio de 2010.

Coincidência com brotações			
Psíldeo/Ramo	Ramo sintomático de planta sintomática	Ramo assintomático de planta sintomática	Ramo de planta assintomática
Adultos	0,58	0,42	0,58
Ovos	0,75	0,83	0,58
Ninfas	0,67	0,83	0,92
Coincidência com ramos vegetativos			
Adultos	0,75	0,83	0,58
Ovos	0,42	0,33	0,50
Ninfas	0,67	0,50	0,50

* Coincidência = proporção de avaliações realizadas em que a presença ou ausência de ambas as variáveis avaliadas coincidiu.

Tabela 2. Coeficientes de correlação do número médio de adultos, ninfas e ovos de *Diaphorina citri* com o número médio de brotações (estádio V2 a V4) e com o número médio de ramos vegetativos (estádios V5 e V6) em três ramos sintomáticos e assintomáticos de plantas com e sem sintomas de Huanglongbing, nas parcelas sem controle do psilídeo, no período de dezembro de 2009 a maio de 2010.

Coeficiente de correlação com brotações			
Psilídeo/Ramo	Ramo sintomático de planta sintomática	Ramo assintomático de planta sintomática	Ramo de planta assintomática
Adultos	0,44 ^{n.s.}	0,19 ^{n.s.}	0,57 ^{n.s.}
Ovos	0,79 [*]	0,76 [*]	-0,06 ^{n.s.}
Ninfas	0,86 [*]	0,77 [*]	0,67 [*]
Coeficiente de correlação com ramos vegetativos			
Adultos	0,24 ^{n.s.}	-0,04 ^{n.s.}	0,45 ^{n.s.}
Ovos	0,19 ^{n.s.}	0,22 ^{n.s.}	0,13 ^{n.s.}
Ninfas	0,49 ^{n.s.}	0,18 ^{n.s.}	0,69 [*]

* Coeficiente de correlação significativo ($P < 0,05$).

^{n.s.} Coeficiente de correlação não significativo.

Por sua vez, na média, as ocorrências de ovos e ninfas foram coincidentes com 79% e 75% das ocorrências de brotações nas plantas doentes, respectivamente (Tabela 1), assim como os números de ovos e ninfas foram altamente correlacionados com a presença de maior número de brotações nas plantas com sintomas de HLB, independentemente da presença ou não de sintomas no ramo (Tabela 2). Entretanto, as coincidências entre a ocorrência de ovos e ninfas com a ocorrência de ramos vegetativos nas plantas doentes foram menores, 38% e 58%, respectivamente (Tabela 1) e os números de ovos e ninfas não foram significativamente correlacionados com o número de ramos vegetativos nestas plantas (Tabela 2). Sabe-se que a fêmea do psilídeo coloca os seus ovos em brotações bem jovens e que as ninfas se desenvolvem durante o crescimento dos tecidos tenros destas brotações (Husain & Nath, 1927; Paiva, 2009).

Nas plantas assintomáticas os números de brotações e de ramos vegetativos somente tiveram correlação significativa com o número de ninfas e não com o número de ovos (Tabela 2). A falta de correlação entre o número de ovos com o número de brotações nas plantas assintomáticas deve-se à coincidência de apenas 58% entre a ocorrência de ovos e a ocorrência de brotações. Embora não tenham sido observadas brotações nos estádios V2 a V4

em plantas assintomáticas nas avaliações última quinzena de dezembro de 2009 e primeiras quinzenas de janeiro e abril de 2010 (Figura 16), ovos de *D. citri* foram observados nas gemas dormentes no estágio V1 (Figura 14). Desconsiderando estas avaliações, a correlação entre o número de ovos e o número de brotações aumenta de $-0,06$ ($P>0,05$) para $0,74$ ($P<0,05$).

Embora o número médio de psilídeos em cada tipo de ramo avaliado variou entre as avaliações, considerando o total observado em todo o período, não houve diferença significativa entre os tratamentos (ramos assintomáticos de planta sintomática, ramos assintomáticos de planta assintomática e ramos de plantas assintomáticas) para os números médios de psilídeos adultos, ninfas e ovos, indicando que não houve preferência do psilídeo para um ou outro tipo de ramo com ou sem sintomas de HLB, mesmo havendo uma maior frequência de plantas doentes com a presença de psilídeos durante as avaliações (19 a 26 doentes contra 10 a 14 assintomáticas entre as 30 plantas avaliadas de cada tipo) e um número médio significativamente maior de brotações por planta por avaliação nos ramos sintomáticos e assintomáticos de plantas com sintomas de HLB que nas plantas assintomáticas (Tabela 3). Desta forma, no campo, a preferência do psilídeo por uma ou outra planta de citros parece estar muito mais associada à presença de brotações nestas plantas do que ao seu estado em relação ao HLB (coloração amarelada de folhas ou presença de voláteis atrativos).

Tabela 3. Número médio de adultos, ovos e ninfas de *Diaphorina citri* e de brotações (estádios V2 a V4) e ramos vegetativos (estádios V5 e V6) em três ramos por planta por avaliação de acordo com a presença ou ausência de sintomas de Huanglongbing na planta e no ramo avaliado, nas parcelas sem controle do psilídeo, correspondente ao total observado no período de dezembro de 2009 a maio de 2010.

	Setor da planta			F	P
	Ramo sintomático de planta com sintoma	Ramo assintomático de planta com sintoma	Ramo de planta sadia		
Adultos	0,38 ^{n.s.}	0,38 ^{n.s.}	0,45 ^{n.s.}	0,16	0,85
Ovos	0,37 ^{n.s.}	0,54 ^{n.s.}	0,77 ^{n.s.}	1,87	0,16
Ninfas	0,64 ^{n.s.}	0,69 ^{n.s.}	0,44 ^{n.s.}	1,03	0,36
Brotações	3,11 ^a	3,30 ^a	1,66 ^b	67,01	0,00
Ramos veg.	5,33 ^{n.s.}	5,33 ^{n.s.}	5,33 ^{n.s.}	0,001	1,00

Valores com letras diferentes na linha são diferentes entre si pelo teste de Tukey ($P<0,05$).

Estudos recentes em condições controladas sobre a biologia do psilídeo mostram que logo após a liberação de adultos, a maior parte se dirige para as plantas com sintomas (Mann *et al.*, 2011) por um provável efeito de voláteis atraentes ou pela coloração dos sintomas. Em condições controladas de laboratório sem que o inseto visualizasse a planta, 70% dos psilídeos foram atraídos para as plantas com sintomas de HLB (Noronha Jr., 2010). A coloração mais amarelada das folhas de plantas com sintomas de HLB também são consideradas atrativas ao psilídeo. Segundo Kawamura & Uchida (2006), os adultos de psilídeos são mais atraídos por superfícies que não refletem luz com comprimento de ondas menor que 510 nm. Corroborando com estes dados, Hall *et al.* (2010) observaram que o número de adultos atraídos em armadilhas aumentou com o aumento da porcentagem de refletância nas regiões de comprimento de onda do amarelo (560-590nm), laranja (590-635nm) e vermelho (635-700nm), mas diminuiu com o aumento da porcentagem da refletância na região do comprimento de onda azul (450-490nm). Também observaram que geralmente o número de adultos capturados aumentou com o aumento da razão das porcentagens de comprimento de ondas vermelho/azul ou amarelo/azul, mas diminuiu com o aumento da razão amarelo/vermelho. Armadilhas com maior porcentagem de refletância no comprimento de onda na região do amarelo que na região do verde atraíram mais adultos, porém armadilhas com alta razão das porcentagens de comprimento de ondas amarelo/verde que também tem alta porcentagem de refletância na região do comprimento de onda azul atraíram menos adultos (Hall *et al.*, 2010). De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, no campo, porém, a produção destes voláteis parece ser diluída e a coloração amarela ter menor efeito em comparação com a presença das brotações. Mesmo que inicialmente os psilídeos prefiram as plantas sintomáticas, de acordo com Mann *et al.* (2011), sete dias após a liberação, os adultos acabam se dispersando para as plantas saudáveis em vez de permanecerem nas plantas doentes. Este comportamento, de causa ainda não esclarecida, pode explicar a não diferença de preferência observada no presente trabalho.

3.2 Comparação dos estádios fenológicos de plantas com sintomas de HLB e de plantas assintomáticas em duas épocas do ano

No primeiro período, houve a emissão de brotações (estádio V2 conforme escala descritiva da Stoller®), tanto nas plantas assintomáticas como nas sintomáticas, somente no período entre 13/08/2009 e 27/08/2009. Um novo surto foi observado somente em parte das plantas com sintomas entre 29/10/2009 e 25/11/2009 (Figura 18A e C). No segundo período, as plantas sintomáticas iniciaram o primeiro surto de brotações no dia 13/12/2009, 14 dias

antes das plantas assintomáticas. A partir desta data, os surtos de brotações nas plantas assintomáticas e sintomáticas foram semelhantes (Figura 18B e D).

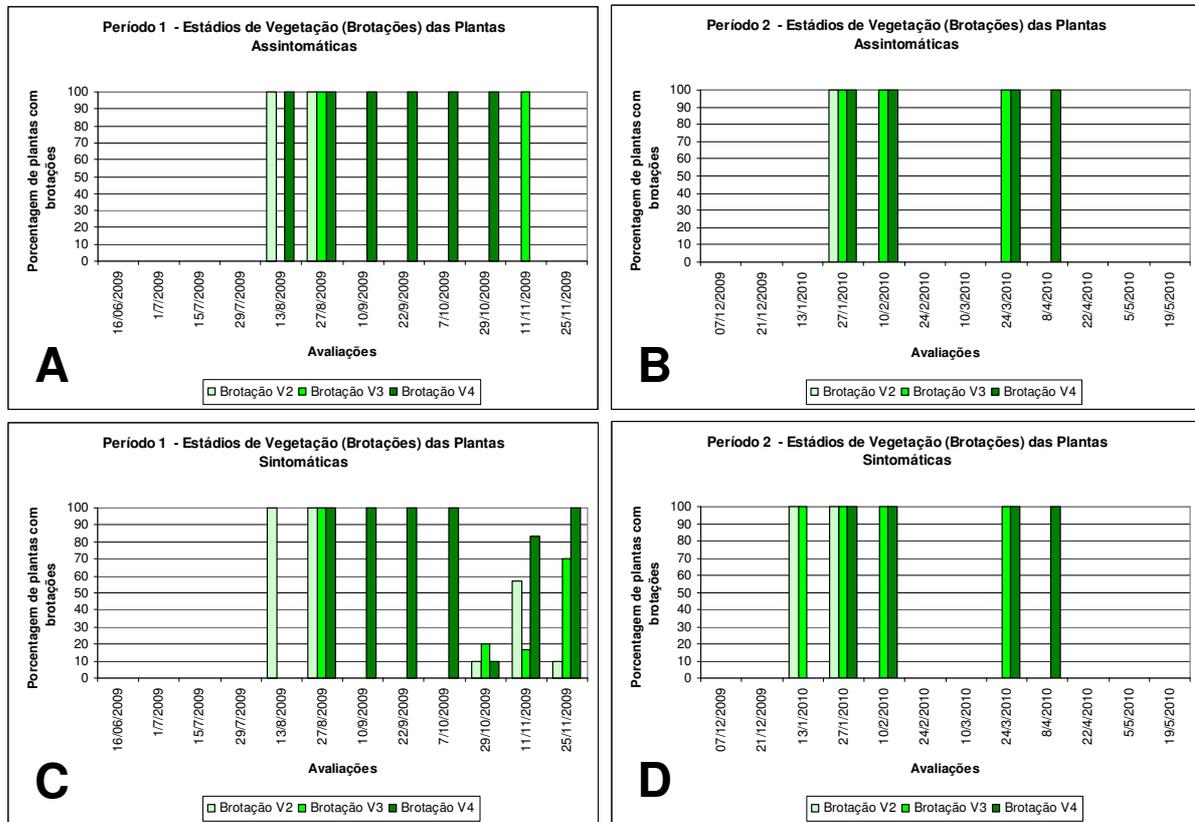


Figura 18. Frequência de plantas assintomáticas (A e B) e com sintomas de HLB (C e D) com brotações (estádios V2 a V4), durante o primeiro (A e C) e segundo (B e D) períodos, nas parcelas com controle de *Diaphorina citri*.

