

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

**TÚLIO MARQUES PANCCIONI**

**Caracterização dos sintomas de HLB e da infecção por *Candidatus  
Liberibacter asiaticus* em limão verdadeiro**

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**

**TÚLIO MARQUES PANCCIONI**

**Caracterização dos sintomas de HLB e da infecção por  
*Candidatus Liberibacter asiaticus* em limão verdadeiro**

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**

# TÚLIO MARQUES PANCCIONI

Dissertação apresentada ao Fundo de Defesa da Citricultura 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

---

Prof. Dr. Nelson Arno Wulff  
Fundo de Defesa da Citricultura - Fundecitrus

---

Prof. Dr. José Carlos Barbosa  
Universidade Estadual Paulista - UNESP

*À Deus, que sempre me proporcionou sabedoria e discernimento para encarar os desafios e obstáculos em minha vida. Agradeço pelo crescimento pessoal, profissional e espiritual proporcionando maior experiência de vida.*

*Aos meus Pais, Regina e José, a quem tanto tenho admiração. Mãe sempre presente e companheira, de fibra e conselheira. Mulher que me proporcionou sempre os valores mais importantes da vida: humildade, honestidade, integridade e amor. Mulher da educação, amante do conhecimento.*

*Ao meu irmão Bruno, por todos os conselhos e chamadas de advertência quanto à perseverança e foco para a conclusão dos estudos. Os “puxões de orelha” muito bem dados e lições de experiências da vida acadêmica.*

*À minha tia Ana Nere, por ser uma pessoa muito importante em minha vida, a qual mesmo tão longe, me transmite uma força pela vontade e amor com que conduz a educação em seu cotidiano.*

*À minha noiva Cilene, a quem a cada dia amo mais, pela confiança, toda dedicação, companheirismo e otimismo neste caminhar juntos, e pela grande felicidade a mim proporcionada. Obrigado por sempre estar ao meu lado e me proporcionar tanta satisfação.*

**Dedico**

## AGRADECIMENTOS

À empresa Louis Dreyfus Commodities S.A. que me proporcionou a oportunidade da realização deste estudo.

Ao professor e orientador Dr. Silvio Aparecido Lopes, pela orientação atenciosa e sempre precisa em todos os momentos, pela compreensão, apoio, dedicação, paciência e o imenso amor à profissão.

Ao gerente regional agrícola da LDC e amigo Ricardo Ap. Lourenço Benedetti, por todo ensinamento nestes anos de trabalho, e por ter me proporcionado tempo necessário à dedicação nos estudos.

Ao Fundecitrus (Fundo de Defesa da Citricultura) a todos os professores/pesquisadores e funcionários que colaboraram em muito no desenvolvimento do projeto. Em especial ao Sr. Hermes Teixeira de Oliveira, à Sra. Fernanda Alves Queirós Benedito e à Amanda Oliveira por toda dedicação nas coletas de materiais, análises, ajuda na interpretação dos resultados e no auxílio nas formatações e correções. Obrigado pelas boas risadas.

Ao Sr. Edson Dias Lopes, pela imprescindível colaboração e apoio ao longo das fases do projeto. Edson foi o elo e a peça-chave na preparação e evolução nas descobertas deste trabalho: meu muito obrigado por todo tempo dedicado.

À toda equipe da Fazenda Morrinhos, principalmente às inspetoras HLB que nos auxiliaram e nos orientaram para a realização deste trabalho.

Ao meu primo e fotógrafo José Fernando P. C. Marques por todo empenho e paciência na elaboração das fotografias deste trabalho.

Ao Dr. José Belasque Junior por toda ajuda nas análises e interpretações dos resultados estatísticos deste trabalho. Obrigado pela sua visão crítica e aplicação da vasta experiência.

Por todos os colegas do curso de mestrado do Fundecitrus pela atenção, carinho, ensinamento e amizade.

À Dra. Susette Aparecida de Barros Cardoso por todo incentivo ao conhecimento. Obrigado pelos livros, artigos, conversar e troca de conhecimento.

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.  
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.*

*Madre Teresa de Calcutá*

## **Caracterização dos sintomas de HLB e da infecção por *Candidatus Liberibacter asiaticus* em limão verdadeiro**

Autor: Túlio Marques Pancioni  
Orientador: Dr. Silvio Aparecido Lopes

### **Resumo**

A citricultura possui expressiva representação no Brasil, especificamente no Estado de São Paulo, com o limão verdadeiro sendo uma excelente fonte de renda às empresas, as quais se beneficiam com produtos e subprodutos. O mais importante é o óleo essencial da casca do fruto. Em consequência do aumento da incidência do Huanglongbing (HLB), tem havido queda na produção de citros, em especial em países como Brasil e Estados Unidos. O controle do HLB em limão possui um agravante quando comparado com o controle da doença em laranja. Não existem informações detalhadas sobre os sintomas que especificamente caracterizem as plantas doentes, dificultando a correta diagnose. Além disso, desconhece-se o papel que uma planta de limão com HLB exerce como fonte de inóculo sobre uma planta de laranja e vice-versa. Os objetivos do presente trabalho foram (i) caracterizar os sintomas de HLB em limão Siciliano, (ii) determinar se existe associação entre tipo e intensidade de sintomas e título bacteriano, e (iii) estudar a resposta de limões e laranjas quando inoculadas com a bactéria oriunda dos mesmos hospedeiros, em combinações homólogas e heterólogas. Procedimentos foram conduzidos em campo, laboratório e casa de vegetação envolvendo quatro variedades de limão Siciliano e uma de laranja doce. Para caracterização dos sintomas de HLB em limão foi realizado levantamento das plantas suspeitas. Os sintomas foram separados por tipo e analisado por PCR quantitativo (qPCR). Para avaliar se a intensidade do tom de amarelo no limbo foliar estaria associado ao título bacteriano, foram coletadas folhas maduras de ramos de plantas doentes, separadas em quatro categorias e analisadas por qPCR. A fim de determinar se a bactéria do HLB presente em limão infectaria e induziria sintomas em laranja e vice-versa, foram coletados ‘borbulhões’ de plantas infectadas e realizada a inoculação em mudas sadias em casa de vegetação. Os sintomas ‘amarelecimento da nervura central’, ‘amarelecimento das nervuras secundárias’, ‘engrossamento da nervura central’, ‘engrossamento das nervuras secundárias’, ‘mosqueamento da base para a ponta’ e ‘mosqueamento da ponta para a base’ estiveram mais associados ao HLB em limão verdadeiro. Foram observadas concentrações similares de *Liberibacter* em folhas ‘verde’ e ‘verde com nervuras amarelas’. *Liberibacter* de plantas de limão infectou plantas de laranja e vice versa com maiores porcentagens de infecção em combinações homólogas que heterólogas. A importância que um hospedeiro tem como fonte de inóculo para o outro será mais bem determinada com a inclusão do inseto vetor nos estudos.

**Palavras-chave:** *Citrus lemon*; Huanglongbing; sintomas; limão verdadeiro

## **Characterization of HLB symptoms and *Candidatus Liberibacter asiaticus* infection on lemon**

Author: Túlio Marques Panccioni  
Advisor: Dr. Silvio Aparecido Lopes

### **Abstract**

The citriculture has significant representation in Brazil, specifically in the State of Sao Paulo, with the Sicilian lemon consisting of an excellent source of income for companies, which benefit from products and by-products. The essential oil from the fruit bark is the most important. As a result of the increase in the incidence of huanglongbing (HLB), citrus production has decreased, especially in countries like Brazil and the United States. The control of HLB in lemon has an aggravating factor when compared with the control of the disease in orange. There is no detailed information about the symptoms that specifically characterize the diseased trees, making difficult a correct disease diagnosis. In addition, it is not known the role as source of inoculum of a plant of lemon with HLB on a plant of orange, and vice versa. The objectives of this study were (i) to characterize the symptoms of HLB in lemon, (ii) determine whether there is an association between the type and intensity of symptoms and bacterial titers, and (iii) study the response of lemons and oranges after inoculation with the bacterium coming from the same hosts, in homologous or heterologous combinations. Procedures were conducted in the field, lab and greenhouse involving four varieties of lemon and one variety of sweet orange. For HLB symptom characterization in lemon a survey of suspicious plants was carried out. The leaf symptoms were characterized by type and analyzed by quantitative PCR (qPCR). To assess whether the intensity of the yellow on the leaf blade would be associated with bacterial titer, mature leaves were collected from a diseased branch, separated in four symptom category, and analyzed by qPCR. In order to determine if the bacterium of HLB present in lemon would infect and would induce symptoms in orange and vice versa, budsticks were collected from field trees and graft inoculated healthy seedlings in greenhouse. Higher association to HLB in lemon was observed for symptoms characterized as 'yellowing of the midrib', 'yellowing of the veins', 'thickening of the midrib', 'thickening of veins', ' blotchy mottling going from base to the tip of the leaf', and 'blotchy mottling going from tip to the base of the leaf' than the other symptoms observed in the field. 'Green leaf' and 'green leaves with yellow vein' resulted in similar concentrations of *Liberibacter*. *Liberibacter* from lemon infected orange and vice versa, and the percentages of infection were higher in homologous than heterologous combinations. The importance that one host has as a source of inoculum for the other will be better determined with the inclusion of the insect vector in the studies.

