

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

WALTER JOSÉ QUEIROZ FURTADO DE MENDONÇA

**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**

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 2015**

WALTER JOSÉ QUEIROZ FURTADO DE MENDONÇA

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

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 2015**

WALTER JOSÉ QUEIROZ FURTADO DE MENDONÇA

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

Araraquara, 29 de Janeiro de 2015.

BANCA EXAMINADORA



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



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



Dr. José Carlos Basbosa
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP, Jaboticabal/SP.



Prof. Dr. Eduardo Augusto Girardi
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Mandioca e Fruticultura,
Cruz das Almas/BA.

Dedico

A minha esposa e companheira Eliana Soares, por todo amor, paciência e incentivo em todos os momentos da minha vida.

A minha filha Ana Luiza, que mesmo sem saber, quando sorri para mim, me fornece toda a luz e coragem que preciso para continuar.

Ao meu pai, Valdete Furtado, pelos ensinamentos e exemplos que tanto me ajudam.

Aos meus avós, Luiza Barbara e Walter Furtado, prefiro sentir como se vocês nunca saíram de perto de mim.

Aos meus irmãos, Adolfo e Patrícia, pelo companheirismo e exemplos de busca e determinação.

Agradecimentos

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

A Cutrale, pela oportunidade, ensinamentos e exemplos.

Ao meu orientador Silvio Lopes, por toda a capacidade, apoio e paciência na orientação deste trabalho.

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

Ao Fundecitrus, pelos ensinamentos e apoio.

Ao pessoal que me ajudou nas fazendas, Santa Maria (Evandro, Thiago, Marcio, Ismael, Diogo), Portal de Minas (Marcio, Lucio, Romilson, Aparecido, Ademir), Vale Verde (Flávio, Joaquim, Charles), Rio Verde (Jairo, Carlos, Leonardo, Alessandro, Carlos Alberto).

Aos pesquisadores/professores do Fundecitrus, pela oportunidade, ensinamentos e apoio.

Aos alunos do 3º ciclo do Mestrado, pelo companheirismo e convivência durante o curso.

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

Autor: Walter José Queiroz Furtado de Mendonça
Orientador: Silvio Aparecido Lopes

Resumo

O cinturão citrícola brasileiro ocupa área que se estende do sul ao norte do Estado de São Paulo (SP) englobando parte do Triângulo Mineiro (TM), envolvendo regiões de distintas condições edafoclimáticas. Historicamente o verão tem sido mais quente e o inverno mais seco no norte que nas demais regiões. O Huanglongbing (HLB) está presente em todas, porém atingindo menores incidências nos extremos norte e sul. Aparentemente, no norte os sintomas de HLB também progridem mais lentamente dificultando o reconhecimento das plantas doentes. Visando determinar se a evolução dos sintomas e da infecção diferia entre regiões e se possíveis diferenças estariam associadas ao clima, plantas adultas com HLB foram podadas e engaioladas com tela antiafídica na fazenda Santa Maria (SM), município de Analândia, centro de SP, na fazenda Portal de Minas (PM), município de Frutal, sul do TM, e fazenda Rio Verde/Vale Verde (RV/VV), também no sul do TM. Estas plantas foram avaliadas a cada dois ou três meses por um ano. As avaliações foram feitas em um ramo marcado, no qual se determinou a proporção do número de folhas com diferentes tipos e níveis de sintomas (4 de mosqueado e 4 de deficiência). Folhas e ramos também foram analisadas por qPCR. Data loggers registraram a temperatura do ar e umidade relativa de hora em hora. As porcentagens de mosqueado e deficiência mineral e os títulos bacterianos em folhas e ramos diferiram entre regiões e épocas do ano. As porcentagens de mosqueado foram similares na SM e PM e mais altas nestes locais do que na RV/VV. As porcentagens de deficiência foram similares na SM e RV/VV e mais altas nestes locais do que na PM. Na RV/VV os títulos bacterianos foram menores que nas duas outras fazendas. Análise de regressão indicou correlação positiva entre umidade relativa acima de 50% e níveis de mosqueado, e correlação negativa entre o mesmo fator climático e níveis de deficiência mineral. Embora não estudado, suspeita-se que a fertilidade do solo tenha também papel preponderante em determinar os níveis de deficiência mineral associados ao HLB. Visto que sintomas iniciais de HLB podem facilmente ser confundidos com sintomas iniciais de deficiência mineral, a predominância de sintomas de deficiência mineral leve na RV/VV explica a maior dificuldade de reconhecimento de plantas com HLB neste local e a maior dependência do teste de PCR para a correta diagnose da doença. Visando determinar se as *Liberibacters* dos três locais poderiam diferir em patogenicidade e se o ambiente também estaria influenciado a viabilidade de bactéria, ramos foram removidos das plantas em maio, agosto e dezembro de 2013 e fevereiro de 2014 e usados para inocular plantas sadias em casa de vegetação. As plantas manifestaram tipos similares de sintomas para os três locais de origem de inóculo, sugerindo níveis similares de patogenicidade. Os títulos nos borbulhões coletados se associaram positivamente com temperaturas abaixo de 15°C e negativamente com temperaturas acima de 30°C, corroborando outros estudos envolvendo folhas maduras e brotações.

Palavras-chave: clima, *Citrus* spp., mosqueado, deficiência mineral.

Evolution of infection *Candidatus Liberibacter asiaticus* and symptoms of Huanglongbing in citrus trees in southern Triângulo Mineiro and the central region of São Paulo State.

Autor: Walter José Queiroz Furtado de Mendonça
Orientador: Silvio Aparecido Lopes

Abstract

The Brazilian citrus belt occupies area that extends from south to north of the State of São Paulo (SPS) covering part of the Triângulo Mineiro (TM), involving regions with distinct soil and climatic conditions. Historically the summer has been hotter and the winter drier in the north than in other regions. Huanglongbing is present everywhere but has reached lower incidences in the extreme north and south. Apparently, in the north HLB symptoms also progress more slowly, making difficult field recognition of diseased plants. In order to determine whether the symptom and infection progress differ between regions, and if possible differences could be linked to the climate, adult plants with symptoms of HLB were pruned and caged within screened structure in the farms Santa Maria (SM) in Analândia, located in the center SPS, and Portal de Minas (PM) in Frutal, and Rio Verde/Vale Verde (RV/VV) in Comendador Gomes, both located in the south TM, Minas Gerais State, and evaluated every two or three months for one year. The evaluations were made in a selected branch in which it was determined the proportion of leaves with the different types and levels of symptoms (4 for mottling and 4 for mineral deficiency). Leaves and branches also were sampled for qPCR analysis. Data loggers recorded air temperature and relative humidity every hour. The percentage of the distinct symptoms and of bacterial titers on leaves and branches varied between regions and seasons. The percentages of mottled leaves were similar in SM and PM and highest in these places than in RV/VV. The percentages of deficient leaves were similar in SM and RV/VV and were highest in these places than in PM. In RV/VV lower titers were observed. Regression analysis indicated positive correlation between relative humidity above 50% and mottling levels and negative correlation between the same climatic factor and mineral deficiency levels. Although not studied, it is suspected that soil fertility also have important role in determining the levels of mineral deficiency associated with HLB. Since initial HLB symptoms are easily confounded with initial symptoms of mineral deficiency, the predominance of mineral deficiency in RV/VV explains the greater difficulty in recognizing plants with HLB in this place and the greater dependency on the PCR test for the correct disease diagnosis. In order to determine whether the environment could also influence *Liberibacter* viability within branches, and whether the bacteria would differ in pathogenicity, budsticks were removed from symptomatic branches in May, August and December 2013, and February 2014, and used to inoculate healthy plants in greenhouse. The inoculated plants expressed similar symptoms types for all three inoculum origins suggesting similar pathogenicity levels. The titers in budsticks associated positively with temperatures below 15°C and negatively with temperatures above 30°C, corroborating other studies involving mature leaves and shoots.

Keywords: climate, *Citrus* spp., mottling, mineral deficiency.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Mapa do cinturão citrícola que se estende do sul ao norte do Estado de São Paulo até parte do Triângulo Mineiro, Estado de Minas Gerais.....9
- Figura 2. Médias mensais de temperatura máxima e mínima, médias mensais da amplitude térmica (diferença entre a média mensal da temperatura máxima e mínima), médias mensais da umidade relativa coletada às 15:00 h, e acumulado mensal de precipitação pluviométrica (mm) registrados entre janeiro de 2008 e dezembro de 2014 nas fazendas Santa Maria (SM), Portal de Minas (PM) e Rio Verde (RV), localizadas no centro (SM) e norte (PM e RV) do cinturão citrícola brasileiro..... 10
- Figura 3. Esquema representativo das plantas usadas no experimento, mostrando os percentuais estimativos de sintomas, os lados esquerdo e direito (E, D), e posição e volume de sintomas de HLB na copa, em plantas da fazenda Santa Maria (A).....13
- Figura 4. Esquema representativo das plantas usadas no experimento, mostrando os percentuais estimativos de sintomas, os lados esquerdo e direito (E, D), e posição e volume de sintomas de HLB na copa, em plantas da Portal de Minas (B) e Rio Verde/Vale Verde (C).....14
- Figura 5. Fotografias de planta logo após a poda (A), planta com os ramos etiquetados (B), e logo após ser engaiolada (C).....15
- Figura 6. Composição dos tratamentos foliares de pomares em recuperação e pomares em manutenção, contendo nome comercial do produto, dose por bomba de 2.000 litros de água (kg/bb), número de aplicações por safra e total de quilos do produto por safra.....17
- Figura 7. Escala fotográfica de severidade de sintomas de HLB (mosqueado e deficiência mineral) preparada para avaliação das plantas.....18
- Figura 8. Porcentagens médias de **folhas mosqueadas**, acumuladas e separadas por intensidade de sintomas, em plantas engaioladas (barras azuis) e não engaioladas (barras vermelhas) na fazenda Santa Maria. Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si (Tukey, $p \leq 0,05$). São apresentadas letras somente para as médias que diferiram entre si.....23
- Figura 9. Porcentagens médias de **folhas com deficiência mineral**, acumuladas e separadas por intensidade de deficiência, em plantas engaioladas (barras azuis) e não engaioladas (barras vermelhas) na fazenda Santa Maria. Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si (Tukey, $p \leq 0,05$). São apresentadas letras somente para as médias que diferiram entre si.....23
- Figura 10. Porcentagens médias de **folhas mosqueadas**, acumuladas e separadas por intensidade de sintomas, em plantas nas fazendas Santa Maria, Portal de Minas e Rio Verde e Vale Verde. Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si (Tukey, $p \leq 0,05$). São apresentadas letras somente para as médias dentro e fora que diferiram entre si.....25
- Figura 11. Porcentagens médias de **folhas com deficiência mineral**, acumuladas e separadas por intensidade de deficiência, em plantas nas fazendas Santa Maria, Portal de Minas e Rio Verde e Vale Verde. Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si (Tukey, $p \leq 0,05$). São apresentadas letras somente para as médias dentro e fora que diferiram entre si.....25
- Figura 12. Totais de associação entre variáveis dependentes (**folhas com diferentes tipos e intensidade de sintomas**) e variáveis independentes (**fatores climáticos**).....28
- Figura 13. Gráficos gerados com valores mostrados na Tabela 4. Representam coeficientes de determinação entre as variáveis dependentes (sintomas de deficiência mineral) e variáveis independentes (climáticas). Foram excluídas da Tabela 4 as associações entre sintomas e dados de clima registrados nos 60 dias anteriores a data de avaliação de sintomas.....29

- Figura 14. Gráficos gerados com valores mostrados na Tabela 4. Representam coeficientes de correlação entre as variáveis dependentes (sintomas de mosqueado) e variáveis independentes (climáticas). Foram excluídas da Tabela 4 as associações entre sintomas e dados de clima registrados nos 60 dias anteriores a data de avaliação de sintomas.....30
- Figura 15. Evolução nas porcentagens de ramos com *Liberibacter* em plantas mantidas dentro das gaiolas em três locais do cinturão citrícola.....31
- Figura 16. Porcentagem média de todas as datas de avaliações (junho/2012, janeiro/2013 e agosto/2013) por fazenda.....32
- Figura 17. Valores de \log_{10} médio estimado do número de células de *Ca. L. asiaticus* na casca de ramos secundários com sintomas de HLB, em laranjeira naturalmente infectada com a bactéria, previstos com base na equação ($\text{Log}=5,97+0,316 \times \text{horas abaixo de } 15^{\circ}\text{C}-0,53 \times \text{horas acima de } 30^{\circ}\text{C}$) gerada por meio de análise de regressão múltipla.....34
- Figura 18. Número de horas acumuladas com umidade relativa acima de 50% nas fazendas Santa Maria, Portal de Minas, Rio Verde/Vale Verde, nos últimos 7 e 30 dias anteriores às datas das avaliações de sintomas em folhas.....36
- Figura 19. Número de horas acumuladas com temperaturas de 35 a 40°C nas fazendas Santa Maria, Portal de Minas, Rio Verde/Vale Verde, nos últimos 7, 30 e 60 dias anteriores as datas das avaliações de sintomas de deficiência mineral em folhas.....37
- Figura 20. Número de horas abaixo de 15 e acima de 30°C registrados nos últimos sete dias antes da coleta de segmentos de ramos de plantas com HLB engaioladas (A e B) e não engaioladas (C), os quais foram usados na inoculação das plantas em casa de vegetação. (A) Maio de 2013, nas fazendas Santa Maria, Portal de Minas e Rio Verde/Vale Verde. (B) Maio, agosto e dezembro de 2013 na fazenda Santa Maria. (C) Maio, agosto e dezembro de 2013 e fevereiro de 2014.....39

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Informações detalhadas das plantas experimentais.....12
- Tabela 2. Médias mensais de fatores climáticos registrados em três fazendas do cinturão citrícola brasileiro no período de novembro de 2012 a dezembro de 2013.....21
- Tabela 3. Médias gerais dos valores para categorias de sintomas observados nas três fazendas do cinturão citrícola brasileiro no período de novembro de 2012 a dezembro de 2013.
- Tabela 4. Coeficientes de regressão e determinação entre **variáveis dependentes** (folhas com diferentes tipos e intensidade de sintomas) e **variáveis climáticas independentes*** registradas em períodos de sete, 15, 30 e 60 dias antes das avaliações dos sintomas nas plantas engaioladas mantidas nos três locais do cinturão citrícola, no período de novembro de 2012 a dezembro de 2013.....24
- Tabela 5. Título de *Ca. Liberibacter asiaticus* (Las) em ramos de plantas de laranja naturalmente infectadas e **mantidas dentro de gaiolas**, em três locais do cinturão citrícola brasileiro, e taxa de transmissão da bactéria para plantas saudáveis, por meio de enxertia, em diferentes épocas do ano.....33
- Tabela 6. Título de *Ca. Liberibacter asiaticus* (Las) em ramos de plantas de laranja naturalmente infectadas e **mantidas fora da gaiola**, em três localidades do cinturão citrícola brasileiro, e taxa de transmissão da bactéria para plantas saudáveis, por meio de enxertia, em diferentes épocas do ano.....34

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1. Importância do Brasil como produtor de frutas cítricas.....	2
2.2. Importância e etiologia do HLB.....	2
2.3. Os insetos vetores de <i>Liberibacter</i>	3
2.4. Expressão e evolução dos sintomas de HLB.....	5
2.5. Manejo do HLB.....	6
3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	7
4. MATERIAIS E MÉTODOS	8
4.1 Descrição da área experimental.....	8
4.2. Seleção das plantas experimentais.....	11
4.3. Poda e proteção das plantas com tela anti-afídeos.....	15
4.4. Tratos culturais das plantas experimentais.....	16
4.5. Progressão dos sintomas de HLB na copa.....	17
4.6. Progressão da infecção na copa.....	19
4.7. Experimento de inoculação em casa de vegetação.....	19
4.8. Análise da associação entre clima e sintomas nas fazendas Santa Maria, Portal de Minas, e Rio Verde/Vale Verde.....	20
4.9. Análise da associação entre clima e log de Las nas fazendas Santa Maria, Portal de Minas, e Rio Verde/Vale Verde.....	21
5. RESULTADOS	21
5.1. Evolução dos sintomas de HLB na copa em plantas engaioladas e não engaioladas na fazenda Santa Maria.....	22
5.2. Evolução dos sintomas de HLB na copa em plantas engaioladas nas fazendas Santa Maria, Portal de Minas, e Rio Verde/Vale Verde.....	24
5.3. Análise da associação entre clima e sintomas nas fazendas Santa Maria, Portal de Minas, e Rio Verde/Vale Verde.....	26
5.4. Natureza das associações entre proporção de folhas sintomáticas e variáveis climáticas	28
5.5. Evolução da infecção na copa.....	31
5.6. Experimento de inoculação em casa de vegetação.....	32
5.7. Análise da associação entre clima e log de Las nas fazendas Santa Maria, Portal de Minas, e Rio Verde/Vale Verde.....	34
6. DISCUSSÃO	35
6.1. Diferenças nos níveis de sintomas em plantas engaioladas e não engaioladas na fazenda Santa Maria.....	35
6.2. Diferenças nos níveis de sintomas em plantas engaioladas nas três regiões do parque citrícola.....	35
6.3. Diferenças na evolução da infecção das copas por <i>Liberibacter</i>	37
6.4. Diferenças nas taxas de transmissão por <i>Liberibacter</i>	38
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	40
8. REFERÊNCIAS	41

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor de laranjas do mundo. A maior parte é produzida no cinturão citrícola brasileiro, área que se estende do sul ao Norte do Estado de São Paulo e parte do Triângulo Mineiro. O Estado de São Paulo tem a maior área e produção. O Triângulo Mineiro pode alcançar mais espaço na produção nacional porque apresenta condições climáticas, econômicas e logísticas convidativas. Contudo, o “huanglongbing” (HLB) ou “greening”, doença altamente destrutiva e de difícil controle, já está presente em todo o cinturão citrícola, inclusive no Triângulo Mineiro. No entanto, a doença tem evoluído mais lentamente nesta região.

O HLB foi detectado no Brasil em 2004, na região central do estado de São Paulo. No Triângulo Mineiro as primeiras plantas apareceram em 2009. A doença está associada a bactérias *Candidatus Liberibacter* spp. que colonizam o floema da planta. No Brasil ocorrem as espécies *Ca. L. americanus* e *Ca. L. asiaticus* que diferem quanto à tolerância a altas temperaturas e capacidade de multiplicação na planta cítrica e afetam todas as variedades comerciais, independente do porta-enxerto e do estágio de desenvolvimento da planta. As bactérias são transmitidas por meio do psílídeo *Diaphorina citri*.

A planta doente tem os vasos do floema obstruídos, dificultando a distribuição normal de seiva elaborada. Essa obstrução induz a expressão de sintomas reflexos em folhas e frutos. Nas folhas causa o chamado “mosqueado”, que é o amarelecimento de parte do limbo foliar contrastando com partes de cor verde normal. Nos frutos ocorre assimetria, amarelecimento na região do pedúnculo e morte das sementes.