Em regiões mais quentes, de clima tropical ou subtropical úmido, o crescimento das plantas cítricas pelo desenvolvimento de ramos ocorre em três a cinco surtos anuais bem definidos (Spiegel-Roy & Goldschmidt, 1996). O primeiro ocorre na primavera com ramos vegetativos e reprodutivos e os demais no verão e outono, quando os ramos são mais compridos, vigorosos, com folhas maiores e entrenós mais longos e não produzem flores, a não ser que condições climáticas indutivas ocorram antes da brotação (Medina *et al.*, 2005). A presença de brotos nos estádios V3 e V4 em ramos na primeira brotação ocorrida no primeiro período se estendeu por praticamente dois meses, tanto nas plantas assintomáticas como sintomáticas (Figura 18A e C), enquanto que a presença de brotações nos ramos no segundo período foram mais curtas, de um mês (Figura 18B e D). A menor duração da presença de brotações no segundo período pode ser explicada pelas maiores temperaturas maiores neste

período que aceleram o crescimento dos tecidos tenros e sua mudança de estágio fenológico. Nas épocas de brotação no primeiro período, a média das temperaturas máxima, média e mínima foram respectivamente 28,9°C, 23,0°C e 17,1°C, enquanto que nos dois surtos de brotação do segundo período foram respectivamente 31,1°C e 29,0°C, 26,4°C e 24,6°C, e 21,8°C e 20,2°C.

No primeiro período, a presença de ramos vegetativos ou ramos com folhas tenras (estádios V5 e V6) foi marcante após o dia 27/08/2009, 14 dias após o início das brotações, sendo pequena nas plantas assintomáticas na primeira avaliação de 16/06/2009 e maior nas plantas sintomáticas na avaliação de 15/07/2009 (Figura 19A e C). Durante o segundo período, a presença de ramos com folhas tenras ocorreu por praticamente todo período (Figura 19B e D). Ramos com folhas tenras são menos importantes para a reprodução do inseto vetor, mas importantes para sua alimentação (Husain & Nath, 1927; Paiva, 2009) na qual ocorrem a aquisição e/ou inoculação das bactérias associadas à doença, e para a identificação dos sintomas iniciais de HLB como os ramos com folhas amarelas. As pequenas diferenças encontradas entre plantas assintomáticas e sintomáticas quanto à presença de ramos com folhas tenras foram resultantes destas diferenças nas épocas e quantidades dos fluxos vegetativos (Figura 19).

No primeiro período, as plantas assintomáticas apresentaram, juntamente com a brotação de primavera, uma única florada, do dia 13/08/2009 até o dia 22/09/2009, que foi bastante uniforme, ficando a quase todo momento em 100% das plantas avaliadas (Figura 20A). No segundo período, não foi observada nenhuma emissão de flores, ou segunda florada (Figura 20B). De acordo com trabalho de Di Giorgi *et al.* (1990), a primeira florada da laranja Valência no estado de São Paulo responde por mais de 71% da produção total desta cultivar, sendo a segunda florada responsável pelo restante da produção.

As plantas sintomáticas, por sua vez, apresentaram, no primeiro período, a mesma florada principal observada para as plantas assintomáticas, porém a mesma ou outra florada iniciou-se praticamente dois meses antes de maneira irregular, isto é, em apenas 20 a 50% das plantas. Também foram observadas floradas em uma pequena porcentagem de plantas sintomáticas (entre 10 e 20% das plantas) após o período da florada principal (Figura 20C). No segundo período, foram também observadas mais duas floradas em parte das plantas sintomáticas, a primeira na primeira quinzena de janeiro até a primeira quinzena de fevereiro de 2010, e a segunda, na primeira quinzena de maio de 2010 (Figura 20D).

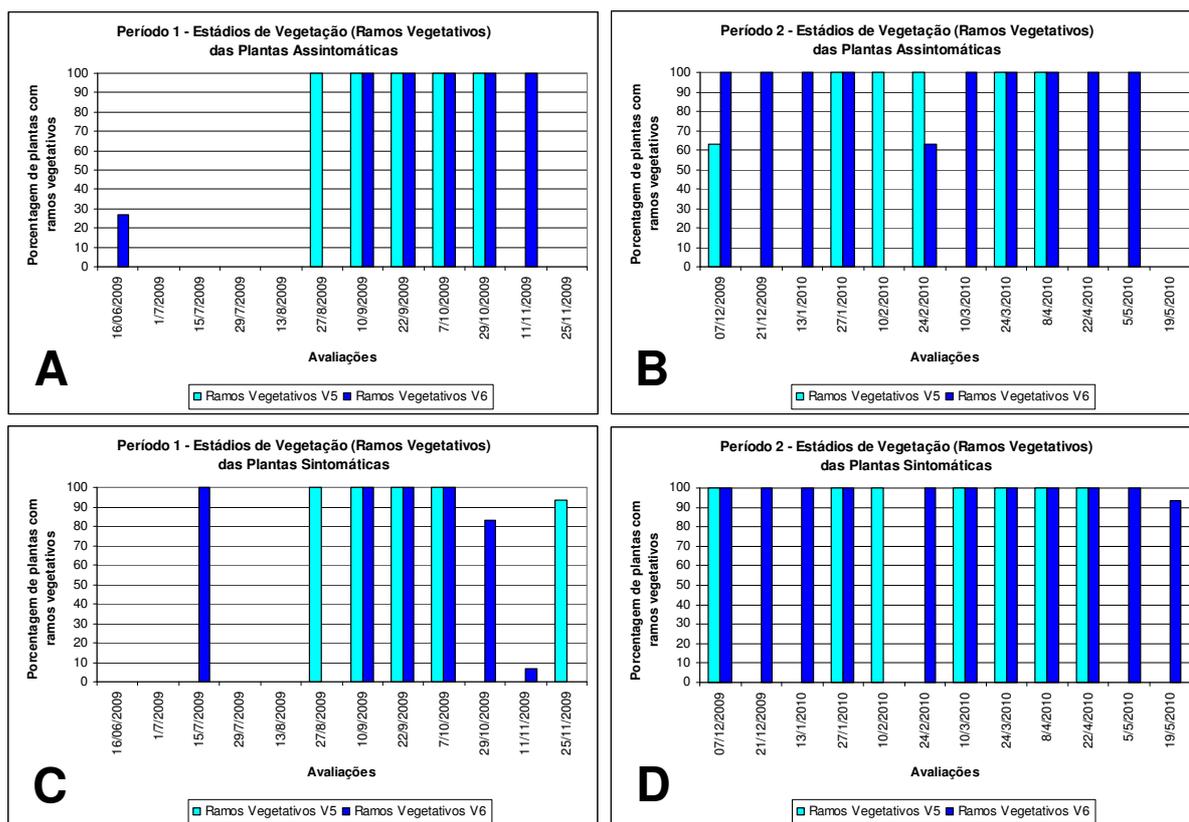


Figura 19. Frequência de plantas assintomáticas (A e B) e com sintomas de HLB (C e D) com ramos vegetativos (estádios V5 e V6), durante o primeiro (A e C) e segundo (B e D) períodos, nas parcelas com controle de *Diaphorina citri*.

A presença de floradas irregulares e extemporâneas já foi anteriormente relatada para plantas afetadas por outras doenças, como Declínio e Gomose de *Phytophthora* (Feichtenberger *et al.*, 2005), interpretada como uma última chance destas plantas enfermas se perpetuarem antes de morrerem. O déficit hídrico ou a baixa produção de giberelinas pela redução do sistema radicular provocada pelas doenças são fatores que induzem a floração nos citros (Spiegel-Roy & Goldschmidt, 1996; Monselise, 1985). É descrito na literatura que plantas com sintomas de HLB apresentam seu sistema radicular pouco desenvolvido com poucas radículas, possivelmente causada pela falta de suprimento para as raízes (Salibe & Cortez, 1966; Aubert, 1987). Adicionalmente, o crescimento de novas raízes é suprimido e as raízes geralmente decaem a partir das radículas (Zhao, 1981), e isto poderia estar causando este florescimento fora de época nas plantas com maior severidade de doença. Este trabalho é pioneiro em quantificar e mostrar que plantas afetadas pelo HLB também geram floradas irregulares e extemporâneas em plantas de laranjeiras.

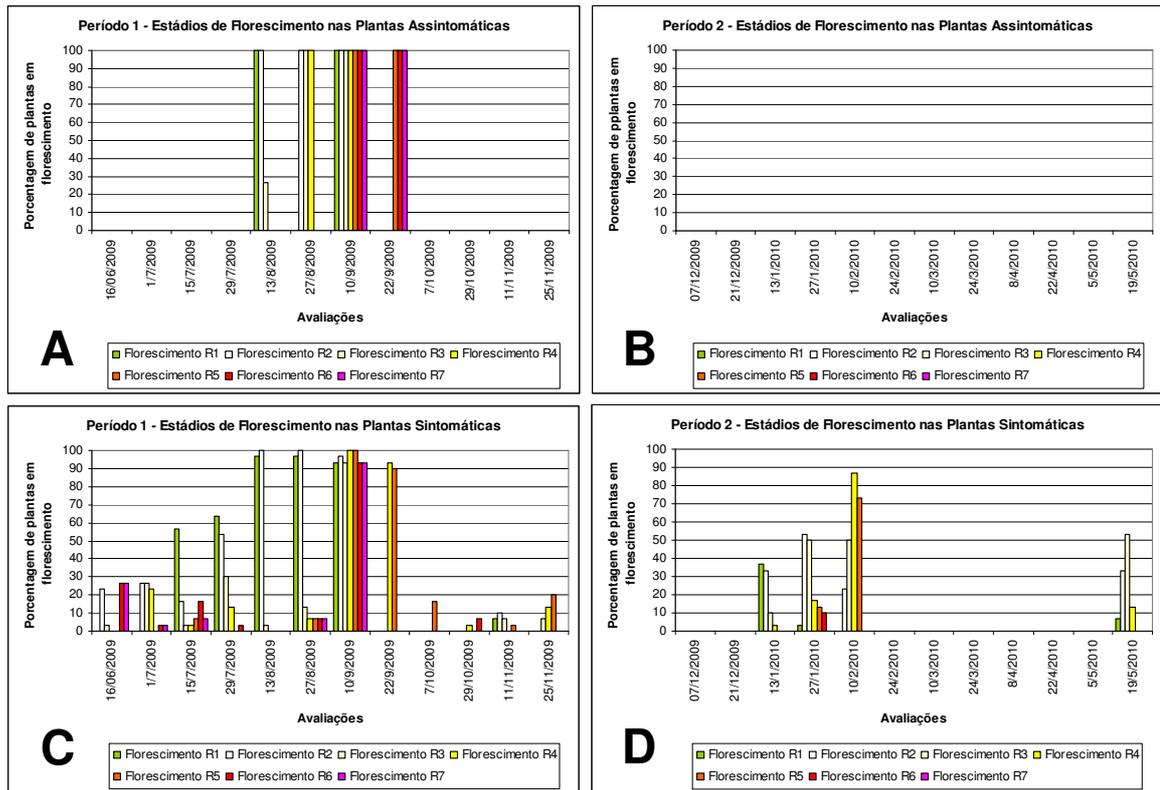


Figura 20. Frequência de plantas assintomáticas (A e B) e com sintomas de HLB (C e D) com diferentes estádios de florescimento (estádios R1 a R7), durante o primeiro (A e C) e segundo (B e D) períodos, nas parcelas com controle de *Diaphorina citri*.