**Keywords:** *Citrus lemon*, Huanglongbing, symptoms, lemon.

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1.....	7
Figura 2.....	8
Figura 3.....	8
Figura 4.....	10
Figura 5.....	11
Figura 6.....	13
Figura 7.....	14
Figura 8.....	16
Figura 9.....	17
Figura 10.....	20
Figura 11.....	20
Figura 12.....	21
Figura 13.....	21
Figura 14.....	22
Figura 15.....	23
Figura 16.....	26

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1.....	12
---------------	----

## SUMÁRIO

RESUMO .....	IX
ABSTRACT .....	X
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	2
2.1 O limão verdadeiro .....	2
2.1.1 Importância econômica .....	2
2.1.2 Origem e taxonomia .....	3
2.1.3 Cultivares de limão .....	4
2.2 Huanglongbing (HLB, greening) .....	5
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	6
3.1 Área experimental .....	7
3.2 Caracterização de sintomas de HLB em limão verdadeiro .....	8
3.3 Associação entre a intensidade de sintomas e título bacteriano .....	10
3.4 Inoculações .....	11
4. RESULTADOS .....	14
4.1 Caracterização de sintomas de HLB em limão verdadeiro .....	14
4.2 Associação entre a intensidade de sintomas e título bacteriano .....	15
4.3 Inoculações .....	16
5. DISCUSSÃO.....	19
5.1 Caracterização de sintomas de HLB em limão verdadeiro .....	19
5.2 Associação entre a intensidade de sintomas e título bacteriano .....	24
5.3 Inoculações cruzadas .....	24
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	25
REFERÊNCIAS .....	26
Anexo 1 .....	26

## 1 INTRODUÇÃO

A citricultura no contexto mundial possui expressiva representação no Brasil, especificamente no Estado de São Paulo, devido à concentração das maiores áreas de cultivo. Dentre as espécies e cultivares, o limão verdadeiro (*Citrus limon*) é excelente fonte de renda às empresas, as quais se beneficiam com produtos e subprodutos, sendo o mais importante o óleo essencial da casca do fruto.

Não há na literatura corrente dados comparativos recentes sobre a área cultivada com limões em relação aos demais citros. Porém, segundo Neves (2010), a evolução da área cultivada de limão no mundo no período de 1978/79 a 2008/09 foi de 197%, aumentando de 0,34 para 1,01 milhões de hectares. No período 2008/2009 o Brasil representou 4% da área plantada e 8% da produção mundial, com 44 mil hectares e 1,04 milhões de toneladas, com produtividade de 23 toneladas por hectare.

Propriedades com alta incidência de Huanglongbing (HLB) vêm, ano após ano, sofrendo com queda na produção de frutas cítricas. O HLB foi detectado pela primeira vez no Brasil em 2004 e na Flórida em 2005. O HLB é doença bacteriana disseminada por insetos que afeta o fluxo da seiva no floema causando perda de produção dos ramos afetados. Com a evolução dos sintomas pode provocar ‘morte econômica’ da planta. O manejo envolve plantio de mudas sadias, inspeções frequentes com erradicação das plantas sintomáticas e controle rigoroso do inseto vetor.

O controle do HLB em limão possui um agravante maior quando comparado com o controle da doença em laranja. Não existem, no momento, informações detalhadas sobre os sintomas que especificamente caracterizem a planta doente, dificultando o trabalho de inspeção e consequente erradicação das plantas afetadas. Além disso, desconhece-se o papel que uma planta de limão com HLB exerce como fonte de inóculo sobre uma planta de laranja, e vice-versa. Visando trazer informações sobre esses aspectos do problema, o presente trabalho teve como objetivos: a) Caracterizar os sintomas de HLB em plantas de limão verdadeiro ao nível de campo; b) Determinar possível associação entre tipo e intensidade de sintomas e título bacteriano, e c) Estudar a resposta de limões e laranjas em combinações homólogas e heterólogas, em plantas inoculadas artificialmente por enxertia.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 O limão verdadeiro

#### 2.1.1 Importância econômica

O limão vem sendo cultivado em regiões nas quais a média anual de precipitação está acima de 200 mm, umidade relativa acima de 50% e temperatura média de 17°C (Reuther, 1973). O clima subtropical, com temperatura média anual inferior a 20°C, é o mais adequado. Florescimentos consecutivos são possíveis em locais onde a amplitude térmica média anual seja ao redor de 7°C, situação que leva à produção de frutos praticamente todo o ano (Coggins, 1984).

A produção comercial de limão iniciou-se na Itália e, por muitos anos, foi umas das principais produtoras mundiais (Sinclair, 1984). No final da década de 1970, o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos publicou uma lista contendo mais de 60 países produtores desta espécie. Entre estes, Estados Unidos, Itália, Argentina, Espanha e Turquia representavam mais de 60% da produção mundial. No Brasil, os dados de produção de limão devem ser observados com cautela, pois costuma-se colocar em um mesmo grupo dados das espécies ‘Siciliano’, um tipo de limão verdadeiro, e da “Tahiti” (*Citrus latifolia* Tan.) que, na verdade, se trata de lima ácida. Isso ocorre porque neste país ambas as espécies são conhecidas como ‘limão’.

Neves (1994) relata que o Brasil possui algumas vantagens em relação aos demais países produtores porque possui (i) melhor clima para desenvolvimento da espécie, (ii) menor custo de produção da fruta, (iii) pessoal mais bem capacitado ao cultivo da fruta, e (iv) estratégias apropriadas de compra, venda e logística de distribuição dos produtos. Como desvantagem está a falta de política de incentivo à pesquisa e desenvolvimento.

O limão verdadeiro é utilizado na maioria dos países do mundo como fruta fresca para consumo, diferente do que ocorre no Brasil onde a lima ácida ‘Tahiti’ é a mais aceita, provavelmente pela ausência de sementes, sabor mais ácido, maior facilidade de extração do suco. No entanto, a lima ‘Tahiti’ apresenta como desvantagem curta duração em pós-colheita. Contrário do que acontece com os limões verdadeiros, ao iniciar o processo de maturação (mudança de cor da casca de verde para amarela) ocorre rápida deterioração do fruto o que leva à necessidade de colheita dos mesmos com a casca ainda totalmente verde. Embora como fruta fresca o limão verdadeiro é pouco consumido no país, talvez por não ser muito conhecido ou pelos custos mais elevados, possui grande expressão comercial, pois, desta fruta se extrai suco concentrado e óleo essencial para uso em diversos fins. Como consequência de sua importância,

com o passar dos anos a qualidade tanto agrícola como industrial passou por importantes processos de aperfeiçoamento.

Segundo Neves (1994), do limão se extrai o óleo essencial, o suco concentrado e a polpa seca, produtos de grande importância econômica. O óleo essencial ou “cold press” é usado como essência na indústria de perfumaria fina e cosméticos e como aroma na indústria alimentícia em formulações de refrigerantes ‘cola’ e ‘limão’. O óleo essencial não tem concorrentes na perfumaria fina e fabricação de refrigerantes. No entanto, em diversos outros produtos, o óleo do limão pode, por exemplo, ser substituído pelo da lima ‘Tahiti’. Através da recuperação industrial retira-se também, tanto dos limões como da lima ‘Tahiti’, o óleo destilado terpenado, o qual possui baixa qualidade e valor de mercado, conferindo odor de limão na indústria de perfumaria e cosméticos. Outro produto é o d’limoneno, empregado como solvente, espalhante e removedor de tintas, e também na fabricação de aditivos para combustíveis, resinas e detergentes.

O segundo produto em importância é o suco (Neves, 1994), pois se trata de um acidulante natural. O suco vem ganhando importância nos últimos anos. É muito empregado nas indústrias de refrigerantes gaseificados, iogurte, sorvete, entre outros produtos. Na indústria o suco é extraído, concentrado e congelado (para que a diluição seja realizada pelo consumidor) ou extraído e comercializado em sua forma natural. Devido à sua característica de acidulante natural, para atingir o sabor desejado pelo mercado importador, o limão é utilizado em misturas com sucos de laranja ou com os mais variados tipos de sucos.

Segundo Neves (1994), o albedo (terceiro produto do limão) é espesso garantindo alto rendimento de polpa seca, usada na indústria alimentícia como base na fabricação de pectina (geleificante e espessante) empregada em geleias, sorvetes, ‘catchups’ e iogurtes. Por possuir ação reguladora e protetora do sistema gastrointestinal, a pectina é também usada na indústria de fármacos em medicamentos contra diarreia, gastrites e úlceras. Outro subproduto do albedo são os pellets, fabricados a partir da polpa da fruta e direcionados à alimentação de animais.