O manejo da doença envolve plantio de mudas sadias, inspeção e erradicação de plantas doentes e controle do inseto vetor. Apesar de todos os esforços em conter o avanço do HLB, a doença evoluiu rapidamente na maioria das regiões do cinturão citrícola.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Importância do Brasil como produtor de frutas cítricas

O Brasil é o maior produtor de laranjas do mundo. O país contribui com 50% da produção mundial de suco e ao exportar 98% do que produz, detém 85% de participação no mercado mundial (Neves et al., 2010). A maior parte é produzida no cinturão citrícola brasileiro, área que se estende do sul do Estado de São Paulo até o Triângulo Mineiro.

O Estado de São Paulo é o maior representante do parque citrícola, sendo responsável por 78% da produção de frutas, 71% da área plantada e 98% da produção de suco (FNP Consultoria & Comércio, 2011). No Estado de São Paulo, em 2013 os pomares de citros em produção ocupavam 496.735 Ha, com produção estimada de 328 milhões de caixas de 40,8 kg de frutas, equivalentes a 13,38 milhões de toneladas.

O Triângulo Mineiro, por sua vez, contribui com 23,0 mil hectares. No estado de Minas Gerais, dos seis municípios que mais produzem laranja, cinco estão localizados na região do Triângulo Mineiro, que responde por quase 70% de toda a oferta mineira de laranja (Companhia Nacional de Abastecimento, 2013). Dentro do Triângulo Mineiro, o líder da produção é o município de Comendador Gomes, com 240 mil toneladas na safra 2011, seguido de Frutal, com estimativa de 195 mil toneladas na safra 2011/2012 (Companhia Nacional de Abastecimento, 2011).

A produção de laranja no Triângulo Mineiro vem conquistando cada vez mais espaço na produção nacional. As principais vantagens da região para esta atividade são a proximidade com as indústrias citrícolas do Estado de São Paulo, quantidade de chuva suficiente ao desenvolvimento das plantas, solos agriculturáveis, e o menor valor da terra nua. Contudo, a pujança de todo o parque citrícola vem sendo ameaçada pelo crescente aumento da incidência de plantas com “huanglongbing” (HLB) ou “greening”, doença altamente destrutiva e de difícil controle.

2.2. Importância e etiologia do HLB

O HLB é a doença mais importante e destrutiva da citricultura mundial (Bové, 2006; Gottwald et al., 2007a). Afeta todas as variedades comerciais, independente do porta-enxerto e do estágio de desenvolvimento da planta. A doença foi detectada no Brasil em 2004, na região central do estado de São Paulo. Está presente no continente asiático há mais de cem anos. Foi relatada pela primeira vez em 1919 por Reinking com o nome de *huanglongbing* que significa “doença do ramo amarelo” (Reinking, 1919; Lin, 1956). No continente africano

foi relatada pela primeira vez em 1937 com o nome de greening (Van de Merwe & Anderson, 1937).

A doença está associada a bactérias que colonizam o floema da planta. Essas bactérias são do grupo *Candidatus Liberibacter* spp., Gram-positivas (Garnier et al., 1984), pertencentes ao grupo das alfa-proteobactérias (Jagoueix et al., 1994). Em função dos continentes em que primeiramente foram encontradas, as espécies foram denominadas *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Ca. L. africanus* e *Ca. L. americanus*. A espécie *Ca. L. americanus* foi relatada no Brasil no final de 2004, único local onde aparentemente ocorre. Além da *Ca. L. americanus*, está presente também *Ca. L. asiaticus*, encontrada quase ao mesmo tempo que a *Ca. L. americanus* (Bové et al., 2008). De menor importância, no Brasil também foi relatada a associação dos mesmos sintomas de HLB a um fitoplasma. Ao ser analisado, este fitoplasma mostrou-se com 99% de identidade com o fitoplasma do grupo 16S rDNA-IX, que causa vassoura de bruxa no feijão guandu (“pigeon pea witches-broom phytoplasma”) (Teixeira et al., 2008).

As *Liberibacters* associadas ao HLB diferem quanto à tolerância a altas temperaturas e capacidade de multiplicação na planta cítrica. *Ca. L. asiaticus* é tolerante a temperaturas acima de 32°C enquanto que a *Ca. L. americanus* é consideravelmente afetada nestas temperaturas, podendo até não ser detectada pelo PCR (método altamente sensível) após exposição das plantas a altas temperaturas (Lopes et al., 2009b). Quanto à multiplicação em tecidos de citros, a *Ca. L. asiaticus* atinge títulos maiores do que a *Ca. L. americanus*, podendo ser até 10 vezes maior que a *Ca. L. americanus*. Esses dois fatores (maior sensibilidade a altas temperaturas e menor capacidade de multiplicação na planta e o inverso para *Ca. L. asiaticus*) explicam o declínio na ocorrência de *Ca. L. americanus* e o aumento da ocorrência de *Ca. L. asiaticus* ao longo do tempo (Lopes et al 2009a), sendo esta última espécie a que hoje predomina na maioria dos pomares do cinturão citrícola (Wulff, dados não publicados).

2.3. Os insetos vetores de *Liberibacter*

As bactérias do HLB são transmitidas por duas espécies de psílídeos, *Ca. L. asiaticus* e *Ca. L. americanus* são transmitidas pela espécie *Diaphorina citri*, enquanto que *Ca. L. africanus* é transmitida pela espécie *Trioza eritreae*. Em condições experimentais, ambos os vetores podem transmitir as três espécies de *Liberibacter* (Bove, 2006). Assim como acontece com *Liberibacter*, as duas espécies de psílídeos também diferem quanto à sensibilidade a altas temperaturas. *T. eritreae* é sensível a temperaturas superiores à 25°C, e *D. citri* tolerante

(Bové, 2006). No Brasil não foi relatada a presença de *T. eritreae*. *D. citri*, por sua vez, foi relatado na década de 40. Trata-se de um inseto polígrafo com preferência por plantas da família Rutaceae, que inclui todas as espécies de citros e várias ornamentais, em especial a murta ou falsa-murta (*Murraya* spp.).

Hoje no Brasil o HLB é a mais destrutiva doença dos citros. Consequentemente, o psílídeo transmissor se tornou o principal alvo de controle. Trata-se de inseto sugador de seiva, com preferência por brotos e vegetações novas. Quando o ataque é severo podem causar enrolamento ou engruvinhamento das folhas jovens e morte da gema apical das plantas. Quando adultos medem cerca de 2 a 4 mm de comprimento, são marrons claros a cinza. Quando jovens são manchados de escuro. As asas são transparentes, sendo as anteriores com manchas escuras. Possuem pernas posteriores saltatórias (Gallo et al., 2002). As fêmeas podem colocar de 200 a 800 ovos em sua vida. Os ovos são alongados e afilados nas extremidades com 0,3 mm de comprimento, de coloração amarelada, tornando-se alaranjados no final do período de incubação. Os ovos são colocados nas gemas vegetativas ainda quando os folíolos estão em formação. Após quatro dias em média as primeiras ninfas aparecem. São cinco estádios ninfais até a fase adulta. As ninfas são achatadas, pouco convexas e apresentam pernas curtas, de coloração amarelada. Atingem cerca de 1,7 mm de comprimento no quinto e último instar ninfal. Possuem mobilidade e exibem tecas alares (asas em formação) nos últimos ínstaes, aumentando a largura do corpo.

Sob condições experimentais, o ciclo biológico (ovo-adulto) varia de 15 a 40 dias, sendo que as temperaturas de 25° a 28°C são as que mais favorecem o desenvolvimento. Nava et al. (2007) observaram que a duração do período de ovo foi de 8,2 a 2,6 dias a temperaturas de 18°C e 32°C respectivamente, sendo a viabilidade drasticamente reduzida a temperatura de 32°C. Para a fase de ninfa, o ciclo variou de 39,3 dias a 18°C a 10,7 dias a 30°C. A viabilidade das ninfas também foi reduzida a 30°C. A longevidade de adultos também é afetada pela temperatura. Fêmeas viveram 40 dias a 25°C e acima de 88 dias a 15°C. Outro fator climático importante para a biologia da *D. citri* é a umidade relativa. Umidades relativas acima de 50% são favoráveis à viabilidade dos ovos (Liu & Tsai, 2000; Nava et al., 2006; Nava et al., 2007). A viabilidade ninfal foi reduzida para 40% sob umidade relativa de 30%. A 25°C e 33% de umidade relativa apenas 20% dos adultos de *D. citri* sobreviveram após 30 horas de exposição a estas condições (McFarland & Hoy, 2001).

A longevidade de *D. citri* também foi avaliada em condições de campo. Aubert (1987) observou 60 a 70% de mortalidade em ninfas à umidades relativas de 87 a 90% respectivamente. O aumento populacional ocorreu no final da primavera e se estendeu durante

o verão, períodos de temperaturas variando de amenas a quentes, umidades relativas mais altas e grande intensidade de fluxos vegetativos. No período mais seco e frio (outono/inverno), a população é baixa em relação ao que ocorre no período chuvoso (primavera/verão) (Yamamoto et al., 2001 e Costa et al., 2006).

Na presença de fontes de inóculo e do inseto vetor, a incidência de novas plantas com sintomas aumenta rapidamente nos pomares. Para adquirir a bactéria, o período mínimo de alimentação na planta infectada é de 15 a 30 minutos (Lopes et al., 2009a). A aquisição ocorre por ninfas e adultos, porém as ninfas são mais eficientes. Indivíduos que adquirem o patógeno na fase ninfal são capazes de transmitir após a ecdise para a fase adulta (Inoue et al., 2009), evidenciando que o patógeno é circulativo no vetor, não estando restrito ao estomodeu ou às peças bucais, como no caso das cigarrinhas transmissoras da *Xylella fastidiosa*, bactéria causadora da doença Clorose Variegada do Citros. Segundo Ferreira et al. (2010), ninfas de 4º e 5º ínstaes são mais eficientes na aquisição e se tornam adultos também mais eficientes na inoculação. Isto se deve ao fato de que, após a aquisição, é necessário um tempo para que *D. citri* seja capaz de inocular a bactéria em uma planta sadia, característica conhecida como latência. Períodos de latência de 24 horas (Buitendag & von Broembsen, 1993) a 21 dias (Capoor et al., 1974) são relatados na literatura. Períodos mais longos de acesso à aquisição e inoculação devem aumentar a eficiência de transmissão das bactérias, além do estágio de desenvolvimento do psilídeo (Parra et al, 2010) e níveis de bactérias na planta (Lopes et al, 2013).

2.4. Expressão e evolução dos sintomas de HLB

As bactérias do HLB colonizam e obstruem os vasos do floema impedindo a distribuição normal da seiva elaborada nos ramos infectados e dos ramos infectados para o restante da planta. Essa obstrução induz a expressão de sintomas reflexos em folhas e frutos. Os primeiros sintomas ocorrem após períodos de seis a doze meses após a inoculação (Bové, 2006; Lopes et al 2010). A taxa de evolução e severidade dos sintomas é influenciada pela variedade e idade da planta, concentração bacteriana e condições climáticas, principalmente a temperatura (Bové, 2006).

Os primeiros sintomas ocorrem em folhas, que começam a perder parte de sua coloração verde normal, apresentando-se parcialmente amarela, sem delimitação clara entre a parte verde e amarela. Esse tipo de sintoma é conhecido como “mosqueado”. Os sintomas de mosqueados normalmente diferem entre folhas e na mesma folha, principalmente no tamanho, posição e cor. Com o tempo, a nervura principal e as nervuras secundárias amarelecem e

aumentam de tamanhos. Com o amarelecimento generalizado, as folhas caem. Plantas infectadas há mais tempo apresentam folhas novas com tamanho reduzido e com sintomas de deficiência de zinco e manganês. Os frutos de ramos com sintomas foliares são assimétricos, deformados, com sementes abortadas, menores, apresentam gosto amargo, e assim como as folhas, caem prematuramente, com perdas imediatas à produção (McClellan & Schwarz, 1970).

Os sintomas são mais evidentes no final do ciclo das águas e começo do ciclo da seca, ou seja, nos meses de março, abril, maio e junho. Nos meses de julho, agosto e setembro, geralmente a planta está muito afetada pela seca, o que faz com que as folhas estejam semi-enroladas, dificultando a diagnose. Já nos meses muito chuvosos (dezembro e janeiro) a planta emite novos brotos que se desenvolvem com bastante vigor. A nova folhagem resultante do desenvolvimento dos brotos podem ocultar as folhas maduras sintomáticas localizadas mais internamente na copa.

2.5. Manejo do HLB

É preconizado o manejo do HLB pelo plantio de mudas saudáveis, inspeção e erradicação de plantas doentes e controle do vetor. Para serem bem sucedidas, estas medidas devem ser coordenadas e adotadas em larga escala, ou seja, ao nível regional (Bassanezi et al., 2013).

A produção de mudas em viveiros telados certificados é essencial para evitar plantas já infectadas no início da formação do pomar. A inspeção e erradicação de plantas doentes são necessárias para diminuir fontes de inóculo. O ideal é que a identificação seja no início de aparecimento dos sintomas, para a mais rápida erradicação possível. Equipes de inspetores bem treinados e comprometidos são importantes para o sucesso da medida. Está em vigor no Brasil a Instrução Normativa nº53 de 13 de Outubro de 2008 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento que obriga os produtores de cítricos a inspecionar e erradicar plantas doentes. Esta rotina é obrigatória a cada trimestre (Belasque Jr. et al., 2009) e relatórios devem ser entregues a cada semestre.

O manejo do vetor é importante ferramenta para o manejo da doença. Inspeção e monitoramento do vetor facilitam o momento certo de agir. O controle do vetor em pomares é feito com aplicação de inseticidas, mas alternativas devem ser buscadas para o manejo integrado. O monitoramento com armadilhas amarelas adesivas em grandes áreas tem permitido observar a flutuação populacional do inseto de maneira macro, o que tem permitido adoção de estratégias de controle regionais (Bassanezi et al., 2013). Essa medida é essencial para evitar infecções primárias, as que têm origem fora da propriedade. A soltura do inimigo natural *Tamarixia radiata* também tem sido um método alternativo de controle da *D. citri*,

porém, seu uso está limitado a pomares abandonados e áreas urbanas, onde não se aplicam inseticidas.

Apesar de todos os esforços em conter o avanço do HLB, ou talvez pelo fato de as medidas de manejo não terem sido adotadas de forma regional desde o início, a doença evoluiu rapidamente por todo o cinturão citrícola. Os primeiros sintomas de HLB apareceram em 2004 na região de Araraquara, e em 2005 em Minas Gerais. A evolução de plantas com sintomas no cinturão citrícola tem sido relevante. De 2008 a 2012 a porcentagem de plantas com sintomas evoluiu de 1,12 para 9,89% no centro, de 0 para 1,78 no norte, de 0,01 para 0,28 no noroeste, de 0,01 para 1,35 no oeste, de 0,73 para 14,81 no leste e de 0,07 para 0,85 no sul do cinturão citrícola. Como se vê a evolução do HLB não foi uniforme nas diferentes regiões, atingindo menores incidências nas regiões noroeste, sul e oeste do que nas demais (www.fundecitrus.com.br).

3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A identificação das plantas com HLB é feita por inspetores treinados. Um dos aspectos que torna difícil a correta identificação dos sintomas de HLB no campo são a similaridade que os sintomas de HLB podem ter com os sintomas manifestados por outras causas, como ataque de pragas e doenças, danos mecânicos e principalmente deficiência mineral. Muitas vezes, dada a dificuldade de diagnose no campo, é necessário o envio de amostras foliares para análise laboratorial.

A dificuldade de reconhecimento dos sintomas no campo pelos inspetores tem sido ainda maior na região do Triângulo Mineiro. Informações laboratoriais do Fundecitrus (Wulff, dados não publicados) indicam que os níveis de acerto dos inspetores de propriedades do Triângulo Mineiro ficam por volta de 30 a 50 %, enquanto que os níveis de acerto dos inspetores de propriedades localizadas na região central do estado de São Paulo são em geral acima de 80%. Estas diferenças poderiam ser atribuídas a diferenças nos níveis de treinamento dos inspetores. No entanto, observações de campo sugerem que tais diferenças estão, aparentemente, mais associadas a uma evolução mais ou menos rápida na intensidade de expressão dos sintomas foliares, que, por sua vez, podem estar associados às condições climáticas predominantes, afetando não somente a evolução dos sintomas como também a multiplicação do patógeno nos tecidos da planta.

A região do Triângulo Mineiro apresenta condições climáticas diferentes das observadas na maior parte do cinturão citrícola, em particular da região centro-sul do estado

de São Paulo. No Triângulo Mineiro os verões são em geral mais quentes e, no outono-inverno, o déficit hídrico é mais acentuado.

Diante da carência de informações sobre as aparentes diferenças na evolução da infecção e sintomas de HLB em plantas cítricas nas diferentes regiões do cinturão citrícola brasileiro, importantes para o aprimoramento do manejo do HLB, este trabalho teve como objetivos gerais (i) comprovar ou não se as diferenças de sintomas observadas no campo de fato existem e, se houver, (ii) identificar as possíveis causas das diferenças. Como objetivos específicos, visou (i) avaliar ao longo do tempo a proporção dos diferentes tipos e intensidade de sintomas de HLB em folhas de plantas adultas em propriedades localizadas nos municípios de Analândia, na região central do Estado de São Paulo e Frutal e Comendador Gomes, no sul do Triângulo Mineiro, (ii) avaliar a evolução na proporção de ramos infectados por *Ca. L. asiaticus* na copa das plantas, (iii) verificar se existe correlação entre título bacteriano, época do ano, região geográfica e taxa de transmissão da bactéria por enxertia, e (iv) identificar se as possíveis variações na evolução dos sintomas se correlacionam com variáveis climáticas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Descrição da área experimental

Os tipos e progressão dos sintomas de HLB e progressão da infecção da planta por *Ca. L. asiaticus* ao longo do tempo, foram avaliados em pomares comerciais no norte e centro do parque citrícola (Fig.1). Os locais foram definidos em função das diferenças climáticas históricas e das diferenças na incidência e severidade de sintomas de HLB verificadas ao longo do tempo, sempre maiores no centro que nas demais (Maschio, 2011). No Norte foram escolhidas as fazendas Portal de Minas, localizada em Frutal, MG, e Rio Verde/Vale Verde, ambas localizadas em Comendador Gomes, MG. No centro foi escolhida a fazenda Santa Maria, localizada em Analândia, SP (Fig. 1). Na Portal de Minas, o tipo de solo do talhão escolhido é definido como latossolo distroférico (antigo latossolo roxo) que, de modo geral, são mais bem providos em micronutrientes do que a maioria dos outros latossolos (Embrapa Arroz e Feijão, Sistemas de Produção, No. 7, Versão eletrônica, Setembro/2006). Nas fazendas Rio Verde/Vale Verde, o tipo de solo dos talhões escolhidos é definido como latossolo vermelho distrófico, e na fazenda Santa Maria como neossolo quartzarênico (antigo areia quartzosa latossólica), ambos mais pobres em micronutrientes que o da fazenda Portal de Minas.