Embora parte das plantas sintomáticas tenha florescido mais vezes e fora da época principal, nos dois períodos de avaliação, não foram observadas diferenças no período de ocorrência dos estádios de frutificação em relação às plantas assintomáticas (Figuras 21 e 22), tanto para frutos jovens e verdes, como para frutos em fase final de crescimento e de maturação. Aparentemente, as floradas fora de época em algumas plantas sintomáticas não resultaram em frutos viáveis ou os frutos produzidos caíram precocemente durante o início do seu crescimento em função da doença. Esta última hipótese pode ser observada no final do primeiro período de avaliação, quando houve um florescimento no final de outubro/2009 em aproximadamente 30% das plantas sintomáticas (Figura 20C), foram formados frutos a partir desta florada, mas estes frutos não permaneceram nas plantas até a maturação (Figura 22C).

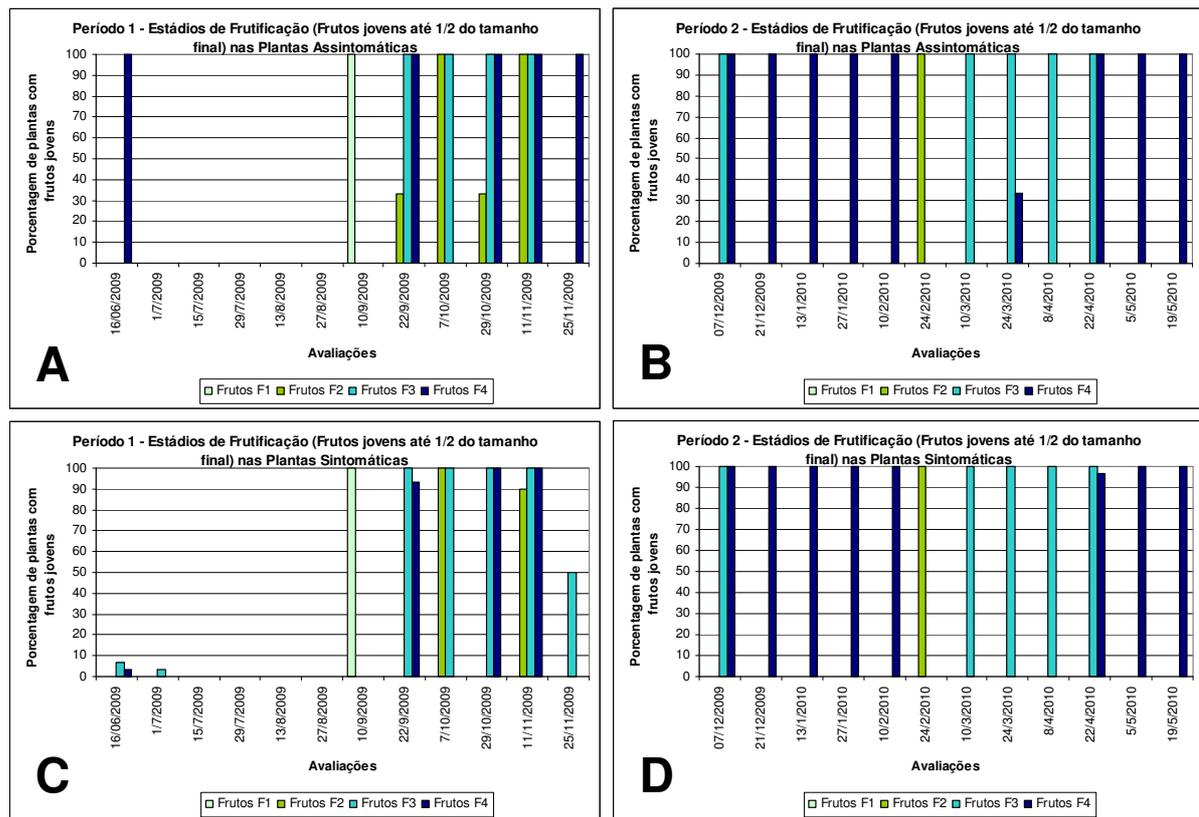


Figura 21. Frequência de plantas assintomáticas (A e B) e com sintomas de HLB (C e D) com diferentes estádios de frutos jovens até metade do tamanho final (estádios F1 a F4), durante o primeiro (A e C) e segundo (B e D) períodos, nas parcelas com controle de *Diaphorina citri*.

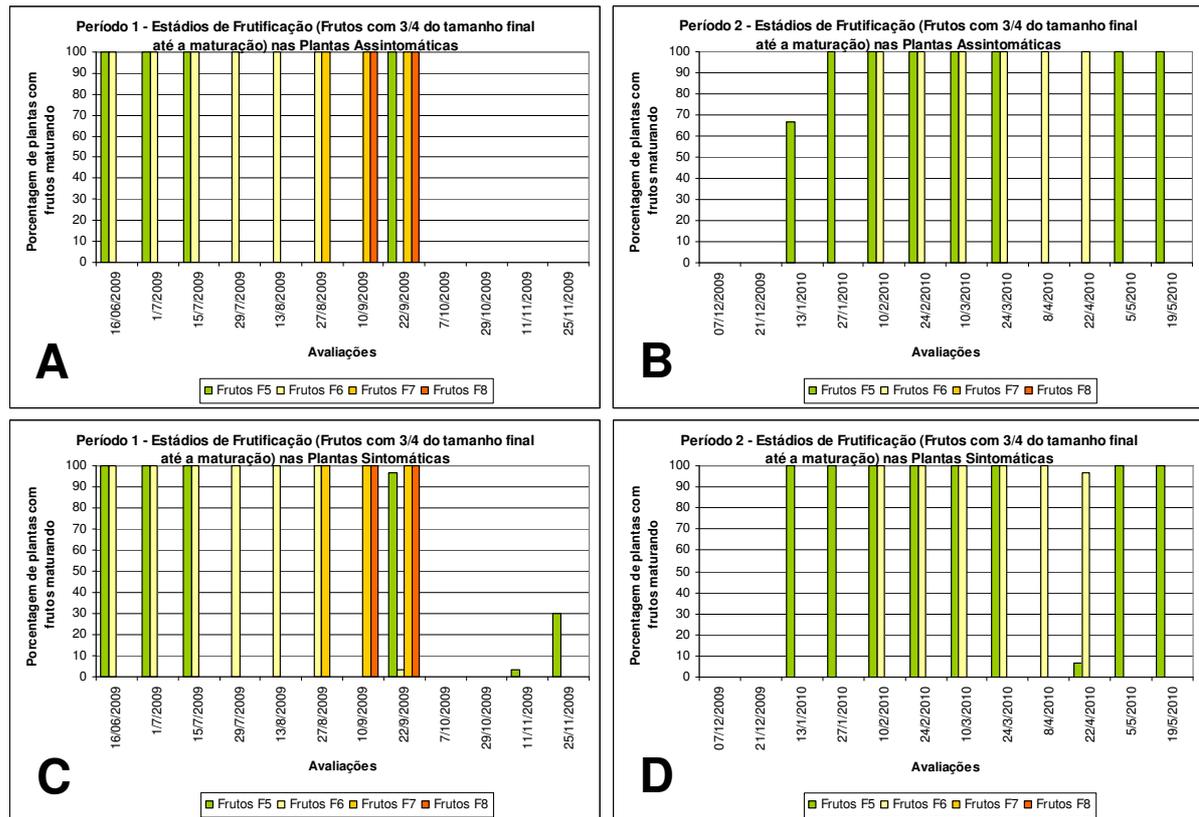


Figura 22. Frequência de plantas assintomáticas (A e B) e com sintomas de HLB (C e D) com diferentes estádios de frutos com 3/4 do tamanho final até o final da maturação (estádios F5 a F8), durante o primeiro (A e C) e segundo (B e D) períodos, nas parcelas com controle de *Diaphorina citri*.

3.3 Caracterização dos sintomas da doença em função da época do ano e do estágio fenológico das plantas com sintomas de HLB

3.3.1 Progresso dos sintomas foliares e em ramos e relação com os estádios fenológicos das plantas

No primeiro período, os sintomas foliares iniciais de HLB nas plantas sintomáticas recém encontradas, da segunda quinzena de junho/2009 à primeira quinzena de agosto de 2009, se caracterizaram pela presença de nervuras centrais amareladas e sintomas considerados sugestivos (Figura 23A). O sintoma de nervura central amarelada permaneceu em todas as plantas até a terceira avaliação (15/07/2009), a partir da qual a sua frequência foi diminuindo até 13/08/2009, depois da qual voltou a se manifestar em todas as plantas por duas semanas e novamente caiu para uma baixa frequência nas avaliações do final de setembro de 2009 ao final de outubro de 2009, quando depois voltou a ser bastante frequente. Os sintomas foliares considerados sugestivos foram bastante frequentes durante praticamente

todo o primeiro período. Neste primeiro período, a frequência de folhas com mosqueado difuso assimétrico típico de HLB foi muito baixa ou ausente até a avaliação do dia 13/08/2009. Este sintoma de mosqueado foi observado em alta frequência nas plantas apenas nas avaliações de 27/08/2009, 22/09/2009 e de 29/10/2009 a 25/11/2009. Ramos com folhas apresentando amarelecimento generalizado foram observadas com alta frequência apenas nas avaliações de 27/08/2009, 29/10/2009 e 11/11/2009, coincidindo com alta frequência de plantas com sintomas de mosqueado difuso assimétrico.

