

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

RODRIGO REIS CONCHAL

**Influência do clima e fontes externas de inóculo na evolução de
huanglongbing em três propriedades citrícolas**

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

Orientador: Dr. Silvio Aparecido Lopes

**Araraquara
Janeiro 2016**

RODRIGO REIS CONCHAL

**Influência do clima e fontes externas de inóculo na evolução de
huanglongbing em três propriedades citrícolas**

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

Orientador: Dr. Silvio Aparecido Lopes

**Araraquara
Janeiro 2016**

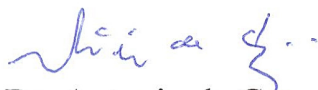
RODRIGO REIS CONCHAL

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

Araraquara, 12 de janeiro de 2015.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Silvio Aparecido Lopes (Orientador)
Fundo de Defesa da Citricultura - FUNDECITRUS, Araraquara/SP



Prof. Dr. Antonio de Góes
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, Jaboticabal/SP



Prof. Dr. Renato Beozzo Bassanezi
Fundo de Defesa da Citricultura - FUNDECITRUS, Araraquara/SP

Dedico

À minha esposa e companheira Isabella Lucian Torres Conchal, pelo amor, carinho, alegria, otimismo e apoio durante a elaboração dessa Dissertação. Pelo incentivo incondicional ao meu crescimento pessoal, profissional e intelectual, e também colaborando nas traduções e revisões. Agradeço por tê-la em minha vida.

Ofereço

À minha amada filha Isadora Torres Conchal, que me enche de amor e ternura, dando-me coragem para continuar sempre.

Aos meus pais, Ademir Conchal e Laudelina Reis Conchal, por terem me concedido a oportunidade de viver, pela minha educação e pelo exemplo de vida e união.

Às minhas irmãs, Danielle Reis Conchal e Viviane Reis Conchal, pelo amor, convivência e respeito compartilhado.

Aos meus sogros, José Romualdo Torres e Lucia Helena Romeiro Torres, agradeço por me acolherem como um filho.

Aos meus cunhados, Felipe Rafael Torres e Fernanda Batista, pelo exemplo de conhecimento, dedicação e persistência.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar a vida, saúde e coragem para não temer novos desafios.

À Empresa Sucocítrico Cutrale LTDA, pela oportunidade em cursar o Mestrado e pela confiança em mim depositada.

Ao Dr. Silvio Aparecido Lopes, pela orientação e ensinamentos durante a realização do Mestrado, pelo conhecimento transferido foi e será essencial para minha vida profissional, além de enriquecer meus conhecimentos acerca da Fitopatologia. Tendo-o como Mestre foi e sempre será uma honra.

Aos Drs. Nelson Arno Wulff e Franklin Behlau, agradeço pelo auxílio na condução deste trabalho.

Aos membros da Banca Examinadora, Dr. Renato Beozzo Bassanezi e ao Dr. Antonio de Goes, agradeço pela disposição em contribuir para as melhorias no presente trabalho.

A todos os pesquisadores do Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus) que durante as disciplinas me proporcionaram conhecer mais do Controle de Pragas e Doenças de Citros por meio de sua experiência profissional e dedicação à Citricultura.

Aos auxiliares de pesquisa do Fundecitrus, Fernanda Queirós Benedito e Hermes Teixeira, pelo companheirismo e expressivas ajudas.

Ao colega Júlio César Rodrigues, ajudando-me no geo-referenciamento e elaboração de mapas e figuras.

À Elaine Cristina Martins, técnica responsável pelo laboratório do Fundecitrus, pelas análises de PCR.

À Amanda Cristina, ajudando-me nas referências bibliográficas.

Ao Juan Camilo Cifuentes Arenas, ajudando-me nas análises estatísticas.

Ao Engenheiro Agrônomo Renato Sartori e equipe da fazenda em Capão Bonito-SP.

Aos funcionários das fazendas em Comendador Gomes e Frutal (Triângulo Mineiro), pela ajuda e paciência.

Ao Fundecitrus pelos serviços prestados à citricultura.

Aos amigos do 4º ciclo do Mestrado, pelo companheirismo, aprendizado e convivência durante o curso.

Influência do clima e fontes externas de inóculo na evolução de huanglongbing em três propriedades citrícolas

Autor: Rodrigo Reis Conchal
Orientador: Silvio Aparecido Lopes

Resumo

A cultura dos citros está sujeita ao ataque de diversas pragas e doenças que contribuem para a diminuição da produtividade nos pomares. Dentre todas as doenças, o huanglongbing (HLB), ou greening, associada à bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus* e transmitida por *Diaphorina citri*, é a mais importante e destrutiva da citricultura mundial. Entender como o HLB progride no tempo e no espaço e quais os fatores estão envolvidos no avanço da doença é de grande valia no aprimoramento das estratégias de manejo dentro das propriedades. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivos: verificar possível associação entre a progressão temporal e distribuição espacial do HLB com (a) clima prevalente na propriedade, (b) presença e espécie de bactéria e (c) áreas-foco da doença. Procurou-se também avaliar a existência de associação entre clima, presença de brotação em diferentes combinações copa/porta-enxerto e população de *D. citri*. Foram estudadas três propriedades, localizadas em Comendador Gomes (CG) e Frutal (FR) no sul do Triângulo Mineiro e em Capão Bonito (CB) no sudoeste do estado de São Paulo. Dois estudos foram realizados, sendo um no período de 2009 a 2014 e outro no período de Out/2014 a Abr/2015. No primeiro, considerado um estudo de caso, foram analisados dados de temperatura e precipitações pluviométricas mensais, e localização de plantas com HLB, enquanto no segundo foram avaliados a quantidade de brotos dos dois lados da planta em um quadrante de 0,25m², em cinco plantas/talhão e em três combinações copa/porta-enxerto diferentes. Para verificar a presença de *D. citri* foram instalados cartões adesivos amarelos para captura, sendo feito testes de qPCR nos insetos para verificar possível contaminação por *Ca. L. asiaticus*. Também foram analisados dados de temperatura e precipitações pluviométricas semanais durante o período de estudo. Os índices de plantas com HLB ao final de 2014 estavam acumulados em 0,21% em CG, 1,02% em FR e 0,51% em CB. Temperaturas mais altas se observaram em FR, CG e CB com picos máximos de 45°C, 43°C e 38°C respectivamente. Temperaturas mais baixas se observaram em CB, com mínima de -2°C, seguido de FR 5°C e CG 6°C. As precipitações foram maiores em CG, com média anual de 1.742 mm, seguido de FR com 1.574 mm e CB com 1.538 mm, sendo esta última mais distribuída ao longo dos anos. Foram capturados 10 psilídeos em FR, 67 em CB e nenhum em CG. Destes, 10% e 28,4% respectivamente estavam com *Ca. L. asiaticus*. Quanto à brotação, houve diferenças significativas entre locais para a combinação Hamlin/citrumelo Swingle, que brotou mais em CG (11,1 brotos/m²) do que em FR (9,9 brotos/m²). Houve também diferenças para a combinação Pêra Rio/tangerina Sunki, que também brotou mais em CG (11,6 brotos/m²) do que em FR (10,4 brotos/m²). Não houve diferenças entre locais para a combinação Valência/limão Cravo. Em CB, houve diferenças, sendo que Valência brotou mais sobre tangerina Sunki (15,2 brotos/m²) do que sobre *Poncirus trifoliata* (12,0 brotos/m²) ou citrumelo Swingle (9,7 brotos/m²). Não houve diferenças entre *P. trifoliata* e citrumelo Swingle. Houve diferenças na intensidade de ocorrência e evolução da doença, mas não no padrão de disseminação, sempre maior nas bordas próximas de prováveis fontes externas de inóculo. Não se detectou associação clara entre clima e incidência de HLB.

Palavras-chave: HLB, clima, brotação, evolução espacial e temporal, *Diaphorina citri*.

Climate influence and external sources of inoculum in the evolution of huanglongbing in three citrus properties

Author: Rodrigo Reis Conchal
Advisor: Silvio Aparecido Lopes

Abstract

Citrus cultivation is under to attack by many pests and diseases that contribute to decreased productivity in the orchards. The huanglongbing (HLB), or greening, associated with bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus* and transmitted by *Diaphorina citri*, is the most important and destructive of the world's citrus industry. Understanding how the HLB progresses in time and space and what factors are involved in the progression of the disease can be of great value in the improvement of management strategies within the properties. The objectives: verify possible association between the temporal progression and spatial distribution of HLB with (a) prevailing climate in the property, (b) the presence and type of bacteria and (c) disease focus areas. We also sought to assess the existence of an association between climate, the presence of budding in different combinations canopy/rootstock and population of *D. citri*. Three properties were studied, located in Comendador Gomes (CG) and Frutal (FR) in the south of the Mineiro Triangle and Capão Bonito (CB) in the southwest of the state of São Paulo. Two studies were performed: case-study which were carried from 2009 to 2014, and a study between Oct/2014 to Apr/2015. For the case-study were analyzed temperature and precipitation each month, and the trees with HLB for search were evaluated quantity of sprouts on both sides of the plant in a quadrant of 0,25m² in five plants/plot and three combinations crown/different rootstock. To verify the presence of *D. citri* were installed yellow sticky cards to capture and to verify the presence of *Ca. L. asiaticus* qPCR tests was performed. Were also analyzed weekly temperature, and precipitation during the study period. At the end of 2014, accumulated index HLB were 0,21% in CG, 1,02% in FR and 0,51% in CB. Higher temperatures were observed in FR, CG and CB with highest peak of 45 °C, 43°C and 38°C, respectively. Lower temperatures are observed in CB, at least -2°C, followed by FR and CG with 5°C and 6°C, respectively. The precipitations were higher in CG with an annual average of 1.742 mm, followed by FR (1.574 mm) and CB (1.538 mm). Psyllids were captured in FR (10 individuals) and CB (67 individuals), but neither was found in CG. In 10% and 28,4%, respectively, was detected the presence of *Ca. L. asiaticus*. Due to budding, there were significant differences between locations for the combination Hamlin/citrumelo Swingle, which sprouted more in CG (11,1 shoots/m²) than in FR (9,9 shoots/m²). There were also differences for the combination Pêra Rio/Sunki mandarin, which also arose in most CG (11,6 shoots/m²) than FR (10,4 shoots/m²). There were no differences between sites for the combination Valência/Rangpur lime. In CB, there were differences, and Valencia sprouted more about Sunki tangerine (15,2 shoots/m²) than on *Poncirus trifoliata* (12,0 shoots/m²) or citrumelo Swingle (9,7 shoots/m²). There were no differences between *P. trifoliata* and citrumelo Swingle. There were differences in intensity and occurrence of the disease, but not in the spread pattern, where the next most likely outer edges of inoculum sources. Not detected clear association between climate and incidence of HLB.

Keywords: HLB, huanglongbing, climate, budding, spatial and temporal evolution, *Diaphorina citri*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Incidência (%) de plantas com HLB no estado de São Paulo (NR, NO, CE, SU e SO), Triângulo e sudoeste Mineiro (NO). Fonte: (Fundecitrus, 2015b; Fundecitrus, 2015c).....4
- Figura 2.** Localização das propriedades estudadas no estado de São Paulo e sul do Triângulo Mineiro, identificadas sobre o mapa, indicando os diferentes tipos climáticos, de acordo com a classificação de Köppen-Geiger. Fonte: (Alvares et al., 2013).....10
- Figura 3.** Posição do cartão adesivo amarelo quadriculado na copa das plantas localizadas na bordadura (A) e detalhe do cartão com a face voltada para fora da planta (B).....15
- Figura 4.** Disposição do quadrante de policloreto de vinila (PVC) com área de 0,25 m² na altura mediana da copa da planta (A) e detalhe do quadrante usado para a contagem de brotos nos dois lados das plantas (B).....18
- Figura 5.** Guia de fases de desenvolvimento foliar (escala fenológica) da (Stoller[®] do Brasil Ltda) usado no estudo. De acordo com a escala, o estágio de vegetação inicia pelo V1 e termina no V7.....19
- Figura 6.** Médias das temperaturas máximas, mínimas e médias, e acumulado de precipitação pluviométrica mensal no período de janeiro de 2009 a dezembro de 2014, em propriedades localizadas em Comendador Gomes (A), Frutal (B) e Capão Bonito (C). As linhas tracejadas superiores, medianas e inferiores correspondem às médias das temperaturas máximas, médias e mínimas respectivamente, e as colunas correspondem ao acumulado de precipitação pluviométrica mensal.....22
- Figura 7.** Médias e erro padrão da média de precipitação pluviométrica (A) e temperaturas máximas (B) e mínimas (C) diárias mensais registrados nos seis anos de estudo (janeiro de 2009 a dezembro de 2014), em duas propriedades localizadas no sul do Triângulo Mineiro (Comendador Gomes e Frutal) e uma no sudoeste (Capão Bonito) do Estado de São Paulo.....23
- Figura 8.** Incidência acumulada, número de plantas infectadas com huanglongbing e linha de tendência de crescimento da doença (A), e médias mensais de temperaturas máximas, mínimas e médias diárias, e precipitação pluviométrica acumulada no período de abril de 2010 a dezembro de 2014 na propriedade em Comendador Gomes-MG (B).....24
- Figura 9.** Incidência acumulada, número de plantas infectadas com huanglongbing e linha de tendência de crescimento da doença (A), e médias mensais de temperaturas máximas, mínimas e médias diárias, e precipitação pluviométrica acumulada no período de agosto de 2009 a dezembro de 2014 na propriedade em Frutal-MG (B).....26
- Figura 10.** Incidência acumulada, número de plantas infectadas com huanglongbing e linha de tendência de crescimento da doença (A), e médias mensais de temperaturas máximas, mínimas e médias diárias, e precipitação pluviométrica acumulada no período de junho de 2010 a dezembro de 2014 na propriedade em Capão Bonito-SP (B).....27

- Figura 11.** Localização das plantas com sintomas de HLB detectadas no período de 2009 até 2014 na propriedade em Comendador Gomes-MG.....29
- Figura 12.** Porcentagem acumulada de plantas com HLB em quadrantes de 2.500 m² (50x50 m) na propriedade localizada em Comendador Gomes-MG.....30
- Figura 13.** Porcentagem acumulada de plantas infectadas com HLB em talhões da propriedade em Comendador Gomes, no período de 2009 a 2014, e indicação de vizinhos (plantas cítricas) próximos (A e B). Os números de 1 a 4 correspondem aos talhões próximos aos vizinhos.....31
- Figura 14.** Localização das plantas com sintomas de HLB detectadas no período de 2009 até 2014 na propriedade em Frutal-MG.....33
- Figura 15.** Porcentagem acumulada de plantas com HLB em quadrantes de 2.500m² (50x50m) na propriedade localizada em Frutal-MG.....34
- Figura 16.** Porcentagem acumulada de plantas infectadas com HLB, em talhões da propriedade em Frutal, no período de 2009 a 2014, e indicação de vizinhos próximos (A, B e C). Os números de 1 a 5 correspondem aos talhões analisados.....35
- Figura 17.** Localização das plantas com sintomas de HLB detectadas no período de 2009 até 2014 na propriedade em Capão Bonito-SP.....37
- Figura 18.** Porcentagem acumulada de plantas com HLB em quadrantes de 2.500m² (50x50m) na propriedade localizada em Capão Bonito-SP.....38
- Figura 19.** Porcentagem acumulada de plantas infectadas com HLB, em talhões da propriedade em Capão Bonito, no período de 2009 a 2014, e os vizinhos próximos (A, B e C). Os números de 1 a 3 correspondem aos talhões analisados.....39
- Figura 20.** Média do número de brotos/m² de copa de cinco plantas das três combinações copa/porta-enxerto (A) e média das temperaturas máximas, médias, mínimas e precipitação acumulada nas trinta semanas de estudo (B) na propriedade de Comendador Gomes-MG.....40
- Figura 21.** Média do número de brotos/m² de copa de cinco plantas das três combinações copa/porta-enxerto (A), média das temperaturas máximas, médias, mínimas e precipitação acumulada nas trinta semanas de estudo (B) e número de psilídeos com *Candidatus Liberibacter asiaticus* capturados em cartões adesivos na bordadura da propriedade (C) na propriedade em Frutal-MG.....41
- Figura 22.** Média do número de brotos/m² de copa de cinco plantas das três combinações copa/porta-enxerto (A), média das temperaturas máximas, médias, mínimas e precipitação acumulada nas trinta semanas de estudo (B) e número de psilídeos com *Candidatus Liberibacter asiaticus* capturados em cartões adesivos na bordadura da propriedade (C) na propriedade em Capão Bonito-SP.....42
- Figura 23.** Médias do número de brotos/m² nas diferentes combinações de copa e porta-enxerto nas propriedades localizadas nos municípios de Comendador Gomes e Frutal no período de trinta semanas de estudo. Médias com a mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% pelo teste de Tukey.....43

Figura 24. Médias do número de brotos/m² entre as combinações de plantas de Valência com diferentes porta-enxertos na propriedade localizada no município de Capão Bonito no período de trinta semanas de estudo. Médias com a mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% pelo teste de Tukey.....44

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Dados edafo-climáticos, variedades copa e porta-enxerto, situação fitossanitária e estratégias de manejo do HLB aplicadas nas propriedades estudadas.....12
- Tabela 2.** Características das combinações de plantas avaliadas quanto à frequência e intensidade de brotações nas três propriedades estudadas.....17
- Tabela 3.** Temperatura (°C) e precipitação pluviométrica (mm) em propriedades localizadas nos municípios de Comendador Gomes, Frutal e Capão Bonito no período de 2009 a 2014.....21

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Importância da citricultura	1
1.2. Importância de pragas e doenças	1
1.3. O huanglongbing ou HLB	2
1.4. As bactérias do HLB	2
1.5. Transmissão de <i>Liberibacter</i>	3
1.6. Distribuição de HLB no mundo e no Brasil	3
1.7. Epidemiologia do HLB	4
1.8. Controle do HLB	6
2. JUSTIFICATIVA	8
3. MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1. Propriedades estudadas	10
3.2. Análise das condições climáticas	13
3.3. Distribuição espacial e progressão temporal de plantas com HLB	13
3.4. Ocorrência de <i>Diaphorina citri</i>	14
3.5. Frequência e intensidade de brotações	16
4. RESULTADOS	20
4.1. Evolução de plantas infectadas por HLB	20
4.1.1. Análise da temperatura e precipitação pluviométrica	20
4.1.2. Progressão temporal de plantas infectadas por huanglongbing	24
4.1.3. Espécies de <i>Liberibacter</i>	27
4.1.4. Distribuição espacial de plantas com sintomas de huanglongbing	28
4.2. Análise da associação da ocorrência de psilídeos, brotos e clima	39
5. DISCUSSÃO	46
6. CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS	49

1. INTRODUÇÃO

1.1. Importância da citricultura

O Brasil detém 50% da produção mundial de suco de laranja, exporta 98% do que produz e participa com 85% do mercado mundial. A citricultura gerou no ano de 2009, entre empregos diretos e indiretos, um contingente de 230 mil posições e massa salarial anual de R\$ 676 milhões (Neves et al., 2010). A estimativa da safra de laranja 2015/16, publicada em 19 de maio de 2015 pelo Fundecitrus, com a cooperação da Markestrat, FEA-RP/USP e FCAV/UNESP, foi de 278,99 milhões de caixas de 40,8 kg, a ser colhida de 174,13 milhões de árvores em fase de produção.

Dentro do cinturão citrícola, duas regiões se destacam – o sul do Triângulo Mineiro e o sudoeste do estado de São Paulo. Da safra 2015/16 estimada para o cinturão citrícola, cerca de 16,37 milhões de caixas deverão ser produzidas por 10,57 milhões de árvores em 23.229 hectares no Triângulo Mineiro, e cerca de 69,64 milhões de caixas por 34,29 milhões de árvores em 71.264 hectares no sudoeste de São Paulo (Fundecitrus, 2015a).

Em 2015, 80% das propriedades foram consideradas de porte pequeno, com 67,0% com menos de 10 mil e 13,0% entre 10 mil e 20 mil árvores. Assim, em número de propriedades pode-se dizer que a citricultura é atividade, em sua maioria, constituída por pequenos citricultores, com apenas 2,3% do total situando na faixa entre 100 mil a 200 mil plantas, e outros 2,3% acima de 200 mil (CitrusBR, 2015).

1.2. Importância de pragas e doenças

A cultura dos citros está sujeita ao ataque de diversas pragas e doenças que contribuem para a diminuição da produtividade dos pomares. Entre os anos de 2000 a 2010, pragas e doenças foram responsáveis pela erradicação de 40 milhões de árvores. A redução do número de plantas saltou de 4,0% para preocupantes 7,5%, com perdas anuais de quase 80 milhões de caixas de frutas (Neves et al., 2010). Dentre todas as doenças, o “huanglongbing” (HLB), também conhecida como “greening”, pela rápida disseminação, ausência de variedades resistentes e principalmente por não ter cura, tem sido a mais séria preocupação do setor.

1.3. O huanglongbing ou HLB

O huanglongbing é conhecido na China há mais de cem anos, tendo sido relatado pela primeira vez em 1919 com esse nome que significa “doença do ramo amarelo” (Reinking, 1919; Lin, 1956). Trata-se da doença mais importante e destrutiva da citricultura mundial (Bové, 2006). Plantas doentes apresentam, geralmente, folhas parcialmente amareladas e verdes, sem delimitação clara entre essas duas cores, o que caracteriza o que se denominou de “mosqueado”. Folhas de ramos sintomáticos podem também se apresentar curvadas, de tamanho reduzido, com nervuras mais grossas e escurecidas. Frutos de ramos sintomáticos são em geral menores, assimétricos, com a região estilar mantendo-se verde, diferentemente de frutos de ramos saudáveis. Cortes perpendiculares desses frutos exibem assimetria do eixo, sementes abortadas e filetes alaranjados. Frutos sintomáticos caem podendo, com o avanço dos sintomas na copa, chegar a 100% (Bassanezi et al., 2006). Além da queda precoce, os frutos são mais ácidos e com menores valores de Brix, “ratio”, porcentagem de suco e sólidos solúveis (Bassanezi et al., 2006). A qualidade do suco também é comprometida. O período de incubação, que é o tempo entre a infecção e o aparecimento dos sintomas é variável, em geral de seis a doze meses dependendo muito provavelmente da época da infecção, combinação de copa e porta-enxerto e da idade da planta (Bové, 2006), além do ambiente, principalmente temperatura, época do ano, e da espécie de *Liberibacter*, entre outros (Lopes et al., 2009b; Mendonça, 2015).