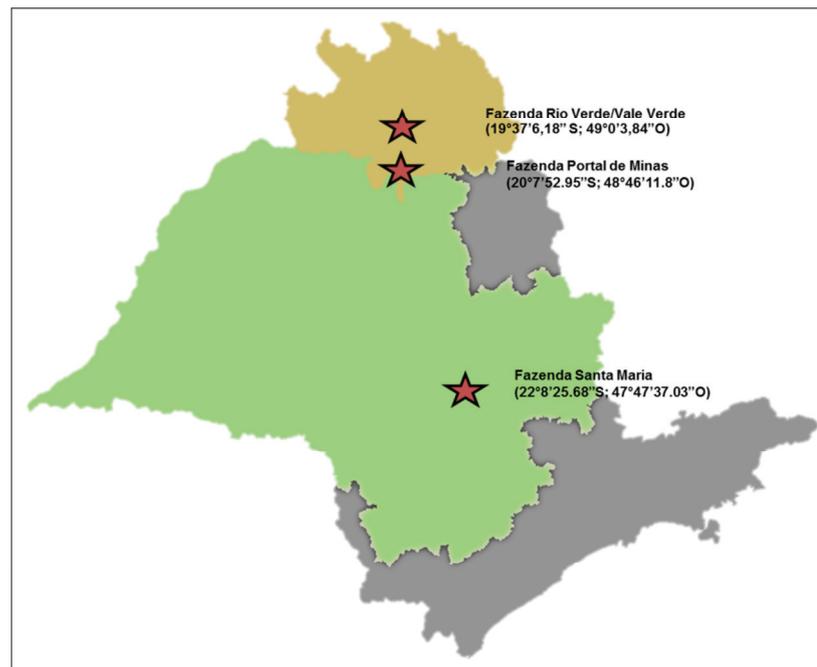


Figura 1. Mapa do cinturão citrícola que se estende do sul ao norte do Estado de São Paulo até parte do Triângulo Mineiro, Estado de Minas Gerais.

Para ilustrar as diferenças climáticas entre as regiões aonde os experimentos foram conduzidos, são apresentados na Figura 2 médias mensais das temperaturas máxima e mínima, amplitude térmica, umidade relativa, além da quantidade acumulada de chuva no período de janeiro de 2008 a dezembro de 2014. As informações, registradas diariamente, foram conseguidas no banco de dados da empresa proprietária das fazendas. O registro das temperaturas vem sendo feito por meio de um registrador marca INSTRUTHERM, modelo HT-210, e da chuva por meio de um pluviômetro. A coleta das temperaturas máximas e mínimas é feita diariamente às 6:00 h e a umidade relativa às 15:00 h.

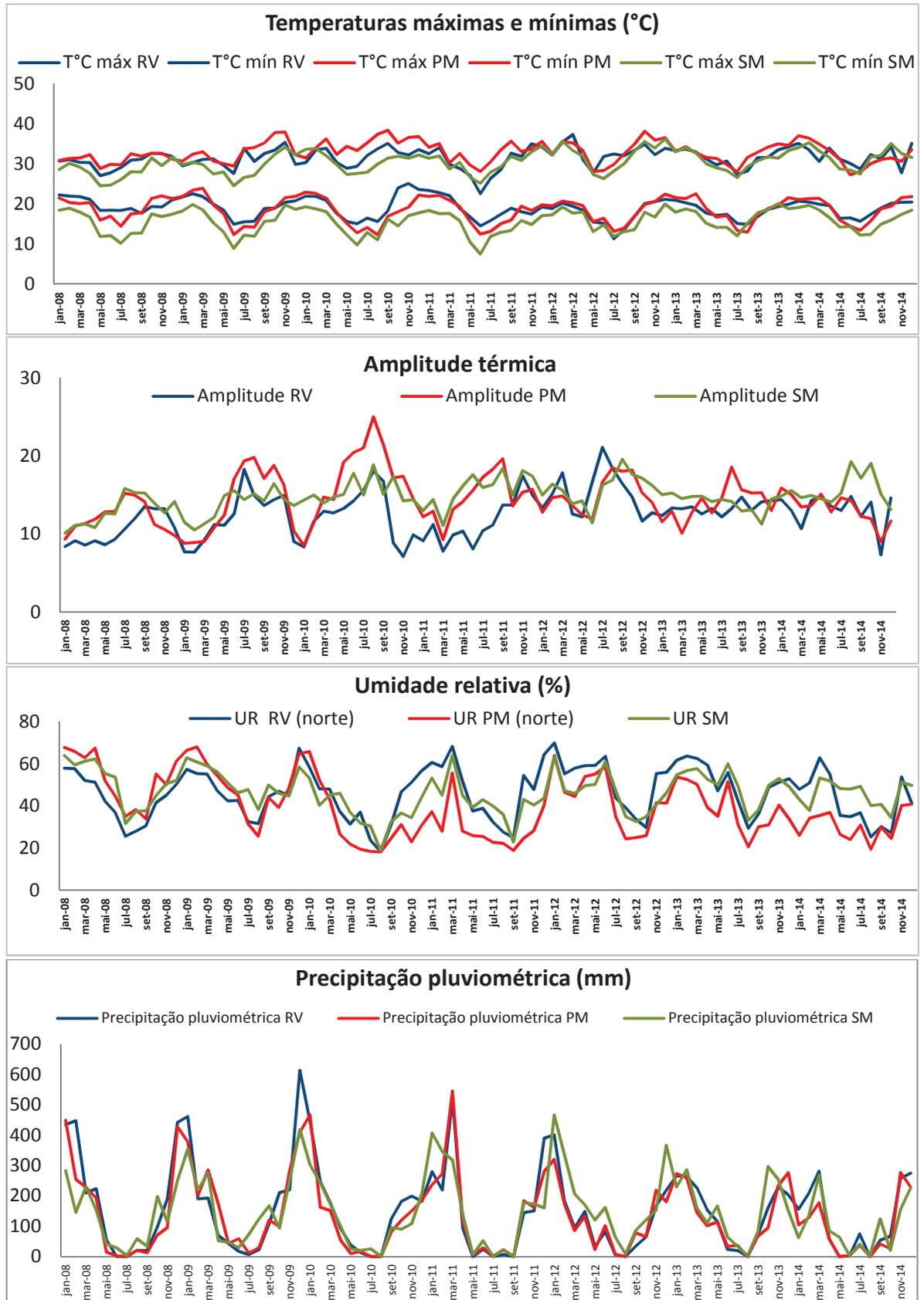


Figura 2. Médias mensais de temperatura máxima e mínima, médias mensais da amplitude térmica (diferença entre a média mensal da temperatura máxima e mínima), médias mensais da umidade relativa coletada às 15:00 h, e acumulado mensal de precipitação pluviométrica (mm) registrados entre janeiro de 2008 e dezembro de 2014 nas fazendas Santa Maria (SM), Portal de Minas (PM) e Rio Verde (RV), localizadas no centro (SM) e norte (PM e RV) do cinturão citrícola brasileiro.

Com relação às médias das temperaturas máximas observa-se que na maioria dos meses levantados, os valores foram maiores na fazenda Portal de Minas, seguidos da Rio Verde e Santa Maria. Com relação às médias das temperaturas mínimas, parece haver um equilíbrio entre a Portal de Minas e Rio Verde no número de meses nos quais as temperaturas foram maiores e na Santa Maria, na grande maioria dos meses levantados, apresentou os menores valores. Com relação à amplitude térmica, a fazenda Rio Verde foi a que apresentou a menor amplitude na maioria dos meses levantados, seguido da Portal de Minas e Santa Maria. Com relação à média da umidade relativa, a Santa Maria apresentou valores intermediários à Portal de Minas e Rio Verde, em praticamente todo o período levantado. Quanto à Portal de Minas e Rio Verde houve aparentemente dois períodos distintos. No primeiro, que vai de 2008 a 2010, a Portal de Minas apresentou valores maiores, invertendo-se esta tendência no período de 2010 a 2014. Com relação a chuvas, até o ano de 2011 observa-se um volume acumulado maior nas fazendas do norte. Já nos anos de 2012 e 2013, maiores volumes foram observados na Santa Maria, e no ano de 2014 houve um aparente equilíbrio.

O experimento foi conduzido no período de novembro de 2012 a dezembro de 2013. Durante este período, os dados dos fatores climáticos obtidos foram submetidos à análise de variância com as médias mensais comparadas estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.2. Seleção das plantas experimentais

Nas três fazendas, inspetores treinados marcam plantas suspeitas para HLB. Uma vez marcadas, os líderes de inspeção ou encarregados fitossanitários vistoriam as plantas e, com base na maior ou menor clareza dos sintomas, enviam ou não amostras para o laboratório do Fundecitrus para diagnose a ser feita por meio do teste de PCR. Na fazenda Rio Verde/Vale Verde todas as plantas suspeitas são analisadas por PCR, na fazenda Portal de Minas somente as plantas mais duvidosas, e na fazenda Santa Maria não se faz mais análise das plantas suspeitas. As plantas marcadas são erradicadas o mais rápido possível.

Até o final de 2014, já haviam sido erradicadas em torno de 3.500 plantas na Portal de Minas (0,5% com relação ao total de plantas da fazenda), 170 plantas na RioVerde (0,03%) e 520 plantas na Vale Verde (0,05%). Na Santa Maria, por outro lado, já haviam sido marcadas mais de 60 mil plantas (25%).

Pretendia-se a princípio conduzir o estudo em variedade e porta-enxerto comuns nas três fazendas, porém, não foi possível devido à demora em aparecer plantas doentes na Rio

Verde/Vale Verde, obrigando a inclusão de outra combinação variedade/porta-enxerto. Na Tabela 1 são apresentados os dados de cada planta informando a fazenda, talhão, data de plantio, variedade, porta-enxerto, espaçamento, idade de plantio, irrigada ou não, e volume de sintomas com HLB na data da poda.

Tabela 1. Informações detalhadas das plantas experimentais.

Fazenda	Planta	Talhão	Data		Porta-enxerto	Espaçamento	Volume de copa com sintomas de HLB na data da poda
			Plantio	Copa			
Santa Maria	1	106	Dez 2001	Valência	Cravo, sub-enxerto Swingle	6,8x3,4	23%
Santa Maria	2	106	Dez 2001	Valência	Cravo, sub-enxerto Swingle	6,8x3,4	16%
Santa Maria	3	106	Dez 2001	Valência	Cravo, sub-enxerto Swingle	6,8x3,4	8%
Santa Maria	4	106	Dez 2001	Valência	Cravo, sub-enxerto Swingle	6,8x3,4	15%
Santa Maria	5	106	Dez 2001	Valência	Cravo, sub-enxerto Swingle	6,8x3,4	10%
Santa Maria	6	106	Dez 2001	Valência	Cravo, sub-enxerto Swingle	6,8x3,4	13%
Santa Maria	7	106	Dez 2001	Valência	Cravo, sub-enxerto Swingle	6,8x3,4	14%
Santa Maria	8	106	Dez 2001	Valência	Cravo, sub-enxerto Swingle	6,8x3,4	8%
Santa Maria	9	106	Dez 2001	Valência	Cravo, sub-enxerto Swingle	6,8x3,4	18%
Santa Maria	10	106	Dez 2001	Valência	Cravo, sub-enxerto Swingle	6,8x3,4	13%
Santa Maria	11	106	Dez 2001	Valência	Cravo, sub-enxerto Swingle	6,8x3,4	13%
Santa Maria	12	106	Dez 2001	Valência	Cravo, sub-enxerto Swingle	6,8x3,4	11%
Portal de Minas	1	309	Fev 2005	Valência	Swingle	7,0x3,5	4%
Portal de Minas	2	309	Fev 2005	Valência	Swingle	7,0x3,5	6%
Portal de Minas	3	309	Fev 2005	Valência	Swingle	7,0x3,5	18%
Portal de Minas	4	309	Fev 2005	Valência	Swingle	7,0x3,5	24%
Portal de Minas	5	309	Fev 2005	Valência	Swingle	7,0x3,5	4%
Portal de Minas	6	309	Fev 2005	Valência	Swingle	7,0x3,5	11%
Vale Verde	1	807	Fev 2006	Natal	Cleópatra	7,5x4,0	24%
Rio Verde	2	205	Abr 2005	Valência	Cleópatra	7,5x4,0	4%
Vale Verde	3	203	Set 2006	Valência	Volkameriano, sub-enxerto Swingle	7,0x4,0	5%
Vale Verde	4	316	Abr 2005	Natal	Cleópatra	7,5x4,0	3%

Para melhor ilustrar o volume estimado de sintomas de HLB na copa, são apresentados na figura 3 e 4 desenhos representativos com a numeração da planta e percentual estimado de sintomas de cada planta. A letra E significa lado esquerdo e a letra D lado direito, e os círculos amarelos indicam a posição e volume de sintomas de HLB.

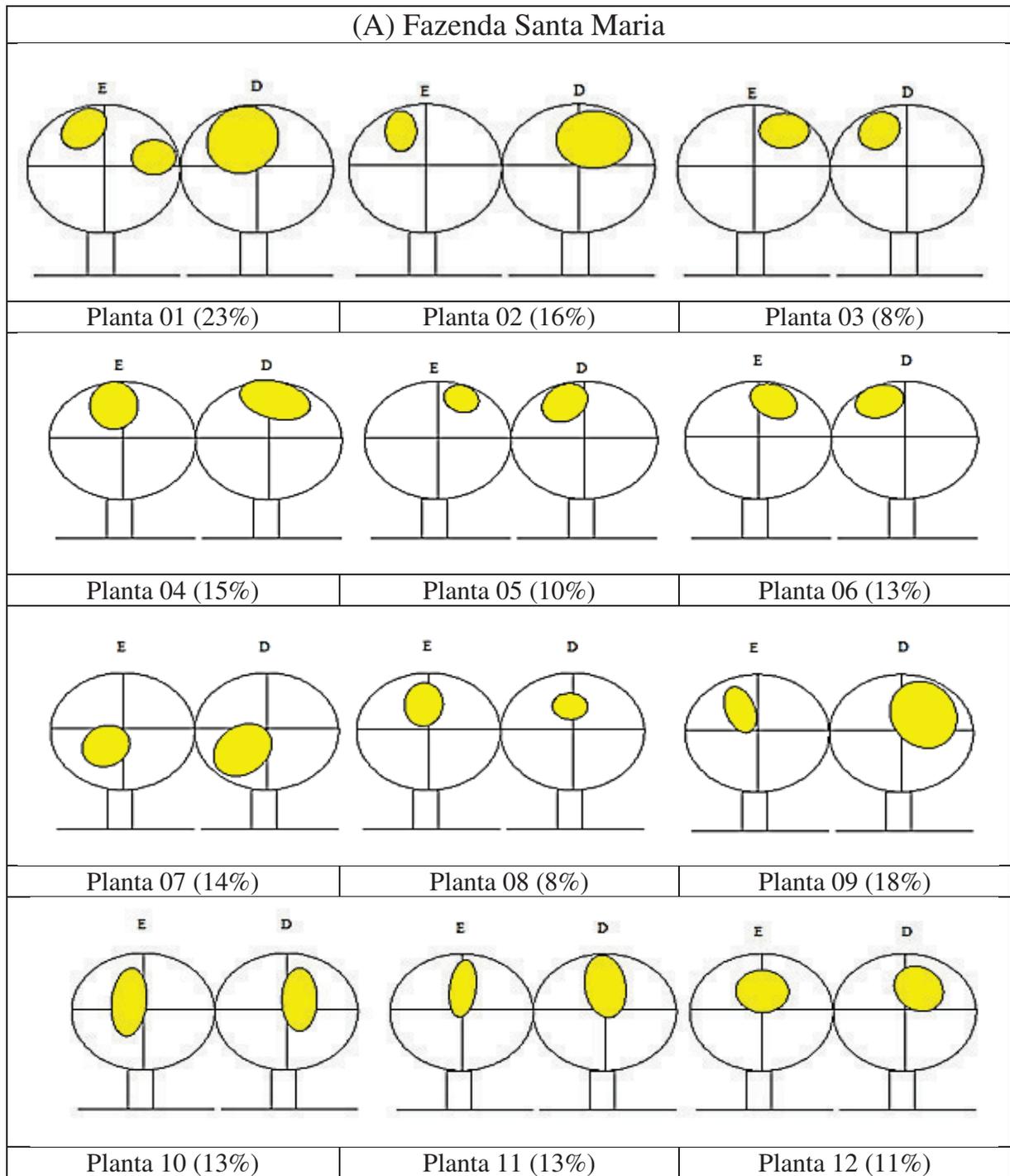


Figura 3. Esquema representativo das plantas usadas no experimento, mostrando os percentuais estimativos de sintomas, os lados esquerdo e direito (E, D), e posição e volume de sintomas de HLB na copa, em plantas da fazenda Santa Maria (A).