No segundo período, os sintomas de nervura central amarelada e os duvidosos e sugestivos também foram os sintomas iniciais observados nas plantas sintomáticas recém encontradas (Figura 23B). Neste período a frequência dos sintomas de nervura central amarelada permaneceu alta da primeira quinzena de dezembro de 2009 até a primeira quinzena de fevereiro de 2010, praticamente desaparecendo do final de fevereiro até o início de abril, quando voltou a ser bastante frequente, mais depois voltou a diminuir e desaparecer até o final do período. Os sintomas foliares duvidosos foram bastante frequentes durante todo o segundo período com exceção nas avaliações do mês de março de 2010. Por sua vez os sintomas sugestivos apareceram em menor frequência no início, talvez porque desde o início já havia uma boa frequência de sintomas de mosqueado difuso assimétrico. Nos períodos em que a frequência de mosqueado difuso assimétrico foi elevada, de fevereiro a maio de 2010, as frequências de sintomas sugestivos foram menores, com exceção das avaliações de fevereiro de 2010 e da primeira avaliação de abril de 2010. Em todas as avaliações feitas no segundo período, a frequência de plantas com sintomas de mosqueado difuso assimétrico foi acima de 25%, e em mais de 66% das avaliações foi acima de 90%. Neste segundo período, folhas com sintomas de amarelecimento generalizado foram encontradas com alta frequência a partir da avaliação de 10/02/2010 até a última avaliação, porém em menor frequência (entre 40 a 50%) nas últimas quatro avaliações. Neste período, a presença de ramos com folhas com amarelecimento generalizado também coincidiu com a alta frequência de folhas com mosqueado difuso assimétrico.

Não foi observada uma relação clara entre a frequência dos diferentes tipos de sintomas foliares com algum estágio fenológico específico nas plantas sintomáticas, sendo que estes tipos de sintomas foram observados tanto nos períodos de ausência como de presença de vegetação nova, flores e frutos nas plantas sintomáticas. Ao que parecem, estes sintomas de folhas com nervura central amarelada, ou com sintomas sugestivos representam apenas um estágio inicial dos sintomas de HLB que antecedem ao sintoma típico de mosqueado difuso assimétrico.

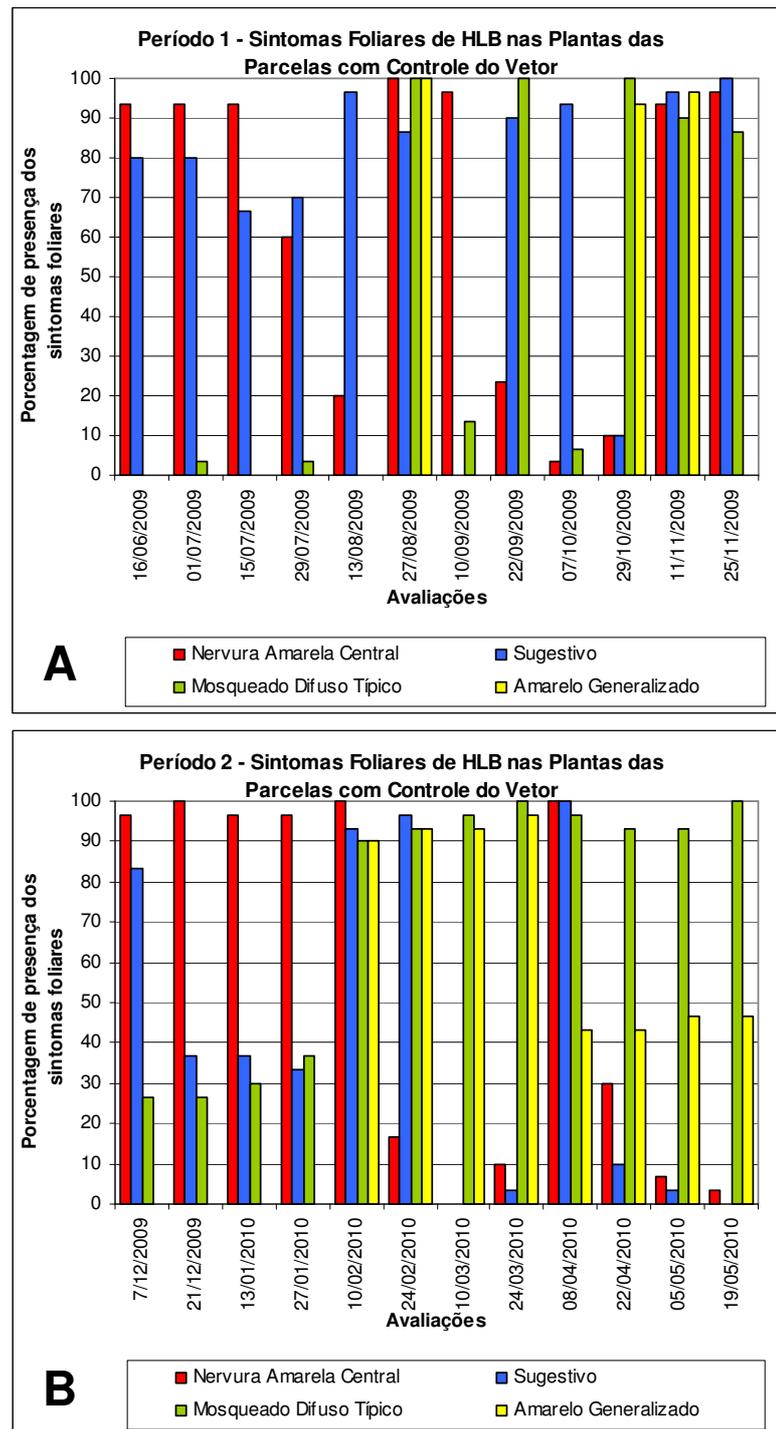


Figura 23. Frequência de plantas com determinado tipo de sintoma foliar de Huanglongbing, durante o primeiro (A) e segundo (B) períodos, nas parcelas com controle de *Diaphorina citri*.

Comparando-se as condições climáticas dos dois períodos estudados, observou-se que no segundo período as temperaturas e precipitações pluviométricas foram maiores que as do primeiro período (Figura 24). No período de junho a novembro de 2009, na média as temperaturas mínima, média e máxima foram respectivamente 15,6 °C, 22,0 °C e 28,4 °C e a chuva acumulada foi de 593 mm. No período de dezembro de 2009 a maio de 2010, na médias as temperaturas mínima, média e máxima foram respectivamente 20,5 °C, 25,1 °C e 29,5 °C e a chuva acumulada foi de 593 mm. Em nenhum dos períodos foram observadas temperaturas máximas acima de 35 °C e que pudessem causar alguma remissão dos sintomas foliares da doença (Lopes *et al.*, 2009b; Gasparoto *et al.*, 2011). Entretanto, no primeiro período, as temperaturas mínimas abaixo dos 15 °C parecem ter interferido no aparecimento dos sintomas típicos do HLB. Folhas com mosqueado difuso assimétrico começaram a ser observadas quando as temperaturas mínima passaram dos 15 °C e as médias passaram dos 20 °C (Figura 24A), assim como as folhas com sintomas de amarelecimento generalizado. O aparecimento do sintoma de mosqueado difuso nas folhas está associado ao acúmulo de amido e consequente destruição dos cloroplastos nas folhas devido à degeneração dos vasos do floema pela ação das bactérias associadas ao HLB (Albrigo & Achor, 2011). Maiores concentrações das bactérias associadas ao HLB foram encontradas em temperaturas entre 17 e 27 °C (Lopes *et al.*, 2009b; Gasparoto *et al.*, 2011). Assim, as temperaturas maiores que 15 °C e menores que 35 °C, no segundo período, podem ter acelerado o metabolismo foliar, aumentado a concentração bacteriana nos tecidos e, consequentemente, acelerado a expressão dos sintomas de mosqueado e amarelecimento foliar.

A menor frequência de sintomas mais típicos de HLB nas folhas, como o mosqueado difuso assimétrico, no primeiro período de avaliação, que corresponde à grande parte do segundo semestre do ano, pode explicar a menor frequência de plantas encontradas pelas equipes de inspeções de HLB no campo nesta época do ano em relação ao primeiro semestre, representado pelo segundo período de avaliação, cuja frequência destes tipos de sintomas foliares é maior (Bassanezi *et al.*, 2010).

Sintomas relacionados à deficiência de zinco, como clorose internerval nas folhas e ramos com internódios curtos também foram observados em ambos os períodos de avaliação nas plantas com HLB, mas não nas plantas assintomáticas (Figura 25). O zinco é um micronutriente importante, pois participa da produção de hormônios de crescimento e da ativação de enzimas. A sua deficiência provoca principalmente a redução de tamanho das novas brotações e das folhas, além de um amarelecimento acentuado do limbo, entre as nervuras secundárias, sendo que as nervuras principais permanecem verdes (Rossetti, 2001).

Sintomas de deficiência de zinco aparecem frequentemente em plantas com HLB e possivelmente são induzidos pela presença do patógeno (Da Graça, 1991; Bové, 2006), assim como em plantas cítricas com outras doenças, como Declínio, Tristeza e Clorose Variegada dos Citros (Rossetti, 2001, Feichtenberger *et al.*, 2005).

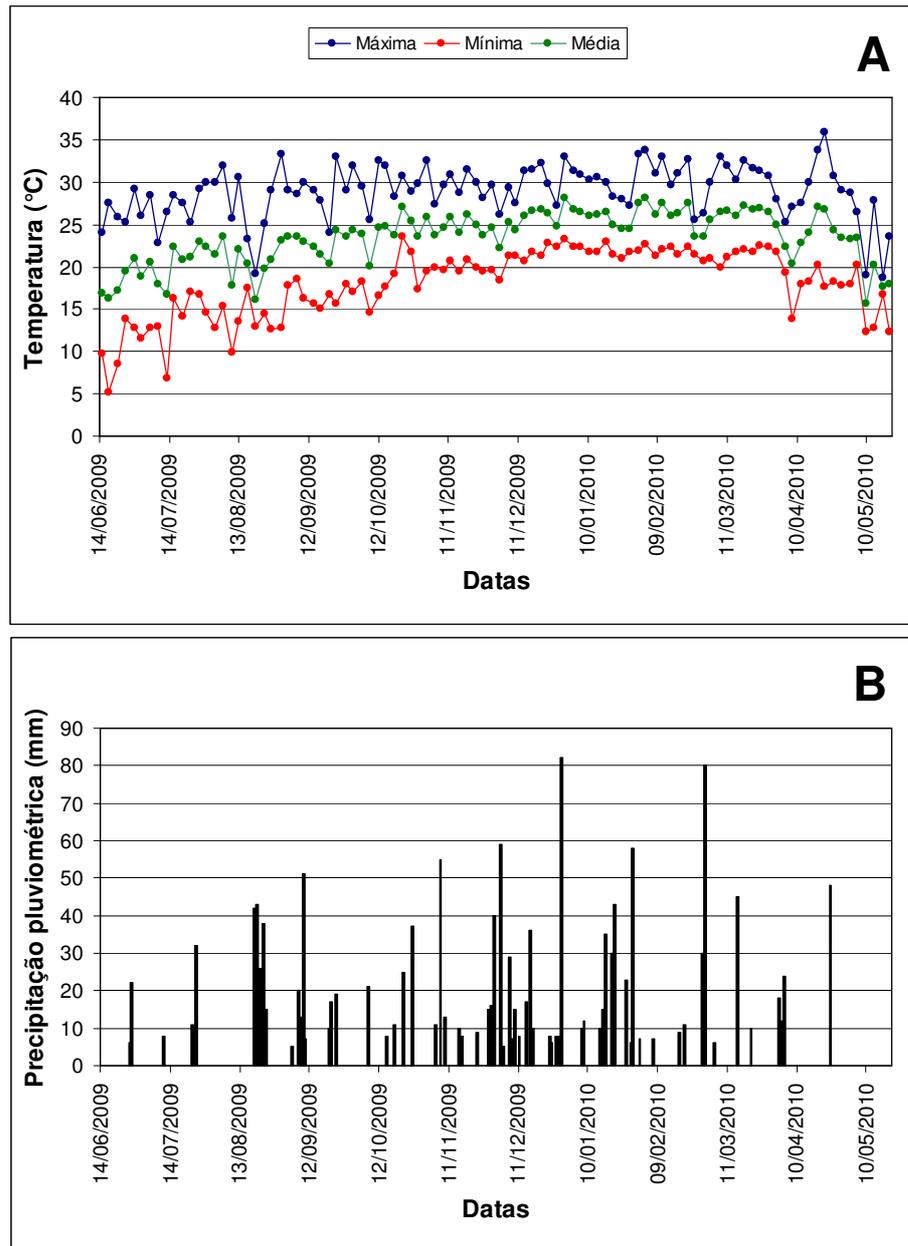


Figura 24. Dados de temperatura (mínima, média e máxima) e de precipitação pluviométrica na área do experimento entre o período de 16 de junho de 2009 a 20 de maio de 2010.