### **2.1.2 Origem e taxonomia**

Existem muitas controvérsias sobre a taxonomia e origem do limão. Os estudos taxonômicos conduzidos na década de 1970 não foram suficientes para solucionar esta questão. Existem dúvidas se se trata de híbrido ou não. Segundo Malik et al. (1974), apud Sinclair (1984), o limão é um derivado da lima, da cidra, e de outra fonte genética não identificada. Sobre a origem, para Tolkowsky (1938), apud Sinclair (1984), as primeiras referências ao limão

são de 800 A.C., sugerindo sua origem na Índia. Para Webber (1943) o limão é nativo da porção oriental do Himalaia no norte de Burma e China meridional. Já para Hodgson (1967) o limão originou-se na Índia, região oriental do Himalaia e áreas adjacentes, já que híbridos naturais com características de limão e cidra são encontrados lá.

Quanto ao cultivo comercial de limão, também existem dúvidas. Tolkowsky (1938) apud Sinclair (1984), com base em referências literárias antigas, teoriza que seu cultivo foi bem estabelecido no Iraque cerca de 900 A.C. e reportam que as cruzadas religiosas do século XI foram responsáveis pela introdução, ou reintrodução, dos citros na Europa, incluindo a região meridional. Todos concordam que nenhum fruto cítrico teve origem nas Américas, mas encontrou aí condições muito favoráveis, sendo atualmente cultivado nos Estados Unidos, Argentina e Brasil, além dos países mediterrâneos (Itália e Espanha) e, em menor quantidade, em outros países.

### 2.1.3 Cultivares de limão

Apesar de limões da espécie *Citrus limon* serem conhecidos, no Brasil, como limão Siciliano, essa denominação se aplica, na verdade, a uma variedade pouco cultivada, a ‘Bears’. Assim sendo, o termo ‘Siciliano’ acaba englobando uma série de seleções ainda não devidamente classificadas dentro das demais variedades. O termo ‘Siciliano’ também está associado ao local de origem das primeiras sementes introduzidas no país, já que as mesmas vieram possivelmente da Sicília na Itália (Alves, 1986).

A grande facilidade de hibridação e o alto grau de compatibilidade apresentados pela espécie *C. limon* levaram à produção de grande número de tipos ou cultivares com características morfológicas distintas, exceto os frutos que, em geral, são muito semelhantes entre os cultivares (Swingle & Reece, 1967). As variações nos frutos que se observam no campo são provenientes das diferentes floradas anuais (Hodgson, 1967).

Hodgson (1967) listou nove cultivares principais, dezessete de menor importância comercial e alguns ornamentais ou de sabor doce. Segundo Sinclair (1984), os cultivares de maior importância são o ‘Eureka’ e o ‘Lisboa’. ‘Eureka’ originou-se em 1880 na Califórnia a partir de um grupo de “seedlings” de origem italiana, enquanto que ‘Lisboa’ é português e acredita-se tratar de variante do limão galego.

O ‘Eureka’ é menos vigoroso que o ‘Lisboa’, tem hábito de crescimento mais espalhado, suas folhas são mais dispersas, são menos resistentes ao frio, apresentam menor quantidade de espinhos, produção concentrada no fim do inverno, e os frutos, por serem

produzidos em cachos terminais, são mais suscetíveis a danos mecânicos, principalmente os decorrentes da ação dos ventos. O fruto tem tamanho médio, casca fina, ao redor de três sementes e suco abundante. É incompatível com *Poncirus trifoliata* e seus híbridos. Na Califórnia ele é considerado o cultivar mais importante sendo ‘Allen’, ‘Cook’, ‘Meek’, ‘Ross’ e ‘Wheatley’ os seus mais populares clones. Já o cultivar ‘Lisboa’ é o mais importante na Espanha, Itália e outros países do Mediterrâneo. Suas seleções mais populares são o ‘Limonera 8A’, ‘Monroe’, ‘Prior’, ‘Rosenberger’, ‘Strong’, ‘Kaweah’ e ‘Walker’ (Hodgson, 1967). Este mesmo autor descreve brevemente o cultivar ‘Femminello Ovale’ como plantas bastante vigorosas com frutos de boa qualidade para o mercado de fruta fresca ou indústria, sendo o cultivar mais velho da Itália, responsável por três quartos da produção italiana.

No Brasil os limões verdadeiros foram introduzidos por sementes. Somente em 1963 foram multiplicados em clones nucelares (Moreira, 1963). Na Estação Experimental Sylvio Moreira em Cordeirópolis-SP existem mais de 100 espécies de frutos ácidos e, entre elas, estão os limões verdadeiros.

## 2.2 O huanglongbing (HLB, greening)

A denominação huanglongbing é chinesa com significado "doença do ramo amarelo", analogia aos sintomas foliares iniciais setorizados na copa (Van Vuuren, 1996). Trata-se da doença mais importante dos citros pela rapidez com que se dissemina no campo, pelas grandes perdas que provoca na produção de frutas, e pelas grandes dificuldades e altos custos envolvidos no manejo, que envolve frequentes vistorias dos pomares, eliminação das plantas com sintomas e controle rigoroso do inseto vetor.

O HLB é considerado uma ameaça ao desenvolvimento da citricultura mundial. A redução de área plantada e busca por outras culturas ocorrem em todos os países produtores onde o HLB está presente. No Brasil, especificamente no Estado de São Paulo, a principal alternativa é a cana de açúcar, mas, em geral, com retornos financeiros inferiores aos dos citros. Com base em relatórios fornecidos pelos próprios citricultores, a Coordenadoria de Defesa Agropecuária estimou que de 2004 a 2012, 26,7 milhões de plantas foram erradicadas somente no estado de São Paulo (Fundecitrus, 2013a).

O HLB está associado a três espécies de proteobactérias Gram-negativas: *Candidatus* (*Ca.*) *Liberibacter* (L.) *africanus*, *Ca.* L. *asiaticus* e *Ca.* L. *americanus*, que colonizam o floema das plantas (Bové, 2006). No Brasil estão presentes *Ca.* L. *asiaticus* e *Ca.* L. *americanus* (Davis

et al., 2008) ambas disseminadas pelo psílideo *Diphorina citri*, inseto altamente prolífico e de difícil controle.

Observações de campo e inoculações artificiais (Lopes & Frare, 2008) demonstram que todas as cultivares comerciais de laranja doce e de limões são suscetíveis ao HLB. Também foi relatado que os títulos de *Ca. L. asiaticus* no tecido foliar (a espécie mais prevalente nos dias atuais) não varia significativamente entre as cultivares de laranja e espécies comerciais (Lopes et al., 2010). No entanto significativas diferenças existem nos padrões de mosqueado e respostas dos diferentes citros quando infectados por *Liberibacter*.

Em laranjas doces os sintomas nas folhas iniciam com leve amarelecimento do limbo que progride para clorose assimétrica denominada de mosqueado. Com o tempo as folhas caem e os ramos secam (Bové, 2006). Os frutos ficam deformados, com sementes abortadas, e também caem prematuramente. O tempo para manifestação dos primeiros sintomas foliares depende do modo de inoculação do patógeno – ao redor de quatro meses quando a inoculação é feita por enxertia de ramos doentes (Lopes & Frare, 2008) e ao redor de oito meses quando a inoculação é feita por psílideos infectivos (Hung et al., 2004). Este longo e variável período de incubação dificulta a detecção de plantas doentes no campo e a adoção das práticas de manejo (Lopes et al., 2006).

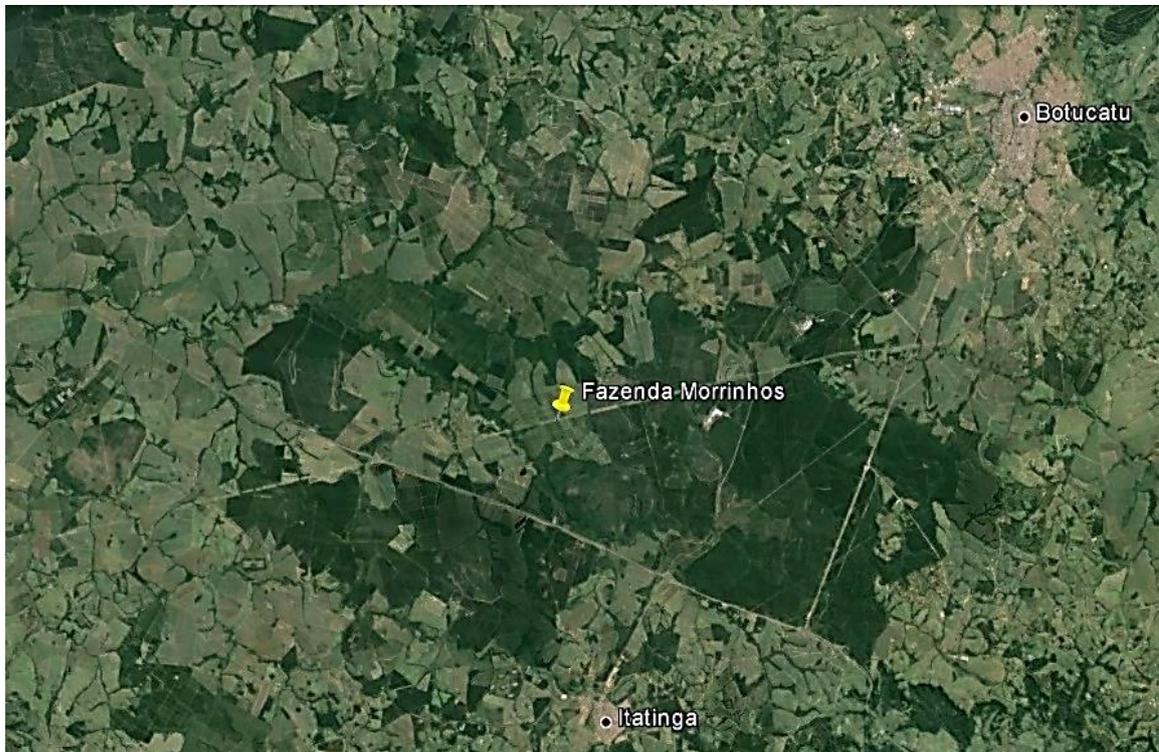
Em limões verdadeiros os sintomas de HLB não foram ainda totalmente caracterizados gerando bastante dúvida na identificação das plantas doentes. Não se sabe ao certo qual é o padrão de mosqueado. O amarelecimento geral do limbo foliar, que normalmente ocorre como característica da espécie, mas que pode ser amenizado por frequentes complementações minerais, também dificulta a diagnose. Além disso, o amarelo das folhas pode ainda ser acentuado em plantas afetadas por outras doenças como é o caso da gomose de *Phytophthora*. As dificuldades apontadas têm sido um problema bastante frequente na fazenda Morrinhos e em áreas produtoras de limão, como é o caso da Argentina, aonde a doença aparentemente ainda não chegou (Fundecitrus 2013b). Essas dificuldades estimularam a condução do presente trabalho.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