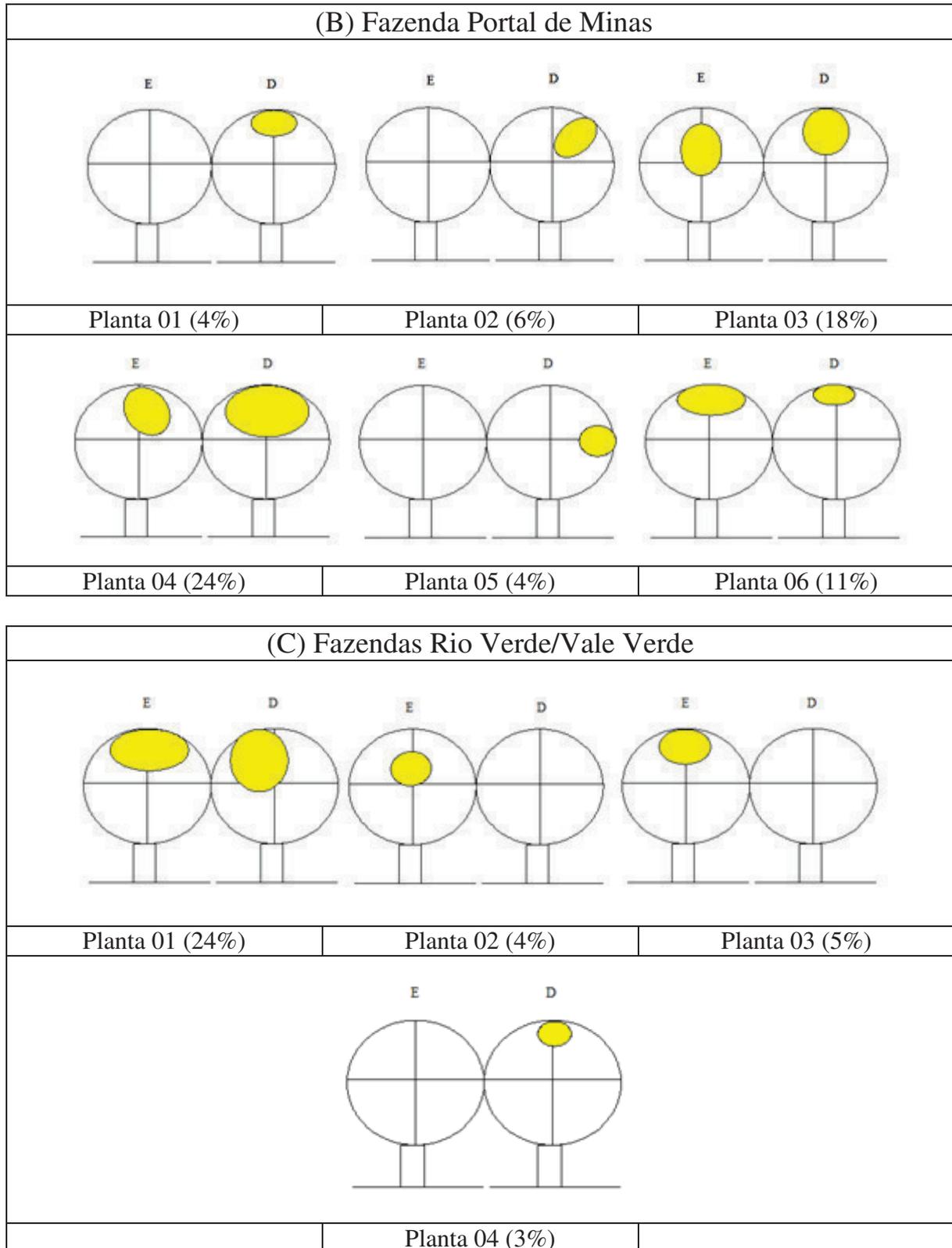


Figura 4. Esquema representativo das plantas usadas no experimento, mostrando os percentuais estimativos de sintomas, os lados esquerdo e direito (E, D), e posição e volume de sintomas de HLB na copa, em plantas da Portal de Minas (B) e Rio Verde/Vale Verde (C).

4.3. Poda e proteção das plantas com tela anti-afídeos

A confirmação de que os sintomas observados eram de HLB foi feita por PCR no laboratório do Fundecitrus aonde as folhas foram avaliadas para *Ca. L. asiaticus*, *Ca. L. americanus* e fitoplasma. Nenhuma das plantas testou positivo para *Ca. L. americanus* e uma das plantas amostradas na RV testou positiva para fitoplasma, a qual foi descartada do estudo. As demais plantas (infectadas com *Ca. L. asiaticus*) foram então podadas. A poda se fez necessária para adequar a planta ao tamanho da tela e para padronizar a idade das folhas que posteriormente seriam avaliadas. A poda foi feita cortando-se todos os ramos secundários para que a planta ficasse a uma altura média de 150 cm do solo (Fig. 5). Em seguida, planta, tronco principal (pernada) e ramos secundários foram identificados por números. Nem todos os ramos foram identificados, somente os mais distribuídos na copa e obrigatoriamente os que estavam com folhas sintomáticas. Após a poda, uma estrutura metálica de 3x3x3 m (Fig. 5) envolta por tela anti-afídica foi usada individualmente para proteger as plantas do acesso de *D. citri*. Na Santa Maria as plantas de número 7 a 12 (Fig. 3) foram mantidas sem proteção de tela para fins de comparação.

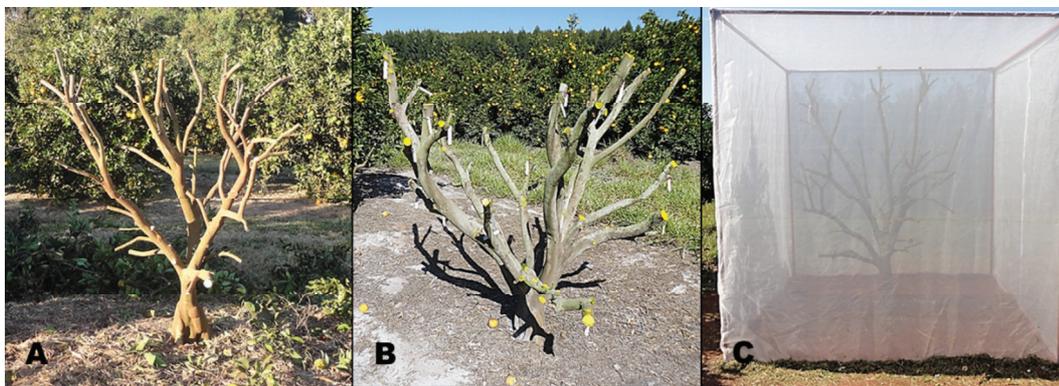


Figura 5. Fotografias de planta logo após a poda (A), planta com os ramos etiquetados (B), e logo após ser engaiolada (C).

Na Santa Maria e Portal de Minas todas as plantas foram podadas nos meses de junho e julho de 2012, e na RioVerde/Verde Verde em julho e agosto de 2012. Foram necessárias novas podas (podas leves) para impedir que os ramos, ao se desenvolverem, perfurassem a tela. Isto foi feito cortando se os ramos em torno de 30 cm abaixo do ápice. Essas novas podas foram feitas em janeiro e agosto de 2013.

Aparelhos registradores de temperatura e umidade relativa do ar (LogBox, Novus, Porto Alegre, RS) foram instalados dentro e fora de uma das gaiolas nas três fazendas. Os aparelhos ficaram protegidos em uma casinha de madeira, sendo que o sensor coletor dos

dados mantidos na parte externa. Os dados foram registrados de hora em hora. Coleta e transferência dos dados foram feitos periodicamente.

4.4. Tratos culturais das plantas experimentais

Todas as plantas podadas, tanto as protegidas, como as não protegidas (Santa Maria) receberam os tratamentos fitossanitários e nutricionais recomendados para o talhão. Os tratamentos fitossanitários foram definidos com base nos dados de inspeção e monitoramento levantados por inspetores de pragas e doenças. O volume de calda dependia do tipo de praga ou doença alvo, variando de 150 ml / m³ de copa para altos volumes e 90 ml / m³ de copa para baixos volumes. Para as plantas protegidas foram necessários complementos de aplicação, pois, foi verificado que a tela antiafídea oferecia barreira à chegada da calda na planta. Os complementos foram feitos através de pulverizador costal com a mesma calda usada na pulverização atomizadora. O controle de plantas infestantes foi feito quando necessário, por meio de aplicações de herbicidas ou capina manual.

As adubações foliares de macro e micro nutrientes foram definidas através do programa nutricional da empresa proprietária, sendo que na Santa Maria, onde o solo é mais pobre, o programa é chamado de “Programa Foliar de Recuperação” e nas fazendas do Norte (Portal de Minas, Rio Verde/Vale Verde), o programa usado é chamado de “Programa Foliar de Manutenção”. Nome comercial, nutrientes e teores, dosagens do produto comercial, número de aplicações e totais dos produtos usados podem ser vistos na Figura 6.

Tratamento pomares em recuperação					
Produto comercial	Nutrientes	Teores	kg/bb	Nº aplicação	kg / safra
Sulfato de zinco	S-SO4	35%	4	6	24
	Zn	18%			
Sulfato de manganês	S-SO4	31%	5	6	30
	Mn	18%			
Molibdato de sódio	Mo	39%	0,03	6	0,18
Acido bórico	B	17%	2	6	12
Nitrato de magnésio (d=1,35)	N	7%	9,45	6	57
	Mg	6%			
Nitrato de potássio	N	13%	5	6	30
	K	44%			
Fosfito (d=1,51)	P2O5	28%	4,5	6	27
Pulverizações realizadas na presença de vegetação nova					
Tratamento pomares em manutenção					
Produto comercial	Nutrientes	Teores	kg/bb	Nº aplicação	kg / safra
Sulfato de zinco	S-SO4	35%	3	6	18
	Zn	18%			
Sulfato de manganês	S-SO4	31%	3	6	18
	Mn	18%			
Molibdato de sódio	Mo	39%	0,02	6	0,12
Nitrato de magnésio (d=1,35)	N	7%	11,5	2	23
	Mg	6%			
Fosfito (d=1,51)	P2O5	28%	3,75	3	11,25
Pulverizações realizadas na presença de vegetação nova					

Figura 6. Composição dos tratamentos foliares de pomares em recuperação e pomares em manutenção, contendo nome comercial do produto, dose por bomba de 2.000 litros de água (kg/bb), número de aplicações por safra e total de quilos do produto por safra.

Da mesma forma que foi preciso complementar as pulverizações usadas para o controle de pragas e doenças, as pulverizações de adubos foliares (macro e micronutrientes) também foram complementadas. As adubações de solo, com formulações NPK, foram feitas mecanicamente nas quadras, porém complementadas manualmente nas plantas engaioladas. A quantidade aplicada por planta experimental foi a mesma das plantas do talhão, calculada em função dos resultados das análises de solo e folhas e potencial de produção das plantas, seguindo os parâmetros do boletim 100 do IAC (Quaggio et al., 1997).

4.5. Progressão dos sintomas de HLB na copa

Para classificação dos sintomas foi elaborada uma escala fotográfica de severidade (Fig. 7). No dia 10 de julho de 2012 aproximadamente 500 folhas foram coletadas em plantas com sintomas típicos de HLB na fazenda Santa Maria, depois selecionadas, lavadas e separadas visualmente em grupos de sintomas parecidos. Sintomas de HLB são difíceis de agrupar pela grande diversidade de padrões de mosqueado encontrados nas folhas.

Com relação ao mosqueado, as folhas foram separadas em quatro grupos diferentes separados um do outro visualmente: M1 - folha predominando a cor verde com leve mosqueado amarelo, M2 - folha com contraste marcante entre o verde e o amarelo, M3 - folha com limbo e nervura predominando a cor amarela, e M4 - folha predominando a cor amarela com nervuras salientes amareladas e/ou amarronzadas.

Com relação à deficiência mineral, as folhas foram separadas em quatro grupos diferentes separados um do outro visualmente: D1 - deficiência de zinco pouco intensa, D2 - deficiência de zinco com a cor amarela bem delimitada pelas nervuras secundárias, D3 - deficiência de zinco com amarelo mais intenso com menos delimitação das nervuras secundárias, e D4 - folha amarelada com círculos de cor verde.

Na Figura 7 é apresentada a escala contendo uma folha representativa de cada categoria de mosqueado e deficiência mineral. A confirmação da viabilidade do uso da escala foi testada em casa de vegetação e campo.

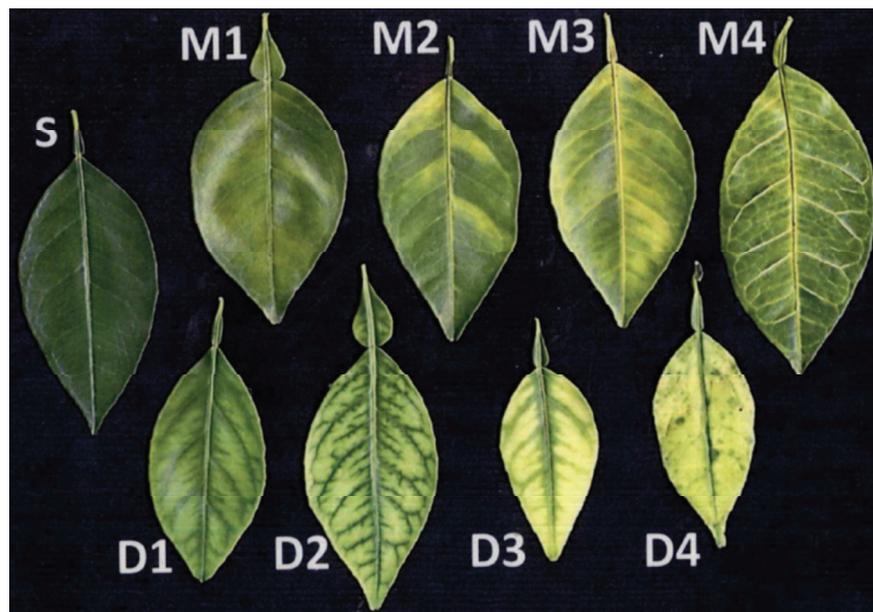


Figura 7. Escala fotográfica de severidade de sintomas de HLB (mosqueado e deficiência mineral) preparada para avaliação das plantas.

As plantas foram avaliadas, com o uso da escala, no período de novembro de 2012 à dezembro de 2013, em intervalos de dois a três meses entre as avaliações.

Para avaliação, foi escolhido um ramo sintomático antes da poda inicial. Inicialmente (novembro de 2012, janeiro de 2013 e março de 2013) avaliou-se 20 folhas presentes no terço médio do ramo. Nas datas seguintes avaliaram-se todas as folhas do ramo de todos os fluxos vegetativos. As médias foram comparadas estatisticamente (Tukey, 5% probabilidade).

4.6. Progressão da infecção na copa

Para se avaliar a evolução da infecção na copa das plantas, as plantas foram avaliadas por PCR e visualmente por sintomas. No momento da primeira poda, todos os ramos marcados foram amostrados e analisados via PCR. Conforme mencionado, todas as plantas do estudo estavam infectadas com *Ca. L. asiaticus*. As amostras consistiram de um segmento de 3 cm de ramo coletado na extremidade logo abaixo da linha de corte. No laboratório, a casca foi removida e sua parte interna raspada para obtenção dos tecidos floemáticos, os quais foram processados para extração de DNA e avaliação por PCR. O resultado do PCR foi usado para se identificar o padrão de distribuição inicial da bactéria na copa. As primeiras coletas foram feitas entre os meses de junho e agosto de 2012. Uma segunda coleta e análise por PCR foi feita em janeiro de 2013, quando novamente todos os ramos etiquetados foram amostrados. Nesta coleta, a amostra consistiu de 20 folhas, as quais foram combinadas em uma única amostra por ramo. Uma terceira análise da distribuição da bactéria nos ramos foi feita em agosto de 2013, seguindo-se o mesmo procedimento usado na segunda coleta, com a diferença que neste caso foram amostrados e analisados somente os ramos que visualmente não apresentavam sintomas de HLB. Em todas as análises desta pesquisa, consideraram-se como positivas para *Liberibacter* as amostras que resultaram em valores de Concentração de título (Ct) igual ou abaixo de 32,0. Para estimar os títulos de *Liberibacter* nas amostras, empregou-se curva padrão e procedimentos já descritos por Lopes et al. (2009a).

Avaliou-se o progresso da infecção na copa, onde foi calculada a porcentagem de ramos infectados por planta nos diferentes locais e épocas. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas estatisticamente pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.7. Experimento de inoculação em casa de vegetação

Estudo complementar ao realizado no campo foi conduzido em casa de vegetação no Fundecitrus em Araraquara. Os objetivos foram verificar se existe alguma correlação entre título bacteriano detectado no ramo usado como inóculo, região geográfica, época do ano, com as taxas de sobrevivência do material enxertado e transmissão da bactéria. As retiradas de material e inoculações foram feitas em maio, agosto, dezembro de 2013 e fevereiro de 2014.

De todas as plantas avaliadas no campo, o ramo com a maior quantidade de sintomas de HLB foi escolhido e marcado para servir de material para o experimento. Desses ramos,

foram retirados pedaços de galhos (± 30 cm), que acomodados em jornal molhado eram levados ao Fundecitrus para inoculação. Foram usadas mudas de Valência em Swingle com 40 cm de altura e 1 cm de diâmetro de tronco. Para estas mudas foi utilizada a técnica de encostia, conforme descrito por Lopes & Frare (2008). As condições climáticas da estufa tem sido favoráveis à infecção e avanço do HLB em qualquer época do ano, conforme pesquisas anteriores têm demonstrado.

Nas inoculações de maio, agosto e dezembro de 2013, o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado. Cada planta experimental do campo das três localidades foi considerada como um tratamento com quatro repetições cada. Na inoculação de fevereiro de 2014, o delineamento experimental utilizado também foi o inteiramente casualizado, uma planta de campo sem gaiola das três localidades com sintomas de HLB foi considerada como um tratamento, com 30 repetições cada.

As plantas foram avaliadas após períodos variáveis de incubação. Foram avaliados (i) os títulos bacterianos no segmento usado como enxerto, (ii) a taxa de pegamento do enxerto, e (iii) a taxa de transmissão da bactéria. Para avaliação do título no enxerto procedeu-se a análise por PCR do tecido da parte interna da casca de metade do segmento, o qual foi cortado longitudinalmente. Assim, metade do segmento foi usada na inoculação e a outra metade avaliada por PCR. Para avaliação da taxa de transmissão, empregou-se a porcentagem de plantas com sintomas de HLB ou positivas por PCR. Os dados foram submetidos à análise de variância com as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.8. Análise da associação entre clima e sintomas de HLB nas fazendas Santa Maria, Portal de Minas, e Rio Verde/Vale Verde

Visando identificar quais fatores climáticos poderiam explicar a variação observada na intensidade de sintomas de HLB em folhas nos diferentes locais, foi feita análise de regressão múltipla. Para a análise empregou-se o programa Statistica nas funções “multiple regression”, “stepwise” e “forward”, tendo como variável dependente as porcentagens médias de sintomas (mosqueados e deficiência mineral) em folhas nos três locais, e como variáveis independentes o acumulado de chuva, o número acumulado de horas com umidade relativa acima e abaixo de 50%, o número acumulado de horas às temperaturas do ar entre 0 e 5, 5 e 10, 10 e 15, 15 e 20, 20 e 25, 30 e 35, 35 e 40, e acima de 40 graus Celsius, além da máxima e mínimas absolutas e amplitude térmica (diferença entre a média da temperatura máxima e a média da temperatura mínima), registrados durante períodos de 7, 15, 30 e 60 dias antes de cada data de

avaliação. Foram consideradas somente as equações que resultaram em valores de probabilidade menores do que 0,005 (Tabela 4).

4.9. Análise da associação entre clima e log de Las nas fazendas Santa Maria, Portal de Minas e Rio Verde/Vale Verde.

Visando identificar quais fatores climáticos poderiam explicar a variação observada no log de Las nos diferentes locais, foi feita análise de regressão múltipla. Para as análise empregou-se o programa Statistica nas funções “multiple regression”, “stepwise” e “forward”, tendo como variável dependente as médias de log de Las em segmentos de ramos nos três locais, e como variáveis independentes o número acumulado de horas com temperaturas do ar abaixo de 15, e acima de 30 graus Celsius, registrados durante período de sete dias antes de cada data de avaliação. Foram consideradas somente as equações que resultaram em valores de probabilidade menores do que 0,005.

5. RESULTADOS

O primeiro objetivo deste trabalho foi verificar se os sintomas de HLB diferiam na intensidade e tipo entre locais e épocas do ano. Para isto foram engaioladas plantas doentes em três locais de condições climáticas diferentes conforme mostrado na Figura 1. De fato, nos 14 meses em que o trabalho foi conduzido, os dados coletados nos registradores mantidos nas sedes das fazendas mostraram haver diferenças entre elas quanto às médias mensais de temperaturas mínimas e máximas, e de porcentagem de umidade relativa (Tabela 2).