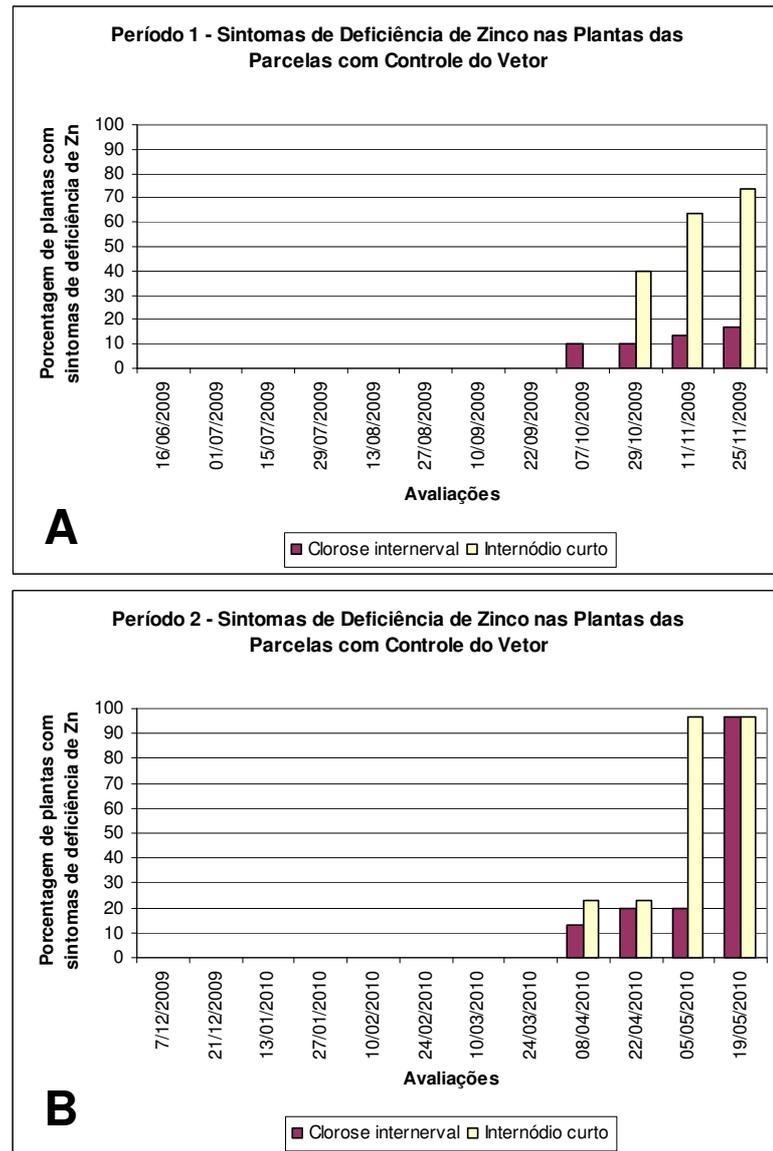


Figura 25. Frequência de plantas com sintomas de deficiência de zinco (folhas com clorose internerval e ramos com internódios curtos), durante o primeiro (A) e segundo (B) períodos, nas parcelas com controle de *Diaphorina citri*.

Ambos os sintomas de clorose internerval nas folhas como de internódios curtos, apareceram somente nas últimas avaliações em ambos os períodos, mas não em todas as plantas (Figura 25). Plantas com ramos com internódios curtos foram mais frequentes (40 a 73% no primeiro período e 23 a 97% no segundo) que plantas com folhas com clorose internerval (10 a 17% no primeiro período e 13 a 97% no segundo). As frequências de plantas com estes sintomas foram crescendo com o tempo e parecem estar associadas mais ao aumento da severidade dos sintomas nas plantas, do que a algum estágio fenológico

específico ou variação de temperatura dentro de cada período. No segundo período a frequência de plantas com sintomas de deficiência de zinco foi maior em função da maior severidade dos sintomas da doença neste período. Este sintoma de deficiência de zinco induzida pode ser considerado como sendo o último sintoma foliar de HLB a aparecer.

No primeiro período, a frequência de desfolha nas plantas com sintomas de HLB foi bastante elevada na segunda quinzena de julho, induzindo uma forte brotação nas semanas seguintes (Figura 26A). Nesta época, a severidade média dos sintomas de HLB estava entre 10 e 15%. Entretanto, neste caso, esta desfolha não pode ser atribuída exclusivamente ao HLB, mas sim complementar ao efeito do período de estresse hídrico nos meses de maio a julho de 2009 (apenas 132 mm acumulado em 9 dias de chuva de um total de 92 dias) (Figura 24B), pois a mesma desfolha e início de brotação foram observados nas plantas assintomáticas nesta época (Figura 18A e C). Também, observou-se que a brotação no final do primeiro período não foi induzida pela desfolha das plantas com HLB como se poderia sugerir anteriormente, e sim pela indução floral provocada pela doença. No segundo período, quando a severidade média da doença estava entre 8 e 11% em janeiro de 2010, também foi observada alta frequência de plantas com desfolha seguida por nova brotação antecipada nas plantas sintomáticas (Figura 26B e Figura 18B e D). Esta desfolha de janeiro de 2010, não foi observada nas plantas assintomáticas e não pode ser atribuída ao déficit hídrico, pois de dezembro de 2009 a janeiro de 2010 foram acumulados 540 mm em 24 dias de chuva de um total de 62 dias (Figura 24B). No mês de março e início de abril de 2010, foi observada novamente outra desfolha das plantas sintomáticas, muito provavelmente causada pela alta severidade da doença nestas plantas (média entre 38 e 50% no final de fevereiro e início de março de 2010). A precipitação pluviométrica acumulada de fevereiro a março de 2010 foi de 204 mm, sendo 80 mm apenas no dia 01/03/2010 (Figura 24B). Entretanto, esta desfolha de março de 2010 não foi suficiente para adiantar a emissão das brotações em relação às plantas assintomáticas (Figura 18B e D).

Como os sintomas de deficiência de zinco e de desfolha não ocorrem durante todo o ano, em todas as plantas afetadas e podem ser causados também por outros fatores que não o HLB, eles não devem ser tomados como sintomas chaves para a identificação desta doença, mas como sintomas complementares.

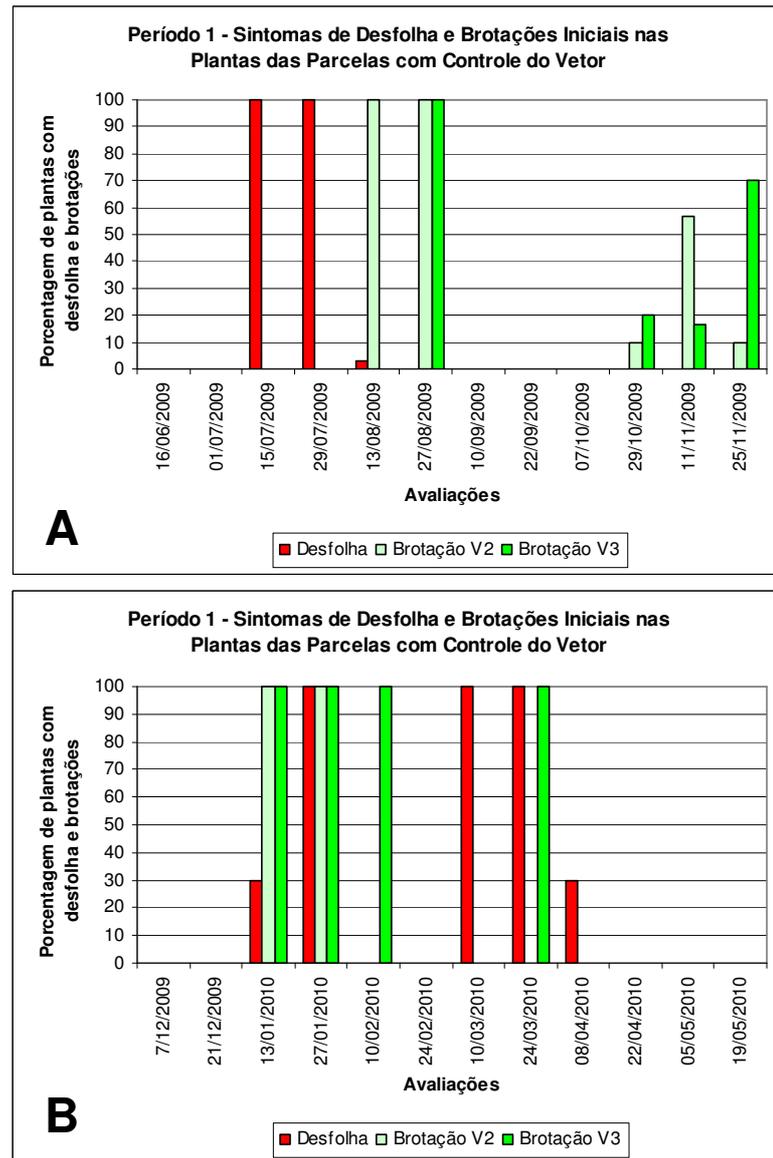


Figura 26. Frequência de plantas com sintomas de desfolha e brotações iniciais (estádios V2 e V3), durante o primeiro (A) e segundo (B) períodos, nas parcelas com controle de *Diaphorina citri*.