1.4. As bactérias do HLB

Três espécies de bactérias Gram-negativas (Garnier et al., 1984) pertencentes ao grupo das alfa-proteobactérias (Jagoueix et al., 1994) têm sido associadas ao HLB: *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Ca. L. africanus* e *Ca. L. americanus* (Teixeira et al., 2005a; Bové, 2006). No Brasil, em 2007, foi confirmada a associação de um fitoplasma do grupo 16Sr-IX em plantas de citros expressando sintomas semelhantes aos associados à infecção por *Liberibacter* (Teixeira et al., 2008a). O mesmo fitoplasma do grupo 16Sr-IX foi encontrado em crotalaria (*Crotalaria juncea*) com sintomas de vassoura de bruxa (Wulff et al., 2009). Em 2009, um segundo fitoplasma, agora do grupo 16Sr-I, foi encontrado na China associado aos mesmos sintomas de HLB (Chen et al., 2009).

1.5. Transmissão de Liberibacter

As bactérias do HLB são limitadas ao floema (Garnier et al., 2000) e transmitidas por insetos (psilídeos), demonstrado pela primeira vez na África do Sul por McClean & Oberholzer (1965), na Índia por Capoor et al. (1967), nas Filipinas por Martinez & Wallace (1967), e no Brasil por Yamamoto et al. (2006). O fitoplasma que ocorre no Brasil é transmitido por cigarrinhas (Marques, 2011). Existem duas espécies de psilídeos que transmitem Liberibacter. A espécie *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae), de ocorrência no Brasil e diversos países dos continentes americano e asiático, transmite *Ca. L. asiaticus* (Martinez & Wallace, 1967) e *Ca. L. americanus* (Yamamoto et al., 2006), e a espécie *Trioza erytreae*, de ocorrência predominante no continente africano, transmite *Ca. L. africanus* (McClean & Oberholzer, 1965). O psilídeo *D. citri* foi relatado no Brasil em 1942 (Costa Lima, 1942). Possui mais de 50 espécies hospedeiras conhecidas, todas da família Rutaceae, com preferência para plantas dos gêneros *Citrus* e *Murraya* (Halbert & Manjunath, 2004), sendo estas também hospedeiras de *Ca. L. americanus* e *Ca. L. asiaticus* (Lopes et al., 2006). Pode se movimentar ativamente por voos curtos e ser levado a longas distâncias por massas de ar. Sua capacidade de dispersão e constante migração entre pomares favorece a disseminação da bactéria para áreas ainda livres da doença (Gottwald et al., 2007).

A transmissão de bactérias por insetos é em geral um processo específico e, portanto, é improvável que exista outro organismo transmissor de Liberibacter além dos psilídeos (Pereira et al., 2007). As espécies de Liberibacter também podem ser transmitidas por enxertia de tecidos infectados (Lin, 1963; Lopes & Frare, 2008). A transmissão transovariana por *D. citri* em taxas que variaram de 2 a 6% já foi comprovada (Pelz-Stelinski et al., 2010). *Ca. L. asiaticus* é mais eficientemente transmitida do que *Ca. L. americanus*, provavelmente, por atingir maiores concentrações dentro das plantas infectadas (Lopes et al., 2009a). Além disso, *Ca. L. asiaticus* é menos sensível ao calor do que *Ca. L. americanus* (Lopes et al., 2009a).

1.6. Distribuição do HLB no mundo e no Brasil

O HLB está presente em diversos países da região sudeste da Ásia, do leste e sul da África, do Oriente Médio, e das Américas Central, Norte e Sul, além da região do Caribe. No Brasil, o primeiro relato foi em março de 2004 no município de Araraquara, região central do estado de São Paulo (Coleta-Filho et al., 2004; Teixeira et al., 2005b). Em 2005 e 2007, a doença foi relatada também em Minas Gerais e Paraná respectivamente (Belasque Junior et

al., 2009). Sua distribuição no parque citrícola é mais bem conhecida porque o Fundecitrus vem realizando levantamentos amostrais desde o ano de seu primeiro relato em São Paulo. O levantamento de 2015 (Fig. 1) mostrou que, 11 anos depois do primeiro relato, a doença já estava em todas as regiões citrícolas do Estado, além das regiões do Triângulo e sudoeste Mineiro, com maiores incidências nas regiões sul e centro de São Paulo com, respectivamente, 42,5% e 23,57% de plantas com sintomas.

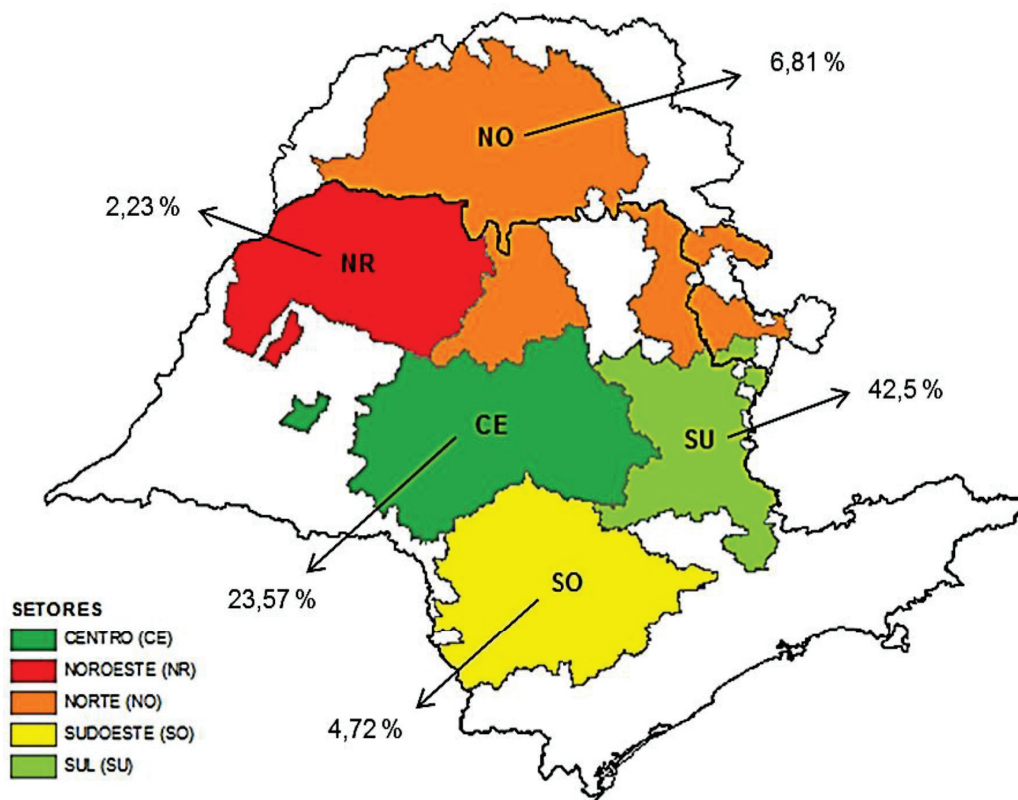


Figura 1. Incidência (%) de plantas com HLB no estado de São Paulo (NR, NO, CE, SU e SO), Triângulo e sudoeste Mineiro (NO). Fonte: (Fundecitrus, 2015b; Fundecitrus, 2015c).

A região do Triângulo Mineiro foi a menos afetada, com 0,07% de plantas com sintomas, seguida das regiões noroeste, sudoeste e norte de São Paulo, com 2,23%, 4,72% e 6,81%, respectivamente (Fundecitrus, 2015b).

1.7. Epidemiologia do HLB

Pomares altamente infestados, mantidos sem controle da doença, são fontes de inóculo para pomares vizinhos em razão da migração de *D. citri* portadores da bactéria. Estudos

conduzidos sobre a distribuição de plantas sintomáticas em diversos países, incluindo o Brasil, sugerem a existência de duas formas de dispersão do inseto: (i) à longa distância, até 3,5 km, sendo mais comum entre 880 e 1610 m, e (ii) à curta distância, entre plantas próximas entre si ou até 50 m (Gottwald et al., 1991), (Gottwald et al., 2007). A primeira forma é responsável pela infecção primária, resultante da migração de psíldeos infectivos oriundos de fontes de inóculo externas à propriedade, e a segunda pela infecção secundária, ou seja, entre plantas dentro do próprio talhão ou entre talhões vizinhos. Assim, em propriedades distantes de plantas e pomares infestados, acima de 3,5 km, o HLB pode ser mais facilmente controlado que propriedades mais próximas de outras com alta incidência, conforme sugere o trabalho de Ferreira (2014). Explicação para a dispersão de *D. citri* entre pomares pode ser a diferença entre idade das plantas e disponibilidade de brotos entre áreas, associado a manejo diferenciado como adubação, poda, irrigação e outros (Tomaseto, 2012).

Em estudo conduzido em 2001 na região norte do estado de São Paulo, o pico populacional de *D. citri* ocorreu no final da primavera e início do verão (Yamamoto et al., 2001). Isto se deve provavelmente, pela ocorrência nestas estações do ano, de maior frequência de novos fluxos vegetativos, preferidos pelo inseto para alimentação e oviposição. Já é conhecido que em regiões mais quentes, de clima tropical ou subtropical úmido, o crescimento das plantas cítricas ocorre pelo desenvolvimento de ramos 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, com ramos somente vegetativos. Estes são maiores, vigorosos, com folhas maiores e entrenós mais longos, e somente florescerão se condições climáticas esporádicas indutivas ocorrerem antes da brotação (Medina et al., 2005).

Ressalta-se que estudos quantitativos sobre epidemia de HLB são de difícil condução e interpretação. Seu efeito devastador, com rápidas perdas de produção e qualidade de frutas, torna o citricultor relutante em permitir a manutenção em seus pomares de plantas doentes ou parcelas sem adoção de qualquer medida de controle. Com isto, torna-se difícil obter locais de estudo nos quais a doença possa progredir, sem intervenções, por vários anos seguidos (Gottwald et al., 2007; Bassanezi et al., 2010). Outra dificuldade está no longo e variável período de incubação da doença.

1.8. Controle do HLB

Não há medidas efetivas e de baixo custo, nem mesmo métodos curativos para o controle de HLB. Desta forma, prevenir a infecção das plantas é fundamental. Tentativas de cura foram realizadas com a injeção de antibióticos (tetraciclina), sem resultados promissores (Bové, 2006), pois além do risco ambiental, uma vez interrompido o tratamento, os sintomas reapareceram. A poda de ramos sintomáticos e assintomáticos também foi testada, também sem sucesso (Lopes et al., 2007). Também foi testada no Brasil, sem sucesso, a termoterapia, com o uso do calor (Lopes et al., 2013a). Portanto, o controle fundamenta-se essencialmente na eliminação de plantas com sintomas, com a redução ao máximo possível da população do inseto vetor e com o plantio de mudas saudáveis (Belasque Junior et al., 2009).

A aplicação de inseticidas contra o vetor é a medida mais amplamente adotada. Deve estar acompanhada de monitoramento da população do inseto, feito por meio de cartões adesivos amarelos (armadilhas adesivas) ou observações visuais de brotações (Belasque Junior et al., 2009). As armadilhas adesivas foram mais eficientes do que o modelo 'delta amarelo' (Pavani, 2015) e vêm sendo empregadas no monitoramento tanto de *D. citri* como das cigarrinhas transmissoras da clorose variegada dos citros. Baseia-se na atração desses insetos pela cor amarela. A localização das armadilhas no pomar também deve ser levada em consideração. Menezes (2011) capturou mais insetos nas armadilhas instaladas na periferia do que nas instaladas no interior dos talhões.

A redução de inóculo é medida obrigatória desde 2005. Atualmente é regulamentada pela Instrução Normativa Nº 53 de 16/10/2008 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). A aplicação desta medida demanda, por sua vez, contínua dedicação por parte dos citricultores. Todas as plantas devem ser inspecionadas no mínimo quatro vezes ao ano. As inspeções e eliminações frequentes são necessárias pelo desconhecimento do momento em que a planta foi infectada, pela grande variação do período de incubação, e pela dificuldade de reconhecimento dos sintomas em estádios iniciais ou em determinadas épocas do ano (Mendonça, 2015). Na prática, pela falta de fiscalização pelos órgãos estaduais de defesa e por questões econômicas, muitos citricultores não cumprem a IN 53. No estudo feito por Maschio (2011), constatou-se que apenas 45% dos pequenos produtores realizavam pelo menos as quatro inspeções anuais previstas por lei, contra 69% dos médios e 86% dos grandes produtores. O controle de *D. citri* com mais de sete pulverizações anuais de inseticidas, número considerado razoável na época para manter a população do vetor sob controle, era realizada por 50% dos pequenos produtores paulistas, contra 74% dos médios e 90% dos

grandes. O emprego das medidas recomendadas por apenas parte dos citricultores e somente em nível local tem impedido a contenção da doença, com aumento da incidência em todo o parque citrícola paulista e nos estados do Paraná e Minas Gerais.

O manejo regional consiste em adotar as medidas de controle por grupos de produtores e em grandes áreas visando reduzir em nível regional as fontes de inóculo e a população de *D. citri*. Bassanezi et al. (2013) relataram que em áreas onde foi adotado o manejo regional a incidência e a taxa de progresso da doença de HLB foram respectivamente 90% e 75% menores do que em áreas sem manejo regional.

2. JUSTIFICATIVA

Entender como o HLB progride no tempo e no espaço e os fatores envolvidos pode ser de grande valia no aprimoramento das estratégias de manejo dentro das propriedades. A doença tem progredido de forma bastante desuniforme dentro do cinturão citrícola, que vai do extremo sul ao norte do estado de São Paulo englobando também a região sul do Triângulo Mineiro. Maiores incidências são observadas nas regiões centro e sul de São Paulo. Fatores climáticos podem estar associados a este fenômeno. O ambiente influencia a multiplicação de *Liberibacter* em citros, o que foi demonstrado em três estudos conduzidos em câmaras de crescimento e campo (Lopes et al., 2009a, 2013b).

Em um primeiro estudo, realizado com plantas jovens infectadas com *Ca. L. asiaticus* e *Ca. L. americanus*, demonstrou-se que *Ca. L. asiaticus* é mais tolerante ao calor do que *Ca. L. americanus* (Lopes et al., 2009a). O título de *Ca. L. asiaticus* revelado por qPCR, não foi afetado em plantas expostas diariamente a 32°C durante 90 dias, enquanto que, sob mesmas condições, *Ca. L. americanus* não foi detectada ou estava presente, mas, em baixíssimas quantidades. O título de *Ca. L. asiaticus* foi alterado somente em plantas expostas a 38°C, nas quais se detectou drástica redução do mesmo.

Em um segundo estudo, envolvendo brotações de plantas afetadas por *Ca. L. asiaticus*, observou-se que sob regime diário de temperaturas de 24 a 38°C não somente os títulos da bactéria nos brotos (4,94 células/g de tecido) foram menores do que os encontrados em plantas expostas a regimes de 12 a 24°C (6,88 células/g de tecido), como também os menores títulos estiveram associados a significativa redução (52% para 2%) na taxa de aquisição da bactéria por adultos de *D. citri* que se alimentaram dos brotos (Lopes et al., 2013b).

No terceiro estudo, envolvendo plantas naturalmente infectadas em diferentes regiões do cinturão citrícola, observou-se que, além da temperatura, o regime hídrico também está envolvido na multiplicação da bactéria nos brotos e na consequente aquisição da bactéria pelo vetor (Lopes et al., 2015). Nas plantas localizadas em pomares do Triângulo Mineiro, aonde as temperaturas foram mais altas e as quantidades de chuva menores nos últimos sete dias antes das coletas das amostras, os títulos e a taxa de aquisição de *Liberibacter* foram menores do que nas plantas localizadas em pomares da região central do estado de São Paulo, de temperaturas mais amenas e com maiores quantidades de chuva.

Considerando-se que a disseminação da doença no campo envolve não somente a quantidade de bactéria nos brotos, mas também a quantidade de plantas com HLB em

propriedades vizinhas, assim como a população do inseto vetor que, por sua vez, também é influenciada pela presença de brotos e clima, são necessários mais estudos para melhor compreensão das diferenças observadas nas taxas de progresso da doença nas diferentes regiões citrícolas, menores nos extremos norte e sul do parque citrícola do que nas regiões centrais. A presença de vizinhos sejam eles municípios, vilarejos, ranchos, condomínios ou propriedades que possuem plantas cítricas ou hospedeiras, e que não tomam qualquer ação contra o HLB, torna-se um problema para propriedades que possuem rigoroso controle fitossanitário, pois favorece a multiplicação do inseto vetor e também atua como fonte de inóculo (Ferreira, 2014; Bassanezi et al., 2013; Michigami, 2015).

Esse trabalho teve, portanto, como objetivo principal avaliar a existência de possível associação entre a progressão temporal e distribuição espacial do HLB com (a) clima prevalente na propriedade, (b) presença e espécie de *Ca. Liberibacter* spp. e (c) áreas-foco da doença. Procurou-se também avaliar a existência de associação entre clima, presença de brotação em diferentes combinações copa/porta-enxerto e população de *D. citri*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Propriedades estudadas

Esse trabalho foi conduzido em propriedades localizadas nos extremos norte e sul do parque citrícola. São duas propriedades ao norte, na região sul do Triângulo Mineiro, especificamente nos municípios de Frutal e Comendador Gomes, e uma propriedade no sudoeste do estado de São Paulo, no município de Capão Bonito (Fig. 2).

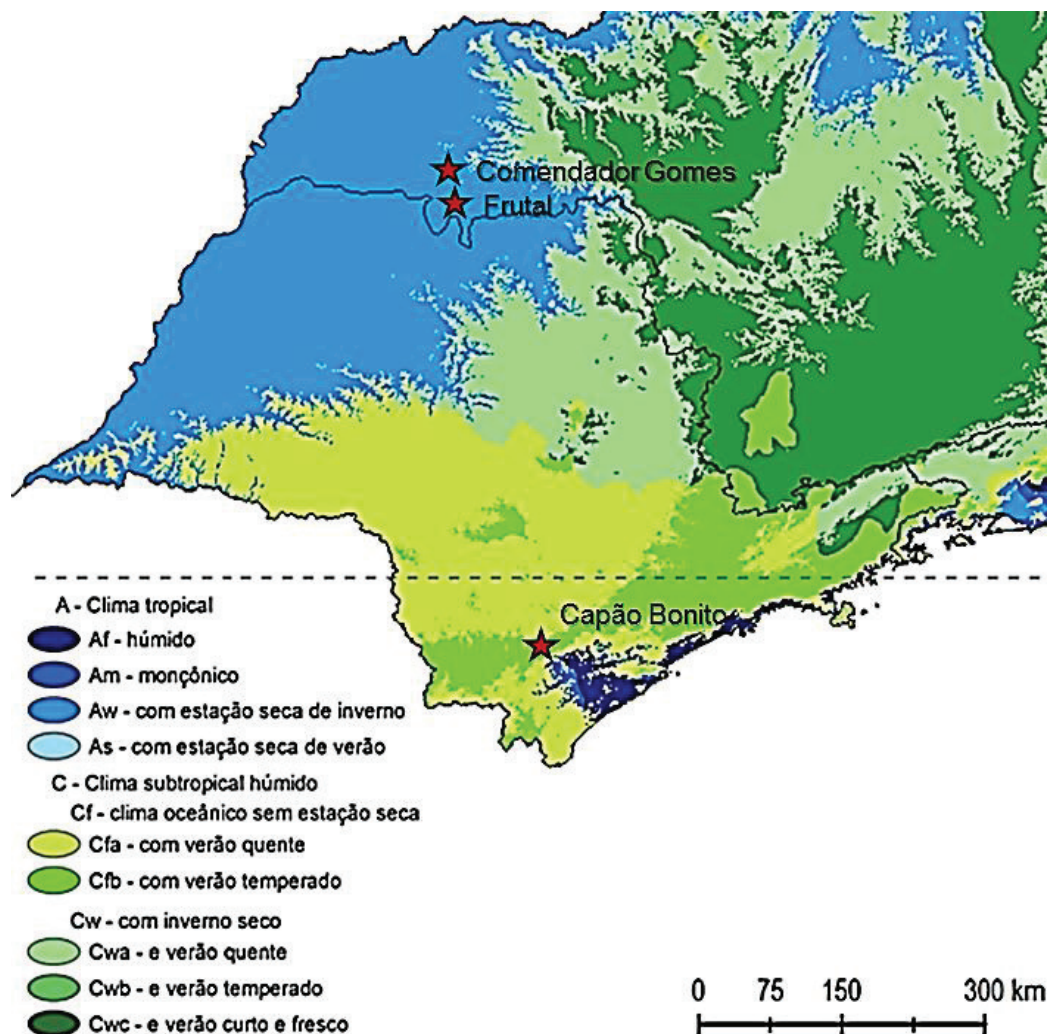


Figura 2. Localização das propriedades estudadas no estado de São Paulo e sul do Triângulo Mineiro, identificadas sobre o mapa, indicando os diferentes tipos climáticos, de acordo com a classificação de Köppen-Geiger. Fonte: (Alvares et al., 2013).

As propriedades foram escolhidas por causa das diferenças climáticas existentes entre elas e por haver dados históricos de ocorrência do HLB desde o momento em que surgiram as primeiras plantas doentes em 2009, até o ano de 2014. Com relação à pesquisa sobre a existência de associação entre clima, presença de brotação em diferentes combinações copa/porta-enxerto e de psilídeo, o período estudado foi de outubro/2014 a abril/2015, perfazendo um total de trinta semanas. A propriedade de Comendador Gomes está localizada a 19°42'47''S de latitude e 48°58'15''W de longitude, e 703 m de altitude, a propriedade de Frutal a 20°08'10''S e 48°46'25''W e 491 m, e a propriedade de Capão Bonito a 23°51'41''S e 48°13'53''W e 629 m de altitude.