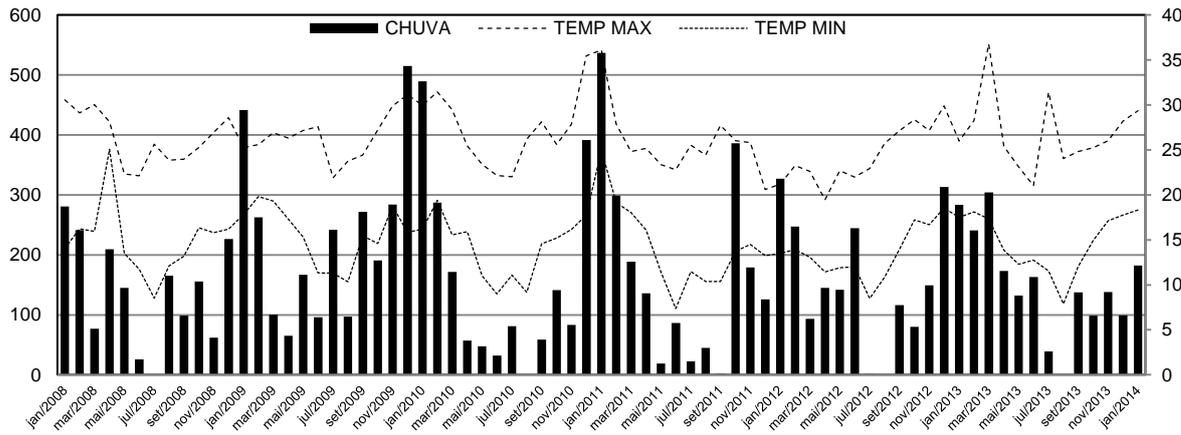
Para realização deste trabalho, procedimentos foram conduzidos em campo, laboratório e casa de vegetação envolvendo duas variedades de limão ('Eureka' e 'Femminello'), uma seleção da variedade 'Lisboa' ('Limonera'), e uma seleção ainda não classificada ('AB').

#### 3.1 Área experimental

O trabalho foi conduzido na Fazenda Morrinhos, localizada no município de Botucatu, Estado de São Paulo. Posição geográfica e dados climáticos históricos de cinco anos da fazenda são mostrados nas Figuras 1 e 2.

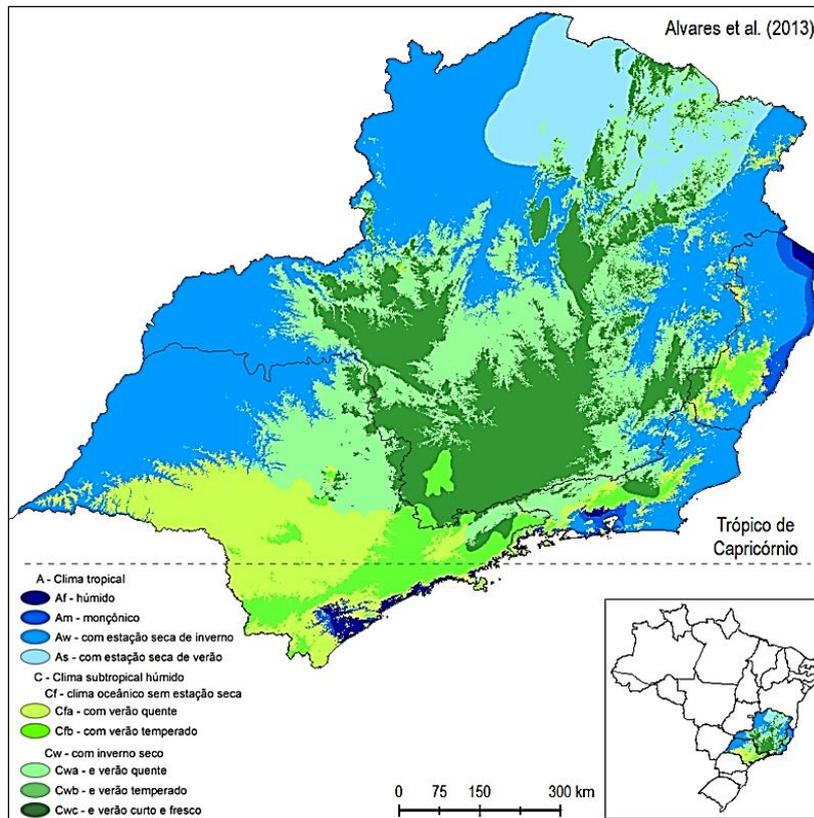


**Figura 1.** Localização da Fazenda Morrinhos, situada entre os municípios de Botucatu e Itatinga a  $22^{\circ}59'44.61''$  sul e  $48^{\circ}37'56.89''$  oeste.



**Figura 2.** Dados climáticos registrados em seis anos na Fazenda Morrinhos. Acumulado mensal de chuva (mm) e médias de temperaturas máxima e mínima nos anos de 2008 a 2014.

O clima do município onde está localizada a fazenda classifica-se segundo o Sistema Internacional de Köppen como Cfa (subtropical com verão ameno), conforme Figura 3. As chuvas se encontram relativamente bem distribuídas durante o ano, com as maiores precipitações ocorrendo nos meses de novembro a março.



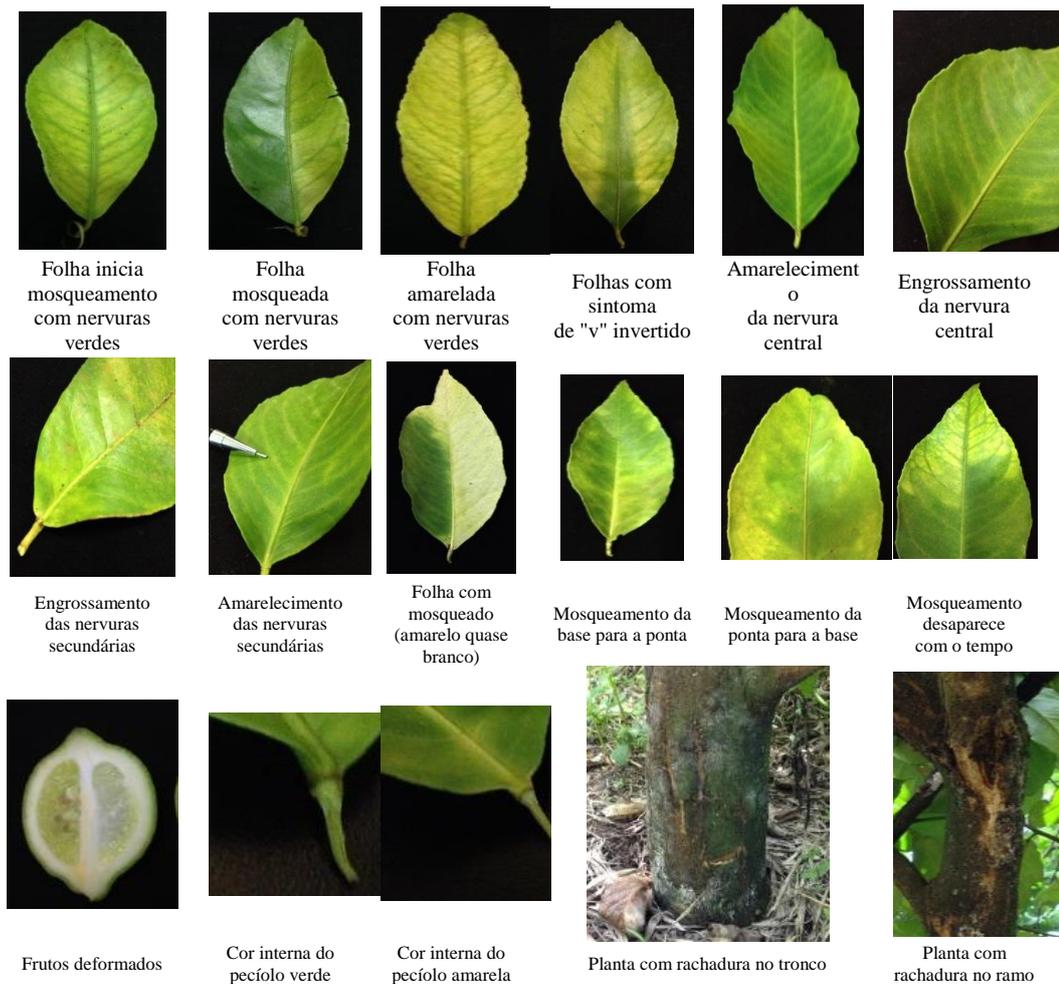
**Figura 3.** Mapa climático da região sudeste do Brasil de acordo com a classificação climática de Köppen-Geiger. Fonte: Alvares et al., 2013.