3.3.2 Progresso dos sintomas em frutos e relação com os estádios fenológicos das plantas

Alta frequência de plantas com frutos deformados nas plantas com HLB (acima de 70%) foi observada desde a primeira detecção destas plantas pelos avaliadores em 07/12/2009 no período (Figura 27A). Isto pode indicar que os sintomas em frutos e folhas surgiram ao mesmo tempo, ou, mais provavelmente, que os frutos da florada do ano anterior já estavam sendo afetados pela doença antes do aparecimento dos sintomas foliares e não chamaram a atenção dos inspetores nas avaliações anteriores. Estes frutos deformados quando encontrados

pela primeira vez já estavam com $\frac{3}{4}$ a $\frac{1}{2}$ do seu tamanho final, estádios F5 e F6 (Figura 22C), respectivamente, porém só foi observada alta frequência plantas com queda de frutos (acima de 70%) (Figura 27A), quando atingiram os estádios finais de maturação (F7 e F8), na mesma época em que os frutos das plantas assintomáticas (Figura 22A e C). No mês de outubro de 2009, após a colheita dos frutos da florada anterior e da florada de setembro de 2009, observou-se uma pequena frequência de frutos deformados nas plantas (Figura 27A) entre 5 a 20 mm de diâmetro (estádio F1 e F2 – Figura 21C). Entretanto, no mês de novembro de 2009, a frequência de plantas com frutos deformados nos estádios F2 a F5 (Figuras 21C e 22C) foi bastante acentuada, já havendo pequena frequência de queda de frutos, abaixo de 5% (Figura 27A). Isto indica que frutos deformados de laranja Valência, e provavelmente de baixa qualidade, cujos sintomas foliares aparecem no segundo semestre tem grande chance de serem colhidos e serem levados para a indústria, enquanto que os frutos formados na florada seguinte terão maior índice de queda precoce.

Nas plantas com HLB detectadas pela inspeção no segundo período, a presença de frutos deformados somente foi observada pela primeira vez na avaliação do dia 13/01/2010 (Figura 27B). De 13/01/2010 até o dia 24/02/2010 a presença de frutos deformados foi observada em 13% das plantas avaliadas (Figura 27B) quando os frutos estavam entre os estádios F4 e F6 (Figuras 21D e 22D) e após este período sua frequência aumentou para 60% ou mais de plantas. Nesta fase os frutos estavam na fase F5 e F6. A presença de frutos caídos foi observada em pouco mais de 30% das plantas do final de fevereiro e em todo o mês de março de 2010, sendo que nas avaliações seguintes houve um acréscimo nas frequências chegando a pouco mais de 60% até o final deste período (Figura 27B). Neste caso, observou-se que à medida que os frutos vão se desenvolvendo nos ramos de plantas já com sintomas da doença, eles vão ficando deformados e caem precocemente, antes de atingir a maturação. Entretanto, isto não ocorre em todas as plantas com sintomas iniciais de HLB.

Frutos deformados ocorrem durante todo o ano e numa alta frequência de plantas doentes, sendo um sintoma bastante útil para a identificação de plantas com sintomas de HLB e, em alguns casos, até antes do aparecimento dos sintomas foliares, principalmente do mosqueado difuso assimétrico, como observado no segundo semestre (primeiro período).

Em ambos os períodos, a queda de frutos coincidiu com a presença de ramos com folhas apresentando mosqueado difuso assimétrico e de folhas com amarelecimento generalizado. Estudos posteriores devem ser realizados para indicar qual é o significado desta possível relação.

Infelizmente, o acompanhamento do progresso dos sintomas e dos estádios fenológicos nas plantas sintomáticas não foi possível ser realizado ao longo de um ano completo para cada planta detectada, em cada época do ano, pela necessidade de erradicação das plantas de acordo com a legislação vigente, o que limitou em parte as conclusões deste trabalho. Também, neste trabalho foi estudado o comportamento da doença em apenas uma variedade de laranja e outras variedades podem se comportar de maneira diferente. Mesmo assim, as observações realizadas neste trabalho podem ser úteis em direcionar e melhorar a eficiência das equipes de inspeção de HLB nas propriedades.

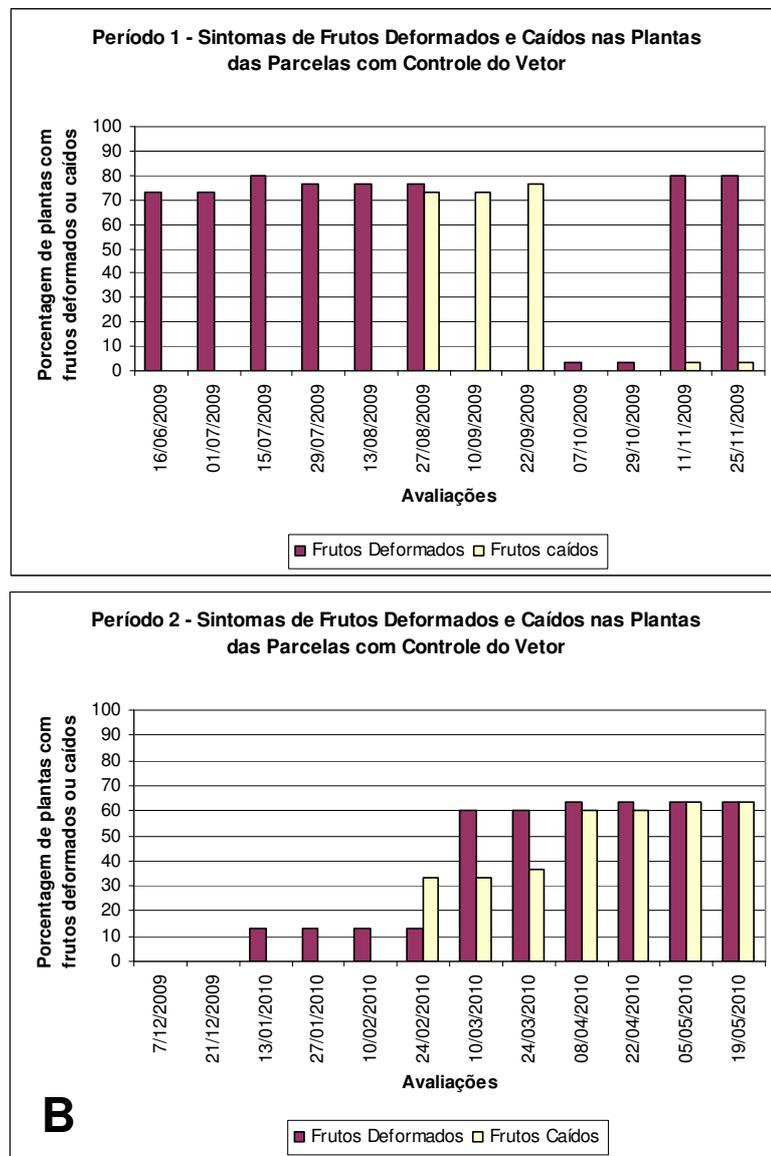


Figura 27. Frequência de plantas com sintomas de frutos deformados e queda de frutos, durante o primeiro (A) e segundo (B) períodos, nas parcelas com controle de *Diaphorina citri*.

3.4 Progresso da severidade dos sintomas nas plantas doentes, em parcelas com e sem tratamento com inseticidas, em duas épocas do ano.

Dentro de cada período, o padrão de progresso da severidade dos sintomas de HLB foi bem parecido entre as plantas com e sem controle do vetor (Figura 28). Embora o HLB seja uma doença sistêmica, como não foi contabilizada a desfolha na avaliação da severidade da doença, observou-se que em todos os tratamentos o progresso não foi acumulativo, havendo períodos de queda e posterior aumento. No primeiro período, a queda nos valores de severidade ocorreu após a avaliação do dia 29/07/2009, tanto nas plantas com sem controle do vetor, e no dia 25/11/2009 somente (Figura 28A e C). No segundo período, a queda ocorreu na avaliação do dia 27/01/2010 nas plantas sem controle do vetor e nas avaliações após o dia 24/03/2010, tanto nas plantas com sem controle do vetor. Os momentos das quedas nos valores de severidade da doença coincidiram com os momentos posteriores às desfolhas e emissões de novas brotações (Figura 26). Em ambos os períodos, os valores maiores de severidade foram atribuídos nos momentos em que haviam menores frequências de plantas com sintomas foliares suspeitos e de folhas com nervuras amarelas e maiores frequências de plantas com sintomas de mosqueado difuso assimétrico e de ramos com folhas amareladas (Figura 23). Desta forma, em trabalhos que envolvam a avaliação da severidade de HLB se deve estar atento a estes detalhes e dificuldades na avaliação, procurando padronizar os momentos de avaliação para que possam ser comparados posteriormente.

Dentro de cada período avaliado, a severidade inicial dos sintomas não diferiu entre os tratamentos com e sem aplicação de inseticidas, mas foi menor na avaliação de junho em relação a dezembro (5,0 e 9,2% respectivamente) (Tabela 4). A independência da severidade inicial dos sintomas de HLB em plantas detectadas após inspeções quinzenais com o controle ou não do vetor aplicado nestas plantas poderia ser um indicativo de que a severidade inicial dos sintomas depende somente da taxa de aloinfecção, isto é, da quantidade de infecções provenientes de psílídeos migrantes que ocorreram durante todo o período até que os sintomas fossem expressos. Para esta hipótese estar correta, o programa de controle do vetor aplicado neste experimento não foi suficiente para reduzir significativamente a quantidade de aloinfecções primárias e uma vez que o psílídeo infectivo migrante infecta uma planta ele não a infecta mais em outros ramos, ou seja, não há aloinfecções secundárias mesmo nas plantas sem controle do vetor, o que é pouco provável. Outra possível explicação para isto seria que as severidades iniciais encontradas refletem o limite humano (ou da equipe de inspetores) para a detecção visual dos sintomas de HLB em cada época do ano, provavelmente em função da presença dos sintomas de folhas com mosqueado difuso assimétrico e nervuras amareladas,

típicos da doença. Como já apresentado anteriormente, na primeira avaliação do segundo período havia uma maior frequência de plantas com folhas apresentando mosqueado difuso assimétrico, enquanto que na primeira avaliação do primeiro período este sintoma não foi notado em nenhuma planta. Como as inspeções foram realizadas com uma alta frequência, as plantas selecionadas foram somente aquelas cujos sintomas chamaram a atenção dos inspetores na última avaliação.