De acordo com Köppen-Geiger (1928), o clima na região sul do Triângulo Mineiro é do tipo Aw, o que corresponde ao tropical com inverno seco. Apresenta estação chuvosa no verão, e nítida estação seca no inverno, com o mês de julho sendo o mais seco. As precipitações são superiores a 750 mm anuais, podendo chegar a 1.800 mm. A temperatura média do mês mais frio é superior a 18°C. O solo nas propriedades dessa região é classificado como Latossolo Vermelho Distrófico (LVd), caracterizado como sendo minerais, profundos, homogêneos, e com pouca diferenciação entre horizontes ou camadas, bem drenados, baixa capacidade de troca de cátions, textura média ou mais fina (argilosa) e, mais frequentemente, pouco férteis (Embrapa, 1999).

A propriedade de Capão Bonito encontra-se em região com clima do tipo Cfb, que corresponde ao clima temperado, com verão ameno (Köppen-Geiger, 1928). As chuvas são uniformemente distribuídas, sem estação seca e a temperatura média do mês mais quente, é inferior a 30°C. A precipitação fica em torno de 1.100 a 2.000 mm anuais. Geadas severas e frequentes ocorrem em média de 10 a 25 dias anuais. O solo nesta propriedade é classificado como Latossolo Vermelho-Amarelo, profundos, bem drenados, com textura variando de argilosa, muito argilosa ou média (Oliveira et al., 1999).

Apesar dessas diferenças, em ambas as regiões estudadas a incidência de HLB tem sido menor quando comparadas com o centro do estado de São Paulo, onde o HLB dizimou milhões de plantas cítricas nos dez anos, após o seu aparecimento. As três propriedades distam aproximadamente 300 km da região central do estado de São Paulo. Na Tabela 1 são apresentadas algumas características das propriedades estudadas.

Tabela 1. Dados edafo-climáticos, variedades copa e porta-enxerto, situação fitossanitária e estratégias de manejo do HLB aplicadas nas propriedades estudadas.

Características	Propriedade		
	Comendador Gomes	Frutal	Capão Bonito
Área total com citros (hectares)	442	1.548	1.112
Solo predominante ^a	LVd	LVd	LVA
Clima predominante ^b	Aw	Aw	Cfb
Altitude (m)	703	491	629
Porcentagem da área com irrigação	16	100	0
Total de plantas	179.821	653.560	595.112
Distribuição (%) das principais variedades copa			
Hamlin	10	28	0
Valência	34	19	64
Pêra	56	18	25
Natal	0	32	0
Outras	0	3	11
Distribuição (%) das principais variedades de porta-enxerto			
Citrumelo Swingle	47	63	71
Limão Cravo	28	20	0
Tangerina Cleópatra	9	6	3
Tangerina Sunki	13	11	8
Outras	3	0	18
Distribuição (%) por idade média (anos) em 2015			
0-3	44	8	1
> de 3	56	92	99
Perímetro da propriedade (km)	16,8	44,6	50,5
Número de vizinhos com HLB até 2 km da divisa em 2015	2	3	3
Inspeções para HLB			
Frequência		Trimestral	
Época		ano todo	
Forma		plataforma e chão	
Frequência de aplicação de inseticidas			
Na borda da propriedade		Quinzenal	
No interior da propriedade		Mensal	

^a LVd - Latossolo vermelho distrófico, LVA - Latossolo vermelho-amarelo (Embrapa, 1999)

^b Aw - Clima tropical com inverno seco, CFb – Clima subtropical úmido com verões temperados (Köppen-Geiger, 1928)

Em relação à inspeção de HLB, a época e frequência foram similares nas três propriedades, porém com variações ao longo do período estudado. No ano de 2009, a frequência foi trimestral, passando para bimestral em 2011, voltando a trimestral em 2014. Em pomares de até três anos de idade as inspeções foram feitas por caminhamento das equipes, e acima de três anos sobre plataformas acopladas a tratores.

Com relação ao controle do inseto vetor, inseticidas dos grupos químicos piretróides, organofosforados e neonicotinóides foram pulverizados quinzenalmente ao longo dos anos em todos os talhões com plantas de até três anos de idade, que também receberam quatro

aplicações de inseticidas sistêmicos do grupo dos neonicotinóides, via solo e tronco, na época de brotação. Plantas acima de três anos de idade foram pulverizadas mensalmente, com os mesmos inseticidas dos grupos químicos utilizados nas plantas com até três anos de idade, e complemento de pulverização aérea, de quatro a seis aplicações, em área total na época de brotação. Nas bordaduras, ou seja, nas plantas que estão localizadas no perímetro das propriedades, independentemente da idade, as pulverizações com inseticidas foram realizadas quinzenalmente.

3.2. Análise das condições climáticas

Os dados de temperatura e de precipitação pluviométrica foram registrados diariamente, com o uso de termômetros digitais (SoilControl[®], São Paulo, SP) e pluviômetros tipo cunha em poliestireno cristal com capacidade de 130 mm e área de captação de 15 cm², instalados na sede das propriedades. Para os dados de temperatura foram feitas médias mensais das temperaturas máximas, mínimas e médias para todos os meses dos anos de estudo. Para os dados de precipitação pluviométrica foram somados os volumes acumulados mês a mês, ao longo dos anos de estudo.

3.3. Distribuição espacial e progressão temporal de plantas com HLB

Para a avaliação da distribuição espacial de plantas com HLB, valores de latitude e longitude foram registrados no campo referentes a todas as plantas sintomáticas eliminadas, desde a primeira até a última encontrada entre janeiro/2009 e dezembro/2014, quando o estudo foi finalizado. A posição de cada planta foi indicada em mapas. Todas as plantas eliminadas haviam sido avaliadas por PCR quantitativo (qPCR) no laboratório do Fundecitrus, para correta diagnose da doença e indicação da espécie de *Liberibacter* eventualmente presente, usando protocolo laboratorial conforme descrito por Teixeira et al. (2008b). Nas propriedades do sul do Triângulo Mineiro buscou-se, a princípio, por informações da exata localização da planta eliminada (talhão, linha e planta).

Em seguida, com as informações em mãos, iniciou-se, por caminhamento, a marcação da latitude e longitude referente a cada planta eliminada, com o uso de equipamento de GPS (Sistema de Posicionamento Global), com precisão de 5 m. Os dados de GPS foram transferidos para o computador por meio do software GPS Track Maker PRO[®] (Belo Horizonte, MG). A visualização dos arquivos gerados no GPS e delimitação espacial dos

talhões foram feitas no Google Earth PRO™ (Mountain View, CA, USA). Os dados do Google foram então transferidos para o software AutoCAD 2011™ (São Rafael, CA, USA), o qual permitiu correção da posição dos talhões, geração de quadrantes (definido arbitrariamente de 50 x 50 m), identificação dos pontos (plantas com HLB), e extração das áreas e coordenadas do centroide de cada um dos quadrantes, neste último caso empregando-se o software AutoCAD Civil 3D 2011 Imperial™ (São Rafael, CA, USA). O software Sufer 12™ (Golden, CO, USA) foi usado na confecção dos mapas de isolinhas.

Para a avaliação da progressão temporal foram somadas em cada propriedade, mês a mês, de 2009 até 2014, todas as plantas com HLB. O programa Excel da Microsoft™ foi usado para somas, cálculos de médias e desvios, e determinação da taxa de crescimento da doença, além de construção de gráficos.

3.4. Ocorrência de *Diaphorina citri*

Esta análise foi feita por um período de trinta semanas, de outubro/2014 a abril/2015. Para tanto, cartões adesivos amarelos quadriculados de 30x10 cm (ISCA®, Ijuí, RS) foram instalados como armadilhas na copa das plantas, a 1,6 m de altura do solo, com a face voltada para fora da planta (Fig. 3), em toda a bordadura (perímetro) das propriedades estudadas, distantes 250 m entre si. No total foram instaladas 36 armadilhas na propriedade em Comendador Gomes, 201 na de Frutal e 241 na de Capão Bonito. A coleta e contagem de *D. citri* presentes nos cartões foram feitos semanalmente, com a mudança na exposição do lado do cartão realizado a cada quinze dias. As trocas dos cartões foram feitas mensalmente.



Figura 3. Posição do cartão adesivo amarelo quadriculado na copa das plantas localizadas na bordadura (A) e detalhe do cartão com a face voltada para fora da planta (B).

Os insetos capturados foram enviados ao laboratório do Fundecitrus para análise por qPCR para determinação de possível presença de *Ca. L. asiaticus*, de acordo com procedimento padrão do laboratório. Os DNAs dos insetos foram extraídos individualmente. Para tal, os insetos foram macerados em tubos eppendorf de 1,5 mL contendo 400 μ L de tampão de extração (CTAB 20 g, NaCl 82 g, PVP 10000 20 g, H₂O 400 mL, 100 mL de Tris 0,1 M pH 8,0 e EDTA 0,5 M pH 8,0, adicionado β -mercaptoetanol, em uma proporção de 0,2%) com pistilo para microtubos. Em seguida, foi incubado por 30 min em banho-maria a 65°C e centrifugados a 956 g por 5 min. Foram recuperados das amostras 350 μ L do sobrenadante e transferido para novo eppendorf e adicionado igual volume (350 μ L) de clorofórmio álcool isoamil (24:1), homogeneizando a solução composta por inversão dos tubos e centrifugada a 15294 g por 10 min. Em seguida foram recuperados 300 μ L do sobrenadante, transferido novamente para eppendorf e tratados com 0,6 vezes o volume de isopropanol (180 μ L), homogeneizando levemente a solução pela inversão dos tubos e deixado durante 30 min. a -20°C ou em “overnight”. Posteriormente foi centrifugado a 15294 g por 20 min, para formação do precipitado e descartado o sobrenadante. O precipitado foi lavado duas vezes com 900 μ L de etanol 70% e centrifugado a 15294 g por 10 min. E em seguida foi desidratado por 6 min no “speed vácuo” e ressuspensão em 25 μ L de H₂O Milli-Q autoclavada e deixada em “overnight” a 4°C. Para a amplificação via qPCR foi utilizado o aparelho StepOne Plus Thermocycler (Applied Biosystems). Para a amplificação foi utilizado um kit da Applied BiosystemsR denominado TaqMan probe Master Mix, que é um composto

fluorescente que se liga entre a fita dupla de DNA, e com excitação da luz emitida pelo sistema ótico do termociclador, emite fluorescência verde. Durante os ciclos consecutivos do qPCR, a quantidade de DNA fita dupla se eleva de maneira exponencial, monitorando o aumento da quantidade de fluorescência combinada à geração de “amplicons” durante os ciclos da fase exponencial. Para cada reação foi utilizado uma quantidade de 10 µL do mix: 1x master mix, 10 µM de cada primer de *Ca. L. asiaticus* f-*rp*/LAS e r-*rp*/LAS e 500 ng do DNA genômico (Teixeira et al. 2008b). Para amplificação do DNA, o programa utilizado consistiu em 95°C por 10 min e 40 ciclos de 95°C por 15 seg e 58°C por 60 seg. Cada amostra de DNA foi avaliada em duplicata para o cálculo da média dos valores referentes ao número de ciclos de PCR. A análise dos dados foi feita no software do mesmo aparelho StepOne Plus. O ponto que detecta o ciclo na qual a reação atinge o limiar da fase exponencial é denominado de Cycle Threshold (CT), ponto que permite estimativa da quantidade de fluorescência de cada amostra.

3.5. Frequência e intensidade de brotações

Nesse estudo também foi determinada a frequência e intensidade de emissão de surtos vegetativos no mesmo período em que se avaliou a ocorrência de *D. citri*. Foram avaliadas cinco plantas de cada talhão, das combinações Pêra Rio/tangerina Sunki, Hamlin/citrumelo Swingle e Valência/limão Cravo (sub-enxertadas em citrumelo Swingle) nas propriedades em Comendador Gomes e Frutal. Na propriedade em Capão Bonito foram avaliadas as combinações Valência/citrumelo Swingle, Valência/tangerina Sunki e Valência/*Poncirus trifoliata*. Nesta propriedade não havia as mesmas combinações das propriedades do Triângulo Mineiro. Para evitar discrepância entre os surtos vegetativos, foram escolhidas plantas com a mesma idade, ou com no máximo um ano de diferença entre si, já que plantas novas ou jovens emitem mais surtos vegetativos do que plantas mais velhas. O espaçamento de plantio não foi levado em consideração neste estudo. As plantas avaliadas estavam localizadas de forma aleatória no interior de cada talhão, distantes entre si e também da bordadura. Para a marcação destas plantas foram utilizadas fitas de cor branca, sendo colocadas nas primeiras plantas da linha de plantio e nas plantas que foram avaliadas dentro dos talhões. Na Tabela 2 são apresentadas características das plantas estudadas.

Tabela 2. Características das combinações de plantas avaliadas quanto à frequência e intensidade de brotações nas três propriedades estudadas.

Propriedade	Combinação copa/porta-enxerto	Idade (anos)	Espaçamento (m)
Comendador Gomes	Pêra Rio/tangerina Sunki	6	7,0 x 4,0
	Hamlin/Citrumelo Swingle	14	7,5 x 3,5
	Valência/limão Cravo	15	8,0 x 4,0
Frutal	Pêra Rio/tangerina Sunki	7	7,0 x 3,0
	Hamlin/Citrumelo Swingle	15	7,0 x 3,0
	Valência/limão Cravo	16	7,0 x 3,5
Capão Bonito	Valência/Citrumelo Swingle	7	6,5 x 3,0
	Valência/tangerina Sunki	6	6,5 x 2,8
	Valência/ <i>Poncirus trifoliata</i>	6	6,5 x 2,8

A contagem dos brotos foi realizada uma vez por semana e no mesmo dia nas três propriedades. A contagem foi feita nos dois lados das plantas voltados para as entrelinhas de plantio e na região mediana das copas das árvores. Para isto, foi usado um quadrante de policloreto de vinila (PVC) de 0,5 x 0,5 m, perfazendo uma área de 0,25 m² (Fig. 4). Os dados de brotação foram submetidos à análise estatística. Cada planta foi considerada uma repetição. Os dados acumulados, independentemente do estágio vegetativo, foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, para determinação de possível influência do porta-enxerto e local, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. O programa usado para estas análises foi o Statgraphics. Para melhor compreensão, o número de brotos, contados em área de 0,25 m², foi convertido em brotos por m².

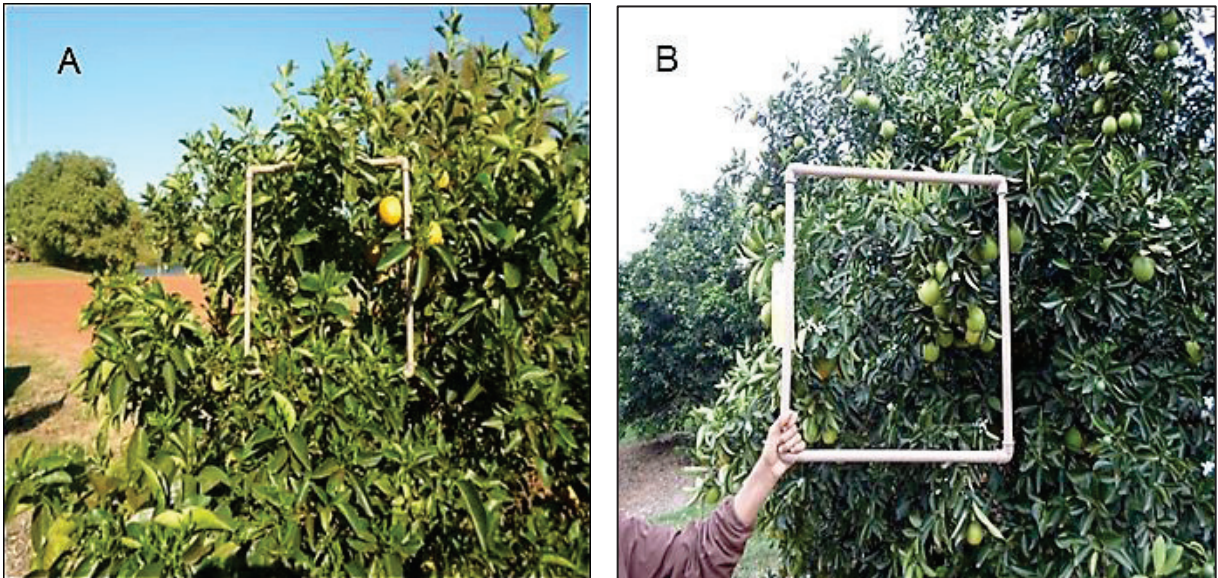


Figura 4. Disposição do quadrante de policloreto de vinila (PVC) com área de $0,25 \text{ m}^2$ na altura mediana da copa da planta (A) e detalhe do quadrante usado para a contagem de brotos nos dois lados das plantas (B).

Para o estudo foram contados todos os brotos do estágio V2, que corresponde ao início da brotação vegetativa, com as folhas iniciando o distanciamento entre elas, porém com o eixo central da brotação pouco definido, ao estágio V6, que corresponde ao ramo vegetativo com $\frac{3}{4}$ do tamanho final, ainda exibindo uma coloração verde-clara. Foi descartado o estágio V7, pois corresponde a ramo vegetativo maduro e que não contribui para a multiplicação do inseto (Arenas, 2014, comunicação pessoal). Foi usada como escala fenológica o guia de fases de desenvolvimento da Stoller[®] do Brasil Ltda (Fig. 5).

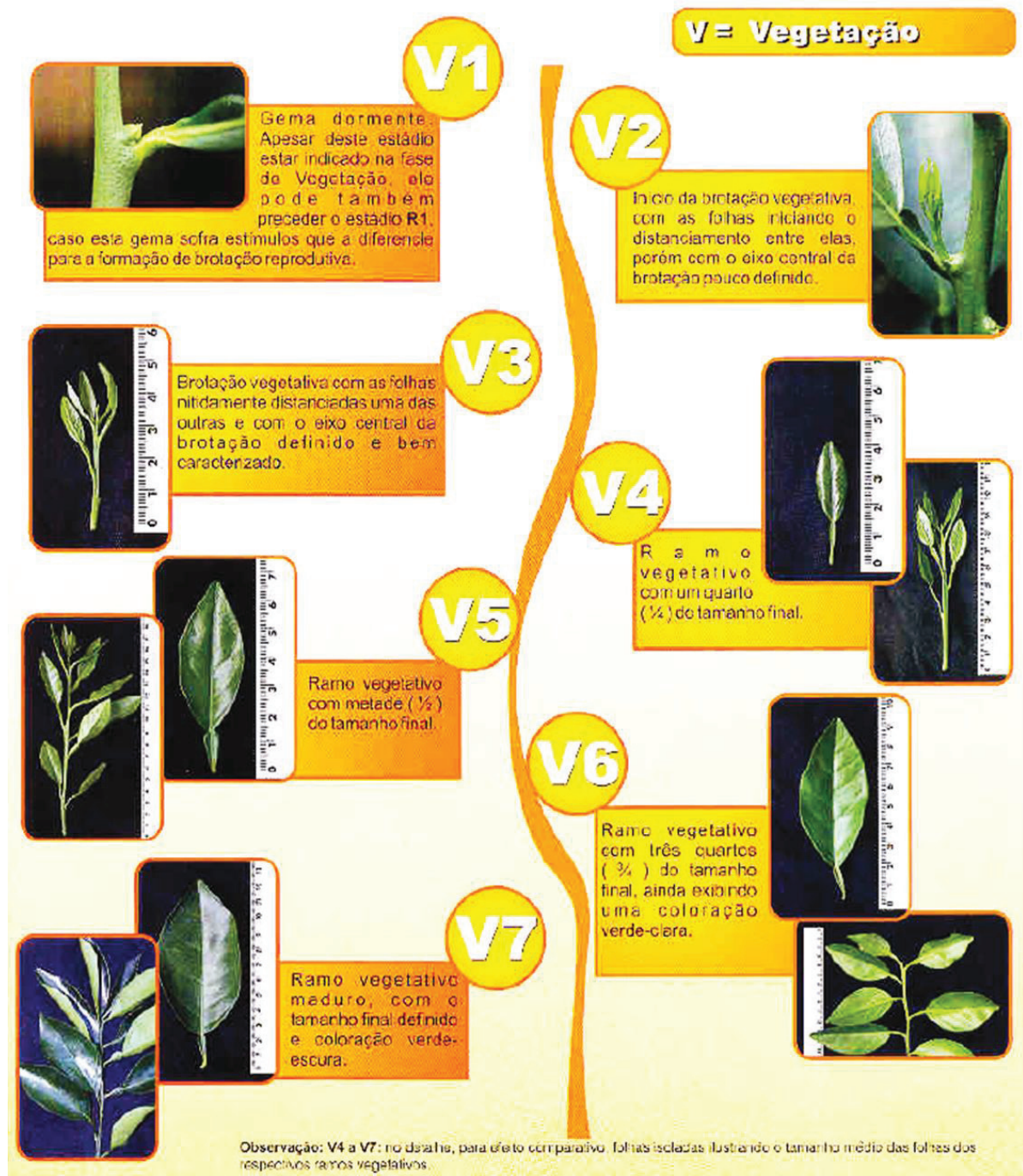


Figura 5. Guia de fases de desenvolvimento foliar (escala fenológica) da (Stoller® do Brasil Ltda) usado no estudo. De acordo com a escala, o estágio de vegetação inicia pelo V1 e termina no V7.

4. RESULTADOS

Os resultados deste trabalho foram divididos em duas partes: (i) estudo da evolução de plantas infectadas por HLB no período de 2009 a 2014, e sua associação a fatores climáticos e a presença de fontes externas de inóculo, (ii) estudo da ocorrência de psilídeos e frequência e intensidade de brotações, e associação dessas variáveis a fatores climáticos durante um período de trinta semanas (outubro/2014 a abril/2015).

4.1. Evolução de plantas infectadas por HLB

4.1.1. Análise da temperatura e precipitação pluviométrica

A Tabela 3 e Figuras 6 e 7 contém informações comparativas dos dados registrados nas três propriedades no período de estudo (jan/2009 a dez/2014). Diferenças foram detectadas entre propriedades, mas principalmente entre regiões. Em relação às temperaturas máximas absolutas diárias (dados não apresentados), a propriedade em Frutal apresentou os maiores valores, com picos de até 45°C em novembro/2009, dezembro/2010 e novembro/2013, seguido das propriedades de Comendador Gomes, com picos de até 43°C em novembro/2012 e setembro/2013, e de Capão Bonito, com picos de 38°C em dezembro/2013 e fevereiro/2014. Em outubro, um dos meses mais quentes do ano, as temperaturas na propriedade em Capão Bonito foi em média 5,9°C menores que em Comendador Gomes, e 8,6°C menores que em Frutal. O número de dias com temperatura acima de 30°C foi de 1.525 na propriedade em Frutal, 1.103 em Comendador Gomes e 429 em Capão Bonito. Foram usados como limites, temperaturas abaixo de 15°C e acima de 30°C porque em outro estudo em andamento, estas temperaturas mostraram estar associadas à maior ou menor concentração de *Ca. L. asiaticus* nos brotos das plantas infectadas (S. Lopes, comunicação pessoal).