### **3.2 Caracterização de sintomas de HLB em limão**

O primeiro objetivo do trabalho foi caracterizar os sintomas de HLB, uma necessidade detectada pelos dirigentes da propriedade. A identificação de sintomas específicos iria facilitar e aprimorar o trabalho dos inspetores para posterior eliminação plantas doentes fontes de inóculo, essencial no manejo do HLB.

Inicialmente foi feito levantamento junto aos inspetores, num total de oito pessoas, no qual se questionou quais eram os sintomas em folhas e em frutos que na opinião deles estavam associados à doença. O segundo passo foi proceder a amostragem de folhas de cada uma das características mencionadas, em várias plantas de idades e variedades diferentes.

Esta primeira amostragem foi feita no período de outubro a novembro de 2012, envolvendo 88 amostras de plantas com sintomas diversos, conforme mostrado na Figura 4. Quando plantas com sintomas nas folhas que sugeriam tratar-se de HLB era encontrada, os inspetores as marcavam com fita amarela em ambos os lados da copa e no ramo suspeito. Em seguida, os sintomas eram agrupados por categorias. Cada planta também era avaliada com relação a outras anomalias como, por exemplo, ramos rachados, tronco lesionado mecanicamente, por alguma doença, ou por ataque de brocas ou cochonilha ‘escama farinha’, entre outras pragas. Em seguida, as amostras, devidamente identificadas, foram encaminhadas ao laboratório do Fundecitrus onde foram devidamente processadas para extração de DNA e análise por PCR quantitativo (qPCR), seguindo-se procedimentos padrões (Teixeira et al, 2005).



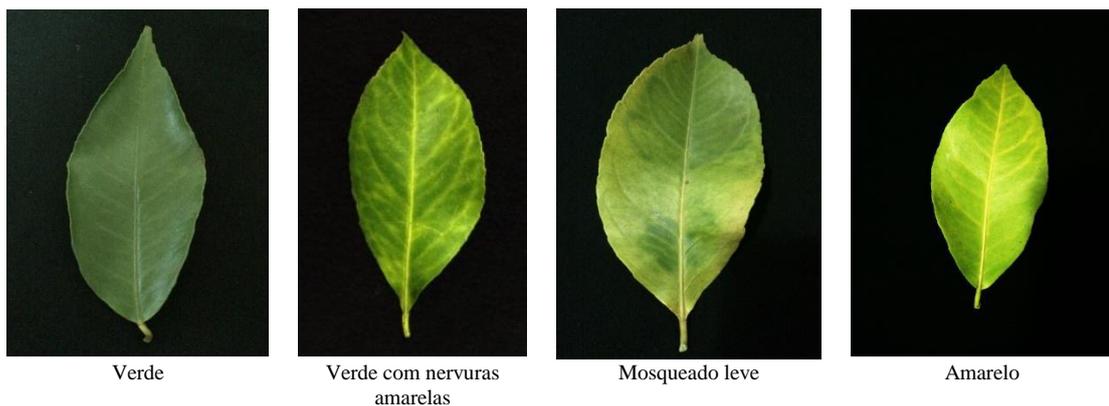
**Figura 4.** Tipos de sintomas em folhas, frutos e tronco, observados na primeira data de amostragem. Folhas foram coletadas e enviadas ao laboratório do Fundecitrus para análise por qPCR visando detecção do patógeno.

Com base nos resultados da primeira amostragem envolvendo 88 amostras (Fig. 4) e levando-se em consideração somente as características das amostras que resultaram positivas por qPCR (Ct abaixo de 34,0), uma segunda coleta foi realizada em março e abril de 2013, agora envolvendo 91 amostras. Uma terceira e última coleta foi realizada entre abril e junho de 2014 com o objetivo de validar a lista final de sintomas considerados fundamentais para a correta diagnose da doença no campo. Esta coleta envolveu 66 amostras de 66 plantas. Foram coletadas por quatro pessoas - um engenheiro agrônomo, o encarregado fitossanitário e duas inspetoras. Cada amostra envolvendo pelo menos 20 folhas foi avaliada visualmente e de forma independente por cada uma das pessoas. A avaliação foi feita primeiro no campo defronte à planta suspeita e depois no escritório observando-se criteriosamente as mesmas folhas removidas das plantas suspeitas. No escritório cada avaliador indicava quais dos seis tipos estavam presentes no grupo de folhas avaliado.

Após a avaliação individual, foi feita reunião das pessoas envolvidas e avaliado o nível de concordância dos resultados, tanto no campo como no escritório. Em seguida as amostras foram colocadas dentro de sacos de plástico e enviadas ao Fundecitrus para análise por qPCR.

### 3.3 Associação entre intensidade de sintomas e título bacteriano

Ainda referente a sintomas, investigação adicional foi conduzida sobre as amostras enviadas ao laboratório. O objetivo (segundo) foi avaliar se a intensidade do tom de amarelo no limbo foliar estaria associada ao título bacteriano. Foram coletadas folhas maduras assintomáticas e sintomáticas dos mesmos ramos suspeitos. No laboratório elas foram divididas em quatro categorias (Fig. 5) com base na intensidade da cor amarela no limbo foliar e, em seguida, fotografadas. Foram utilizadas 96, 22, 165 e 65 folhas respectivamente para as categorias ‘verde’, ‘verde com nervuras amarelas’, ‘mosqueado leve’ e ‘amarelo’. Em seguida o DNA foi extraído e analisado por qPCR para quantificação de *Liberibacter*. Os valores de Ct (“cycle threshold” ou ponto que indica o ciclo no qual a reação atinge o limiar da fase exponencial, permitindo, por meio da emissão de compostos fluorescentes, quantificação reprodutível do número de cópias do DNA alvo) foram convertidos em log do número de cópias de *Liberibacter* com base em curva padrão (Lopes et al, 2010). Os dados foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) com o programa SAS.



**Figura 5.** Folhas de limão com níveis progressivos na intensidade de amarelo no limbo foliar.

Esta parte do trabalho foi feita com folhas coletadas ao acaso de plantas das variedades ‘Eureka’, ‘Femminello’, ‘AB’ e ‘Limonera’ plantadas em área total de 720 hectares, com diferentes idades. Toda a área plantada da fazenda é submetida às adubações necessárias conforme análises de solo e foliar.

### 3.4 Inoculações

O terceiro objetivo deste trabalho foi o de determinar se a bactéria do HLB presente em limão infectaria e induziria sintomas em laranja e vice-versa. Em outras palavras, estudar a resposta de limões e laranjas em combinações homólogas e heterólogas, ou seja, quando inoculadas com a bactéria oriunda do mesmo hospedeiro ou de hospedeiro distinto. Também visou determinar se os sintomas de HLB no campo seriam reproduzidos em plantas jovens crescendo em vasos em casa de vegetação. Esta parte da pesquisa poderia eliminar a dúvida existente quanto ao limão poder atuar como fonte de inóculo para laranja e vice versa, e orientar novos plantios.

Segmentos de ramos foram coletados de plantas doentes (confirmadas por análise laboratorial) e levados ao Fundecitrus para inoculação de mudas em casa de vegetação, conforme combinações entre hospedeiros indicadas na Tabela 1.

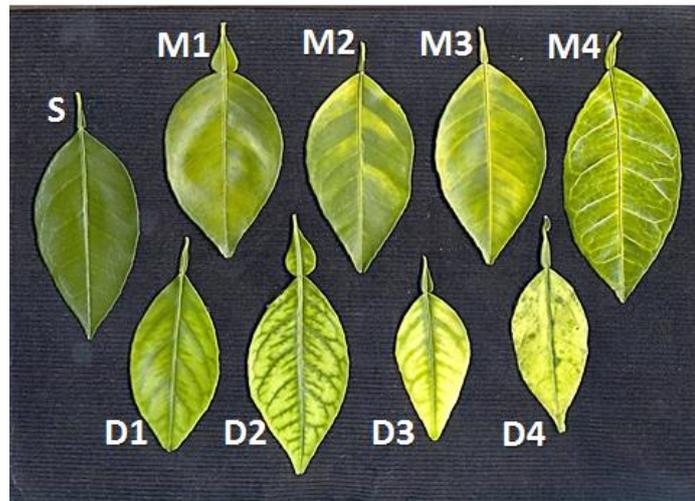
**Tabela 1.** Combinações entre fonte de inóculo e variedade inoculada incluídas no experimento de casa de vegetação indicando também o número de plantas inoculadas.