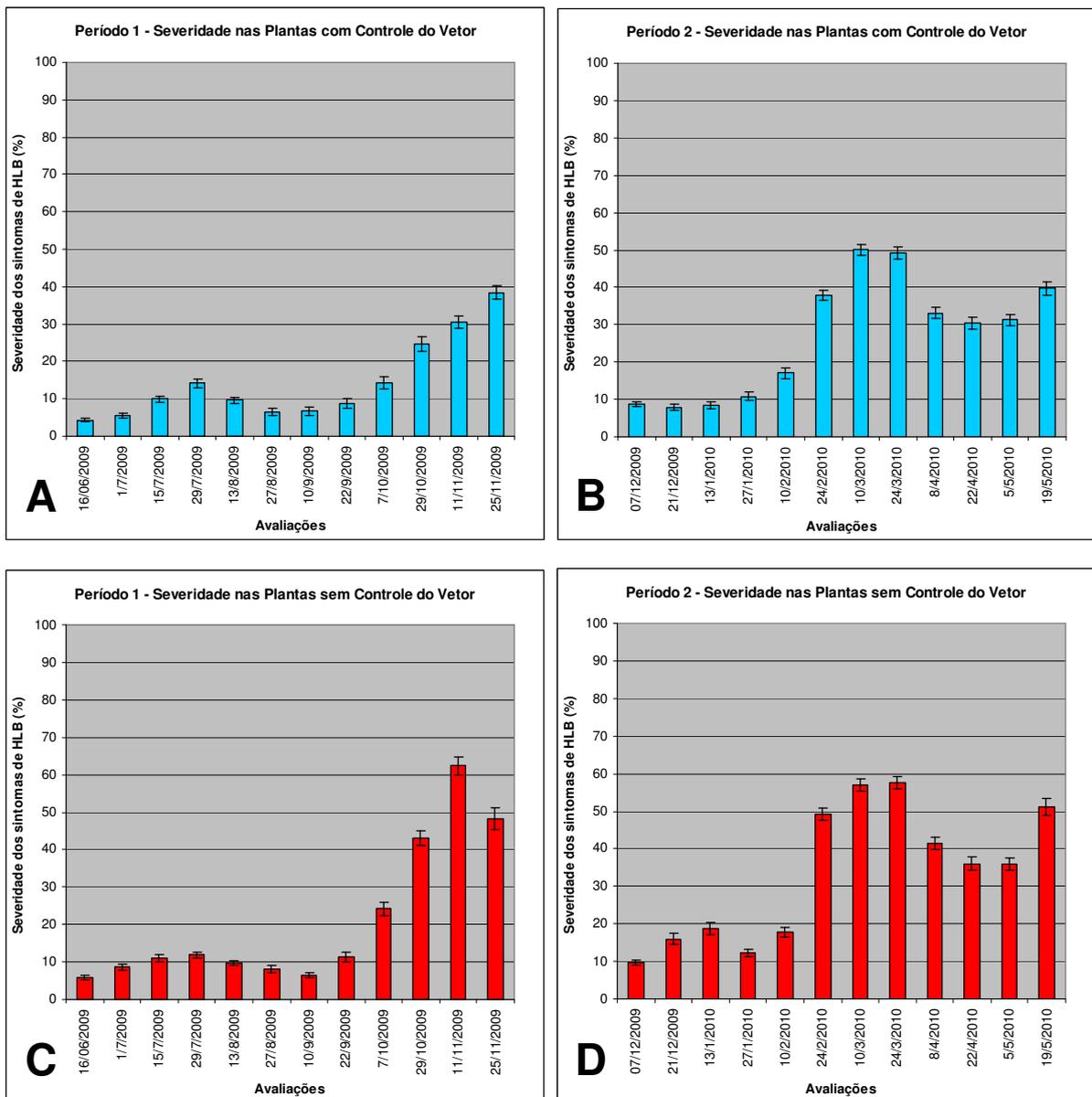


Figura 28. Progresso da severidade dos sintomas de Huanglongbing nas plantas com (A e B) e sem (C e D) controle de *Diaphorina citri* no primeiro (A e C) e segundo (B e D) períodos de avaliação (média de 30 plantas \pm erro padrão da média).

Por outro lado, a severidade final não diferiu entre o primeiro e segundo períodos (Tabela 4). Observando na Figura 28, a velocidade de aumento da severidade de HLB no início do segundo período (primeiro semestre) foi maior que no início do primeiro período (segundo semestre). Entretanto, devido às desfolhas e emissões de brotações novas como mencionado anteriormente, a severidade da doença ao final dos dois períodos foi a mesma, assim como as velocidades de aumento da doença calculadas para o período todo (Tabela 4). Devido às variações no progresso da severidade de HLB dentro de cada período, a melhor estratégia para comparar os períodos e o controle do inseto vetor no progresso da severidade foi pela AACPS que incorpora todas as variações no tempo do início da doença, severidade inicial e final, e velocidades (Campbell & Madden, 1990). Quando considera-se o progresso da severidade por todo o período, observou-se AACPS média 41% maior no segundo período em relação à AACPS média do primeiro período.

Tabela 4. Média (\pm erro padrão da média) das severidades inicial e final, da velocidade de progresso da severidade e da área abaixo da curva de progresso da severidade (AACPS) dos sintomas de Huanglongbing no primeiro (16/06/2009 a 25/11/2009) e segundo (07/12/2009 a 19/05/2010) períodos e nas plantas com e sem controle de *Diaphorina citri*.

	Severidade inicial (%)	Severidade final (%)	Velocidade da severidade*	AACPS
Período				
Primeiro	5,0 \pm 2,9 b	43,3 \pm 14,0 ^{n.s.}	0,020 \pm 0,007 ^{n.s.}	4.382,2 \pm 200,4 b
Segundo	9,2 \pm 3,9 a	45,4 \pm 12,8 ^{n.s.}	0,018 \pm 0,006 ^{n.s.}	7.385,2 \pm 218,1 a
Controle do vetor				
Com controle	6,5 \pm 3,7 ^{n.s.}	39,0 \pm 9,8 b	0,017 \pm 0,005 b	5.039,4 \pm 261,4 b
Sem controle	7,7 \pm 4,2 ^{n.s.}	49,7 \pm 14,4 a	0,022 \pm 0,007 a	6.727,9 \pm 267,7 a

* Pontos percentuais por dia no período.

Valores com letras diferentes na coluna diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Quando se compara a velocidade de aumento da severidade da doença, a severidade final e a AACPS entre as plantas com e sem controle do inseto vetor dentro no mesmo período, verificou-se que ambas foram maiores nas plantas sem controle do inseto vetor (Tabela 4). A maior velocidade de aumento da severidade nas plantas sem controle do inseto vetor deve estar relacionada à maior ocorrência de aloinfecções (primárias e/ou secundárias) e auto-infecções nestas plantas do que nas plantas com controle do psilídeo, uma vez que os psilídeos infectivos permanecem por mais tempo se alimentando e transmitindo a bactéria associadas ao HLB nestas plantas. Geralmente, os inseticidas aplicados sobre as folhas de citros são eficientes para o controle dos insetos vetores quando eles entram diretamente em contato com os insetos no momento da aplicação ou quando os insetos entram em contato com eles quando depositados na superfície das folhas. A rápida ação destes produtos sobre os insetos vetores antes da sua alimentação nas folhas impedem inoculação de patógenos caso já estejam infectados e a aquisição dos patógenos vasculares pelos insetos sugadores e sua posterior inoculação em novas plantas (Miranda *et al.*, 2011; Serikawa *et al.*, 2011). Adicionalmente, produtos sistêmicos aplicados no solo ou via *drench* controlam os insetos vetores quando estes atingem os vasos da planta (xilema e floema) durante seu processo de alimentação e entram em contato com o produto na ingestão, sendo excelentes para evitar a aquisição dos patógenos pelos vetores, mas menos eficientes em evitar a inoculação, principalmente pela primeira salivação do inseto nos vasos da planta (Miranda *et al.*, 2011; Serikawa *et al.*, 2011). Ambos os inseticidas apresentam eficiência em controlar as aloinfecções primárias, mas são muito mais eficientes em evitar as aloinfecções secundárias e as auto-infecções, todas responsáveis por aumentar a severidade do HLB nas plantas doentes.

Embora já tenha sido comentado e recomendado, tanto no Brasil como nos E.U.A., que nos pomares onde não se realiza mais a erradicação das plantas com sintomas de HLB dever-se-ia manter um controle sistemático de *D. citri*, tanto para evitar que a bactéria seja adquirida nestas plantas e transmitida para outras plantas e pomares, como para que o progresso da severidade dos sintomas fosse reduzido, este é o primeiro trabalho que mostra a importância da continuidade do controle sistemático do psilídeo na redução da velocidade de progresso da severidade de HLB nas plantas infectadas.

4. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos nas condições e períodos em que as avaliações foram realizadas, pode-se concluir que:

- Em condições de campo, a preferência de *D. citri* pelas plantas ocorre mais pela presença de brotações que pelo seu *status* com relação ao HLB;
- Plantas com sintomas de HLB têm maior número de brotações por planta, brotações adiantadas e com maior frequência que plantas assintomáticas, assim como florescem mais vezes e de maneira desuniforme, porém os frutos produzidos nestes florescimentos não chegam a atingir a maturação;
- O aparecimento e desenvolvimento dos sintomas foliares aparentemente não dependem dos diferentes estádios fenológicos das plantas sintomáticas, mas das condições de temperatura. Inicialmente, são observados sintomas de nervura central amarelada e sintomas duvidosos e suspeitos que evoluem para sintomas de mosqueado difuso assimétrico e amarelecimento generalizado das folhas;
- Sintomas foliares típicos do HLB, como o mosqueado difuso assimétrico e ramos com folhas amareladas, são observados com maior frequência no primeiro semestre do ano e podem estar associados à maior severidade inicial e detecção das plantas sintomáticas pelas equipes de inspeção neste período;
- Sintomas de deficiência de zinco podem ser considerados como os últimos sintomas foliares observados nas plantas com HLB e estão relacionados ao aumento da severidade da doença;
- Frutos deformados ocorrem durante todo o ano e numa frequência alta, sendo um sintoma bastante útil na identificação de plantas com HLB e em alguns casos até antes do aparecimento dos sintomas foliares, principalmente do mosqueado difuso assimétrico, como observado no segundo semestre;
- Frutos deformados de laranja Valência cujos sintomas foliares aparecem no segundo semestre tem grande chance de serem colhidos, enquanto que os frutos formados na florada seguinte terão maior índice de queda precoce antes da colheita;
- A avaliação do progresso da severidade de HLB é prejudicada pela desfolha e pela emissão de novas brotações nas plantas afetadas, tornando a curva de progresso da severidade variável ao longo do tempo;
- A severidade inicial dos sintomas de HLB em plantas detectadas após inspeções quinzenais independe do controle do inseto vetor aplicado nestas plantas, indicando que a severidade

inicial dos sintomas depende mais do limiar para a detecção visual dos sintomas pelos inspetores em determinada época do ano;

- A *AACPS* no primeiro semestre é maior que no segundo semestre;
- O controle sistemático do inseto vetor reduz a velocidade de aumento da severidade dos sintomas de HLB nas plantas e conseqüentemente a *AACPS* e severidade final da doença. A maior velocidade de aumento da severidade nas plantas sem controle do inseto vetor deve estar relacionada à maior ocorrência de aloinfecções (primárias e/ou secundárias) e auto-infecções nestas plantas do que nas plantas com controle do psilídeo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aubert, B. *Citrus greening disease, a serious limiting factor for citriculture in Asia and Africa*. **Proceedings of the International Society of Citriculture**, p. 817-820, 1992.

Aubert, B. **Le greening, une maladie infectieuse des agrumes d'origine bactérienne, transmise par des Homopteres psyllides**. IRFA/CIRAD, St Pierre, 185 p., 1987.

Albrigo, L.G. & Achor, D.S. Callose Predominates over Phloem Protein 2 in Phloem Plugging of Thess Affected with Huanglongbing. **Proceedings of 2nd International Research Conference on Huanglongbing**, Abstract 8.9, Orlando, 2011.

Bassanezi, R. B.; Lopes, S. A.; Belasque Jr, J.; Spósito, M. B.; Yamamoto, P. T.; Miranda, M. P.; Teixeira, D. C.; Wulff, N. A. Epidemiologia do huanglongbing e suas implicações para o manejo da doença. **Citrus Research & Technology**, v. 31, n. 1, p. 11-23, 2010.