Quanto às temperaturas mínimas absolutas, a propriedade em Capão Bonito apresentou os menores valores, sendo -2°C em agosto/2011 e 0°C em junho/2009, seguido de Frutal, com 5°C em julho/2009, agosto/2011 e julho/2013 e Comendador Gomes, com 6°C em junho/2011 e julho/2012. Em julho, mês mais frio do ano, a propriedade em Capão Bonito foi em média 4,4°C menor que em Comendador Gomes e 6,8°C menor que em Frutal. O número de dias com temperaturas abaixo de 15°C foi de 608 na propriedade em Capão Bonito, 392 em Frutal e 278 em Comendador Gomes.

Quanto a precipitação pluviométrica, a maior quantidade foi observada na propriedade em Comendador Gomes, em cinco dos seis anos estudados, com média anual de 1.742 mm contra 1.574 em Frutal e 1.538 em Capão Bonito. Nas três localidades estudadas, maiores volumes se concentraram no período do ano que corresponde à primavera e verão, enquanto que os menores volumes se concentraram no período do ano que corresponde ao outono e inverno. Houve maior similaridade nos regimes de precipitação pluviométrica nas propriedades em Comendador Gomes e Frutal, locais próximos entre si, que diferiram da propriedade em Capão Bonito onde as precipitações foram mais distribuídas ao longo dos anos de estudo e também com volumes consideráveis no outono/inverno (519 mm) em média.

Tabela 3. Temperatura (°C) e precipitação pluviométrica (mm) em propriedades localizadas nos municípios de Comendador Gomes, Frutal e Capão Bonito no período de 2009 a 2014.

Parâmetros	Localização das propriedades		
	Comendador Gomes	Frutal	Capão Bonito
Temperatura máxima absoluta			
Valor	43°C	45°C	38°C
Ocorrência	Nov 09, Dez 10 e Nov 13	Nov 12 e Set 13	Dez 13 e Fev 14
Temperatura mínima absoluta			
Valor	6°C	5°C	-2°C e 0°C
Ocorrência	Jun 11 e Jul 12	Jul 09, Ago 11 Jul 13	Ago 11 e Jun 09
Total de dias com temperaturas			
Acima de 30°C	1.103	1.525	429
Abaixo de 15°C	278	392	608
Precipitação média anual (mm)	1.742	1.574	1.538

Nos anos em que o estudo foi conduzido, os dados de clima seguiram o mesmo padrão dos dados históricos, ou seja, temperaturas mais amenas e distribuição mais uniforme das precipitações pluviométricas no sudoeste do Estado de São Paulo, e temperaturas mais altas e maior irregularidade das precipitações pluviométricas no sul do Triângulo Mineiro (Fig. 6). Isto fica mais evidente ao se analisar a Figura 7.

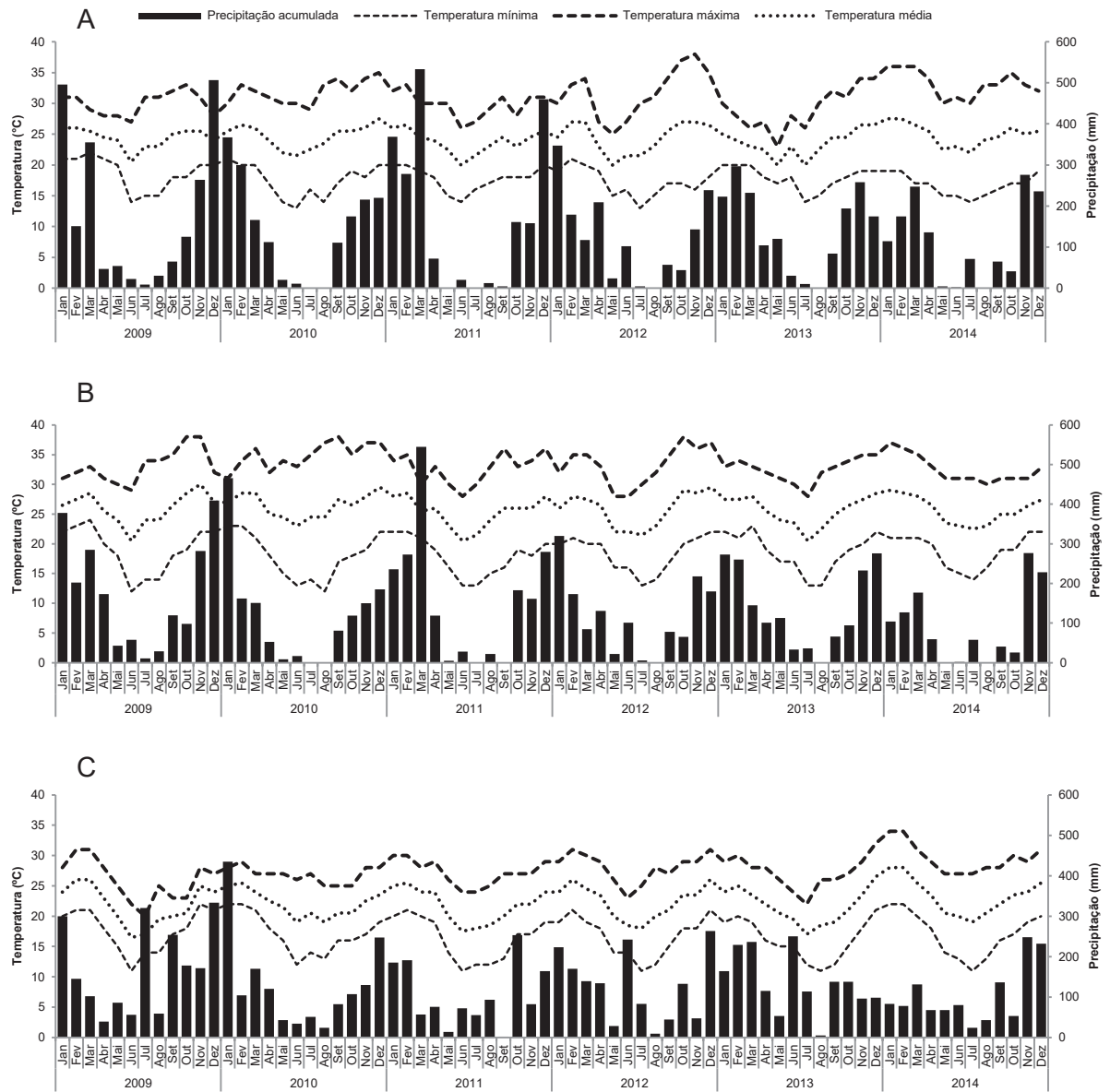


Figura 6. Médias das temperaturas máximas, mínimas e médias, e acumulado de precipitação pluviométrica mensal no período de janeiro de 2009 a dezembro de 2014, em propriedades localizadas em Comendador Gomes (A), Frutal (B) e Capão Bonito (C). As linhas tracejadas superiores, medianas e inferiores correspondem às médias das temperaturas máximas, médias e mínimas respectivamente, e as colunas correspondem ao acumulado de precipitação pluviométrica mensal.

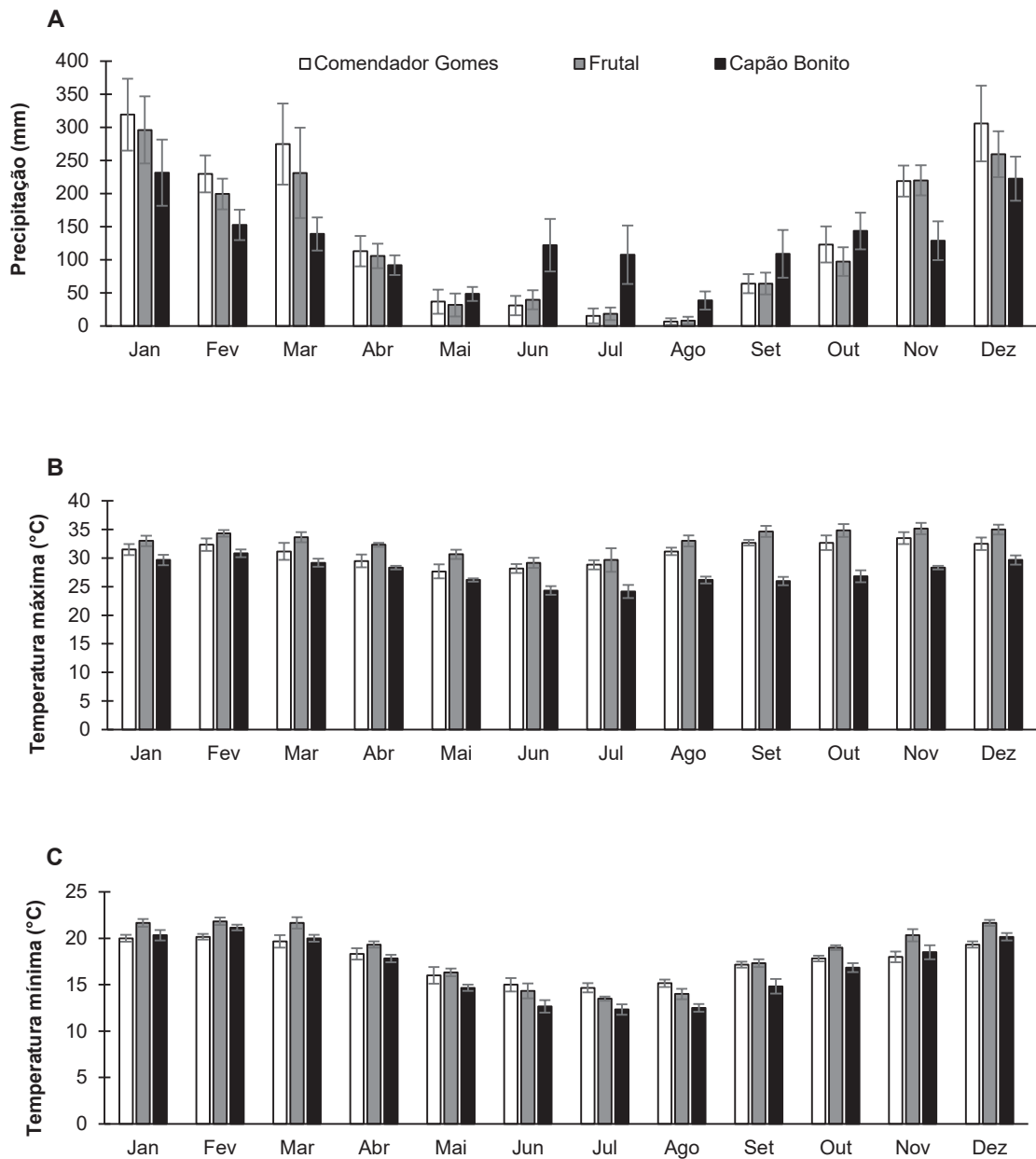


Figura 7. Médias e erro padrão da média de precipitação pluviométrica (A) e temperaturas máximas (B) e mínimas (C) diárias mensais registrados nos seis anos de estudo (janeiro de 2009 a dezembro de 2014), em duas propriedades localizadas no sul do Triângulo Mineiro (Comendador Gomes e Frutal) e uma no sudoeste (Capão Bonito) do Estado de São Paulo.

4.1.2. Progressão temporal de plantas infectadas por huanglongbing

Comendador Gomes

Na propriedade localizada em Comendador Gomes (Fig. 8), a primeira planta com HLB foi relatada em abril de 2010. A porcentagem de plantas sintomáticas permaneceu estável (0,01) até junho de 2012. No inverno deste ano ocorreu o primeiro pico da doença, pois foram encontradas um total de 18 plantas sintomáticas em julho e agosto. Um ano mais tarde ocorreu o segundo pico, também nos meses de julho e agosto, na qual 19 plantas sintomáticas foram detectadas, elevando a incidência a 0,09%. Este índice permaneceu estável até abril de 2014, quando um terceiro pico ocorreu nos meses de maio, junho e julho, totalizando 119 plantas. Em dezembro de 2014 havia acumuladas 185 plantas equivalentes a 0,21% de incidência. O aumento da doença no tempo seguiu a tendência média para a propriedade (Fig. 8A).

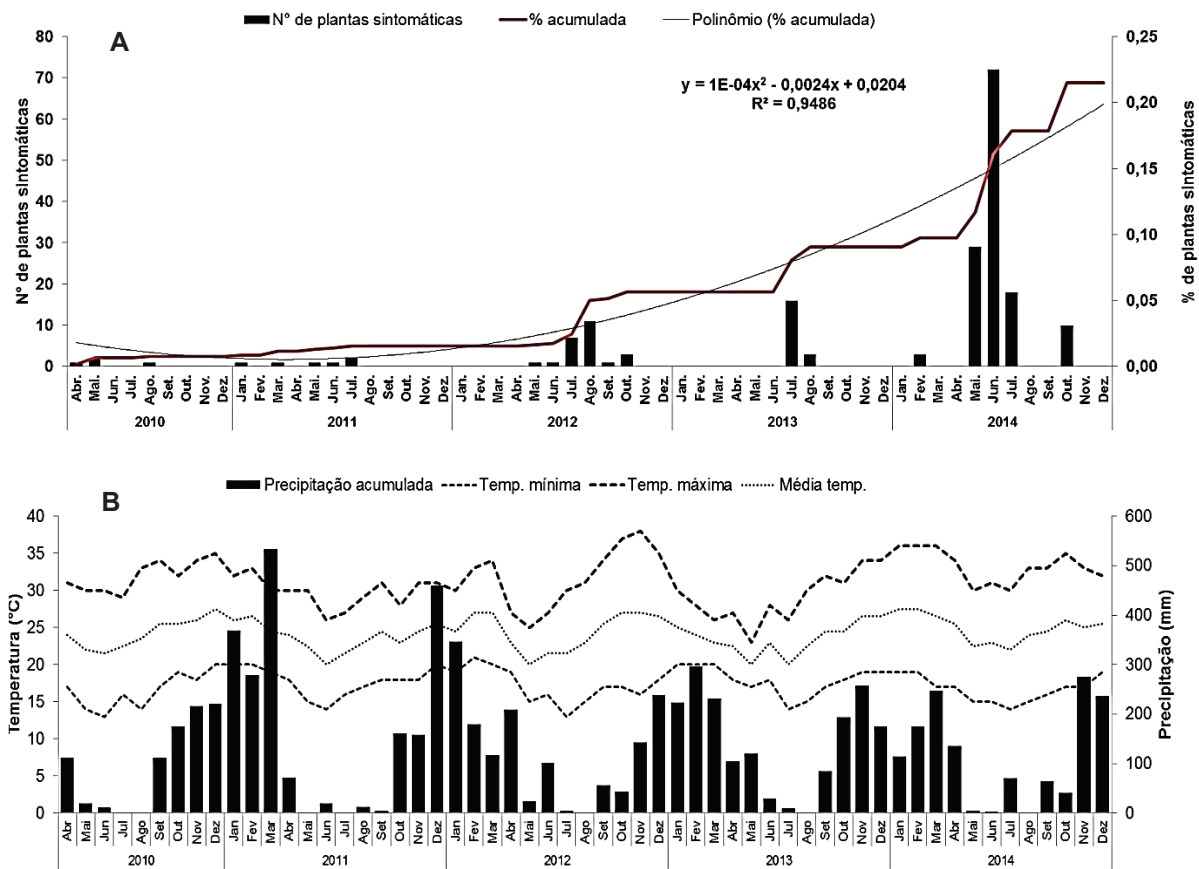


Figura 8. Incidência acumulada, número de plantas infectadas com huanglongbing e linha de tendência de crescimento da doença (A), médias mensais de temperaturas máximas, mínimas e médias diárias, e precipitação pluviométrica acumulada (B), no período de abril de 2010 a dezembro de 2014 na propriedade em Comendador Gomes-MG.

Cerca de 90% das plantas sintomáticas foram detectadas nos meses de inverno, logo após ou durante períodos de queda de temperatura coincidindo com período de baixa precipitação pluviométrica (Fig. 8B).

Frutal

Na propriedade localizada em Frutal (Fig. 9), a primeira planta com HLB foi detectada em agosto de 2009. A porcentagem de plantas sintomáticas permaneceu estável (0,007) até março de 2010. No inverno deste mesmo ano ocorreu o primeiro pico da doença. Foram encontradas 137 plantas sintomáticas entre abril e agosto. No ano de 2011 foram encontradas 44 plantas sintomáticas, elevando a incidência de plantas sintomáticas para 0,11%. Em 2012 ocorreu um terceiro pico da doença, com 134 plantas encontradas em maio e junho, aumentando a incidência para 0,14%, permanecendo estável até abril de 2013. O quarto pico foi observado entre maio e novembro do mesmo ano, com 495 plantas, elevando a incidência para 0,3%. O quinto pico, de maior intensidade, teve início em janeiro de 2014 e permaneceu até novembro do mesmo ano, quando foram detectadas 1.888 plantas sintomáticas. O índice de 2014 foi mais que três vezes superior ao de 2013, elevando a incidência a acumulados 1,01% referentes a 2.730 plantas (Fig. 9A). Nesta propriedade, apesar da incidência encontrar-se ainda baixa, o aumento foi maior que nas demais propriedades, e maior que o esperado, principalmente nos anos de 2013 e 2014. De 2009 até 2013, cerca de 90% das plantas sintomáticas foram detectadas nos meses de inverno, e que correspondem ao período de menor precipitação pluviométrica do ano, similar ao que ocorreu em Comendador Gomes (Fig. 8). O ano de 2014 foi exceção, pois foram detectadas 1.380 plantas sintomáticas (73%) em um período historicamente de maiores precipitações pluviométricas, contrário do que ocorreu em 2014 (Fig. 9B). A baixa precipitação pluviométrica pode ter retardado o início das brotações e favorecido a detecção das plantas com sintomas pela equipe de inspeção.

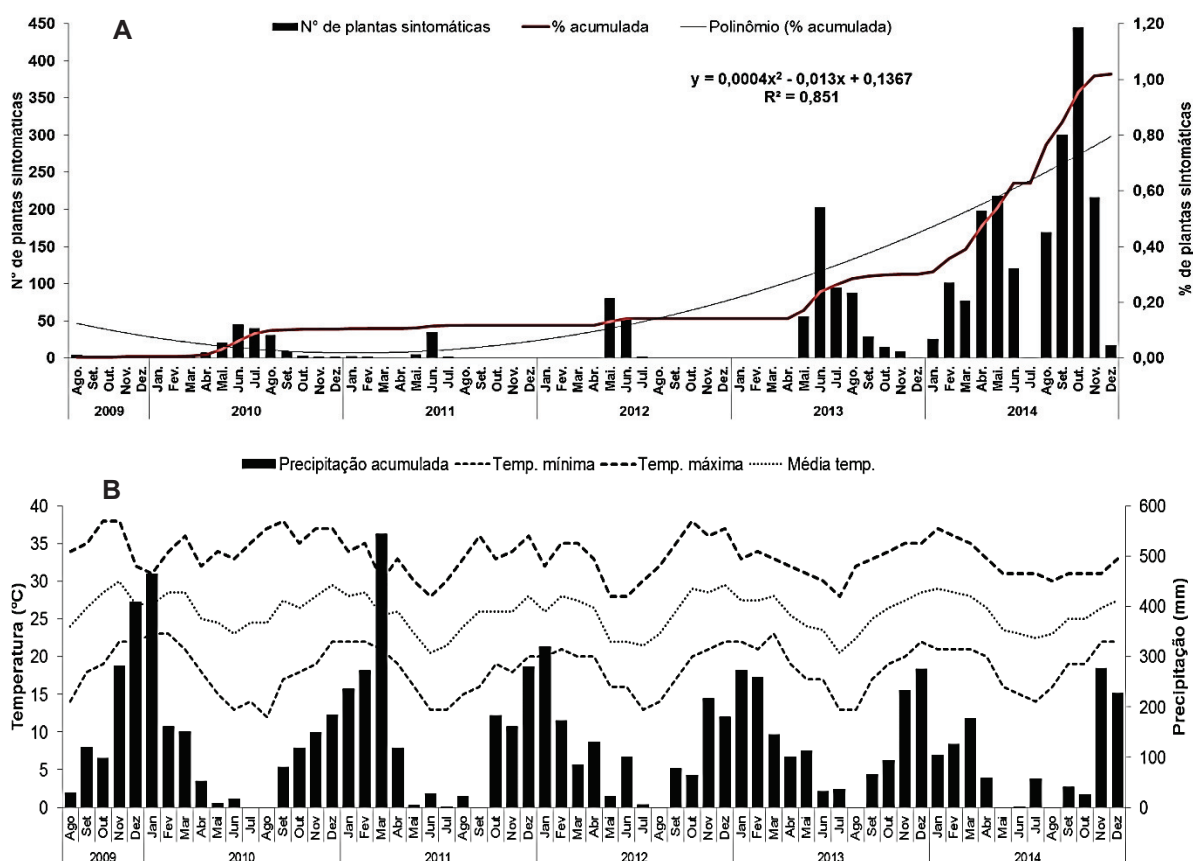


Figura 9. Incidência acumulada, número de plantas infectadas com huanglongbing e linha de tendência de crescimento da doença (A), médias mensais de temperaturas máximas, mínimas e médias diárias, e precipitação pluviométrica acumulada (B), no período de abril de 2010 a dezembro de 2014 na propriedade em Frutal-MG.