Material inoculado	Fontes de inóculo e número de plantas inoculadas		
	Laranja Valência	Limão Eureka	Limão AB
Laranja 'Valência'	24	24	24
Limão 'Eureka'	24	24	24
Limão 'Femminello'	24	24	24
Limão 'Limonera'	24	24	24
Limão 'AB'	24	24	24

Foram retirados das plantas doentes 1 a 2 ramos sem folhas de aproximadamente 20 cm de comprimento e 0,5 cm de espessura (tecido não lignificado). A coleta foi realizada no dia da enxertia (07/02/2013) e, para manter viabilidade das borbulhas, todos os ramos foram transportados acondicionados em jornal umedecido em caixas de isopor. As plantas a serem enxertadas foram oriundas de viveiro protegido e certificado. A enxertia foi conduzida como descrito por Lopes & Frare (2008). Realizou-se um corte longitudinal das mudas de aproximadamente 5 cm acima da linha de inserção da enxertia da copa com o porta-enxerto, com o corte não ultrapassando cerca de um terço do diâmetro do caule. Os ramos fonte de inóculo foram subdivididos em 4 segmentos de aproximadamente 5 cm de comprimento denominados borbulhão. O borbulhão foi removido com diâmetro equivalente ao do tronco da planta a ser inoculada fazendo-se, nos mesmos, cortes longitudinais (tipo bisel) em ambas as extremidades e, em seguida, afixado na região do corte. Cada planta recebeu apenas um borbulhão. Para garantir perfeita fixação entre o borbulhão e o caule da planta inoculada foram utilizadas fitas plásticas transparentes (fitilhos) comumente empregadas em viveiros durante o processo de formação de mudas. Após 30 dias, o fitilho foi retirado do caule. Cada tratamento

consistiu de 24 plantas sendo 20 inoculadas e quatro como controle. Os controles receberam borbulhões de plantas saudias.

Após 60 dias da data de inoculação foi avaliada a taxa de pegamento dos borbulhões e sete meses após inoculação as plantas foram avaliadas visualmente. Para avaliação da laranja Valência empregou-se a escala de sintomas desenvolvida por Mendonça (Mendonça, 2015) (Fig. 6).



**Figura 6.** Escala fotográfica de sintomas progressivos de HLB em folhas de laranjeiras. S – sadia, M- mosqueado, e D – deficiência mineral. (Fonte: Mendonça, 2015).

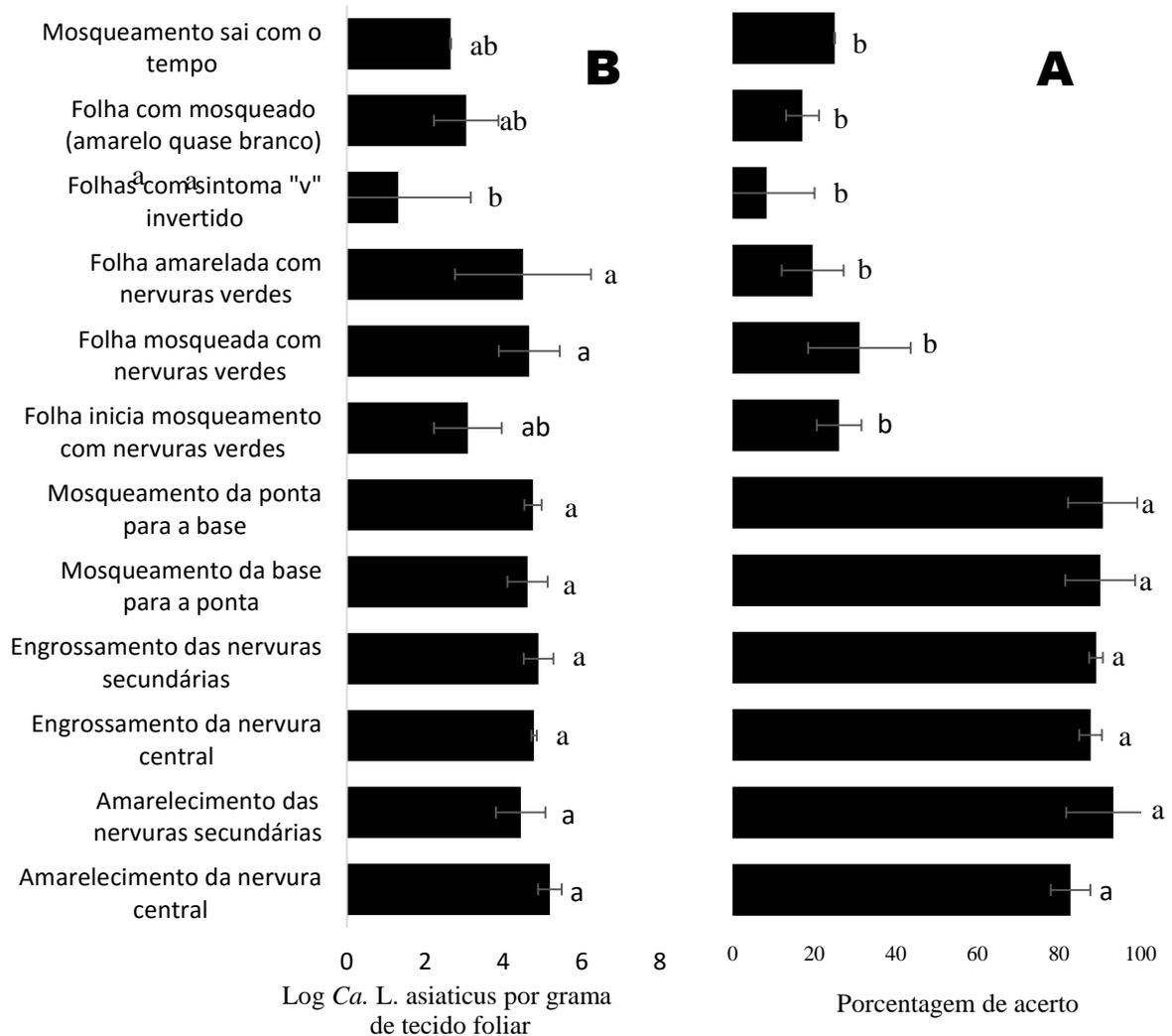
Como para avaliação do limão não existia uma escala similar à preparada para laranja, as plantas de limão foram classificadas empiricamente com base nos tons de amarelo de deficiência mineral ou de mosqueado observados no campo.

Logo após a avaliação de sintomas amostras foram coletadas e avaliadas por qPCR. Os resultados foram então usados para se determinar não somente a porcentagem de infecção dentro de cada combinação de hospedeiros, mas também para se determinar os títulos da bactéria e possível associação entre tipo de sintoma e título bacteriano.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Caracterização dos sintomas de HLB

Para fins de análise, os resultados das amostras de limão coletados no campo foram separados em dois grupos. Na Figura 7 é mostrada relação entre tipo de sintomas e porcentagem de acerto na diagnose em campo, e relação entre tipo de sintomas e título bacteriano. O nível de acerto foi determinado pelos resultados do qPCR.



**Figura 7.** Porcentagem média de acerto (acima de 75%) na diagnose em campo (A) e relação entre tipo de sintomas e log médio do título bacteriano (B).

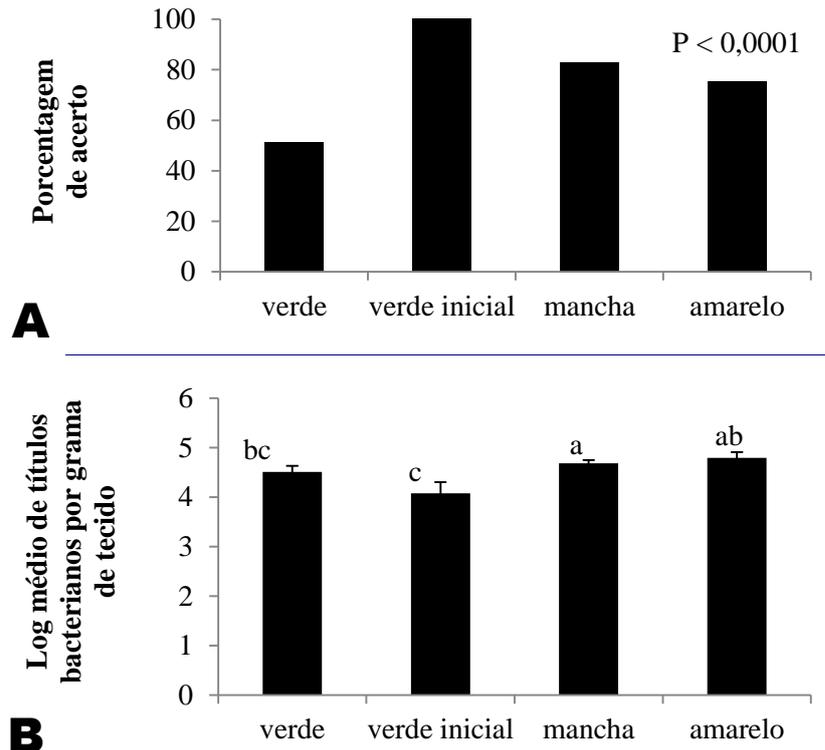
Quando se analisa o percentual de acerto na diagnose feita com base em sintomas e o resultado do PCR (Ct abaixo de 34,0) (Fig. 7 A), observa-se que, na média, as características ‘amarelecimento da nervura central’, ‘amarelecimento das nervuras secundárias’, ‘engrossamento da nervura central’, ‘engrossamento das nervuras secundárias’, ‘mosqueamento da base para a ponta’ e ‘mosqueamento da ponta para a base’ foram estatisticamente similares