Bové, J. M. História, Etiologia, Identificação no Campo, Transmissão e Distribuição Mundial do Huanglongbing: uma Destrutiva, Recém-Emergida, Doença Secular de Citrus. In: **Huanglongbing-Greening International Workshop**, Ribeirão Preto. Proceedings, 2006.

Campbell, C. L.; Madden, L. V. **Introduction to Plant Disease Epidemiology**. John Wiley & Sons: New York. 1990. 532p.

Capoor, S. P.; Rao, D. G.; Viswanath, S. M. *Diaphorina citri* Kuway., a vector of greening disease of citrus in India. **Indian Journal of Agricultural Science**, v. 37, p. 572-576, 1967.

Coletta-Filho, H. D.; Tagon, M. L. P. N.; Takita, M. A.; De Negri, J. D.; Amaral, A. M.; Müller, G. W.; Pompeu Jr, J.; Carvalho, S. A.; Machado, M. A. Detecção do agente causal do greening do citros (*Candidatus Liberibacter asiaticus*) no estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, v. 30, p. 510, 2004.

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

Di Giorgi, F.; Ide, B. Y.; Dib, K.; Marchi, R. J.; Triboni, H. R.; Wagner, R. L. Contribuição ao estudo do comportamento de algumas variedades de citros e suas implicações agroindustriais. **Laranja**, v. 11, p. 567-612, 1990.

Feichtenberger, E.; Bassanezi, R. B.; Spósito, M. B.; Belasque Jr, J. 2005. Doenças dos citros. In: Kimati, H.; Amorim, L.; Rezende, J.A.M.; Bergamin Filho, A.; Camargo, L.E.A.(Eds.) **Manual de Fitopatologia: Doença das Plantas Cultivadas**. Ed. Ceres: São Paulo SP. p. 240-269.

Fundecitrus. **Manual técnico de Greening**. Fundecitrus: Araraquara. 2011. 11p.

Gasparoto, M. C. G., Coletta-Filho, H. D.; Bassanezi, R. B.; Lopes, S. A.; Lourenço, S. A.; Amorim, L. Influence of temperature on infection and establishment of '*Candidatus Liberibacter americanus*' and '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' in citrus plants. **Plant Pathology** 2011 doi: 10.1111/j.1365-3059.2011.02569.x (in press).

Gottwald, T. R.; Aubert, B.; Zhao, X.-Y. Preliminary analysis of citrus greening (Huanglongbing) epidemics in the People's Republic of China and French Reunion Island. **Phytopathology**, v. 79, p. 687-693, 1989.

Gottwald, T. R.; Da Graça, J. V.; Bassanezi, R. B. Citrus Huanglongbing: The pathogen and its impact. **Plant Health Progress** 6 September 2007. Online (doi: 10.1094/PHP-2007-0906-01-RV).

Halbert, S. E & Manjunath, K. L. Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: a literature review and assessment of risk in Florida. **Florida Entomologist**, v. 87, n. 3, p. 330-353, 2004.

Hall, D. G.; Sétamou, M.; Mizell III, R. F. A comparison of sticky traps for monitoring Asian citrus psyllid (*Diaphorina citri* Kuwayama). **Crop Protection** v. 29, p. 1341-1346, 2010.

Hocquellet, A.; Toorawa, P.; Bové, J. M.; Garnier, M. Detection and identification of the two *Candidatus* Liberobacter species associated with citrus huanglongbing by PCR amplification of ribosomal protein genes of the *rrl* operon. **Molecular and Cellular Probes**, v. 13, p. 373-379, 1999.

Husain, M. A., Nath, D. The citrus psylla (*Diaphorina citri*, Kuw.) [Psyllidae: Homoptera]. **Memoirs of the Department of Agriculture in India. Entomological Series** 10, 1-27, 1927.

Kawamura, F. & Uchida, T. Color response of the Asian psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae). **The International Workshop for Prevention of Citrus Greening Disease in Severely Infested Areas**, Ishigaki. Proceedings, p.69-71, 2006.

Laranjeira, F. F.; Amorim, L.; Bergamim Filho, A.; Aguilar-Vildoso, C. I.; Coleta Filho, H. D. Fungos, procariotos e doenças abióticas. In: Matos Jr., D.; De Negri, J. D.; Pio, R. M.; Pompeu Jr., J. (Eds.) **Citros**. Campinas SP. p. 511-558.

Lopes, S. A.; Martins, E. C.; Frare, G. F. Detecção de *Candidatus* Liberibacter americanus em *Murraya paniculata*. **Summa Phytopathologica**, v. 31, p. 48-49, 2005 (Resumo).

Lopes, S. A.; Martins, E. C.; Frare, G. F. Detecção de *Candidatus* Liberibacter asiaticus em *Murraya paniculata*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, 2006.

Lopes, S. A.; Bertolini, E.; Frare, G. F.; Martins, E. C.; Wulff, N. A.; Teixeira, D. C.; Fernandes, N. G.; Cambra, M. Graft transmission efficiencies and multiplication of '*Candidatus* Liberibacter americanus' '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' in citrus plants, **Phytopathology**, v. 99, n. 3, p. 301-306, 2009a.

Lopes, S. A.; Frare, G. F.; Bertolini, E.; Cambra, M.; Fernandes, N. G.; Ayres, A. J.; Marin, D. R.; Bové, J. M. Liberibacters associated with citrus huanglongbing in Brazil: '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' is heat tolerant, '*Ca. L. americanus*' is heat sensitive. **Plant Disease** v. 93, p. 257-262, 2009b.

Mann, R. S.; Pelz-Stelinski, H. S.; Rouseff, R. L.; Stelinski, L. L. Understanding *Diaphorina citri*-*Candidatus* Liberibacter asiaticus interactions and *D. citri* behavior for managing

Huanglongbing (HLB) in Florida. **Proceedings of 2nd International Research Conference on Huanglongbing**, Abstract 3.6, Orlando, 2011.

Medina, C. L.; Rena A. B.; Siqueira, D. L.; Machado, E. C.. 2005. Fisiologia dos citros. In: Matos Jr., D.; De Negri, J. D.; Pio, R. M.; Pompeu Jr., J. (Eds.) **Citros**. Campinas SP. p. 146-195.

Miranda, M. P.; Felipe, M. R.; Garcia, R. B.; Yamamoto, P. T.; Lopes, J. R. S. Effect of insecticides and mineral oil on probing behavior of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) in citrus. **Proceedings of the 2nd International Research Conference on Huanglongbing**, Abstract 3.8, Orlando, 2011.

Miranda, M. P.; Noronha Jr., N. C.; Marques, R. N. Alternativas para o manejo do vetor no Brasil. In: Baldin, E. L.; Fujihara, R. T.; Firmino, A. C.; Negrisoni, E.; Souza, E. S.; Prado, E. P.; Marubayashi, J. M.. (Org.). **Avanços em Fitosauidade**. Botucatu-SP: UNESP-FEPAF, 2011, v. 1, p. 143-163.

Monselise, S. P. Citrus and related genera species In: Halevy, A.H. (Ed.). **Handbook of flowering**. Boca Raton: CRC Press, 1985. v. 2, p. 275-294.

Murray, M. G. & Thompson, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 8, p. 4321-4325, 1980.

Neves, M. F.; Trombim, V. G.; Milan, P.; Lopes, F. F.; Cressoni, F. **O retrato da citricultura brasileira**. Ribeirão Preto, SP. Markestrat. 2010. 137 p.

Noronha Jr., N. C. 2010. Efeito dos coespecíficos e voláteis das plantas *Murraya paniculata* (L.) Jack, *Psidium guajava* L. e *Citrus sinensis* (L.) Osbeck sobre o comportamento de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera:Psyllidae). **Tese Doutorado**. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

Paiva, P. E. B. 2009. Distribuição espacial e temporal, inimigos naturais e tabela de vida ecológica de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) em citros em São Paulo. **Tese Doutorado**. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

Parra, J. R. P.; Lopes, J. R. S.; Torres, M. L. G.; Nava, D. E.; Paiva, P. E. B. Bioecologia do vetor *Diaphorina citri* e transmissão de bactérias associadas ao huanglongbing. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v. 31, p. 37-51, 2010.

Rossetti, V. V. **Manual ilustrado de doenças dos citros**. Piracicaba: Fealq / Fundecitrus, 2001. 207p.

Salibe, A. A.& Cortez, R. E. **Studies on the leaf mottling disease of citrus in the Philippines**. FAO Plant Prot. Bull. v. 14, p. 141-144, 1966.

Serikawa, R. H.; Okuma, D. M.; Backus, E. A.; Rogers, M. E. Effects of soil-applied and foliar-applied insecticides on Asian citrus psyllid (*Diaphorina citri*) feeding behavior and their possible implication for HLB transmission. **Proceedings of the 2nd International Research Conference on Huanglongbing**, Abstract 3.7, Orlando, 2011.

Spiegel-Roy, P. & Goldschmidt, E. E. **Biology of citrus**. Cambridge: Cambridge University Press, 1996. 230p.

Teixeira, D. C.; Danet, J. L.; Eveillard, S.; Martins, E. C.; Jesus Jr., W. C.; Yamamoto, P. T.; Lopes, S. A.; Bassanezi, R. B.; Ayres, A. J.; Saillard, C.; Bové, J. M. Citrus Huanglongbing in São Paulo State, Brazil: PCR detection of the '*Candidatus*' Liberibacter species associated with the disease. **Molecular and Cellular Probes**, v. 19, p. 173-175, 2005.

Teixeira, D. C.; Wulff, N. A.; Martins, E. C.; Kitajima, E. W.; Bassanezi, R. B.; Ayres, A. J.; Eveillard, S.; Saillard, C.; Bové, J. M. A Phytoplasma Closely Related to the Pigeon Pea Witches-Broom Phytoplasma (16SR IX) Is Associated with Citrus Huanglongbing Symptoms in The State of São Paulo, Brazil. **Phytopathology**, v. 98, p. 977-984, 2008.

Tsai, J. H.; Wang, J. J.; Liu, Y. H. Seasonal abundance of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Homoptera:Psyllidae) in Southern Florida. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 85, n. 3, p. 446-451, 2001.

Yamamoto, P. T.; Paiva, P. E. B.; Gravena, S. Flutuação Populacional de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemíptera:Psyllidae) em Pomares de Citrus na Região Norte do Estado de São Paulo. **Neotropical Entomology**. Londrina, v. 30, n. 1, p. 165-170, 2001.

Yamamoto, P. T.; Felipe, M. R.; Garbim, L. F.; Coelho, J. H. C.; Ximenes, N. L.; Martins, E. C.; Leite, A. P. R.; Sousa, M. C.; Abrahão, D. P.; Braz, J. D. *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera: Psyllidae): vector of the bacterium *Candidatus* Liberibacter americanus. In: **Proceedings of the Huanglongbing Greening International Workshop**. Ribeirão Preto. p. 96, 2006.

Zhao, X. Y. Citrus yellow shoot disease (Huanglongbin) a review. **Proc. International Society of Citriculture**. v. 1, p. 466-469, 1981.