Capão Bonito

Na propriedade localizada em Capão Bonito, a doença foi encontrada pela primeira vez em junho de 2010 (Fig. 10). A porcentagem de plantas sintomáticas permaneceu estável (0,008) até abril de 2011. No inverno deste ano ocorreu o primeiro pico, com 64 plantas encontradas nos meses de maio e junho, aumentando para 0,02% a incidência de plantas doentes. Este índice se manteve estável até dezembro do mesmo ano, quando em 2012 ocorreu o segundo pico ao serem detectadas 463 plantas entre os meses de janeiro e setembro. Com isto a incidência subiu para 0,11%. Em 2012 foram encontradas em média 50 plantas/mês, de janeiro a setembro, com queda de outubro a dezembro. A incidência permaneceu estável até abril de 2013 quando foi observado um terceiro e maior pico da doença, quando foram encontradas 718 plantas de maio até outubro, elevando a incidência para 0,35%. O quarto e último pico da doença teve início em janeiro e término em agosto de 2014. Neste período se detectou 448 plantas sintomáticas, elevando a incidência para 0,51% em dezembro do mesmo ano, totalizando 1.751 plantas. O aumento na incidência de plantas

sintomáticas no ano de 2014 esteve abaixo da linha de tendência (Fig. 10A). Cerca de 76% das plantas sintomáticas foram encontradas nos meses de inverno e que correspondem aos meses de menor precipitação pluviométrica, mas no caso desta propriedade nesta estação do ano também choveu de forma regular, com até 300 mm de precipitação acumulada (Fig. 10B).

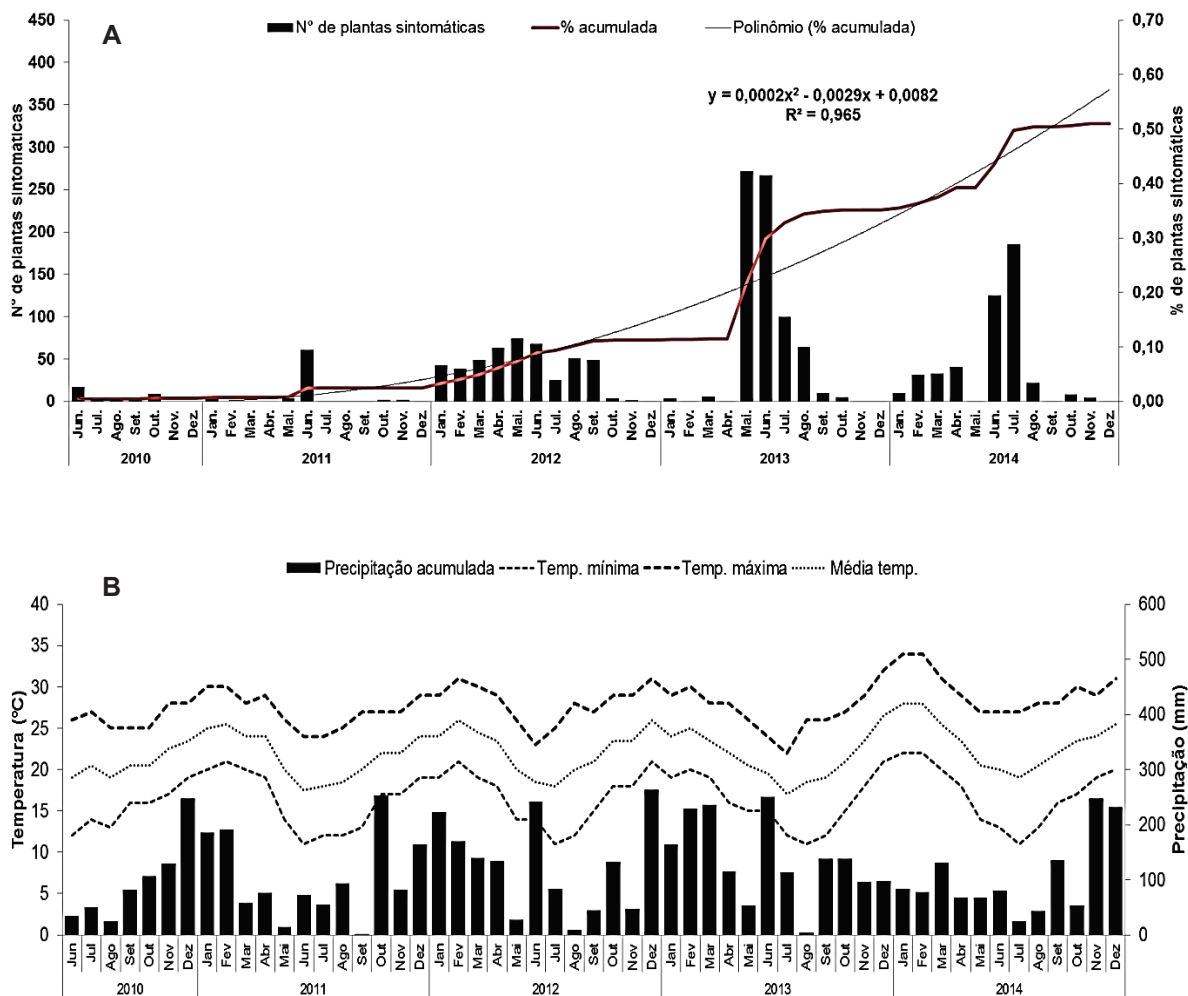


Figura 10. Incidência acumulada, número de plantas infectadas com huanglongbing e linha de tendência de crescimento da doença (A), médias mensais de temperaturas máximas, mínimas e médias diárias, e precipitação pluviométrica acumulada (B), no período de abril de 2010 a dezembro de 2014 na propriedade em Capão Bonito-SP.

4.1.3. Espécies de *Liberibacter*

Nas avaliações, verificou-se que *Ca. L. asiaticus* sempre foi a espécie mais frequente, em relação a *Ca. L. americanus*. As porcentagens de amostras com *Ca. L. asiaticus* e *Ca. L. americanus* foram 98,9 e 1,1 na propriedade localizada em Comendador Gomes, 98,1 e 1,9 em Frutal e 100 e 0 em Capão Bonito. A espécie *Ca. L. americanus* foi detectada somente até o

mês de julho de 2011. Também foram detectadas duas plantas com fitoplasma, uma na propriedade em Frutal e outra na propriedade em Capão Bonito.

4.1.4. Distribuição espacial de plantas com sintomas de huanglongbing

Comendador Gomes

Na propriedade em Comendador Gomes (Fig. 11), plantas com sintomas de HLB e confirmadas por PCR foram detectadas em 2010. Foram encontradas quatro plantas em quatro talhões, distanciados em pelo menos 500 metros entre si, sendo duas localizadas próximas ao perímetro e duas no interior da propriedade. Em 2011, sete plantas com HLB foram detectadas próximas às primeiras plantas encontradas no ano anterior. De 2012 a 2013 foram detectadas 43 plantas com aparente agregação entre elas. Em 2014 foram detectadas 132 plantas doentes, distribuídas na maioria dos talhões da propriedade (de forma aleatória), exceto nos talhões de plantas novas (0-3 anos), nos quais nenhuma planta foi encontrada.

Evidência da agregação das plantas com HLB é também apresentada na Figura 12, na qual é representada a incidência acumulada nos seis anos de estudo. Dois focos se destacam (três picos), um ao norte e outro ao sul da propriedade, sugerindo locais de entrada da doença.

Os pontos de maior incidência observados na Figura 12 encontram-se a cerca de 500 m de fontes externas de inóculo (Fig. 13). Ao norte existe uma propriedade com cerca de 30.000 plantas jovens (vizinho A) abandonadas há cinco anos, e ao sul existe um posto de combustível (vizinho B) em cujo quintal existem várias plantas cítricas. Ambos os locais podem estar servindo de “criadouro” de psilídeos infectivos, já que nestes locais existem plantas sintomáticas as quais não são submetidas a quaisquer medidas de controle fitossanitário. O vizinho A está provavelmente exercendo influência sobre o talhão 3 e talhões adjacentes (Fig. 13), haja visto que nestes os índices variam de 0,15% a 0,2% de plantas com HLB contra, em média, 0,05% nos demais talhões. No talhão 4, apesar de existir somente uma cerca que o separa do vizinho A, não foi encontrada planta com HLB, provavelmente por se tratar de um talhão com plantas novas (0-3 anos), onde o controle do inseto vetor tem sido mais rigoroso (pulverizações quinzenais de inseticidas além de inseticidas sistêmicos no período de maior brotação). Neste talhão, o controle da bordadura também é realizado quinzenalmente. O vizinho B, ao sul, provavelmente está exercendo influência sobre os talhões 1 e 2, que possuem os índices mais altos de HLB da propriedade (0,6% e 0,3% respectivamente) (Fig. 13).

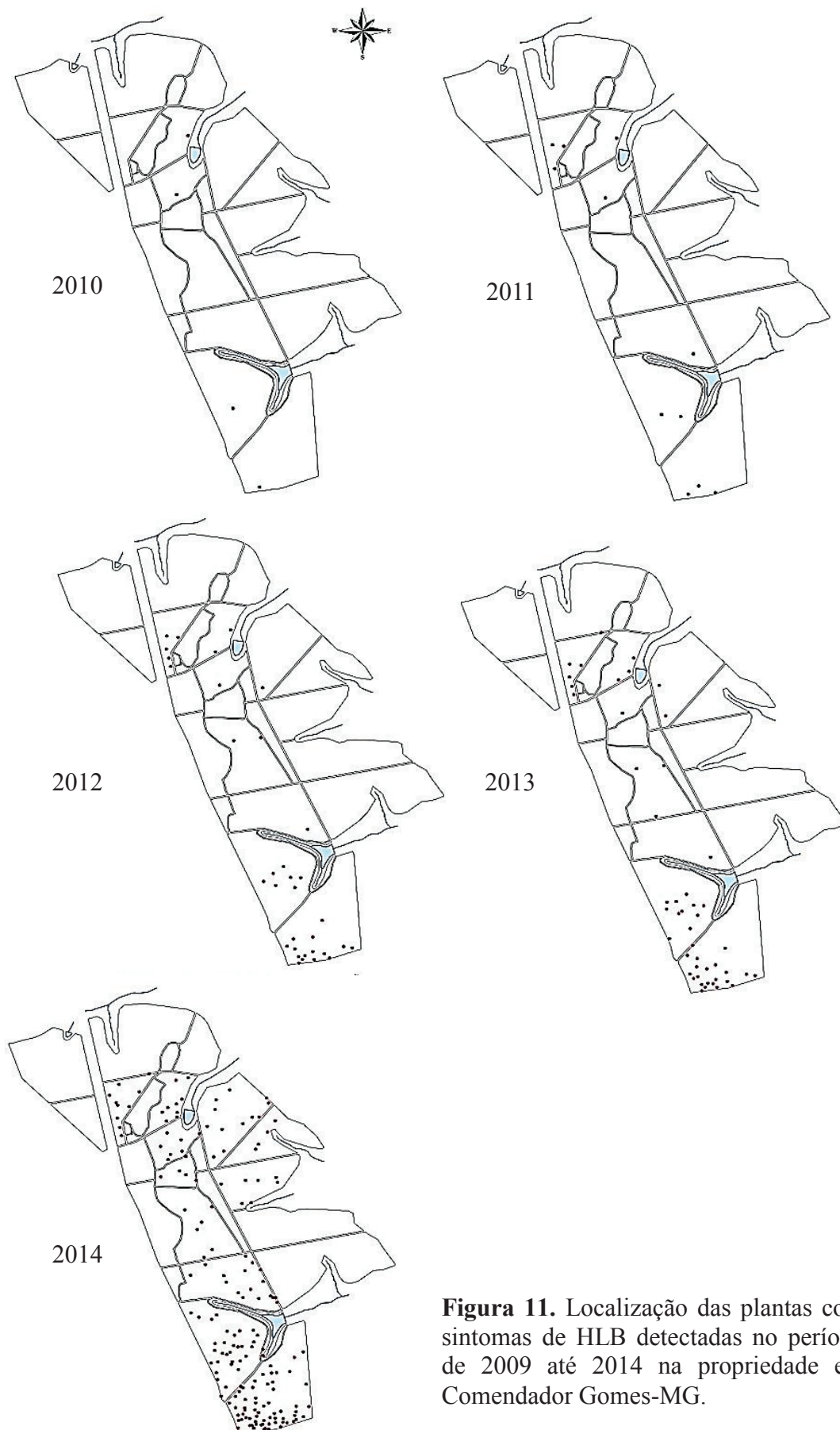


Figura 11. Localização das plantas com sintomas de HLB detectadas no período de 2009 até 2014 na propriedade em Comendador Gomes-MG.

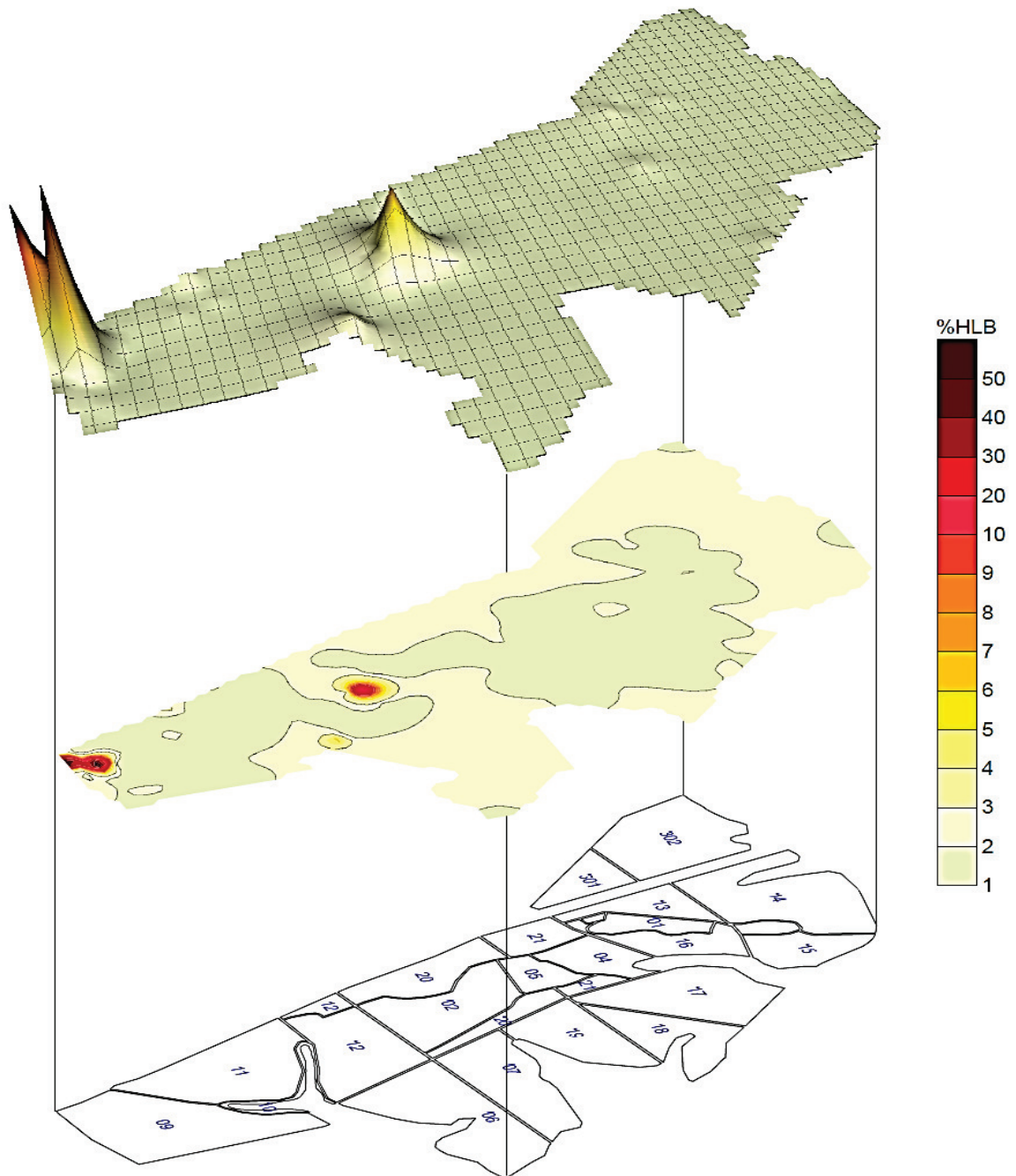


Figura 12. Porcentagem acumulada de plantas com HLB em quadrantes de 2.500 m² (50 x 50 m) na propriedade localizada em Comendador Gomes-MG.

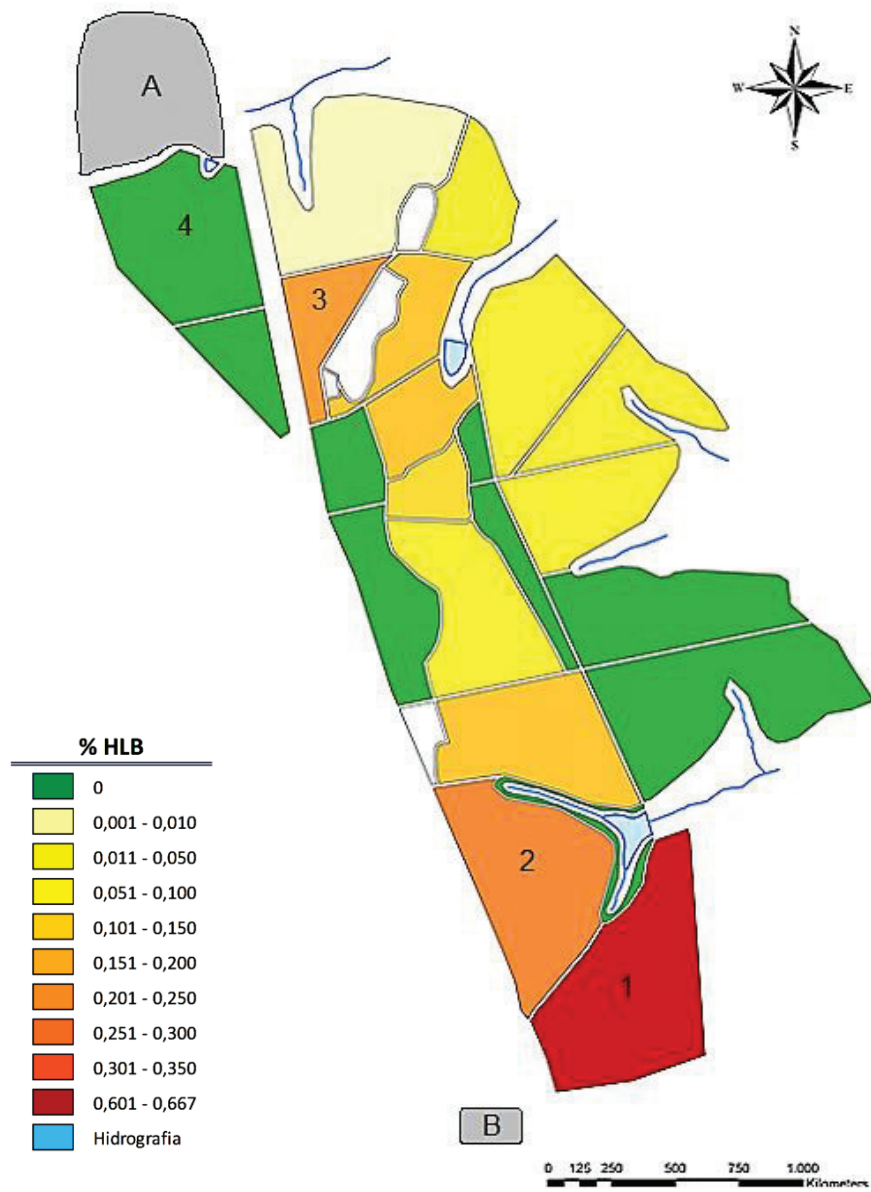


Figura 13. Porcentagem acumulada de plantas infectadas com HLB em talhões da propriedade em Comendador Gomes, no período de 2009 a 2014, e indicação de vizinhos (plantas cítricas) próximos (A e B). Os números de 1 a 4 correspondem aos talhões próximos aos vizinhos.

Frutal

Na propriedade em Frutal, plantas com HLB foram inicialmente encontradas em 2009. Foram seis plantas em cinco talhões, distantes aproximadamente 100 m entre si, dos quais cinco estavam localizadas no interior e uma no outro extremo, na divisa a nordeste da propriedade (Fig. 14). Em 2010 e 2011, foram encontradas 160 e 44 plantas, respectivamente, distribuídas em todos os setores. Em 2012, o número voltou a aumentar, com 134 plantas sintomáticas encontradas, com aparente agregação (focos), já indicando possíveis locais de entrada da doença na propriedade. Em 2013, observou-se aumento nos focos, em número de plantas e em área ocupada. Em 2014 o aumento foi ainda maior, com 1888 plantas detectadas. Na Figura 15 é mostrado o número acumulado de plantas com HLB em todo o período de estudo.

Os pontos de maior incidência observados nas Figuras 14 e 15 se encontram próximos a dois locais de divisa da propriedade (vizinho A e B, Fig. 16), possíveis fontes de inóculo. O vizinho A, localizado a cerca de 100 m de distância de dois setores da propriedade estudada, consiste num vilarejo de aproximadamente uma centena de residências domésticas, onde existem diversas plantas cítricas em seus quintais além de várias plantas de murta (*Murraya exotica*), hospedeira do psilídeo (Halbert & Manjunath, 2004) e da bactéria do HLB (Lopes et al., 2010), sem qualquer tipo de controle fitossanitário. Os talhões 1, 2 e 3 possuem índices de plantas sintomáticas que variam de 0,5 a 0,6% contra, em média, 0,1% no restante da propriedade. Em armadilhas instaladas próximas a estas residências foram encontrados psilídeos e de 10 indivíduos um deles era portador de *Ca. L. asiaticus*, indicativo de que poderia estar migrando das fontes externas de inóculo para a propriedade.

O vizinho B está localizado ao norte, a cerca de 800 m de distância da divisa da propriedade. Trata-se de propriedade comercial de citros aonde, devido ao bom aspecto visual que as plantas se apresentam, se realiza, aparentemente, controle fitossanitário. Mesmo assim, os talhões 4 e 5, mais próximos a este vizinho, apresentam índices de 0,5 e 0,4% de plantas doentes. Por se desconhecer a situação do vizinho em relação ao HLB, não se pode afirmar que este possa estar atuando como fonte externa de inóculo.