entre si e diferiram das demais características. Desta forma, os sintomas do primeiro grupo de categorias (com níveis de acordo entre sintomas e qPCR acima de 75%) foram denominados ‘sintomas potenciais de HLB’. Os demais sintomas analisados foram classificados em ‘sintomas não potenciais’. O estudo foi conduzido em três lotes de amostras, sem diferenças estatísticas entre lotes.

Análise da Fig. 7 também indica não existir clara associação entre níveis de acerto na diagnose em campo ou título bacteriano na amostra (número de células bactérias por grama de tecido) e categorias de sintomas (Fig. 7B). Comparando-se os títulos médios das amostras das duas classes de sintomas, não se observa diferenças estatísticas entre elas, a não ser para a categoria “folha com sintoma em ‘v’ invertido”. No entanto, maiores variações foram detectadas nas amostras da classe de sintomas não potenciais, demonstrando maior erraticidade nesta classe de sintomas.

#### **4.2 Associação entre a intensidade de sintomas e título bacteriano**

O objetivo foi avaliar se a intensidade do tom de amarelo no limbo foliar estaria associada ao título bacteriano. Para isso, folhas foram removidas de ramos sintomáticos e enviadas ao laboratório onde foram separadas em grupos de 10 por tom de amarelo (Fig. 5) e avaliadas uma a uma por qPCR. Na Figura 8 estão apresentados os resultados.



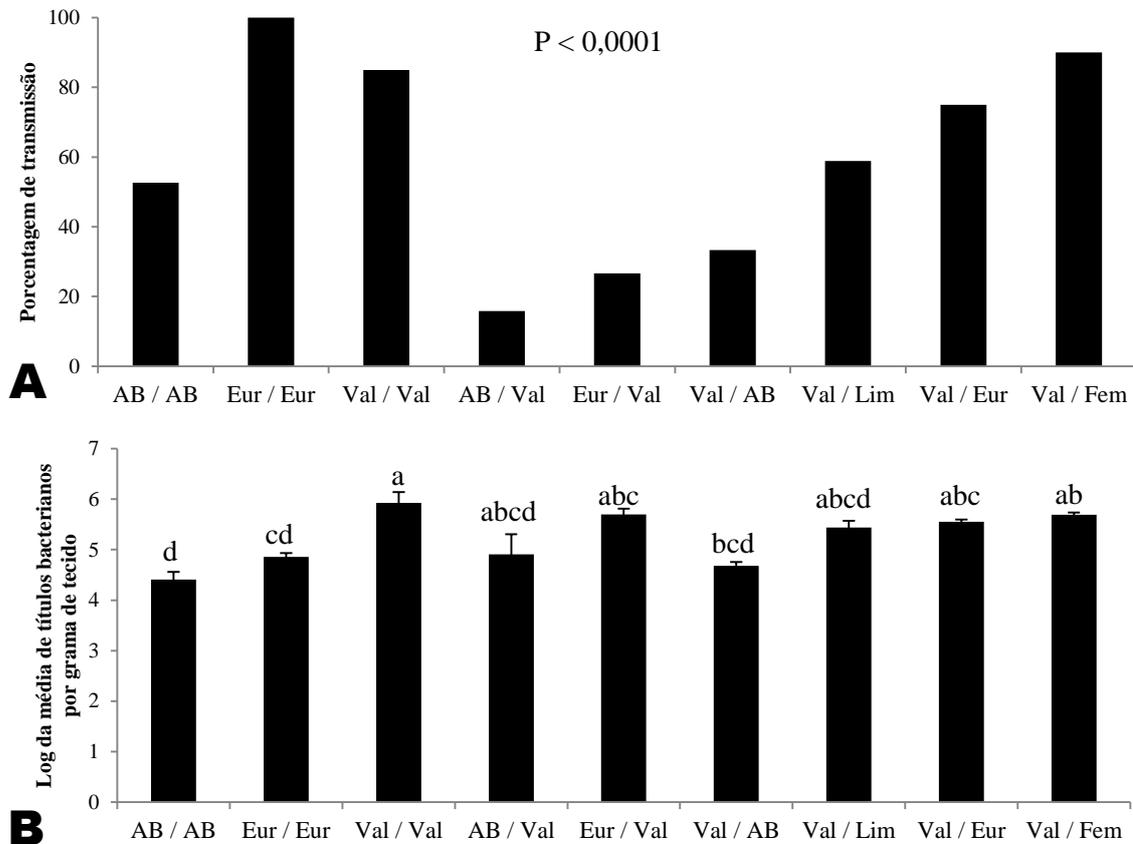
**Figura 8.** Porcentagem média de acerto (A) e título médio de *Ca. L. asiaticus* por grama de tecido (B) em folhas expressando diferentes intensidades de amarelo no limbo foliar. As médias da porcentagem de acerto foram comparadas entre si pelo teste de Qui-quadrado ( e os títulos pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Teste do Qui-quadrado mostrou haver diferenças entre as porcentagens de acerto entre as categorias de sintomas. Todas as folhas verdes com nervuras amarelas foram diagnosticadas como positivo quando analisadas tanto com base em sintomas como por qPCR. As folhas totalmente verdes resultaram em menor nível de acerto, e as com mosqueado leve e totalmente amarelas resultaram em valores intermediários de acerto (75 e 83%).

Quanto aos títulos, análise estatística mostrou haver diferenças entre as categorias de sintomas, com maiores valores para as folhas verdes, mosqueadas e amarelas e menores valores para as folhas verdes com nervuras amarelas. Interessante foi observar que o sintoma verde com nervura amarela, que melhor se correlacionou com o nível de acerto, foi o que resultou em menor valor médio de título bacteriano.

### 4.3 Inoculações

Os objetivos das inoculações foram determinar se a bactéria de limão colonizaria laranja e induziria os mesmos sintomas que a bactéria de laranja, e vice-versa (Fig. 9).



**Figura 9.** Porcentagem de transmissão (A) e log médio de *Ca. L. asiaticus* por grama de tecido (B) nas plantas submetidas a inoculações por enxertia tendo como inóculo ela mesma ou outro hospedeiro. ‘AB’, ‘Eur’ (‘Eureka’), ‘Lim’ (‘Limonera’) e ‘Fem’ (‘Feminello’) são variedades de limão e ‘Val’ (‘Valência’) é variedade de laranja doce. A primeira letra se refere à variedade usada como fonte de inóculo e a segunda se refere à variedade inoculada. As porcentagens de transmissão foram comparadas pelo teste de Qui-quadrado e as médias de títulos bacterianos pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Teste do Qui-quadrado mostrou haver diferenças entre as porcentagens de transmissão entre as combinações planta fonte de inóculo e planta inoculada ( $P < 0,0001$ ), com grande variação na taxa de transmissão entre as diferentes combinações, de 15% para ‘AB/Val’ a 100% para ‘Eur/Eur’. Em geral, em combinações homólogas a taxa de transmissão foi maior do que em combinações heterólogas. Por exemplo, a combinação ‘AB’/‘AB’ resultou em 52,63% de transmissão, porém em 15,79% na combinação ‘AB’/‘Val’. A combinação ‘Eur’/‘Eur’ resultou em 100% de transmissão e em 26,67% na combinação ‘Eur’/‘Val’, e ‘Val’/‘Val’ em 85,0% e porcentagens crescentes para ‘Val’/‘AB’, ‘Val’/‘Lim’, ‘Val’/‘Eur’. A combinação ‘Val’/‘Fem’ resultou em taxa de transmissão (90,0%) superior à própria combinação ‘Val’/‘Val’.

Com relação à concentração da bactéria nas plantas inoculadas, também houve variação – de 4,41 em ‘AB’/‘AB’ a 5,93 em ‘Val’/‘Val’. Quando se compara os hospedeiros inoculados,

não se observou diferenças entre as médias de log dentro de cada hospedeiro, independentemente da origem do inóculo. Ou seja, 'AB', 'Eureka' ou 'Valência' resultaram em valores similares de log, independentemente da origem do inóculo. Quando se compara a origem do inóculo, foram observadas diferenças somente em relação ao inóculo de 'Valência', que resultou em menores valores em 'AB' do que nos demais hospedeiros.