Tabela 2. Médias mensais de fatores climáticos registrados em três fazendas do cinturão citrícola brasileiro no período de novembro de 2012 a dezembro de 2013.

Fazenda	Região	Fatores climáticos				
		Temperatura mínima (°C)	Temperatura máxima (°C)	Amplitude térmica (°C)	Umidade relativa (%)	Precipitação (mm)
Santa Maria	Centro	17,00 b	31,42 b	14,42 a	49,42 a	167,71 a
Portal de Minas	Norte	19,00 a	33,07 a	14,14 a	39,42 b	144,85 a
Rio Verde e Vale Verde	Norte	18,57 a	31,78 b	13,14 a	51,50 a	150,92 a

Médias seguidas de mesma letra não diferem ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

As plantas foram avaliadas visualmente a cada dois ou três meses. As avaliações foram feitas em um ramo sintomático previamente selecionado e etiquetado. Foram contadas e quantificadas a proporção do número de folhas com os diferentes tipos de sintomas (4 de mosqueado e 4 de deficiência mineral, conforme Figura 6).

5.1 Evolução dos sintomas de HLB na copa em plantas engaioladas e não engaioladas na fazenda Santa Maria.

Como havia dúvidas se a gaiola poderia elevar a temperatura ao ponto de interferir nos resultados, na Santa Maria também se avaliou sintomas em plantas não protegidas escolhidas e tratadas da mesma forma que as plantas engaioladas.

Nas Figuras 8 e 9 são apresentadas porcentagens médias acumuladas e porcentagens separadas por nível de intensidade dos sintomas de mosqueado (inicial, leve, moderado e severo) e por nível de intensidade de deficiência (leve, leve a moderada, moderada e severa).

Quando se analisa os dados de mosqueados e deficiência nas folhas, tanto os acumulados como os separados em categorias, observa-se que plantas engaioladas e não engaioladas não diferiram na quantidade de sintomas. Isto ocorreu para a maioria dos valores de mosqueado (Fig. 8) e para a totalidade dos valores de deficiência (Fig. 9).

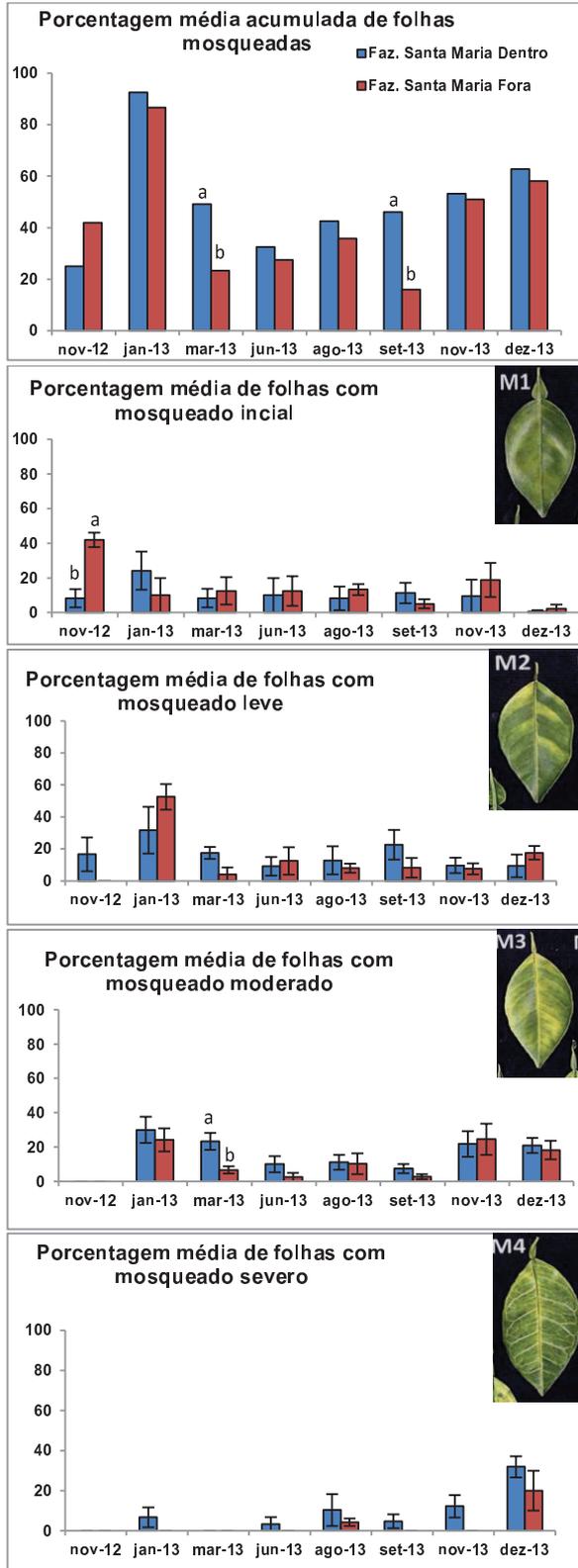


Figura 8. Porcentagens médias de folhas mosqueadas, acumuladas e separadas por intensidade de sintomas, em plantas engaioladas (barras azuis) e não engaioladas (barras vermelhas) na fazenda Santa Maria. Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si (Tukey, $p \leq 0,05$). São apresentadas letras somente para as médias que diferiram entre si.

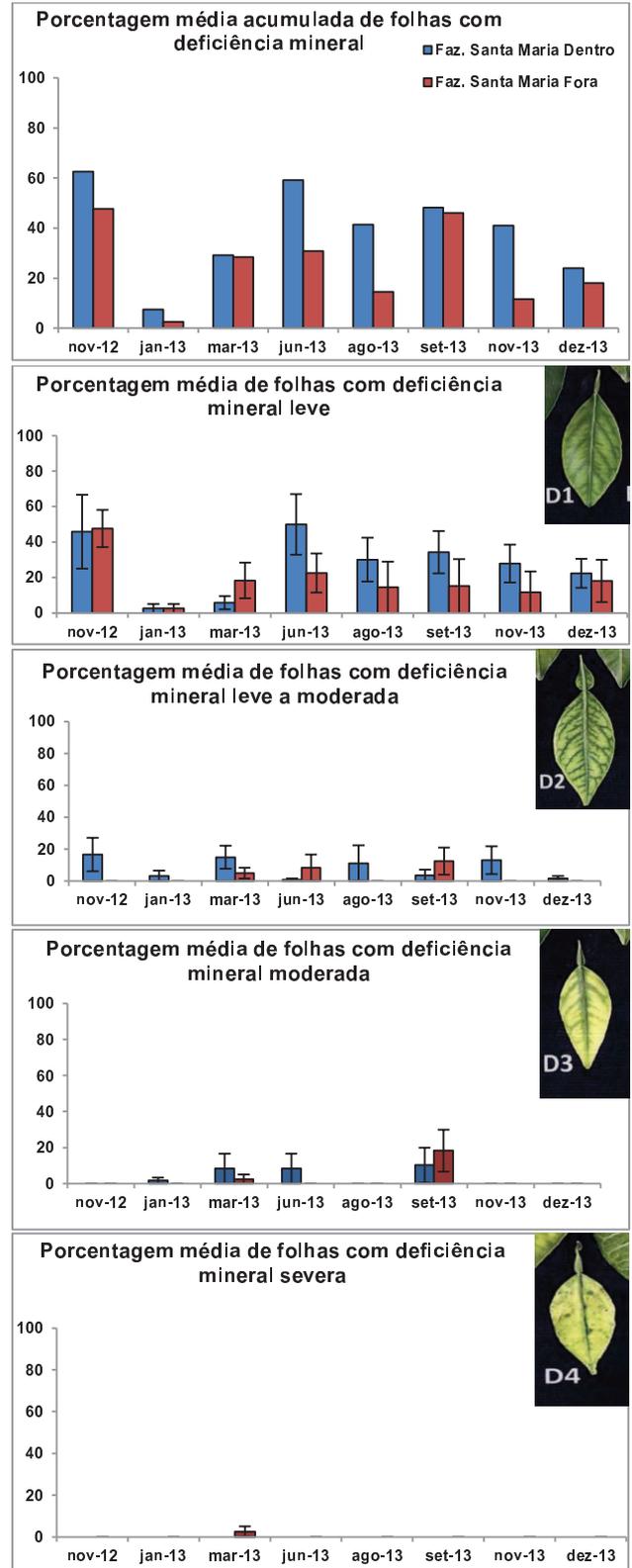


Figura 9. Porcentagens médias de folhas com deficiência mineral, acumuladas e separadas por intensidade de deficiência, em plantas engaioladas (barras azuis) e não engaioladas (barras vermelhas) na fazenda Santa Maria. Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si (Tukey, $p \leq 0,05$). São apresentadas letras somente para as médias que diferiram entre si.

5.2. Evolução dos sintomas de HLB na copa em plantas engaioladas nas fazendas Santa Maria, Portal de Minas, e Rio Verde/Vale Verde.

Nas Figuras 10 e 11 são apresentados os resultados comparativos da avaliação de sintomas em plantas mantidas engaioladas nos três locais do cinturão citrícola. Em cada caso, são apresentadas porcentagens médias acumuladas e porcentagens separadas por nível de intensidade dos sintomas de mosqueado (inicial, leve, moderado e severo) e por nível de intensidade de deficiência (leve, leve a moderada, moderada e severa). As plantas da Portal de Minas não foram avaliadas em novembro de 2012.

Quando se analisa os dados acumulados de folhas com sintomas de mosqueado (Fig. 10), apesar das variações ao longo do tempo, observa-se, de maneira geral, similaridade nos dados entre os três locais. Nas duas datas em que houve diferenças entre as médias, estas foram maiores na Santa Maria e Portal de Minas do que na Rio Verde/Vale Verde. Quando se analisa os dados separados por categorias somente no mês de dezembro de 2013 observou-se diferenças entre regiões, sendo para mosqueado inicial maior valor para Portal de Minas e, para mosqueado severo, maior valor para a Santa Maria. Interessante observar que nos meses mais quentes do ano (novembro de 2012 e janeiro, novembro e dezembro de 2013) foi detectado mosqueado severo na Santa Maria, mas não nas fazendas do norte do cinturão citrícola (Portal de Minas e Rio Verde/Vale Verde).

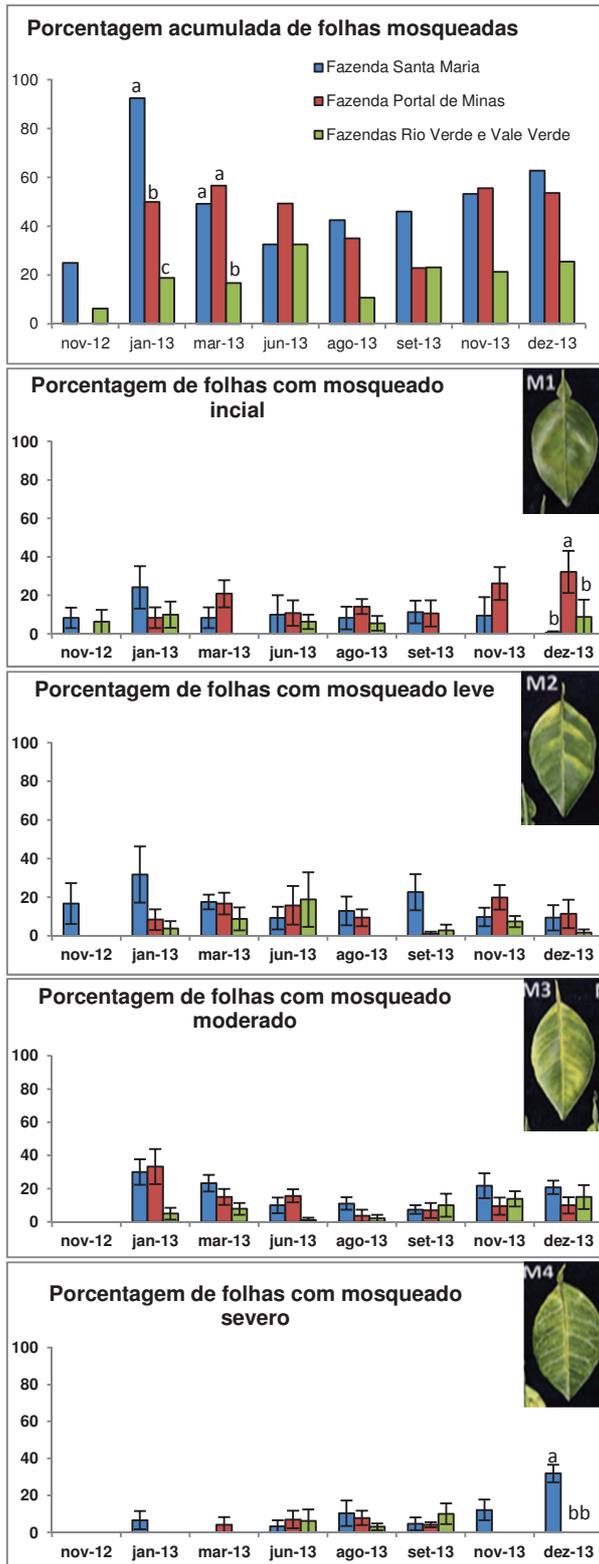


Figura 10. Porcentagens médias de folhas mosqueadas, acumuladas e separadas por intensidade de sintomas, em plantas nas fazendas Santa Maria, Portal de Minas e Rio Verde e Vale Verde. Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si (Tukey, $p \leq 0,05$). São apresentadas letras somente para as médias que diferiram entre si.

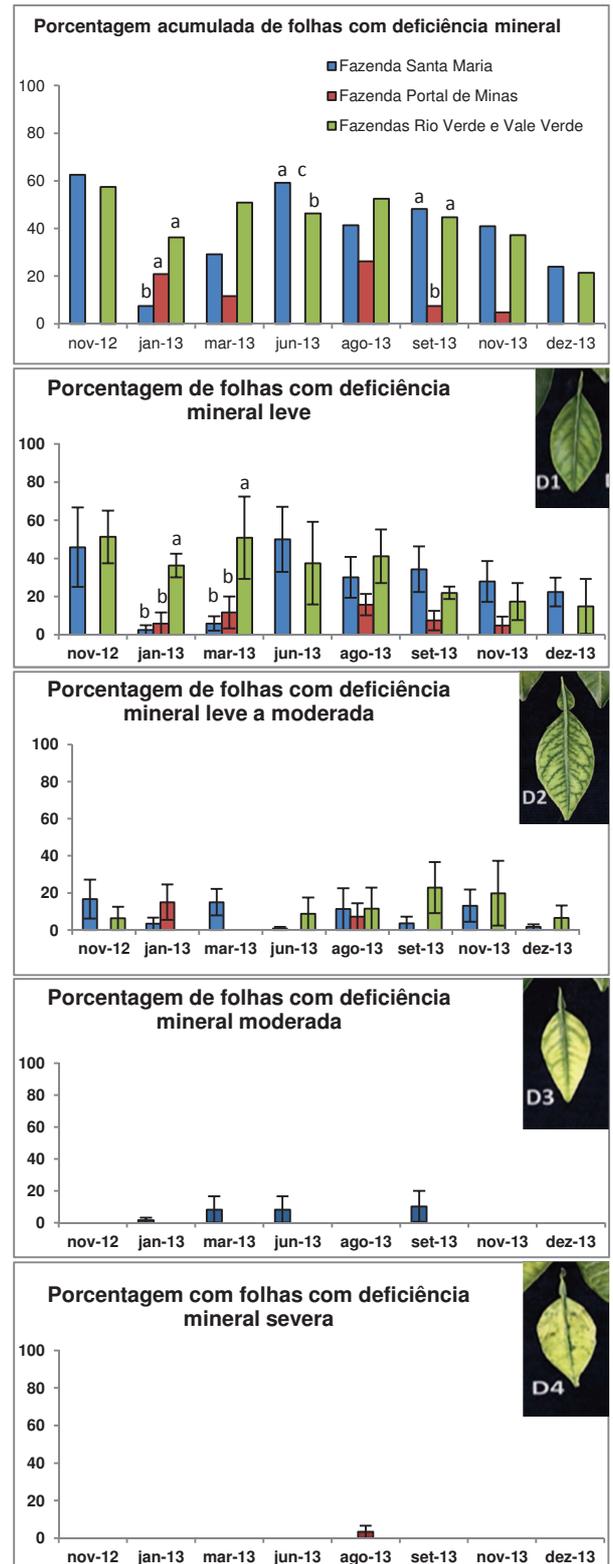


Figura 11. Porcentagens médias de folhas com deficiência mineral, acumuladas e separadas por intensidade de deficiência, em plantas nas fazendas Santa Maria, Portal de Minas e Rio Verde e Vale Verde. Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si (Tukey, $p \leq 0,05$). São apresentadas letras somente para as médias que diferiram entre si.

Com relação à deficiência mineral (Fig. 11), da mesma forma que o observado para mosqueado, apesar das variações ao longo do tempo, observa-se, de maneira geral,

similaridade nos dados entre os três locais, com exceção das datas de janeiro, junho e setembro de 2013 aonde se detectou maiores valores para a Santa Maria e Rio Verde e Vale Verde. Somente em janeiro de 2013 o valor observado na fazenda Portal de Minas foi maior que o da Santa Maria, porém inferior ao da Rio Verde e Vale Verde. Quando os dados são separados por categorias, houve diferenças somente em duas das oito datas da categoria deficiência leve, sendo maior na Rio Verde e Vale Verde do que para os demais locais.

Com exceção da data de agosto de 2013, quando uma pequena porcentagem de folhas com deficiência severa foi detectada na Portal de Minas, em nenhum local foi detectada folha com deficiência severa no ramo marcado para este tipo de avaliação. Folhas com deficiência moderada foi detectada somente na Santa Maria, mas também em baixas incidências.

Na Tabela 3 são apresentadas as médias gerais dos valores das categorias e do total de sintomas observados nas três fazendas.

Tabela 3. Médias gerais dos valores para categorias de sintomas observados nas três fazendas do cinturão citrícola brasileiro no período de novembro de 2012 a dezembro de 2013.

Fazenda	Mosqueado				Total	Deficiência mineral				Total
	M1	M2	M3	M4		D1	D2	D3	D4	
Santa Maria	10,36 ab	16,48 a	15,65 a	8,05 a	50,52 a	27,32 a	8,18 a	3,82 a	0 a	39,32 a
Portal de Minas	17,59 a	11,77 ab	13,44 a	3,33 ab	46,12 a	6,49 b	3,17 a	0 a	0,48 a	10,14 b
Rio Verde/Vale Verde	4,60 b	5,38 b	6,91 a	2,44 b	19,34 b	33,89 a	9,45 a	0 a	0 a	43,33 a

Médias seguidas de mesma letra não diferem ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

Com relação ao mosqueado, a Rio Verde/Vale Verde foi o local com menores intensidades de sintomas em todas as categorias, separadas ou agrupadas. Já com relação à deficiência mineral, menores valores foram encontrados na Portal de Minas.