O vizinho C está localizado a oeste e trata-se de propriedade comercial de citros abandonada há vários anos, possuindo em torno de 10.000 plantas adultas. Esta propriedade faz divisa com 5 talhões da propriedade estudada. No entanto, por causa da menor incidência de HLB nestes talhões, pode se afirmar que o vizinho C exerce menor pressão de inóculo sobre a propriedade que os vizinhos A e B. A incidência de HLB nos talhões vizinhos variou

de 0,01 a 0,1%, similar à incidência encontrada na maioria dos talhões internos da propriedade.

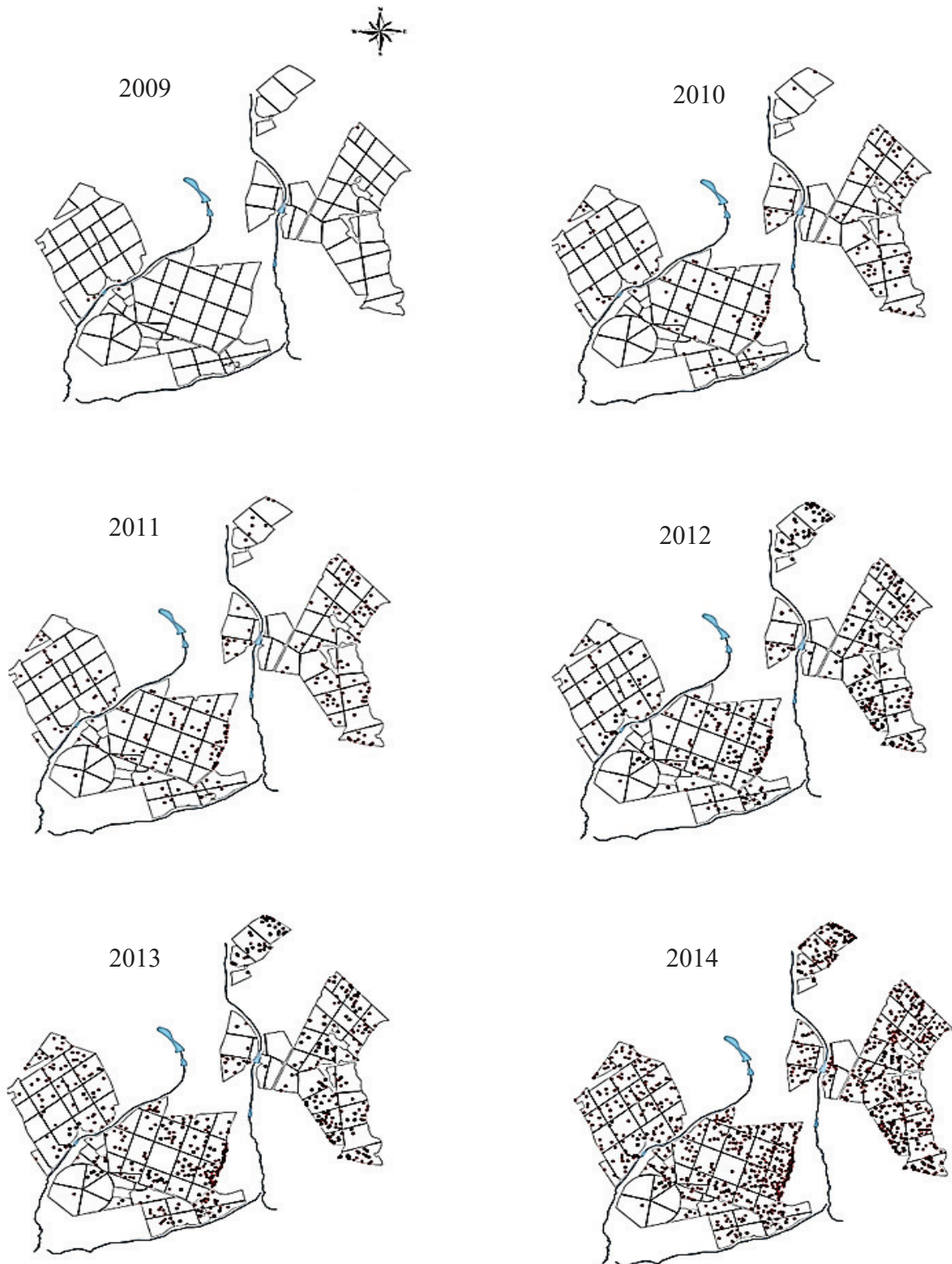


Figura 14. Localização das plantas com sintomas de HLB detectadas no período de 2009 até 2014 na propriedade em Frutal-MG.

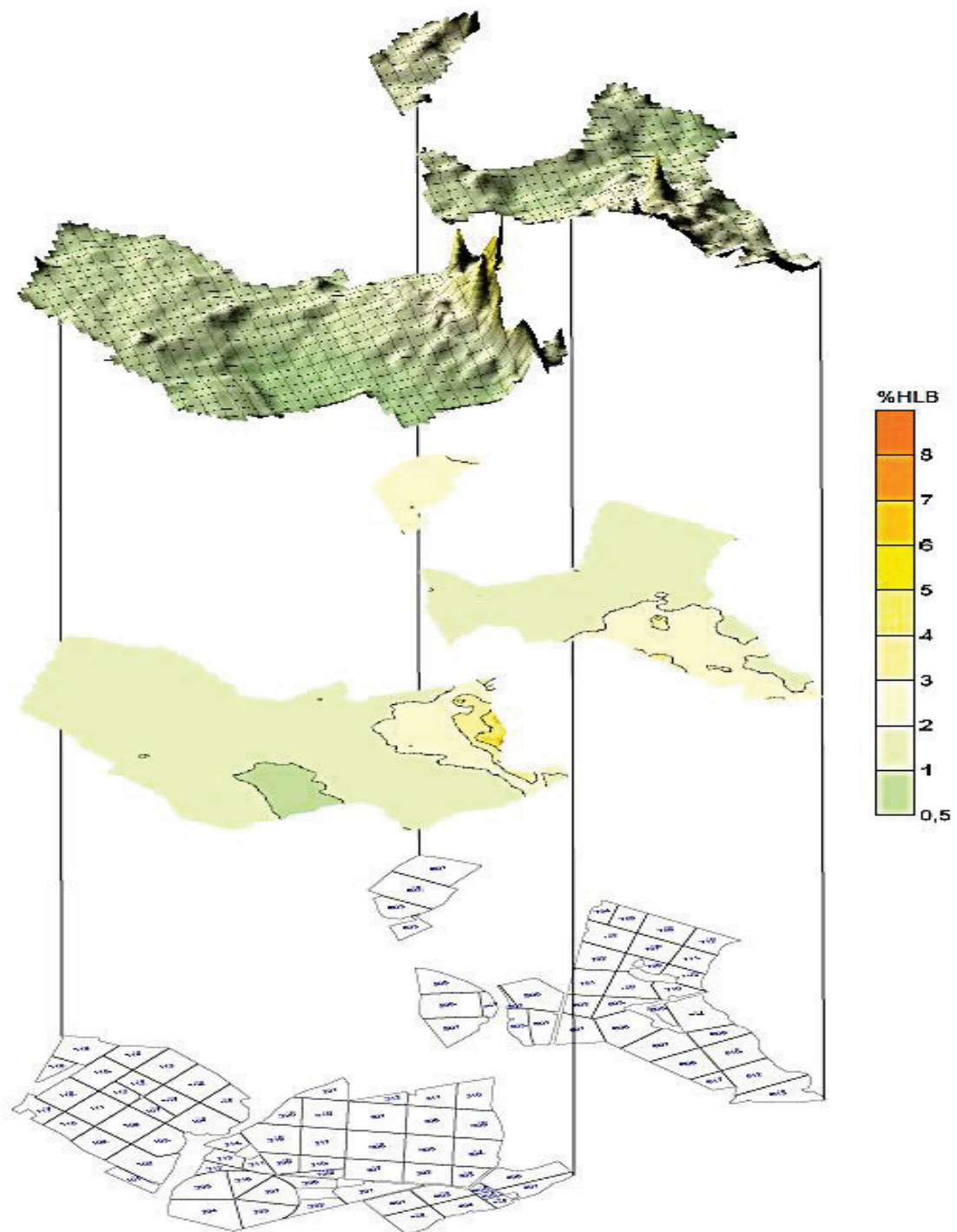


Figura 15. Porcentagem acumulada de plantas com HLB em quadrantes de 2.500m² (50 x 50m) na propriedade localizada em Frutal-MG.

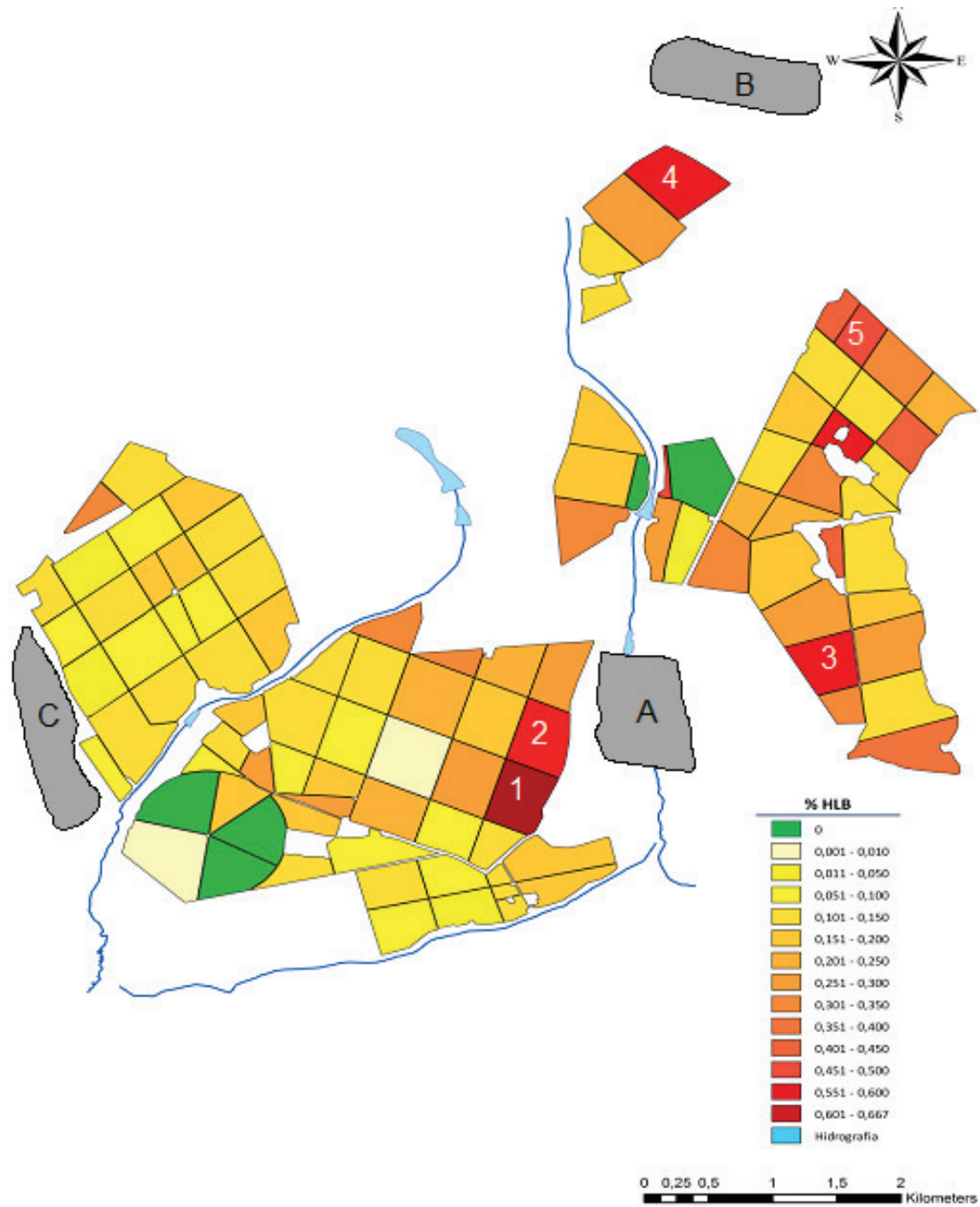


Figura 16. Porcentagem acumulada de plantas infectadas com HLB, em talhões da propriedade em Frutal, no período de 2009 a 2014, e indicação de vizinhos próximos (A, B e C). Os números de 1 a 5 correspondem aos talhões analisados.

Capão Bonito

Na propriedade em Capão Bonito (Fig. 17), plantas infectadas com HLB foram encontradas em 2010, sendo 23 plantas em dez talhões, com sete próximas à divisa e 16 em talhões no interior da propriedade. Em 2011 foram detectadas 72 plantas em todos os setores, ainda mostrando distribuição aparentemente aleatória. Em 2012, além do aumento significativo de plantas sintomáticas, observou-se aparente agregação das plantas, evidenciando-se os locais de possível entrada da doença. Em 2013 e 2014, com 727 e 460 plantas sintomáticas detectadas, respectivamente, os focos se tornaram maiores, com maior número de plantas doentes próximas a três vizinhos, que podem estar servindo de fontes de inóculo (Fig. 19).

A aparente influência dos vizinhos é melhor observada na Figura 18 que apresenta distribuição espacial da incidência acumulada nos seis anos de estudo. Os pontos de maior incidência podem ser devidos à provável proximidade a fontes externas de inóculo (vizinhos A, B e C, Fig. 19). O vizinho A, localizado a leste, cuja divisa encontra-se a 50 m de distância de um dos setores da propriedade estudada, consiste em um condomínio de aproximadamente 50 chácaras, onde existem várias laranjeiras, tangerineiras e limoeiros. Em algumas foram encontradas também plantas de murta. Nestas pequenas propriedades as plantas não estão submetidas a qualquer tratamento fitossanitário. O talhão 1 é o mais próximo deste vizinho, com 0,6% acumulado de plantas com HLB. Os outros quatro talhões circunvizinhos a este talhão também possuem altas incidências (0,4 a 0,6%). Todos os psilídeos capturados nesta propriedade, alguns com *Ca. L. asiaticus*, se encontravam em armadilhas instaladas em talhões próximos a estes vizinhos.

O vizinho B, localizado a cerca de 400 m de distância, consiste num agrupamento de ranchos às margens do rio Paranapanema. Em alguns deles existem plantas cítricas em seus quintais que podem também estar servindo como fontes de inóculo e de psilídeos infectivos para plantas dos talhões mais próximos. O talhão 2, por exemplo, possui índice de 0,6% de plantas com HLB, incidência bem acima dos talhões adjacentes.

O vizinho C está localizado a oeste da propriedade, a cerca de 1.000 m da divisa. Trata-se de um sítio no qual também existem plantas cítricas sem controle, que podem estar influenciando os índices do talhão 3 e cinco talhões vizinhos a este. Os índices destes talhões variam de 0,4 a 0,6%, contra, em média 0,2% nos demais (Fig. 19).

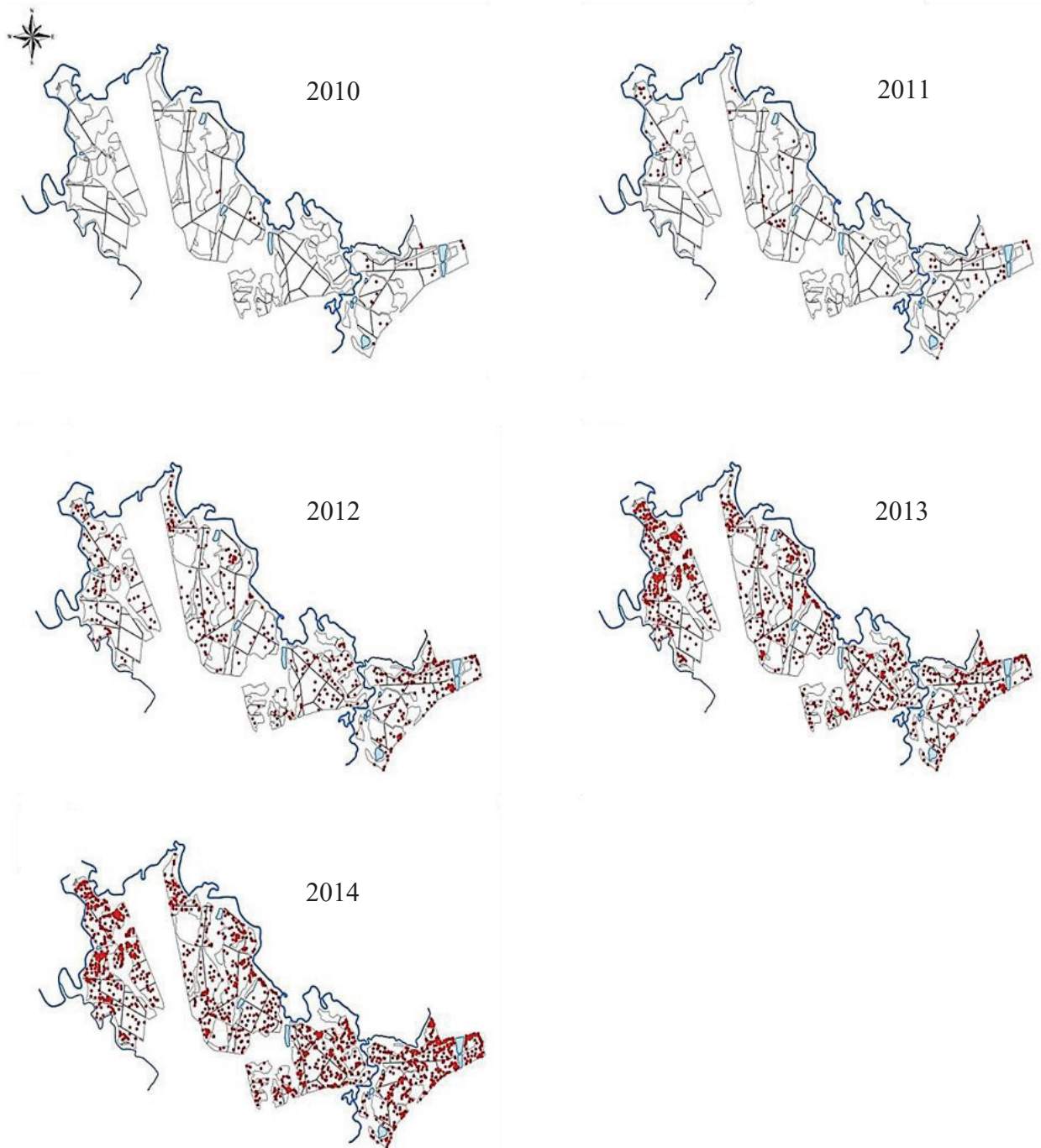


Figura 17. Localização das plantas com sintomas de HLB detectadas no período de 2009 até 2014 na propriedade em Capão Bonito-SP.

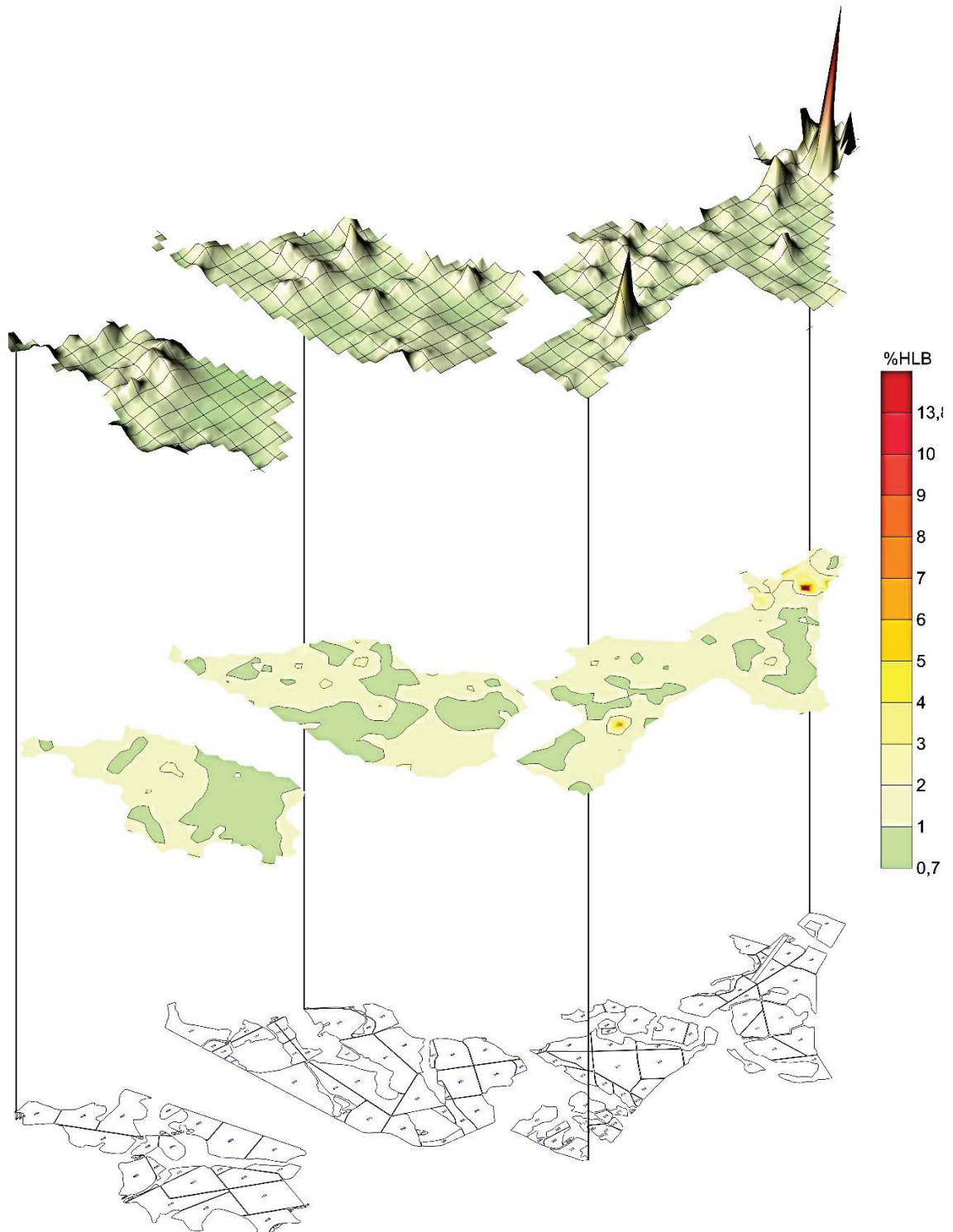


Figura 18. Porcentagem acumulada de plantas com HLB em quadrantes de 2.500m² (50 x 50 m) na propriedade localizada em Capão Bonito-SP.