5.3. Análise da associação entre clima e sintomas de HLB nas fazendas Santa Maria, Portal de Minas, e Rio Verde/Vale Verde

Na Tabela 4 são apresentados os valores das análises da regressão múltipla. Os valores abaixo das variáveis independentes (fatores climáticos) mostram quais foram participativos ou não na expressão dos sintomas, sendo que os valores positivos ou negativos se associaram positiva ou negativamente na manifestação dos sintomas. Os valores em vermelho querem dizer que aquele fator é o que mais contribuiu na equação.

Tabela 4. Coeficientes de regressão e determinação entre **variáveis dependentes** (folhas com diferentes tipos e intensidade de sintomas) e **variáveis climáticas independentes*** registradas em períodos de sete, 15, 30 e 60 dias antes das avaliações dos sintomas nas plantas engaioladas mantidas nos três locais do cinturão citrícola, no período de novembro de 2012 a dezembro de 2013.

Intensidade dos sintomas	Dias de registro antes da avaliação	P <0,05	R2	F	Intercepto	Chuva (mm)	HUR >50%	HUR <50%	H0-5C	H5-10C	H10-15C	H15-20C	H20-25C	H25-30C	H30-35C	H35-40C	HAc 40C	Max Abs	Min Abs	Amplitude térmica
Deficiência leve	7d	0,0087	0,6	5,1	99,9		-0,62								-0,30	-0,51			-0,05	
	15d	0,0087	0,7	4,8	138,6		-1,10		0,57			-0,21		-0,67	-0,45	-0,59			1,38	
	30d	0,0070	0,7	5,2	108,7		-0,91		0,57				-0,03			-0,81			1,33	
	60d	0,0234	0,8	4,5	49,7		-0,97		1,90	-1,90	1,16		1,14		0,55	-1,20	0,75			
Deficiência leve a moderada	15d	0,0139	0,3	7,4	26,5		-0,54													
	30d	0,0396	0,2	5,0	27,5		-0,48													
	60d	0,0325	0,7	3,8	-53,6		-0,54	-0,09					-2,40	1,16	0,79				1,65	0,90
Deficiência moderada	7d	0,0005	0,6	12,3	-0,3				0,55								0,45			
	15d	0,0001	0,7	14,3	11,1				0,35								0,83	-0,31		
	30d	0,0018	0,9	8,0	36,8				1,24	-0,89		-0,30	-1,90		-0,28	0,43	0,20			-1,70
	60d	0,0005	1,0	64,6	45,3		-1,30	-2,60	-0,77	2,45	-2,00		-1,50	-0,77	0,32	1,16	-0,22	0,09	-0,28	
Deficiência severa	7d	0,0000	0,9	39,3	-1,5				-0,51	1,67			-0,39		-0,17					1,16
	15d	0,0002	0,7	11,0	0,1			-0,20	-0,63	0,00	1,07									0,78
	30d	0,0002	0,7	12,9	-1,6				-0,61		1,63									0,78
	60d	0,0270	0,6	4,0	-0,9				-0,61		1,61			0,54						-0,41
Total de deficiência	15d	0,0002	0,6	15,4	122,1		-0,67								-0,44					
	30d	0,0071	0,5	5,9	101,8		-0,58		0,22							-0,27				
	60d	0,0123	0,7	5,0	78,7		-0,72							1,06		-0,73	0,61		-0,70	
Mosqueado inicial	60d	0,0328	0,6	3,8	-126,6		0,97	0,44									-0,32	0,46		
Mosqueado leve	30d	0,0149	0,6	4,4	2,4			-0,87	0,69		-0,39		-1,40		0,79					
	15d	0,0296	0,4	3,9	-49,5	0,56						0,28							0,35	
Mosqueado moderado	7d	0,0053	0,5	7,8	-12,7										0,38		0,77			
	15d	0,0054	0,8	5,4	-69,2					0,51	-1,40			-0,89	-0,58	-0,38	1,12	-0,60		
	30d	0,0258	0,6	3,7	-103,2	0,83			-0,50			0,31		0,81			-0,39			1,94
Mosqueado severo	60d	0,0014	0,9	12,9	15,8		-0,43		0,48			1,96	1,73	2,83	0,53	-0,26	1,29	0,76		
	7d	0,0452	0,5	3,1	-280,5		0,66						-0,55	0,40			-0,40	0,90		
	30d	0,0275	0,4	4,5	-106,5		0,77													0,60
Total de mosqueado	7d	0,0005	0,9	11,5	76,3	-1,10	0,94	0,49							-0,53		1,11			-1,10

*chuva, número de horas de umidade relativa maior (HUR>50%) e menor (HUR<50%) que 50%, número de horas entre 0 e 5 (H0-5C), 5 e 10 (H5-10C), 10 e 15 (H10-15C), 15 e 20 (H15-20C), 20 e 25 (H20-25C), 25 e 30 (H25-30C), 30 e 35 (H30-35C), 35 e 40 (H35-40C), e acima de 40 (HAc 40C) graus Celsius, temperaturas máxima (Max Abs) e mínima (Min Abs) absolutas, e amplitude térmica). Estão marcados em vermelho os valores da análise da regressão com peso mais significativo na equação de regressão.

Todas as variáveis avaliadas estiveram associadas aos sintomas de HLB, nos seus diferentes níveis de intensidade. No entanto, houve variação entre tipos de sintomas (mosqueado ou deficiência) e número de variáveis independentes.

Analisando-se as categorias de sintomas isoladamente e o total de categorias, dentro de cada tipo de sintomas, nota-se associação de maior número de variáveis (84), e em maior intensidade, com deficiência mineral do que com mosqueado (49) (Fig. 12).

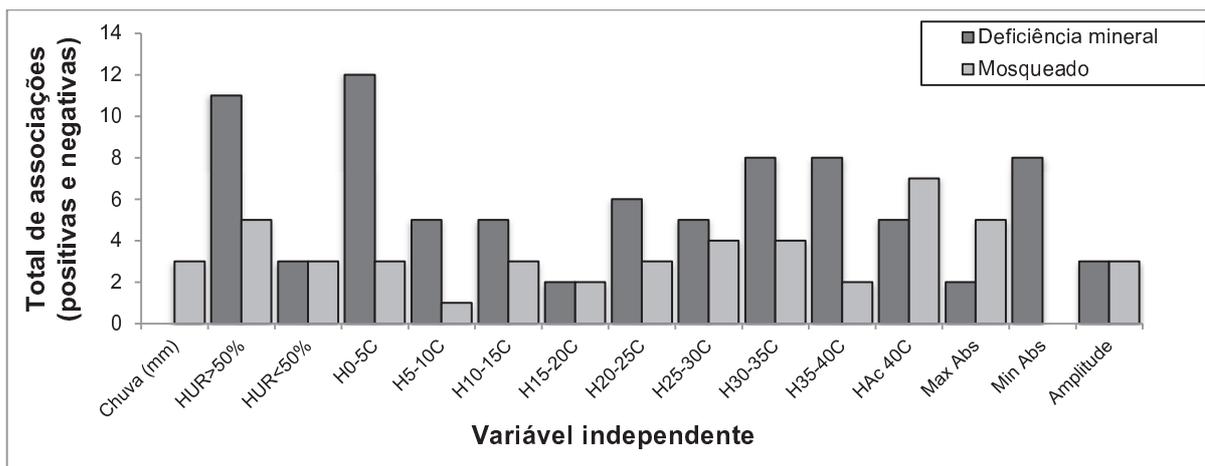


Figura 12. Totais de associação entre variáveis dependentes (folhas com diferentes tipos e intensidade de sintomas) e variáveis independentes (fatores climáticos).

As que mais frequentemente se associaram a deficiência mineral foram (i) o número de horas com umidade relativa do ar acima de 50%, (ii) o número de horas com temperatura entre 0 e 5°C e (iii) acima de 30°C, e (iv) a temperatura mínima absoluta.

Por outro lado as que mais frequentemente se associaram ao mosqueado foram (i) o número de horas acima de 40°C, (ii) a temperatura máxima absoluta e (iii) o número de horas com umidade relativa do ar acima de 50%. Houve associação de chuvas somente com mosqueado e de temperatura mínima absoluta somente com deficiência mineral.

5.4. Natureza das associações entre proporção de folhas sintomáticas e variáveis climáticas

Para determinação da natureza das associações, foi excluído o período de registro de 60 dias antes das avaliações, tendo em vista a baixa reprodutibilidade das associações envolvidas.

As associações foram neutras, positivas ou negativas. Para facilidade de comparação, os dados apresentados na Tabela 4 foram transformados em gráficos de barras mostrados nas Figuras 13 (deficiência mineral versus clima) e 14 (mosqueado versus clima).

No caso das **deficiências**, quando o peso da associação foi significativo (determinado pelo programa Statistica), em geral a natureza da associação (positiva ou negativa) se repetiu em pelo menos dois dos três distintos períodos de dados climáticos submetidos à avaliação, ou seja, 7, 15 e 30 dias antes da data da avaliação dos sintomas (Fig. 13).

Para fins de análise foram levadas em consideração neste trabalho apenas as variáveis que se repetiram em pelo menos dois dos três períodos de dados climáticos submetidos à avaliação, e isto ocorreu com oito das 14 variáveis independentes analisadas: número horas de umidade relativa acima de 50% (HUR>50%), número horas de temperatura entre 0 e 5°C

(H0-5C), 5 e 10°C (H5-10C), 10 e 15°C (H10-15C), 30 e 35°C (H30-35C), 35 e 40°C (H35-40C) e acima de 40°C (HAc 40C), e temperatura mínima absoluta (Min Abs).

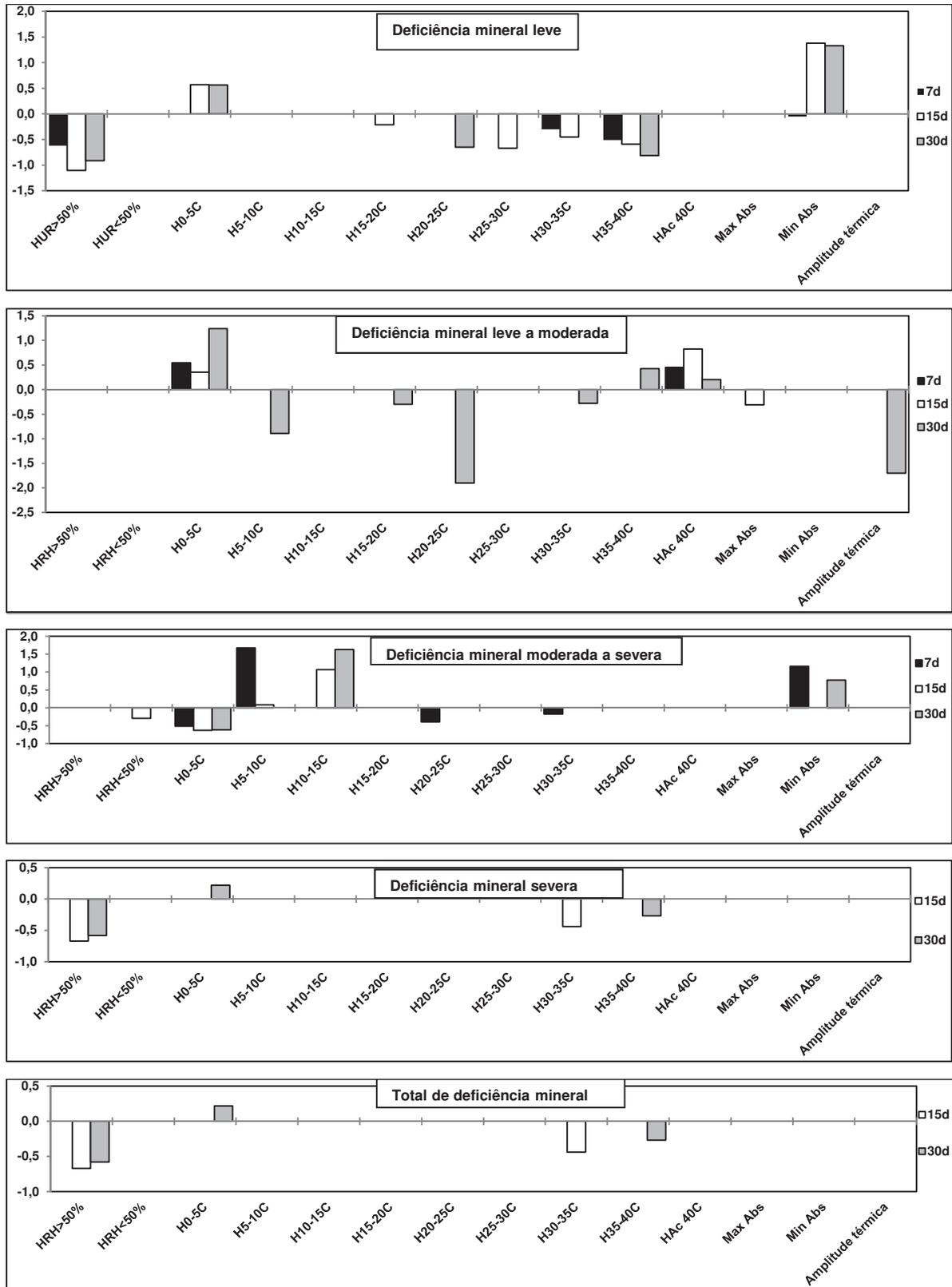


Figura 13. Gráficos gerados com valores mostrados na Tabela 4. Representam coeficientes de determinação entre as variáveis dependentes (sintomas de deficiência mineral) e variáveis independentes (climáticas). Foram excluídas da Tabela 4 as associações entre sintomas e dados de clima registrados nos 60 dias anteriores a data de avaliação de sintomas.

O número, tipo ou peso da variável climática independente variou dependendo da intensidade do sintoma de deficiência analisado (leve, moderada, moderada a severa, severa). Deficiência leve foi influenciada negativamente pela HUR>50%, H30-35C e H35-40C, e positivamente pela H0-5C e Min Abs. Deficiência leve a moderada foi influenciada positivamente pela HAc40C. Deficiência moderada a severa foi influenciada negativamente pela H0-5C e positivamente pela H5-10C, H10-15C e Min Abs. Deficiência severa, assim como o total de deficiência, foi influenciada negativamente pelo HUR>50%.

No caso do mosqueado, não foi detectada nenhuma associação similar à observada com deficiência (em termos de repetição de tendências dentro de uma mesma variável climática independente), a não ser no total de mosqueado, aonde, contrário ao observado com deficiência, o HUR>50% influenciou positivamente os sintomas.

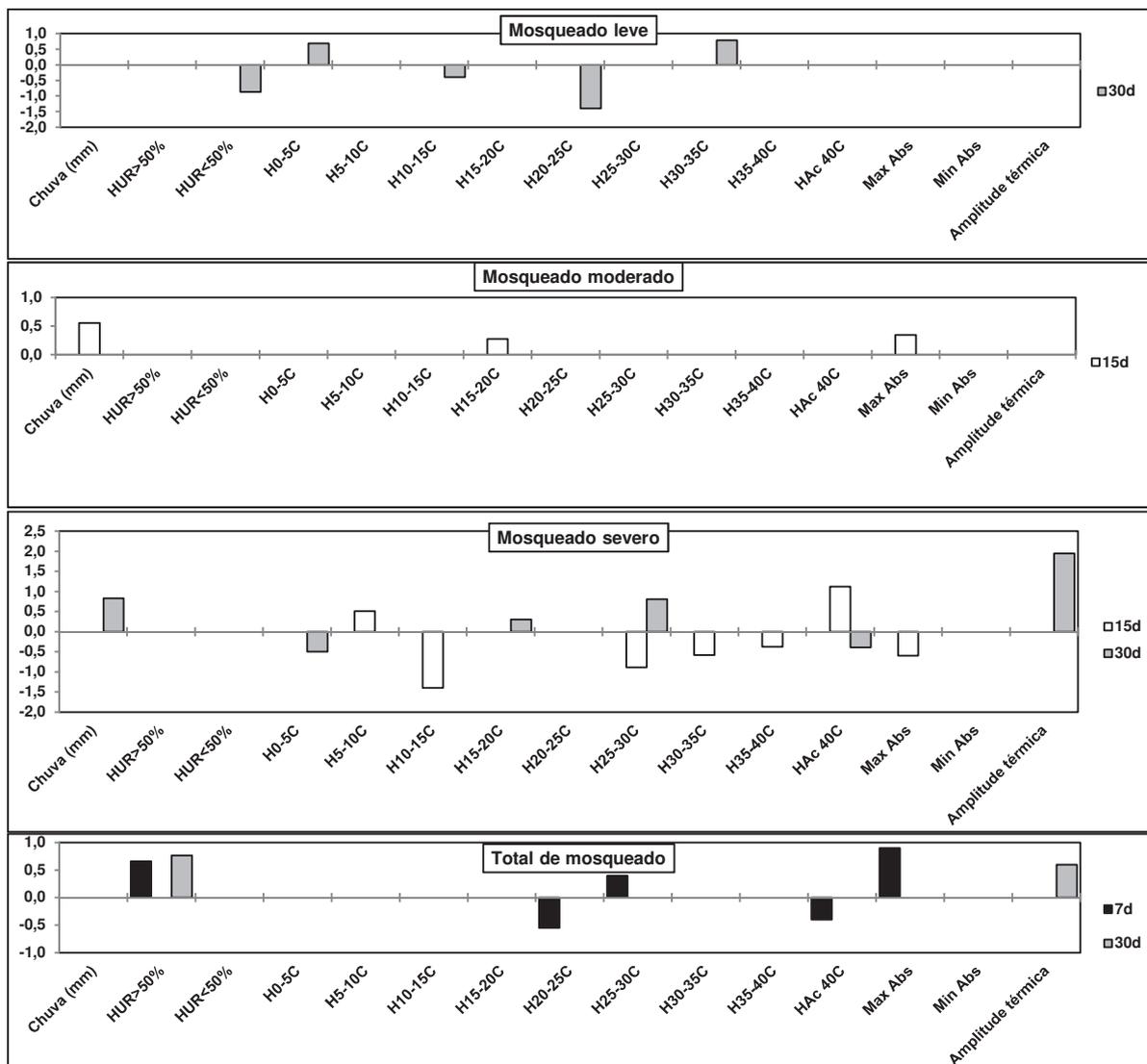


Figura 14. Gráficos gerados com valores mostrados na Tabela 4. Representam coeficientes de correlação entre as variáveis dependentes (sintomas de mosqueado) e variáveis independentes (climáticas). Foram excluídas da Tabela 4 as associações entre sintomas e dados de clima registrados nos 60 dias anteriores a data de avaliação de sintomas.

5.5. Evolução da infecção na copa

O segundo objetivo deste trabalho foi avaliar a evolução da infecção na copa de plantas nos três locais em diferentes épocas do ano. Na Figura 15 são apresentadas as médias gerais e por planta das porcentagens dos ramos infectados por *Ca. L. asiaticus* nas três locais, e na Figura 16 são apresentadas as médias das três épocas de avaliação por local.

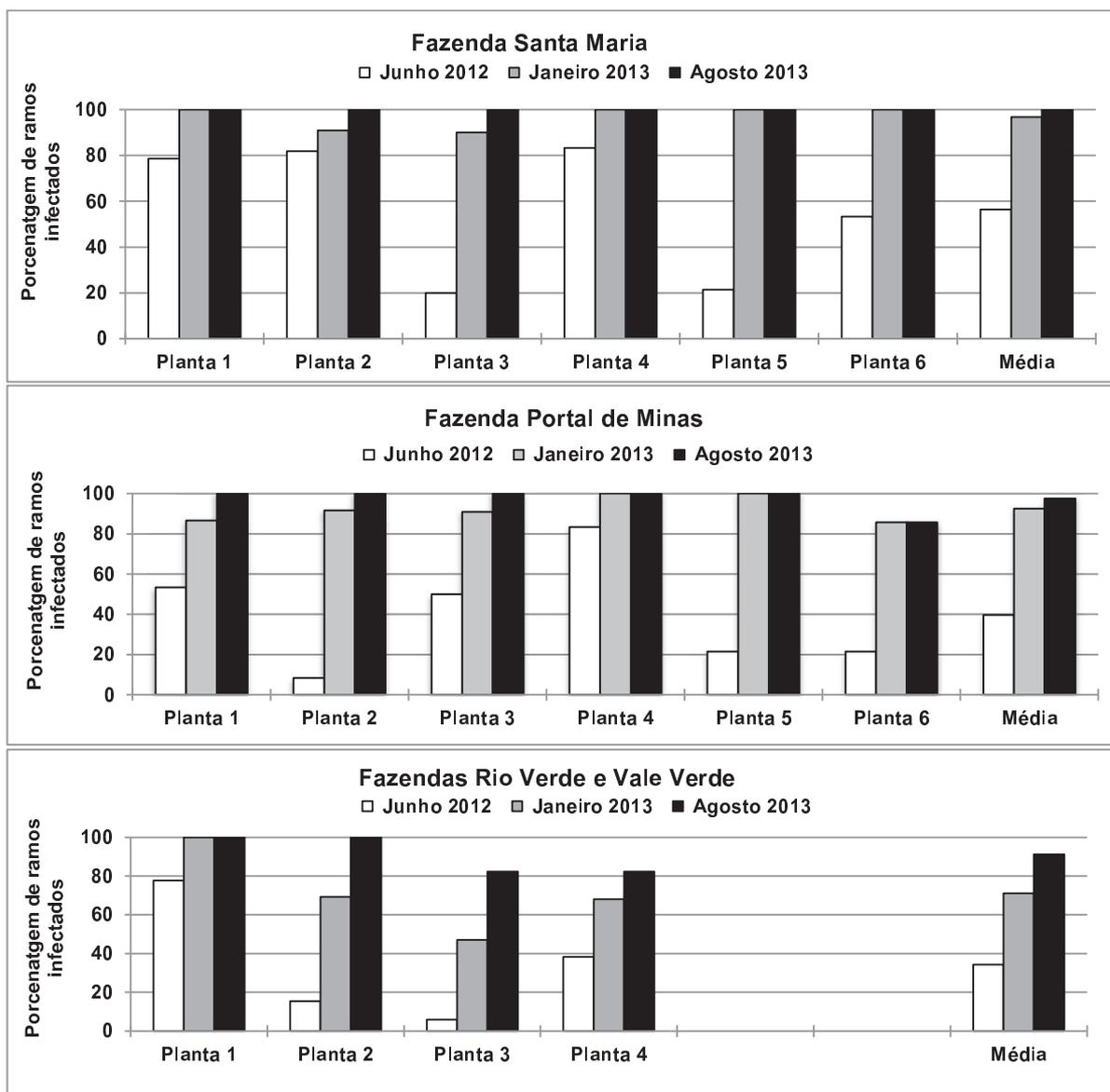


Figura 15. Evolução nas porcentagens de ramos com *Liberibacter* em plantas mantidas dentro das gaiolas em três locais do cinturão citrícola.

Na Santa Maria e Portal de Minas a porcentagem de infecção já tinha atingido valores acima de 90% seis meses após o início das avaliações enquanto que na Rio Verde/Vale Verde a infecção só ultrapassou os 90% na terceira avaliação, feita mais de um ano após a primeira. Apesar das diferenças detectadas, quando se analisa planta a planta (Fig. 15), na média geral

de todas as datas de avaliações não se detectou diferença estatística entre as fazendas (Fig. 16).

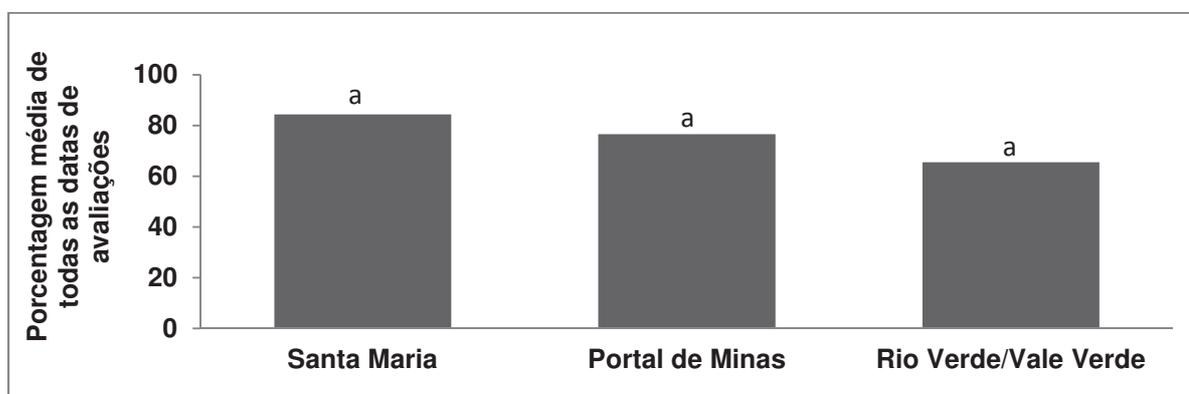


Figura 16. Porcentagem média de todas as datas de avaliações (junho/2012, janeiro/2013 e agosto/2013) por fazenda.

Quando se compara a concentração de *Liberibacter* em amostras de casca de ramos e de folhas das plantas nas quais se avaliou a evolução da infecção, nota-se, maiores valores em amostras da Santa Maria, seguidos dos da Portal de Minas e Rio Verde/Vale Verde. Na primeira avaliação em junho de 2012, que consistiu de amostras de casca, a média dos títulos de *Liberibacter* em log de *Ca. L. asiaticus* por grama de tecido de floema da casca foram $3,6 \pm 0,6$, $2,6 \pm 0,4$ e $1,7 \pm 1,0$, respectivamente para plantas da fazenda Santa Maria, Portal de Minas e Rio Verde/Vale Verde. Na segunda avaliação feita após seis meses (janeiro de 2013), que consistiu de amostras de folhas, a média dos títulos de *Ca. L. asiaticus* em log do número de células por grama de tecido de floema de folhas foram $5,8 \pm 0,2$, $4,5 \pm 0,2$ e $3,5 \pm 1,1$, respectivamente, para plantas das fazendas Santa Maria, Portal de Minas e Rio Verde/Vale Verde.

5.6. Experimento de inoculação em casa de vegetação

O terceiro objetivo deste trabalho foi verificar nos três locais se os títulos bacterianos quantificados em amostras de casca de segmentos de ramos de plantas com sintomas de HLB se correlacionariam com taxas de transmissão por enxertia em plantas sadias mantidas em casa de vegetação. Adicionalmente, teve como objetivo verificar se as bactérias do norte teriam ou não comportamento patogênico similar ao da bactéria do centro de SP, em termos de tipos de sintomas manifestados nas plantas inoculadas.

Na tabela 5 são apresentadas médias dos títulos bacterianos de plantas engaioladas no momento da enxertia, expressados em log do número de células de *Ca. L. asiaticus* por grama

de tecido de floema da casca do borbulhão, taxas de sobrevivência do borbulhão e taxas de transmissão da bactéria.

Tabela 5. Título de *Ca. Liberibacter asiaticus* (Las) em ramos de plantas de laranja naturalmente infectadas e **mantidas dentro de gaiolas**, em três locais do cinturão citrícola brasileiro, e taxa de transmissão da bactéria para plantas saudias, por meio de enxertia, em diferentes épocas do ano.

Local	Data de coleta e inoculação	Origem do inóculo		Plantas inoculadas			
		Total de plantas	Título de Las ^a	Total ^b	% de borbulhões sobreviventes ^c	Plantas infectadas ^d	%
Faz. Santa Maria	maio-13	6	6,08 a A	23	87,0	18	90,3 a A
	agosto-13	6	5,99 a A	24	91,7	18	83,3 a A
	dezembro-13	6	5,49 b A	25	79,2	15	77,8 a A
Faz. Portal de Minas	maio-13	6	5,66 a AB	24	100,0	18	75,0 a A
	agosto-13	6	5,71 a A	24	87,5	19	91,7 a A
	dezembro-13	6	5,36 a A	24	54,2	13	100 a A
Faz. Rio Verde/Vale Verde	maio-13	4	5,08 a B	16	100	11	68,8 a A
	agosto-13	4	5,93 a A	16	68,8	10	91,7 a A
	dezembro-13	4	5,88 a A	15	86,7	13	100 a A

^a Média do \log_{10} do número de células estimado com uso de curva padrão. ^b Número de plantas saudias com 8 meses de idade mantidas em vasos e inoculadas no caule com segmento de ramos sintomáticos com 4 cm de comprimento (borbulhão) retirado da respectiva planta fonte. ^c Plantas nas quais o borbulhão sobreviveu o processo de enxertia. ^d Total de plantas que manifestaram sintomas inequívocos de HLB ou que resultaram positivo por qPCR ($Ct \leq 32,0$). Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente (Tukey; $p \leq 0,05$). Letras minúsculas indicam comparação entre datas dentro de cada local e maiúsculas entre locais para cada data.

Quando se compara os títulos bacterianos nas plantas engaioladas entre datas dentro de cada local houve diferença somente na Santa Maria, com os títulos de maio e agosto maiores do que os de dezembro, e quando se compara os títulos bacterianos nas plantas engaioladas entre locais para cada data houve diferença somente no mês de maio, com maior valor para Santa Maria (A) que não diferiu de Portal de Minas (AB), mas que diferiu de Rio Verde/Vale Verde (B). Para a porcentagem de transmissão não houve diferenças entre datas dentro de cada local, e entre locais para cada data. Com relação ao tipo de sintomas manifestados nas plantas inoculadas, não se detectou diferenças nítidas entre as regiões e épocas do ano.

Na tabela 6 são apresentadas médias dos títulos bacterianos de plantas mantidas fora da gaiola, expressados em log do número de células de *Ca. L. asiaticus* por grama de tecido de floema da casca do borbulhão, taxas de sobrevivência do borbulhão e taxas de transmissão da bactéria.

Tabela 6. Título de *Ca. Liberibacter asiaticus* (Las) em ramos de plantas de laranja naturalmente infectadas e **mantidas fora da gaiola**, em três localidades do cinturão citrícola brasileiro, e taxa de transmissão da bactéria para plantas saudias, por meio de enxertia, em diferentes épocas do ano.

Local	Data de coleta e inoculação	Origem do inóculo		Plantas inoculadas			
		Total de plantas	Título de Las ^a	Total ^b	% de borbulhões sobreviventes ^c	Plantas infectadas ^d	%
Faz. Santa Maria	maio-13	6	5,98 a	24	100	24	100 a
	agosto-13	6	5,97 a	24	75,0	16	88,9 a
	dezembro-13	6	5,70 a	24	87,5	19	91,7 a
	fevereiro-14	6	4,87 b	30	96,7	25	85,8 a
Faz. Portal de Minas	fevereiro-14	6	5,42	30	80	17	69,7
Faz. Rio Verde/Vale Verde	fevereiro-14	6	n.a.	30	100	24	80,0

^a Média do \log_{10} do número de células estimado com uso de curva padrão. ^b Número de plantas saudias com 8 meses de idade mantidas em vasos e inoculadas no caule com segmento de ramos sintomáticos com 4 cm de comprimento (borbulhão) retirado da respectiva planta fonte. ^c Plantas nas quais o borbulhão sobreviveu o processo de enxertia. ^d Total de plantas que manifestaram sintomas inequívocos de HLB ou que resultaram positivo por qPCR ($Ct \leq 32,0$). Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente (Tukey; $p \leq 0,05$).

Comparações de médias dos títulos bacterianos entre datas foram feitas somente para a Santa Maria, que apresentou menor valor somente em fevereiro. Não houve diferença entre datas quanto às porcentagens de transmissão.

5.7. Análise da associação entre clima e log de Las nas fazendas Santa Maria, Portal de Minas, e Rio Verde/Vale Verde

Resultados da análise de regressão são mostrados na Figura 17.

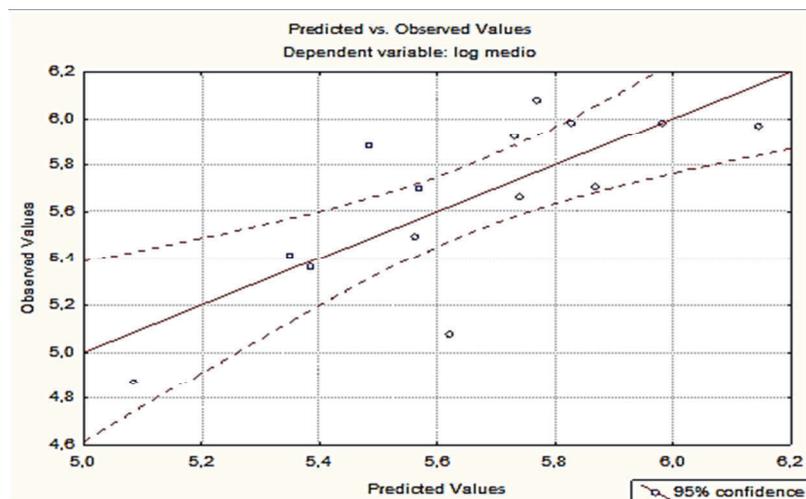


Figura 17. Valores de \log_{10} médio estimado do número de células de *Ca. L. asiaticus* na casca de ramos secundários com sintomas de HLB, em laranjeira naturalmente infectada com a bactéria, previstos com base na equação ($\text{Log} = 5,97 + 0,316 \times \text{horas abaixo de } 15^\circ\text{C} - 0,53 \times \text{horas acima de } 30^\circ\text{C}$) gerada por meio de análise de regressão múltipla.

Análise de regressão mostrou associação entre log de Las e número de horas abaixo de 15°C e acima de 30°C, calculados sete dias antes da coleta dos borbulhões ($F=7,23$; $p=0,009$; R^2 ajustado =0,49). A associação foi positiva para número de horas abaixo de 15°C e negativa para número de horas acima de 30°C ($\text{Log}=5,97+0,316 \times \text{horas abaixo de } 15^\circ\text{C}-0,53 \times \text{horas acima de } 30^\circ\text{C}$) (Fig17).

6. DISCUSSÃO

6.1. Diferenças nos níveis de sintomas em plantas engaioladas e não engaioladas na fazenda Santa Maria

De forma geral não se observou diferença nas porcentagens de folhas com mosqueado ou deficiência mineral entre plantas com e sem gaiola (Fig. 8 a 9). A inexistência de diferença significativa nas médias para maioria das datas amostradas quanto a porcentagem de sintomas nos diferentes tipos (mosqueado e deficiência mineral) e intensidade de sintomas (leves a severos) nas plantas com e sem gaiola, indica que as gaiolas se mostraram apropriadas à condução do estudo proposto.

6.2. Diferenças nos níveis de sintomas em plantas engaioladas nas três regiões do parque citrícola

Com relação ao **mosqueado**, as plantas das fazendas Santa Maria e Portal de Minas expressaram níveis mais altos que as da Rio Verde/Vale Verde (Tab. 3). Quais poderiam ser as causas desta ocorrência? Na análise de regressão o fator que mais se correlacionou (em mais de um período de análise de clima) ao mosqueado foi o acumulado de horas de umidade relativa acima de 50%, ou seja, quanto maior a quantidade de umidade relativa acima de 50% maior a quantidade de mosqueado. De fato, valores de umidade relativa são maiores na Santa Maria e Portal de Minas, conforme mostra a Figura 18, validando os resultados da regressão.

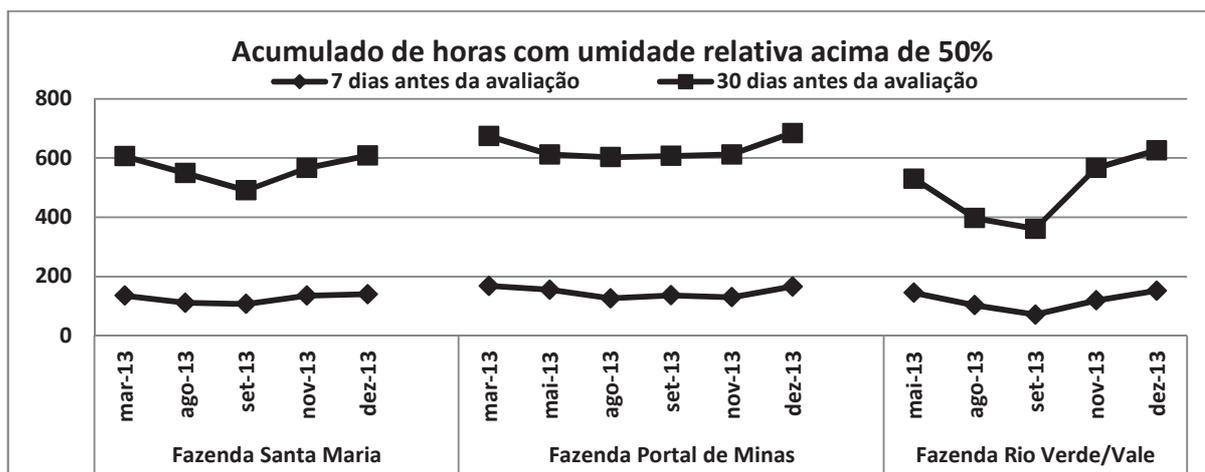


Figura 18. Número de horas acumuladas com umidade relativa acima de 50% nas fazendas Santa Maria, Portal de Minas, Rio Verde/Vale Verde, nos últimos 7 e 30 dias anteriores às datas das avaliações de sintomas em folhas.