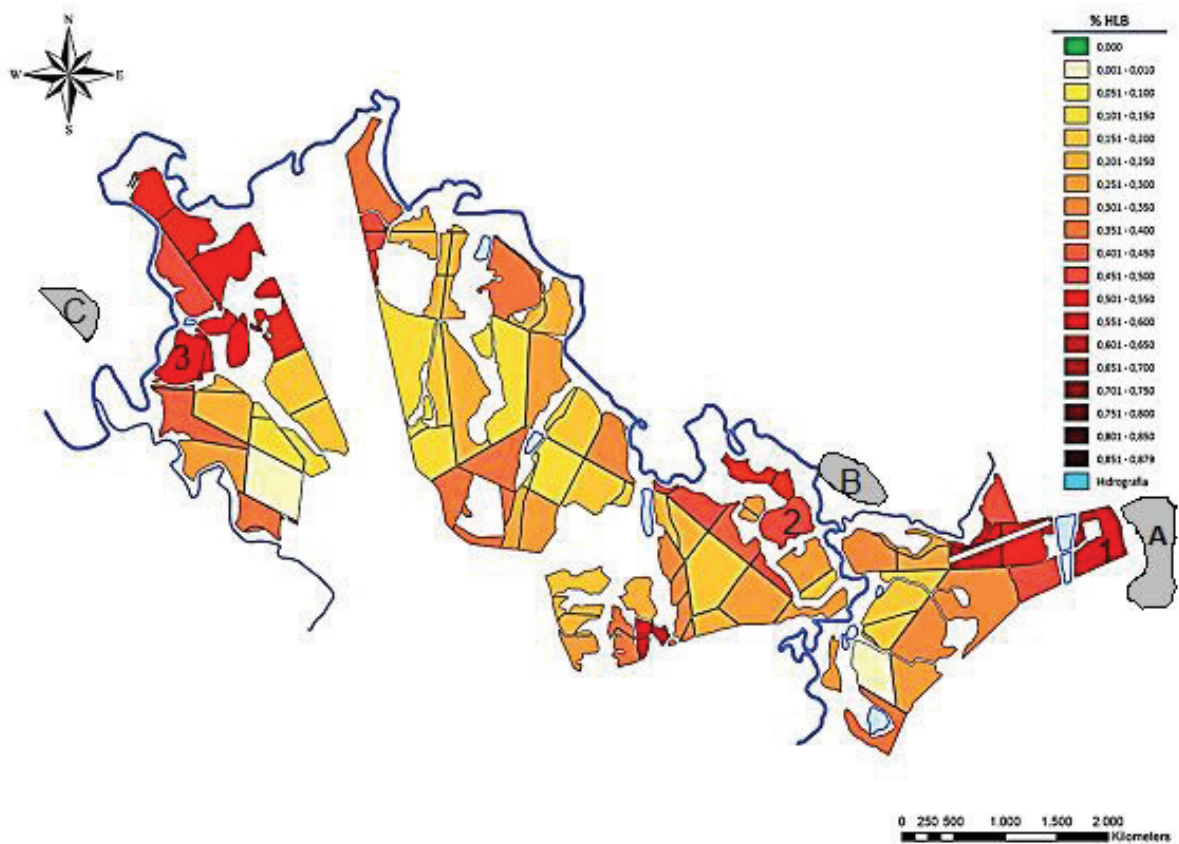


Figura 19. Porcentagem acumulada de plantas infectadas com HLB, em talhões da propriedade em Capão Bonito, no período de 2009 a 2014, e os vizinhos próximos (A, B e C). Os números de 1 a 3 correspondem aos talhões analisados.

4.2. Análise da associação da ocorrência de psíldeos, brotos e clima

Nas Figuras 20 a 22 são apresentados, por propriedade, o número de psíldeos capturados e portadores de *Ca. L. asiaticus* em cartões adesivos amarelos instalados em plantas da bordadura, a média do número de brotos/m² de copa, e a média das temperaturas máximas, médias e mínimas, e precipitação acumulada, em um período de 30 semanas.

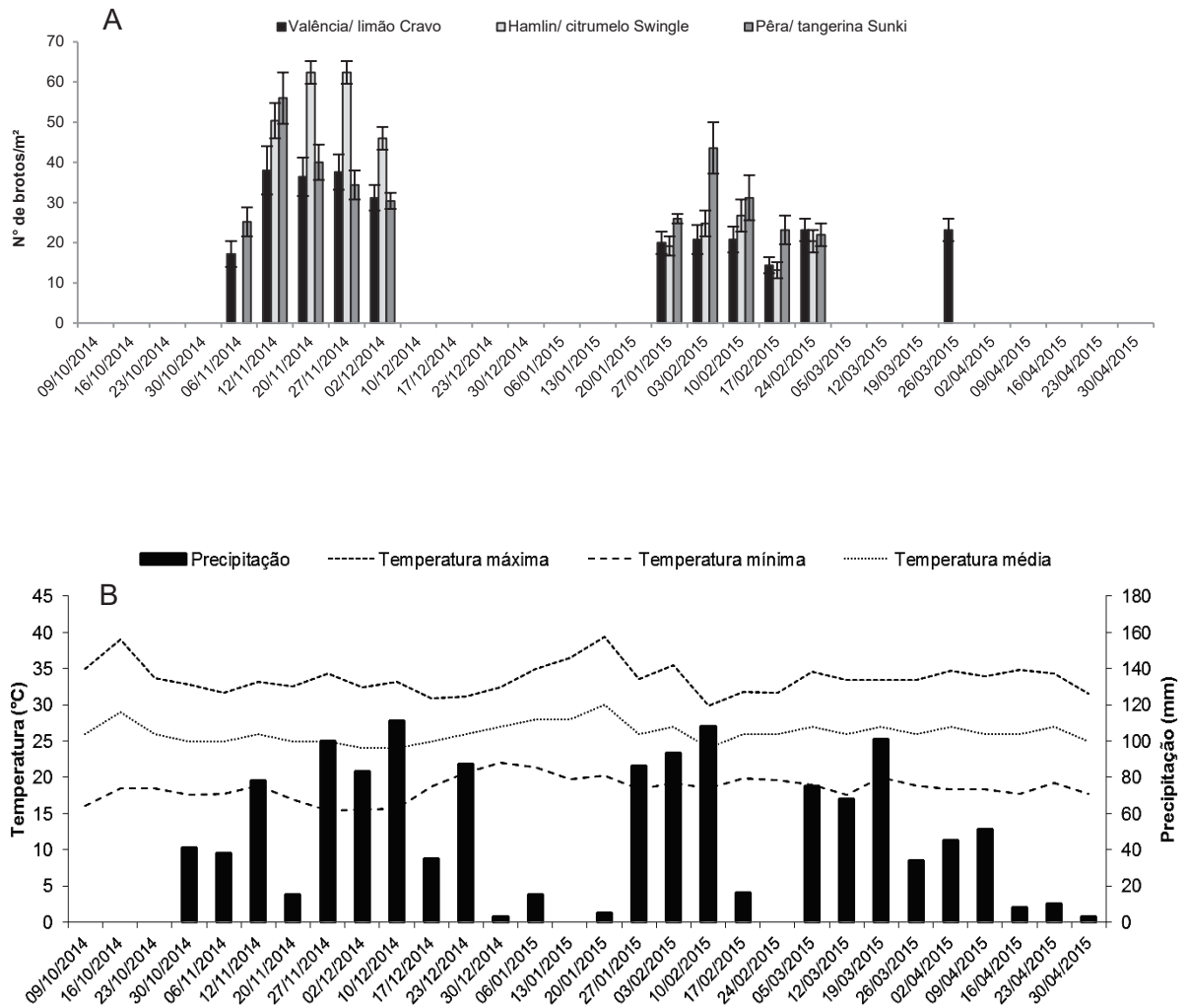


Figura 20. Média do número de brotos/m² de copa de cinco plantas das três combinações copa/porta-enxerto (A) e média das temperaturas máximas, médias, mínimas e precipitação acumulada nas trinta semanas de estudo (B) na propriedade de Comendador Gomes-MG.

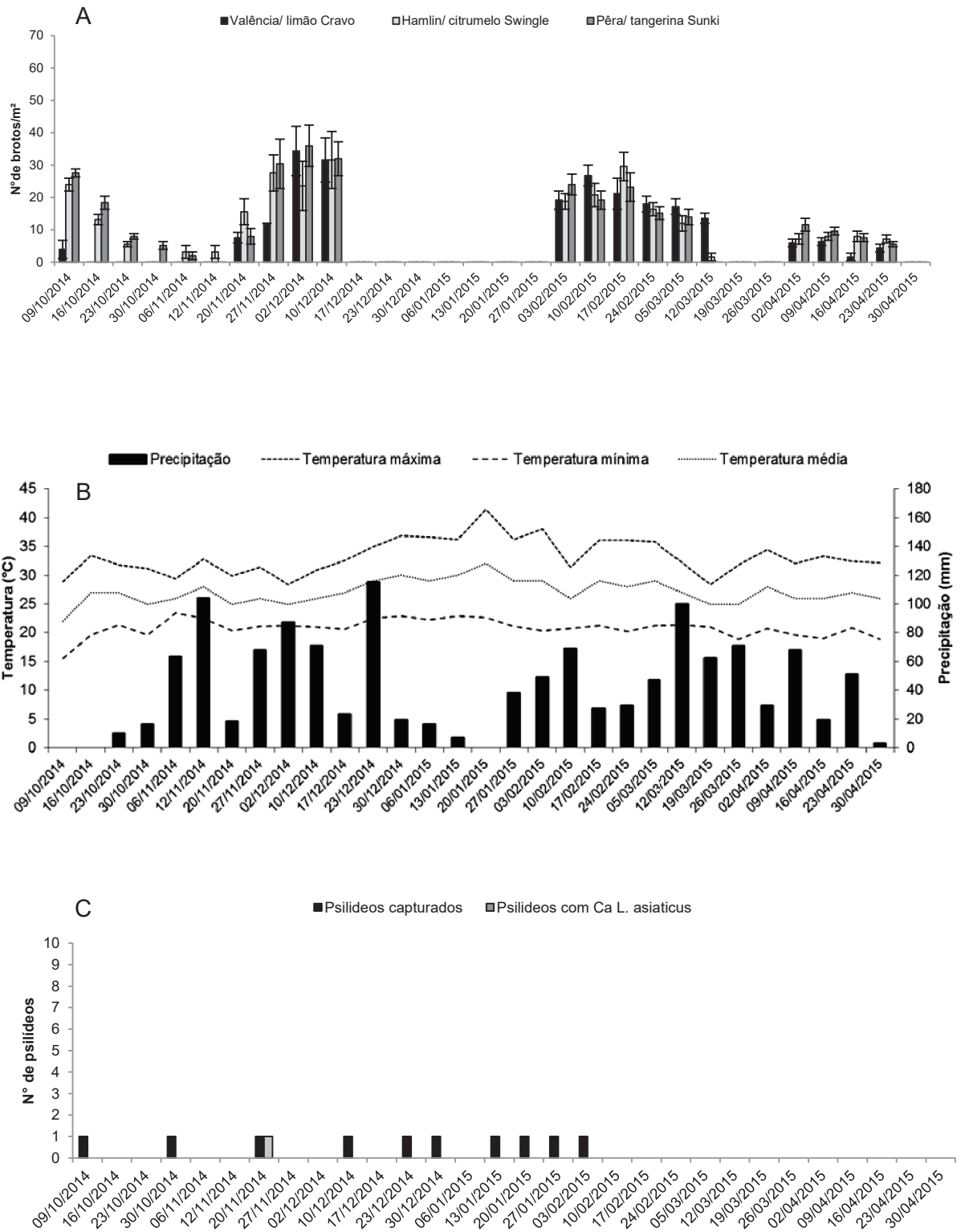


Figura 21. Média do número de brotos/m² de copa de cinco plantas das três combinações copa/porta-enxerto (A), média das temperaturas máximas, médias, mínimas e precipitação acumulada nas trinta semanas de estudo (B) e número de psilídeos com *Candidatus Liberibacter asiaticus* capturados em cartões adesivos na bordadura da propriedade (C) na propriedade em Frutal-MG.

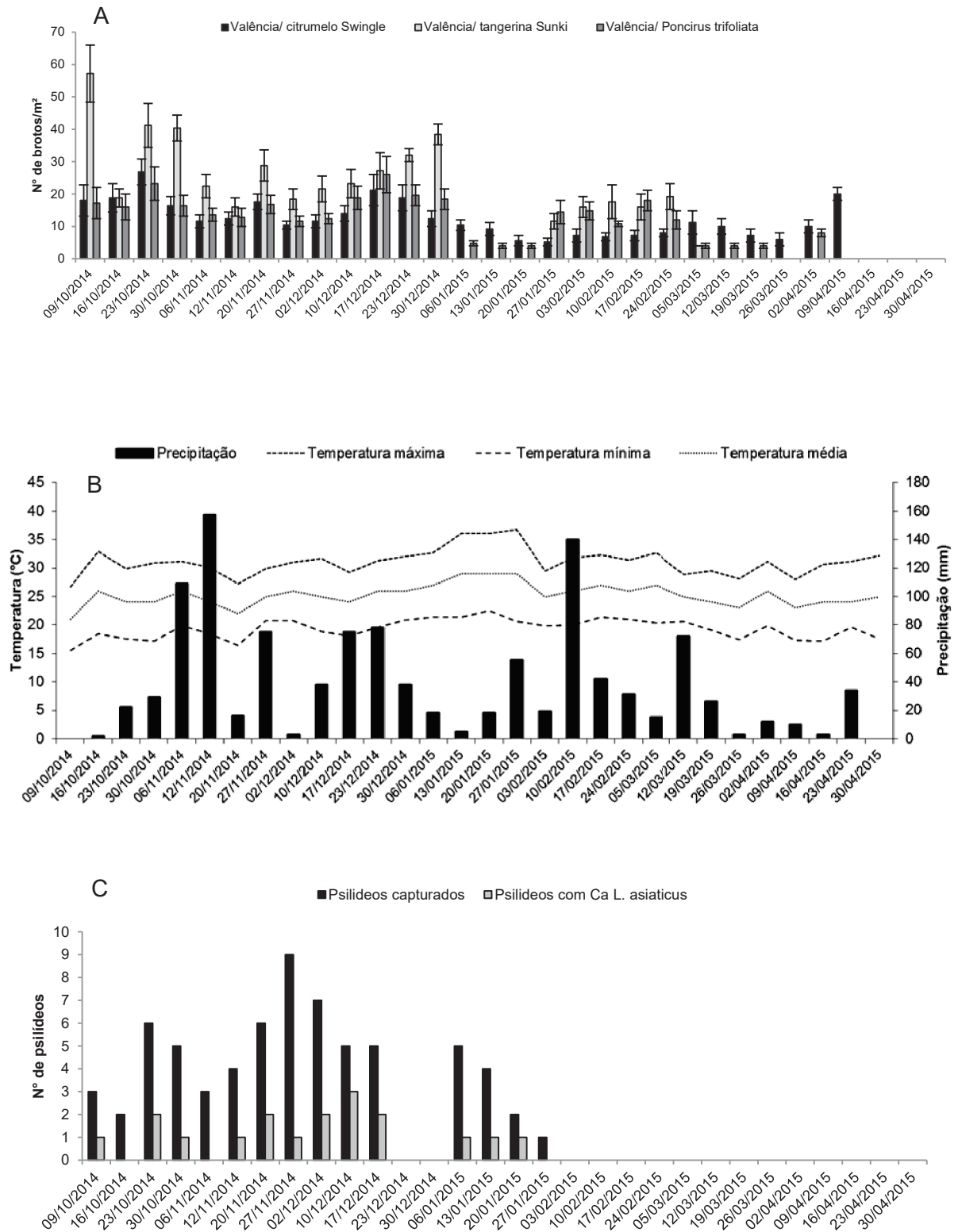


Figura 22. Média do número de brotos/m² de copa de cinco plantas das três combinações copa/porta-enxerto (A), média das temperaturas máximas, médias, mínimas e precipitação acumulada nas trinta semanas de estudo (B) e número de psilídeos com *Candidatus Liberibacter asiaticus* capturados em cartões adesivos na bordadura da propriedade (C) na propriedade em Capão Bonito-SP.

Com relação aos surtos vegetativos, houve diferenças no padrão de brotação entre as três localidades (Figs. 20A a 22A). Na propriedade em Comendador Gomes ocorreram apenas dois picos: o primeiro em novembro/2014 e o segundo em janeiro/2015 com duração de dois meses cada. Na propriedade em Frutal ocorreram quatro picos: o primeiro em outubro/2014, que durou um mês, o segundo em novembro/2014, que durou um mês, o terceiro em fevereiro/2015, com duração de um mês e meio, e o quarto em abril/2015, com duração também de um mês, mas de menor intensidade. Já na propriedade em Capão Bonito ocorreram dois picos: o primeiro em outubro/2014, que durou três meses, estendendo-se até o final de dezembro, e o segundo em janeiro/2015, também com duração de três meses, que durou até o final de março. Nesta localidade observaram-se brotos durante quase todo o período avaliado, expondo as plantas à infecção por períodos mais longos, já que os brotos são os órgãos preferidos pelos insetos para alimentação e oviposição.

Análise estatística mostrou diferenças significativas entre locais para a combinação Hamlin/citrumelo Swingle (Fig. 23), que brotou mais na propriedade em Comendador Gomes (11,1 brotos/m²) do que na propriedade em Frutal (9,9). Houve também diferenças para a combinação Pêra Rio/tangerina Sunki, que também brotou mais em Comendador Gomes (11,6) do que em Frutal (10,4). Não houve diferenças entre locais para a combinação Valência/limão Cravo, com (9,1 brotos/m²) em Comendador Gomes e 7,9 em Frutal (Fig. 23).

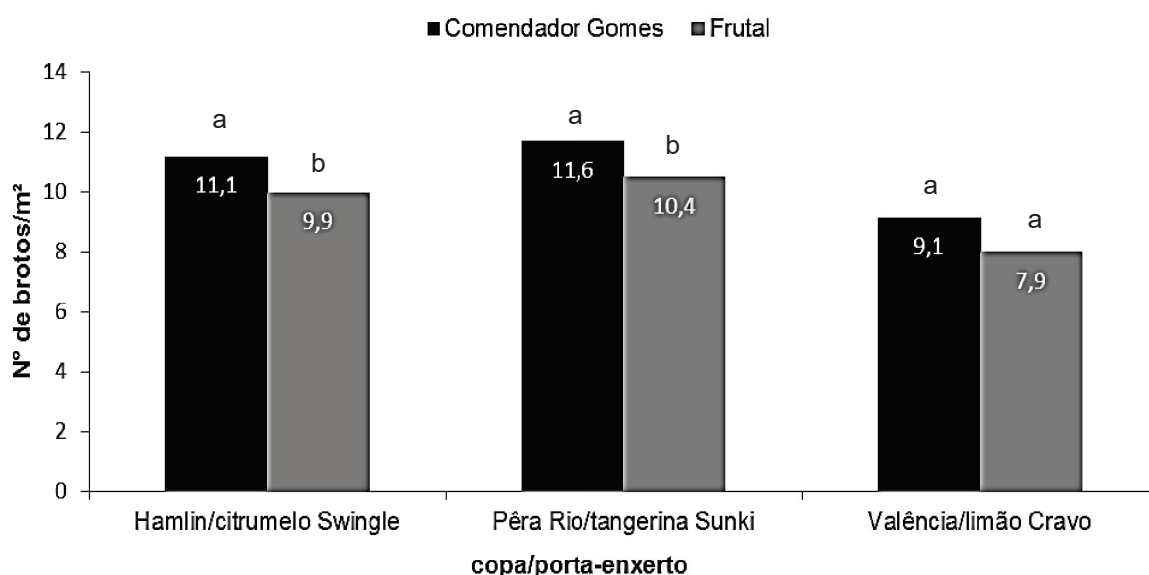


Figura 23. Médias do número de brotos/m² nas diferentes combinações de copa e porta-enxerto nas propriedades localizadas nos municípios de Comendador Gomes e Frutal no período de trinta semanas de estudo. Médias com a mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

Em Capão Bonito, houve diferenças significativas entre porta-enxertos sob a variedade Valência (Fig. 24), que brotou mais sobre tangerina Sunki (15,2 brotos/m²) do que sobre *Poncirus trifoliata* (12,0) ou citrumelo Swingle (9,7). Não houve diferenças entre *P. trifoliata* e citrumelo Swingle.

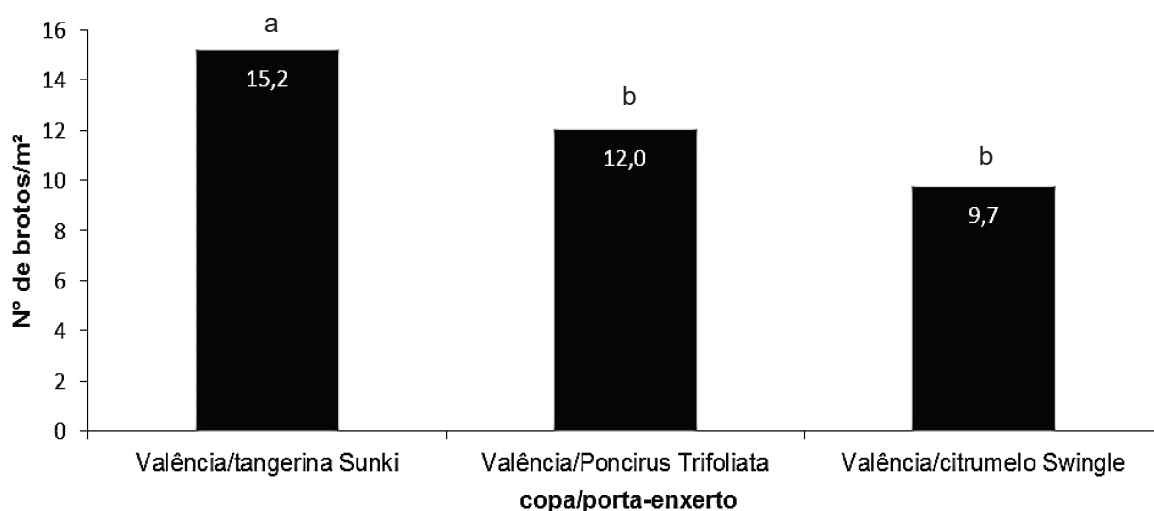


Figura 24. Médias do número de brotos/m² entre as combinações de plantas de Valência com diferentes porta-enxertos na propriedade localizada no município de Capão Bonito no período de trinta semanas de estudo. Médias com a mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

Observaram-se diferenças na temperatura e precipitação entre as três localidades (Figs. 20B a 22B). Temperaturas mais altas e precipitações ligeiramente superiores foram registradas na propriedade em Comendador Gomes e Frutal do que em Capão Bonito.