Ainda com relação ao mosqueado, era de se esperar que a análise de regressão apontasse que temperaturas mais amenas também favorecessem sintomas de mosqueado, visto que, esses sintomas são bastante evidentes no outono-inverno e foram intensos na fazenda Santa Maria, aonde sempre se detectou menores temperaturas mínimas absolutas (Tab. 2). No entanto, não houve qualquer correlação neste sentido.

Com relação à **deficiência**, plantas das fazendas Santa Maria e Rio Verde/Vale Verde expressaram níveis mais altos do que as plantas da Portal de Minas (Tab. 3). Quais poderiam ser as causas?

Neste estudo temperaturas baixas (mínimas absolutas e entre 0 e 5°C) estiveram associadas a maiores valores de deficiência leve e moderada, corroborando observações de campo. É nítida a expressão de sintomas de deficiência nos meses mais frios do ano, estando ou não a planta infectada por *Liberibacter*.

Ainda com relação à deficiência, análise de regressão mostrou que umidade relativa acima de 50% e temperaturas altas, em particular de 35 a 40°C, se correlacionaram negativamente com deficiência leve. Como já apresentado (Fig. 18), a Portal de Minas é a fazenda com maiores valores de umidade relativa acima de 50% e é a fazenda com menores índices de deficiência.

Com relação ao acumulado de horas às temperaturas de 35 a 40°C, observa-se tendência de maiores valores na fazenda Rio Verde/Vale Verde (Fig. 19). Portanto, era de se esperar menores níveis de intensidade de deficiência mineral neste local, o que não ocorreu.

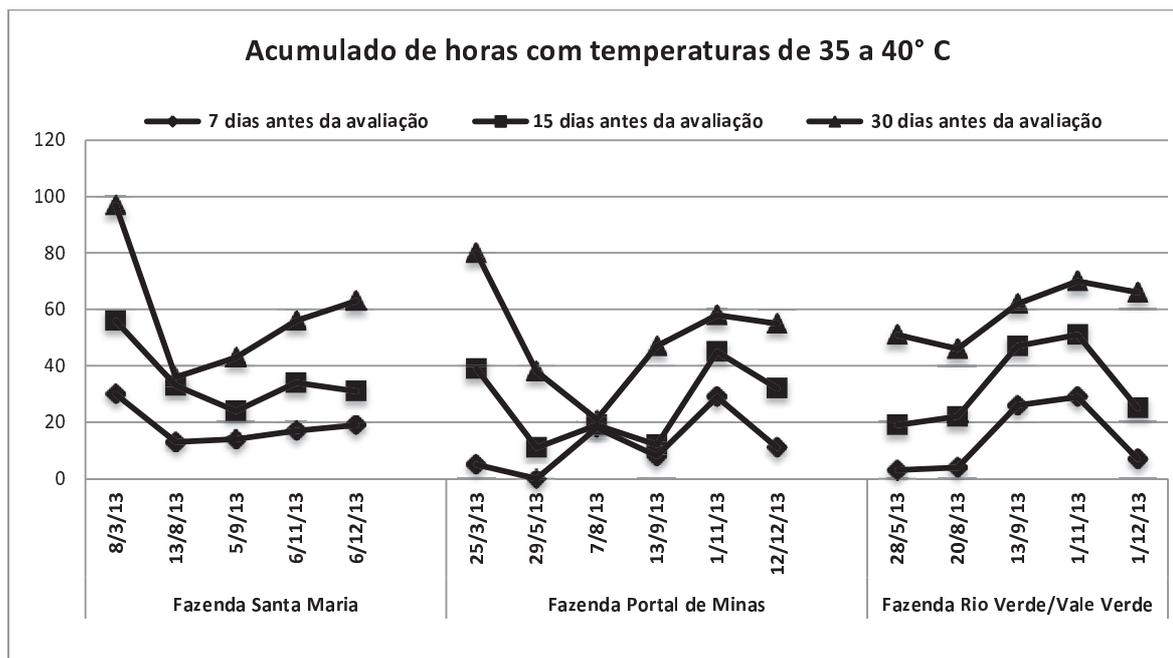


Figura 19. Número de horas acumuladas com temperaturas de 35 a 40°C nas fazendas Santa Maria, Portal de Minas, Rio Verde/Vale Verde, nos últimos 7, 30 e 60 dias anteriores as datas das avaliações de sintomas de deficiência mineral em folhas.

Dessa forma algum outro fator pode ter contribuído para os resultados obtidos. Suspeita-se que este fator seja o nível de micronutrientes ou de matéria orgânica do solo. Conforme já mencionado, dos três locais estudados, a fazenda Portal de Minas é a única que se encontra em área de solos mais argilosos. Ademais, em análise de solo feita em março de 2013 maiores valores de matéria orgânica também foram detectados na Portal de Minas (20 g/dm³) do que na Rio Verde/Vale Verde e Santa Maria, respectivamente com 10 e 9 g/dm³. É sabido que quanto maiores os teores de argila e matéria orgânica, maiores são os níveis de micronutrientes. As deficiências associadas ao HLB são de micronutrientes, sintomas esses que ocorreram em maiores proporções nas fazendas de menores níveis de matéria orgânica e argila, supostamente mais pobres em micronutrientes.

As maiores quantidade de deficiência nas duas fazendas sugerem que os complementos feitos nos níveis indicados (Fig. 6) não foram suficientes para eliminar a deficiência associada ao HLB. Dada à complexidade do assunto em questão, estudos complementares estão previstos com o objetivo de se avaliar melhor este aspecto.

6.3. Evolução da infecção das copas por *Liberibacter*

Esta parte do estudo foi conduzida visando determinar se haveria diferenças na evolução da infecção das plantas entre locais. Análise estatística mostrou não haver diferenças. No entanto, este aspecto precisa ser mais bem investigado. A razão esta no total

desconhecimento de quando ocorreu a infecção inicial nas plantas estudadas. Dessa forma, assim como no caso da deficiência mineral, este tópico requer estudos mais aprofundados.

6.4. Títulos de *Liberibacter* e correlação com taxas de transmissão por *Liberibacter*

Esta parte do estudo foi conduzida com o objetivo de se determinar se as variações no clima (Tabela 2) poderiam estar afetando a sobrevivência da bactéria nos ramos, e se as linhagens de *Liberibacter* prevalentes no norte do cinturão citrícola se assemelhavam com as prevalentes no centro. Para tanto, borbulhões (segmentos de ramos) foram coletados em épocas diferentes e inoculados em plantas saudáveis em casa de vegetação.

Os títulos nos borbulhões de plantas engaioladas variaram entre 5,08 e 6,08 células por grama de tecido de casca que resultaram em porcentagens de transmissão que não diferiram estatisticamente. As médias dos títulos foram diferentes entre locais somente no mês de maio (menor para a Rio Verde/Vale Verde do que para a Santa Maria), e entre datas somente dentro da Santa Maria (menor para o mês de dezembro que para os demais).

Variações nos títulos existiram também nas plantas mantidas fora da gaiola (4,87 a 5,98) na fazenda Santa Maria, que também resultaram em porcentagens de transmissão que não diferiram estatisticamente. Aqui também houve diferenças estatísticas entre os títulos, com valores menores para o mês de fevereiro do que para os demais.

Tendo em vista que as plantas inoculadas manifestaram sintomas similares, indicativo de que as bactérias presentes nos três locais consistem, provavelmente, de mesma linhagem patogênica, suspeitou-se que as diferenças nos títulos poderiam estar associadas a variações climáticas, o que foi confirmado por análise de regressão. A análise indicou haver associação positiva para temperaturas abaixo de 15°C e negativa para temperaturas acima de 30°C. De fato, conforme mostra a Figura 20, na Santa Maria valores de temperaturas abaixo de 15°C foram maiores que nas outras fazendas nos meses de maio de 2013 (Fig. 20 A), e maiores tanto dentro (Fig. 20 B) como fora (Fig. 20 C) da gaiola nos meses de maio e agosto de 2013.

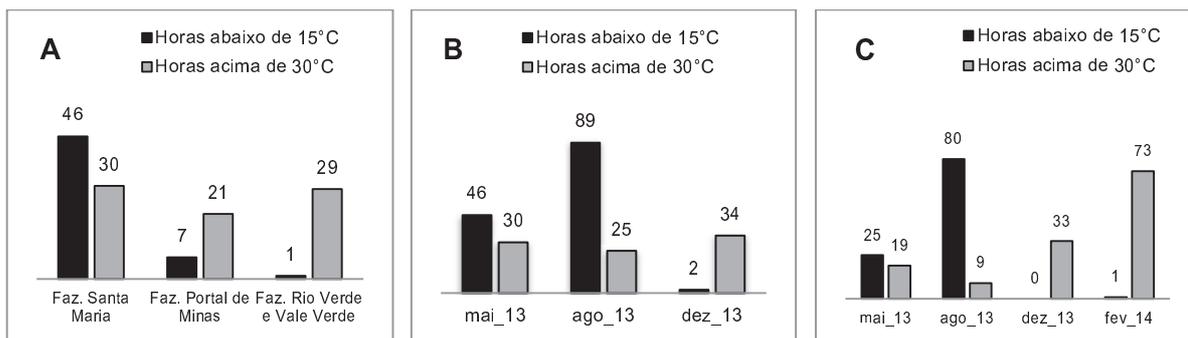


Figura 20. Número de horas abaixo de 15 e acima de 30°C registrados nos últimos sete dias antes da coleta de segmentos de ramos de plantas com HLB engaioladas (A e B) e não engaioladas (C), os quais foram usados na inoculação das plantas em casa de vegetação. (A) Maio de 2013, nas fazendas Santa Maria, Portal de Minas e Rio Verde/Vale Verde. (B) Maio, agosto e dezembro de 2013 na fazenda Santa Maria. (C) Maio, agosto e dezembro de 2013 e fevereiro de 2014.

De maneira geral este estudo demonstrou a importância do clima, em particular da temperatura e umidade relativa, sobre os sintomas de HLB e corroborou resultados já publicados sobre a influência da temperatura sobre a multiplicação de *Liberibacter* tanto em folhas maduras (Lopes et al, 2009b) como em novas brotações (Lopes et al., 2013).

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo mostrou que as plantas das três fazendas avaliadas (Santa Maria, Portal de Minas e Rio Verde/Vale Verde) apresentaram comportamentos distintos frente ao HLB. Na Santa Maria a evolução dos sintomas e os títulos foram maiores e predominou sintomas de mosqueado e deficiência mineral. Na Portal de Minas os títulos foram intermediários e predominou sintomas de mosqueado. Na Rio Verde/Vale Verde os títulos foram menores e predominou sintomas de deficiência mineral, principalmente deficiência leve. Visto que sintomas iniciais de HLB são facilmente confundidos com sintomas iniciais de deficiência mineral, a predominância de sintomas de deficiência mineral leve na Rio Verde/Vale Verde explica a maior dificuldade de reconhecimento de plantas com HLB neste local e a maior dependência do teste de PCR para a correta diagnose. A predominância de mosqueado nas duas outras fazendas explica a maior facilidade de reconhecimento de plantas com HLB naqueles locais e a menor dependência do teste de PCR.

Análise de regressão dos dados dos três locais mostrou haver relação entre sintomas e fatores climáticos. O mosqueado se correlacionou positivamente com umidade relativa alta principalmente, e deficiência mineral com temperaturas baixas. A deficiência também se correlacionou, porém negativamente, com umidade relativa e temperaturas altas.

Correlação positiva de deficiência com baixas temperaturas e negativa de deficiência com altas temperaturas corroboram observações de campo. Cruzamento dos resultados da regressão com as condições predominantes no campo indicou que a expressão dos sintomas de HLB também deve ser influenciada por outros fatores, não climáticos, como a fertilidade do solo, assunto que precisa ser mais bem investigado.

Neste estudo a concentração de *Liberibacter* em ramos foi menor naqueles coletados no local e nos meses de temperaturas mais elevadas demonstrando haver efeito das temperaturas mais altas também sobre a bactéria presente na parte interna da casca. Efeito negativo da temperatura sobre *Liberibacter* já foi demonstrado em outros estudos envolvendo folhas maduras e brotações.

8. REFERÊNCIAS

- Aubert, B. 1987. Le psylle asiatique des agrumes (*Diaphorina citri*) Kuwayama au Brésil. **Fruits**, Paris 42:225-229.
- Bassanezi, R.B., Montesino, L.H., Gimenes-Fernandes, N., Yamamoto, P.T., Gottwald, T.R., Amorin, L., Bergamim-Filho, A. 2013. Efficacy of Area-Wide Inoculum Reduction and Vector Control on Temporal Progress of Huanglongbing in Young Sweet Orange Plantings. **Plant Disease**, St Paul 97(6):789-796.
- Bové, J.M. 2006. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. **Journal of Plant Pathology** 88(1):7-37.
- Bové, J.M., Teixeira, D.C., Wulff, N.A., Eveillard, S., Saillard, C., Bassanezi, R.B., Lopes, S.A., Yamamoto, P.T., Ayres, A.J. 2008. Several Liberibacter and Phytoplasma species are individually associated with HLB. **Proceedings of the International Research Conference on Huanglongbing**. Orlando. p. 152-155.
- Buitendag, C.H., von Broembsen, L.A. 1993. Living with citrus greening in South Africa. In: Moreno, P., Graça, J.V., Timmer, L.W. (Ed.). **Proceedings of the Twelfth Conference of the International Organization of Citrus Virologists**. University of California. Riverside, Department of Plant Pathology. 1993. p. 269-273.
- Capoor, S.P., Rao, D.G., Viswanath, S.M. 1974. Greening disease of citrus in the Deccan Trap Contry and its relationship with the vector, *Diaphorina citri* Kuwayama. In: Weathers, L.G., Cohen, M. (Ed.). **Proceedings of the 6th Conference of the International Organization of Citrus Virologists**. University of California, Division of Agricultural Sciences. 1974. p. 43-49.
- Companhia Nacional de Abastecimento. 2011. **Acompanhamento da safra brasileira: laranja safra 2011/2012, terceiro levantamento - SP, estimativa da safra no Triângulo Mineiro - MG**. Conab. 10 p.
- Companhia Nacional de Abastecimento. 2013. **Acompanhamento da safra brasileira: laranja safra 13/14, primeira Estimativa São Paulo e Triângulo Mineiro**. Conab. 10 p.
- Costa, M.G., Yamamoto, P.T., Barbosa, J.C. 2006. Distribuição de Ninfas de *Diaphorina citri* em Árvores Cítricas. **Proceedings of the Huanglongbing Greening Workshop International**. Ribeirão Preto. 2006. p. 99.
- Ferreira, C., Okuma, D.M., Lopes, J.R.S. 2010. Stylet penetration activities of *Diaphorina citri* associated with transmission of *Candidatus Liberibacter asiaticus*. **Dissertação de Mestrado**. Piracicaba, SP: Universidade de São Paulo
- FNP Consultoria & Comércio. 2011. **Agrianual 2011: anuário da agricultura brasileira**. São Paulo: Informa Economics FNP. 324 p.
- Gallo, D., Nakano, O., Silveira Neto, S., Carvalho, R.P.L., Baptista, G.C., Berti Filho, E., Parra, J.R.P., Zucchi, R.A., Alves, S.B., Vendramim, J.D., Marchini, L.C., Lopes, J.R.S., Omoto, C. 2002. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ. 920 p.

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

Gottwald TR, Da Graça JV & Bassanezi RB (2007) Citrus huanglongbing: the pathogen and its impact. **Plant Health Progress** 6: September 2007. Online.

Inoue, H., Ohnishi, J., Ito, T., Tomimura, K., Miyata, S., Iwanami, T., Ashihara W. 2009. Enhanced proliferation and efficient transmission of *Candidatus Liberibacter asiaticus* by adult *Diaphorina citri* after acquisition feeding in the nymphal stage. **Annals of Applied Biology**, Wellesbourne 55:29-36.

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

Lin KH (1956) Observation on yellow shoot of citrus. Etiological study of yellow shoot of citrus. **Acta Phytopathologica Sinica** 2:1-42.

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

Lopes, 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., Marin, D.R., Bové, J.M. 2009b. Liberibacters associated with citrus huanglongbing in Brazil: “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” is heat tolerant, “*Ca. L. americanus*” is heat sensitive. **Plant Disease** 93:257-262

Lopes, S.A., Benedito, F.A.Q., Martins, E.C., Fassin, C., Barbosa, J.C., Beattie, A. 2013. ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ titers in citrus and acquisition rates by *Diaphorina citri* are decreased by higher temperature. **Plant Disease**, St. Paul 97(12):1563-1570.

Maschio, F. 2011. Ações adotadas pelo citricultor para o manejo do huanglongbing (HLB, Greening) no parque citrícola paulista. **Dissertação de Mestrado**. Araraquara, SP: Fundo de Defesa da Citricultura.

McClellan, A.P.D., Schwartz, R.E. 1970. Greening of blotchy-mottle disease of citrus. **Phytophylactica** 2:177-194.

McFarland, C.D., Hoy, M.A. 2001. Survival of *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae), and its two parasitoids, *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae) and *Diaphorencyrtus aligarhensis* (Hymenoptera: Encyrtidae), under different relative humidities and temperature regimes. **Flórida Entomologist**, Gainesville 84:227-233.

Nava, D.E., Torres, M.L.G., Rodrigues, M.D.L., Bento, J.M.S., Parra, J.R.P. 2007. Biology of *Diaphorina citri* (Hem., Psyllidae) on different hosts and at different temperatures. **Journal of Applied Entomology** 131:709-715.

Neves, M.F., Trombin, V.G., Milan, P., Lopes, F.F., Cressoni, F., Kalaki, R. 2010. **Retrato da Citricultura Brasileira**. Ribeirão Preto: Markestrat. 137 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

Quaggio, J.A., Raij, B.van, Cantarella, H., Sobrinho, J.T., Rodriguez, O., Bataglia, O.C., Sanches, A.C., Blasco, E.E.A., Negri, J.D.de, Malavolta, E., Vitti, G.C. Citros. In: Raij, B.van, Cantarella, H., Quaggio, J.A., Furlani, A.M.C., 1997. **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. 2. ed. .Campinas, Instituto Agrônomo / Fundação IAC. p. 133. (Boletim técnico, 100).

Reinking, O.A. 1919. Diseases of economic plants in southern China. **Philippine Agricultural**, Manila 8:109-135.

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. 2008. A phytoplasma closely related to the pigeon pea witches'-broom phytoplasma (16Sr IX) is associated with citrus huanglongbing symptoms in the state of Sao Paulo, Brazil. **Phytopathology** 98:977-984.

Van De Merwe, A.J., Anderson, F.G. 1937. Chromium and manganese toxicity. Is it important in Transvaal citrus greening? **Farming in South Africa** 12:439-440.

Yamamoto, P.T., Paiva, P.E.B., Gravena, S. 2001. Flutuação populacional de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemíptera: Psyllidae) em pomares de citros na região norte do estado de São Paulo. **Neotropical Entomology**, Londrina 30(1):165-170