Na propriedade em Comendador Gomes, registraram-se temperaturas máximas médias de 39°C nas semanas que se iniciaram nos dias 16/outubro de 2014 e 20/janeiro de 2015, e mínimas de 16°C nas semanas dos dias 02 e 10/dezembro de 2014. No período, houve acúmulo de 1.309 mm de precipitação pluviométrica com picos máximos de 111 e 108 mm.

Na propriedade em Frutal a média das temperaturas máximas foi de 41°C na semana do dia 20/janeiro de 2015, e a média das temperaturas mínimas de 16°C na semana do dia 09/outubro de 2014. No período, houve acúmulo de 1.279 mm de precipitação pluviométrica, com picos máximos de 115 e 104 mm.

Na propriedade em Capão Bonito a média das temperaturas máximas foi de 37°C na semana do dia 27/janeiro de 2015, e mínima de 16°C em 20/novembro de 2014. No período houve acúmulo de 1.145 mm de precipitação pluviométrica com picos máximos de 157 e 140 mm.

Não foi capturado nenhum psilídeo na propriedade em Comendador Gomes, mas 10 psilídeos na propriedade em Frutal e 67 na propriedade em Capão Bonito (Figs. 21C e 22C). Dos insetos capturados, um (10,0%) continha *Ca. L. asiaticus* em Frutal e 19 (28,4%) em Capão Bonito. Em Frutal (Fig. 21C) detectou-se no máximo um inseto por semana, enquanto que em Capão Bonito (Fig. 22C) chegou-se a capturar nove insetos em uma semana. As capturas destes insetos se deram nas bordas das propriedades. Conforme já comentado, uma extensa área da propriedade em Frutal faz divisa com uma vila de garimpeiros onde existem plantas de citros e de murta e, no caso da propriedade em Capão Bonito, uma extensa área faz divisa com um condomínio de chácaras que também possuem muitas plantas cítricas e de murta. As plantas com e sem HLB desses locais vizinhos podem ser a origem de parte dos insetos com e sem *Liberibacter* encontrados.

5. DISCUSSÃO

Análise de dados das inspeções mostrou que, nas três propriedades estudadas, a primeira planta com HLB foi encontrada somente 5 a 6 anos depois do aparecimento da doença no centro do estado de São Paulo. A grande distância entre as propriedades estudadas e as propriedades da região aonde a doença foi inicialmente relatada em 2004, de aproximadamente 300 km, pode ter contribuído para isto.

A bactéria *Ca. L. asiaticus* foi a espécie observada com maior frequência, com *Ca. L. americanus* deixando de ser detectada em 2011, similar ao que ocorreu em outras regiões citrícolas de São Paulo (Lopes et al., 2009a). O fato de a bactéria *Ca. L. asiaticus* atingir maiores concentrações nas plantas infectadas, ser mais facilmente transmitida e tolerar temperaturas mais altas do que *Ca. L. americanus* (Lopes et al., 2009a), pode ser a principal causa do crescimento de *Ca. L. asiaticus* e atual prevalência desta espécie no campo (Lopes et al., 2009b).

Nas três propriedades, as plantas sintomáticas, em sua maioria, foram encontradas no outono e inverno. Este fenômeno já é conhecido e pode estar associado às temperaturas mais baixas, favorecendo tanto a multiplicação da bactéria como a expressão dos sintomas de HLB (Lopes et al., 2009b; Montesino, 2011; Mendonça, 2015).

Por possuírem grandes distâncias em seu perímetro, as propriedades localizadas em Capão Bonito (50,5 km) e Frutal (44,6 km) estão mais expostas ao inóculo externo do que a localizada em Comendador Gomes (16,8 Km), o que também poderia explicar a maior incidência de HLB nas duas primeiras propriedades.

O efeito de borda, ou seja, maior concentração de plantas sintomáticas na periferia das propriedades e talhões é uma característica marcante do HLB. O efeito de borda observado nas três propriedades estudadas seguiu padrão similar ao detectado em outras áreas do estado de São Paulo (Monteiro, 2013; Ferreira 2014; Michigami, 2015). No trabalho de Michigami também se demonstrou que relativamente poucas plantas cítricas podem contribuir enormemente para o aumento da doença em talhões ou propriedades inteiras localizadas nas proximidades.

Com relação às brotações, verificou-se que nas propriedades no sul do Triângulo Mineiro, provavelmente decorrente das temperaturas mais altas, o tempo de vida dos brotos foi menor, ou seja, eles cresceram e amadureceram mais rápido do que aqueles da propriedade em Capão Bonito. A maior longevidade do broto aumenta sua exposição ao inseto,

aumentando assim as chances de servirem como fonte de alimento e de reprodução de psilídeos. Este pode ser um fator adicional que ajudaria a explicar a maior incidência do inseto vetor no sul que no norte.

Evidência de agregação entre plantas doentes imediatamente adjacentes foi observada nas três propriedades estudadas. Focos secundários ou satélites foram raramente observados, o que reforça a ideia de que a introdução e constante disseminação do HLB nas três propriedades podem ser o resultado da ação de fontes externas de inóculo. Esta forma de disseminação é a mais difícil de ser controlada mesmo com frequentes pulverizações de inseticidas. Isto porque os inseticidas possuem relativamente curtos períodos residuais e não protegem brotos em rápido crescimento. Isto se agrava em período de chuva. A aparente ausência de reboleiras no interior dos talhões seria outra indicação de que os insetos portadores de *Liberibacter* têm origem fora da propriedade e indício de que o controle local do HLB tem sido eficiente.

6. CONCLUSÃO

Este estudo teve por objetivo comparar padrões de ocorrência e disseminação do HLB em duas regiões climáticas distintas. Houve diferenças na intensidade de ocorrência e evolução da doença, mas não no padrão de disseminação, sempre maior nas bordas próximas de prováveis fontes externas de inóculo. Isto reforça a necessidade de intensificação do manejo tanto nas bordas como nas áreas externas afetadas. Neste sentido, os cuidados devem ser redobrados na propriedade em Frutal e Capão Bonito. No caso da propriedade em Capão Bonito, os cuidados devem ser redobrados não somente pela maior pressão externa de inóculo detectada, como também pela maior frequência de brotações, provavelmente em decorrência do clima, expondo as plantas a novas infecções.

Não se detectou associação clara entre clima e incidência de HLB. A propriedade em Frutal, com clima similar ao de Comendador Gomes e ambas com temperaturas mais elevadas que a de Capão Bonito, apresentou maior incidência de HLB das três avaliadas. A propriedade de Comendador Gomes foi aquela aonde se detectou a menor incidência. Esta é a que apresenta menor perímetro e aparentemente de menor pressão de inóculo externo. Isto reforça a importância que deve ser dada às fontes externas de inóculo no manejo da doença. Conforme já demonstrado em várias propriedades, a eliminação das fontes externas de inóculo tem facilitado enormemente o controle interno do HLB.

REFERÊNCIAS

- Alvares, C.A., Stape, J.L., Sentelhas, P.C., Gonçalves, J.L.M., Sparovek, G. 2013. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift** 22(6):711-728.
- Bassanezi, R.B., Montesino, L.H., Busato, L.A., Stuchi, E.S. 2006. Damages caused by Huanglongbing on sweet Orange yield and quality in São Paulo. **Proceedings of the Huanglongbing-Greening International Workshop**. Ribeirão Preto, SP. p. 39.
- Bassanezi, R.B., Lopes, S.A., Belasque Junior, J., Spósito, M.B., Yamamoto, P.T., Miranda, M.P., Teixeira, D.C., Wulff, N.A. 2010. Epidemiologia do Huanglongbing e suas implicações para o manejo da doença. **Citrus Research & Technology** 31:11-23.
- Bassanezi, R.B., Montesino, L.H., Gimenes-Fernandes, N., Yamamoto, P.T., Gottwald, T.R., Amorim, L., Bergamin Filho, A. 2013. Efficacy of area-wide inoculum reduction and vector control on temporal progress of Huanglongbing in young sweet orange plantings. **Plant Disease** 97:789-796.
- Belasque Junior, J., Bergamin Filho, A., Bassanezi, R.B., Barbosa, J.C., Fernandes, N.G., Yamamoto, P.T., Lopes, S.A., Machado, M.A., Leite Junior, R.P., Ayres, A.J., Massari, C.A. 2009. Base científica para a erradicação de plantas sintomáticas e assintomáticas de Huanglongbing (HLB, Greening) visando o controle efetivo da doença. **Tropical Plant Pathology** 34:(3)137-145.
- Belasque Junior, J., Bassanezi, R.B., Yamamoto, P.T., Ayres, A.J., Tachibana, A., Violante, A.R., Tank Júnior, A., Di Giorgi, F., Tersi, F.E.A., Menezes, G.M., Dragone, J., Tank Júnior, R.H., Bové, J.M. 2010. Lessons from Huanglongbing management in São Paulo State, Brazil. **Journal of Plant Pathology** 92:285-302.
- Bové, J.M. 2006. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. **Journal of Plant Pathology** 88:7-37.
- Capoor, S.P., Rao, D.G., Viswanath, S.M. 1967. *Diaphorina citri* Kuwayama, a vector of greening disease of citrus in India. **Indian Journal Agricultural Science** 37:572-576.
- Chen, J., Pu, X., Deng, X., Liu, S., Li, H., Civerolo, E. 2009. A Phytoplasma Related to “*Candidatus Phytoplasma asteri*” detected in citrus showing Huanglongbing, P. R. China. **Phytopathology** 99(3):236-242.
- CitrusBR. 2015. Com “o PES no chão”. **CitrusBR** (6):36-54.
- Colleta-Filho, H.D., Targon M.L.P.N., Takita, M.A., De Negri, J.D., Pompeu Junior, J., Carvalho A.S., Machado M.A. 2004. First report of the causal agente of Huanglongbing (“*Candidatus Liberibacter asiaticus*”) in Brazil. **Plant Disease** 88:1382.
- Costa Lima, A.M. 1942. **Insetos do Brasil**: homópteros. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Agronomia. p. 101. v. 3.

Embrapa. 1999. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Brasília: Embrapa Produção de Informações. 412 p.

Ferreira, R.V. 2014. Influência do tipo de controle de Huanglongbing em áreas citrícolas na dispersão de *Diaphorina citri* e na disseminação da doença para pomares próximos. 58 f. **Dissertação de Mestrado**. Araraquara, SP: Fundo de Defesa da Citricultura.

Fundecitrus. 2015a. **Estimativa de safra 2015/2016**. Disponível em: <www.fundecitrus.com.br/pes/estimativa>. Acesso em: 25 jul. 2015.

Fundecitrus. 2015b. CVC diminui 82% HLB aumenta 159%. **Citricultor** (31):8-11.

Fundecitrus. 2015c. O mapa da citricultura. **Citricultor** (30):19.

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

Garnier, M., Jagoueix-Eveillard, S., Cronje, P., Le Roux, H., Bové, J.M. 2000. Genomic characterization of a liberibacter present in an ornamental Rutaceous tree, *Calodendrum capense*, in the Western Cape province of South Africa. Proposal for a “*Candidatus Liberibacter africanus* subsp. *capensis*”. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 50:2119-2125.

Gottwald, T.R., Aubert, B., Huang, K.L. 1991. Spatial pattern analysis of citrus greening in Shantou, China. **Proceedings of 11th Conference of International Organization of Citrus Virologists**. Riverside CA. p. 421-427.

Gottwald, T.R., Irej, M., Gast, T., Parnell, S., Taylor, E., Hilf, M.E. 2007. Spatio-temporal analysis of an HLB epidemic in Florida and implications for future spread. **Proceedings of 17th Conference of International Organization of Citrus Virologists**. Riverside CA.

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

Irej, M.S., Gast, T., Gottwald, T.R. 2006. Comparison of visual assessment and polymerase chain reaction assay testing to estimate the incidence of the Huanglongbing pathogen in commercial Florida citrus. **Proceedings Florida State Horticulture Society** 119:89-93.

Jagoueix, S., Bové, J.M., Garnier, M. 1994. The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the α subdivision of the proteobacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology** 44 (3):379-386.

Köppen, W., Geiger, R. **Klimate der Erde**. Gotha: Verlag Justus Perthes. 1928.

Lin, C.K. 1963. Notes on citrus yellow shoot disease. **Acta Phytopylacica Sinica** 2:243-251.

- Lin, K.H. 1956. Observation on yellow shoot of citrus. Etiological study of yellow shoot of citrus. **Acta Phytopathologica Sinica** 2:1-42.
- Lopes, S.A., Martins, E.C., Frare, G.F. 2006. Detecção de *Candidatus* Liberibacter asiaticus em *Murraya paniculata*. **Fitopatologia Brasileira** 31:303-303.
- Lopes, S.A., Frare, G.F., Yamamoto, P.T., Ayres, A.J., Barbosa, J.C. 2007. Ineffectiveness of pruning to control citrus Huanglongbing caused by *Candidatus* Liberibacter americanus. **European Journal of Plant Pathology** 119:463-468.
- Lopes, S.A., Frare, G.F. 2008. Graft transmission and cultivar reaction of citrus to '*Candidatus* Liberibacter americanus'. **Plant Disease** 92:21-24.
- Lopes, S.A., Bertolini, E., Frare, G.F., Martins, E.C., Wulff, N.A., Teixeira, D.C., Fernandes, N.G., Cambra, M. 2009a. Graft transmission efficiencies and multiplication of "*Candidatus* Liberibacter americanus" and "*Ca. Liberibacter asiaticus*" in citrus plants. **Phytopathology** 99:301-306.
- Lopes, S.A., Frare, G.F., Bertolini, E., Cambra, M., Fernandes, N.G., Ayres, A.J., Marin, D.R., Bové, J.M. 2009b. Liberibacters associated citrus Huanglongbing in Brazil: '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' is heat tolerant, '*Ca. L. americanus*' is heat sensitive. **Plant Disease** 93:257-262.
- Lopes, S.A., Luiz, F.Q.B.F, Fassini, C.G., Oliveira, H.T., Oliveira, S.L.A. 2013a. Limited success of heat treatments for curing HLB affected trees. Resumo. **Proceedings of the 3rd International Research Conference on Huanglongbing**. Orlando, IRCHLB. 2013.
- Lopes, S.A., Luiz, F.Q.B.F., Martins, E.C., Fassini, C.G., Sousa, M.C., Barbosa, J.C., Beattie, G.A.C. 2013b. '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' titers in citrus and acquisition rates by *Diaphorina citri* are decreased by higher temperature. **Plant Disease** 97:1563-1570.
- Lopes, S.A., Luiz, F.Q.B.Q., Mendonça, W.J Q.F., Furtado, E.L., Scarpellini, J.R., Scaloppi Junior., E.J., Barbosa, J.C. 2015. Seasonal variation of *Candidatus* Liberibacter asiaticus titers in new flushes from citrus trees growing in locations with distinct climates. Resumo. **Proceedings of the 4th International Research Conference on Huanglongbing**. Orlando, IRCHLB. 2015.
- Marques, R.N. 2011. Cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae) potenciais vetoras de um fitoplasma (grupo 16SrIX) associado a sintomas de Huanglongbing dos citros, suas plantas hospedeiras e quantificação do patógeno. **Dissertação de Mestrado**. Piracicaba SP: Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".
- Martinez, A., Wallace, J. 1967. Citrus leaf mottle-yellows disease in the Philippines and transmission of the causal virus by a psyllid, *Diaphorina citri*. **Plant Disease** 51:692-695.
- Maschio, F. 2011. Ações adotadas pelo citricultor para o manejo do Huanglongbing (HLB, Greening) no parque citrícola paulista. 21 f. **Dissertação de Mestrado**. Araraquara SP: Fundo de Defesa da Citricultura.

McClellan, A.P.D., Oberholzer, P.C.J. 1965. Citrus psylla, a vector of the greening disease of sweet orange. **South African Journal of Agricultural Sciences** 8:297-298.

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

Mendonça, W.J.Q.F. 2015. Evolução da infecção por *Candidatus Liberibacter asiaticus* e dos sintomas de Huanglongbing em plantas cítricas no sul do Triângulo Mineiro e região central do Estado de São Paulo. 43 f. **Dissertação de Mestrado**. Araraquara, SP: Fundo de Defesa da Citricultura.

Menezes, G.M. 2011. Avaliação de métodos de monitoramento de *Diaphorina citri* na periferia e interior de pomares cítricos com manejo de HLB. 19 f. **Dissertação de Mestrado**. Araraquara SP: Fundo de Defesa da Citricultura.

Michigami, F.A.B. 2015. Benefícios das medidas de manejo adotadas interna e externamente a uma propriedade comercial de citros na redução do progresso do Huanglongbing. 54 f. **Dissertação de Mestrado**. Araraquara SP: Fundo de Defesa da Citricultura.

Monteiro, A.B. 2013. Efeito de um pomar sem manejo de Huanglongbing sobre a ocorrência de *Diaphorina citri* e incidência de plantas doentes em uma área vizinha com manejo da doença. 37 f. **Dissertação de Mestrado**. Araraquara, SP: Fundo de Defesa da Citricultura.

Montesino, L.H. 2011. 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. 49 f. **Dissertação de Mestrado**. Araraquara, SP: Fundo de Defesa da Citricultura.

Neves, M.B. 2013. Simulação do impacto do Huanglongbing na produção de pomares cítricos sob diferentes cenários de manejo, incidências da doença e idades dos pomares no início da epidemia. 58 f. **Dissertação de Mestrado**. Araraquara, SP: Fundo de Defesa da Citricultura.

Neves, M.F., Trombin, V.G., Milan, P., Lopes, F.F., Cressoni, F., Kalaki, R. 2010. **O retrato da citricultura brasileira**. Ribeirão Preto: Markestrat. p. 137.

Oliveira, J.B., Camargo, M.N., Rossi, M., Calderano Filho, B. 1999. **Mapa pedológico do Estado de São Paulo**: legenda expandida. Campinas: IAC/EMBRAPA. 64 p.

Parra, J.R.P., Lopes, J.R.S., Torres, M.L.G., Nava, D.E., Paiva, P.E.B. 2010. Bioecologia do vetor *Diaphorina citri* e transmissão de bactérias associadas ao *huanglongbing*. **Citrus Research & Technology** 31(1):37-51.

Pavani, A.T. 2015. Avaliação de diferentes modelos de armadilhas no monitoramento de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) em pomares cítricos visando à utilização de atraentes. 24 f. **Dissertação de Mestrado**. Araraquara, SP: Fundo de Defesa da Citricultura.

Pelz-Stelinski, K.S., Brlansky, R.H., Ebert, T.A., Rogers, M.E. 2010. Transmission parameters for *Candidatus Liberibacter asiaticus* by Asian citrus psyllid (Hemiptera: Psyllidae). **Journal Econ. Entomology** 103:1531-1541.

Pereira, C., Prado, J.R., Alves, K.C.S., Coletta-Filho, H., Lopes, J.R.S. 2007. Avaliação de diferentes hemípteros quanto à capacidade de aquisição e retenção de *Candidatus Liberibacter* spp. Resumos. **15º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP**. p. 2044.

Reinking, O.A. 1919. Diseases of economic plants in South China. **Philippine Agriculturist** 8:109-135.

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

Teixeira, D.C., Danet, J.L., Eveillard, S., Martins, E.C., Jesus Junior, W.C., Yamamoto, P.T., Lopes, S.A., Bassanezi, R.B., Ayres, A.J., Saillard, C., Bové, J.M. 2005a. Citrus huanglongbing in São Paulo State, Brazil: PCR detection of the '*Candidatus*' *Liberibacter* species associated with the disease. **Molecular and Cellular Probes** 19:73-179.

Teixeira, D.C., Ayres, A.J., Kitajima, E.W., Tanaka, F.A.O., Danet, J.L., Jagoueix-Eveillard, S., Saillard C., Bové, J.M. 2005b. First report of a Huanglongbing-like disease of citrus in São Paulo State, Brazil and association of a new *Liberibacter* species, '*Candidatus Liberibacter americanus*'. **Plant Disease** 89:107.

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. 2008a. 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** 98:977-984.

Teixeira, D.C., Saillard, C., Couture, C., Martins, E., Wulff, N.A., Yamamoto, P.T., Eveillard-Jagoueix, S., Ayres, A.J., Bové, J.M. 2008b. Distribution and quantification of *Candidatus Liberibacter americanus*, agent of huanglongbing disease of citrus in São Paulo State, Brasil, in leaves of an affected sweet orange trees as determined by PCR. **Molecular and Cellular Probes** 22:139-150.

Tomaseto, A.F. 2012. Capacidade de dispersão de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). **Dissertação de Mestrado**. Piracicaba SP: Universidade de São Paulo.

Wikimedia Commons. 2014. Koppen Sudeste-BR.tif. Disponível em: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Koppen_Sudeste-BR.tif>. Acesso em: 20 ago. 2015.

Wulff, N.A., Teixeira, D.C., Martins, E.C., Leite, A.P.R., Mariano, A.G., da Silva A.C.B., Augusto, M.L.V., Ayres, A.J., Bové, J.M. 2009. The 16Sr group IX phytoplasma associated with citrus Huanglongbing symptoms in São Paulo state, Brazil, has been detected in crotalaria plantas (*Crotalaria juncea*). **Tropical Plant Pathology** 34:S7.

Yamamoto, P.T., Paiva, P.E.B., Gravena, S. 2001. Flutuação populacional de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) em pomares de citros na região norte do estado de São Paulo. **Neotropical Entomology** 30:65-170.

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. 2006. *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera: Psyllidae): vetor of the bacterium *Candidatus Liberibacter americanus*. **Proceedings Huanglongbing – Greening International Workshop**. Ribeirão Preto, SP. p. 96.