## **5 DISCUSSÃO**

### **5.1 Caracterização de sintomas de HLB em limão verdadeiro**

Este estudo permitiu aprimorar o nível de acerto dos inspetores no campo simplesmente com escolha/separação dos sintomas foliares. Mostrou-se que os sintomas ‘amarelecimento da nervura central’, ‘amarelecimento das nervuras secundárias’, ‘engrossamento da nervura central’, ‘engrossamento das nervuras secundárias’, ‘mosqueamento da base para a ponta’ e ‘mosqueamento da ponta para a base’ estão mais associados ao HLB em limão do que os demais observados no campo e incluídos neste estudo. Embora ainda haja espaço para aprimoramentos, ao reduzir as incertezas dos inspetores durante as vistorias, a caracterização conduzida neste estudo trouxe importantes benefícios para o manejo do HLB em pomares de limão.

O amarelo das folhas em limão por si só não é indicativo da presença do HLB. Isto porque, embora o limoeiro responda rapidamente a correções nutricionais, tanto via solo como via aplicação foliar, a manutenção a cor verde é temporária requerendo correções nutricionais constantes. É por causa disto que a folhagem de plantas de limão apresenta comumente cor amarelada.

O amarelecimento das nervuras, associado ou não à presença de cor amarela mais ou menos expandida paralelamente às nervuras, tanto na central como nas secundárias, é portanto a característica mais marcante que chama, em primeira vista, a atenção dos inspetores para plantas de limão suspeitas de estarem afetadas por HLB. Indica que observação mais detalhada deve ser conduzida por toda a copa. Em geral, com análise mais criteriosa, folhas com outras características passam a ser detectadas na copa. A segunda característica de maior importância é o engrossamento das nervuras. Mostrou-se neste estudo que engrossamento tanto da nervura central como das secundárias (Figura 10) estão intimamente associadas à doença. Esta característica é analisada tanto visualmente como também pelo tato.



**Figura 10.** Características de amarelecimento e engrossamento de nervuras foliares central e secundárias de limão verdadeiro.

Grande dúvida existia anteriormente (antes deste trabalho) em relação a direção do amarelecimento do limbo - se da ponta para a base ou da base para a ponta da folha (Fig. 11). Um grupo de inspetoras era favorável somente ao amarelecimento partindo da base para a ponta da folha e outro grupo não tinha preferência de direção do amarelo. Foram enviadas amostras para análise por PCR e ambos foram aceitos como fundamentais ao diagnóstico correto da doença.



**Figura 11.** Amarelecimentos em folhas de plantas de limão verdadeiro com HLB.

Inúmeras dúvidas existiam anteriormente também no que diz respeito aos mosqueamentos. Esta característica é muito comum em limão, pois conforme experiência prática do autor, o limão responde com rapidez às adubações tanto via solo como via foliar, comparável ao que ocorre com laranja, eliminando-se desta forma os sintomas de deficiência. Em laranjeiras as deficiências são mais fáceis de serem diagnosticadas. Ocorrem uniformemente em toda a área foliar e, por isto, são em geral mais fáceis de serem separadas do mosqueado. Em limão a maioria das deficiências e sintomas reflexos de lesões mecânicas ou patogênicas inicia com mosqueado o qual, nas inspeções visuais, dificultavam a diagnose. Mostrou-se neste trabalho que a maioria das folhas com mosqueado não está associada ao HLB,

desde que estes mosqueamentos ocorram juntamente com nervuras central e secundárias de cor verde. Normalmente esses mosqueamentos desaparecem das folhas com o passar do tempo e dificilmente se associam a amarelecimento de nervuras (Figura 12).



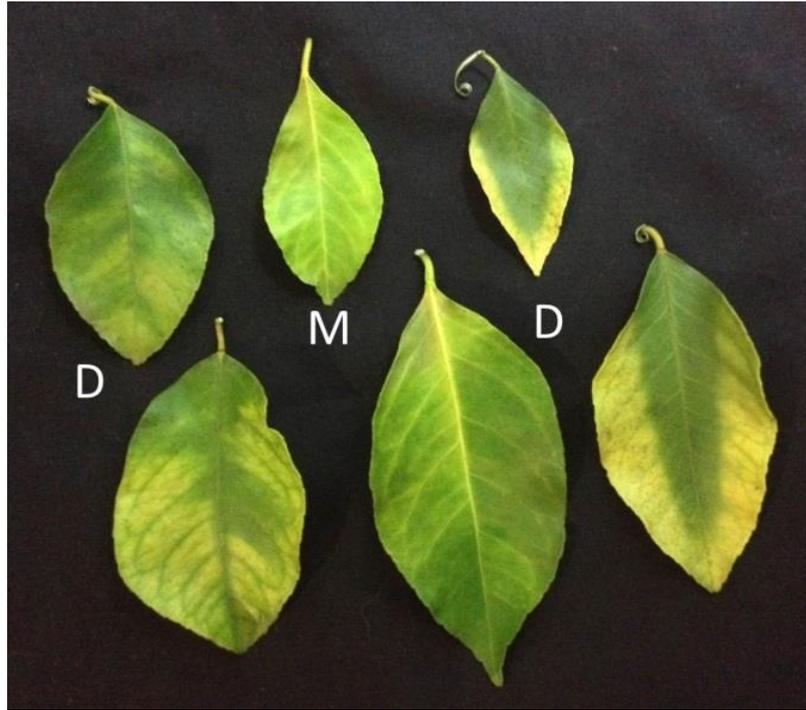
**Figura 12.** Sintomas de deficiência mineral em folhas de limão verdadeiro.

Embora não estudado em detalhes, observações de campo indicam que fruto deformado (assimetria) não contribui para a identificação de plantas de limão com HLB, pois deformação de frutos é característica comum neste hospedeiro. Além disso, diferentemente do que ocorre em frutos de laranjeiras com HLB, a medula central de limões com HLB não se torna totalmente alaranjada, as sementes não ficam murchas, enegrecidas ou com coloração marrom (Figura 13).



**Figura 13.** Sintomas em frutos de limão verdadeiro de plantas sadias que sugerem estar afetadas por HLB.

No segundo lote amostras estudado, 12 características de sintomas foram associadas e revisadas pelas inspetoras. Características que continham nervuras de coloração em tons de verde (escuro ao claro) após resultados de PCR, resultaram em baixa porcentagem de amostras positivas por qPCR, sendo descartadas durante a confecção da figura final onde se separa sintomas de HLB dos de deficiência mineral (Fig. 14).



**Figura 14.** Sintomas foliares de deficiência mineral e de HLB em limão verdadeiro. São mostrados dois grupos de duas folhas com deficiência e um com mosqueado. D = Deficiência mineral; M = Mosqueado

A partir de observações de campo e resultados de todas as análises feitas neste trabalho procurou-se também desenvolver uma escala fotográfica de sintomas de HLB para limão verdadeiro (Fig. 15) que, da mesma maneira que a desenvolvida para laranja (Mendonça, 2015), poderá ser útil em pesquisas e quantificação de sintomas no campo.



**Figura 15.** Escala fotográfica de sintomas foliares progressivos de HLB em limão verdadeiro. S = Sadia; M1 a M4 = Mosqueado de HLB; D1 a D4 = Deficiência mineral.

No campo existem outras características empregadas pelos inspetores em identificar plantas de limão com HLB. Elas são mostradas na Figura 4, porém não foram alvos deste estudo porque ou se trata de sintomas em frutos ou estão presentes no tronco das plantas. Para as inspetoras da fazenda Morrinhos, a coloração interna dos pecíolos é mais uma característica para tomada de decisão ajudando a sanar dúvidas. No entanto, o autor deste trabalho teve dificuldade em separar as folhas com base na cor interna do pecíolo e, portanto, não incluiu amostras com estas características no presente estudo.

Observa-se no campo que plantas com lesões mecânicas ou mesmo afetadas em estágio inicial por outras doenças (gomose e/ou rubelose) induzem sintomas reflexos similares aos de HLB. Neste caso, amostras são coletadas e enviadas ao laboratório, pois não se pode descartar a ocorrência concomitante do HLB e de outras doenças na mesma planta. Seleção de fotografias com diversos tipos de sintomas de HLB pode ser encontrada na Figura 16 no Anexo 1 para serem utilizadas nas inspeções visuais.

## **5.2 Associação entre intensidade de sintomas e título bacteriano**

Separação de folhas com base em tonalidades da cor amarela do limbo é subjetiva e, portanto, varia entre indivíduos. No estudo visando correlação entre intensidade da cor amarela e título bacteriano, a separação das amostras havia sido conduzida pelo autor. As folhas haviam sido coletadas de ramos sabidamente doentes. Maiores títulos foram detectados em folhas com maiores intensidades de amarelo, mas com valores de log (4,68 e 4,79) próximos dos detectados nos demais grupos de folhas (4,08 e 4,51). Poderia se admitir que o amarelo seja o resultado de algum dano na folha provocado por maior concentração de *Liberibacter*. No entanto, folhas totalmente verde apresentaram títulos muito próximos dos encontrados em folhas amarelas, similar ao observado em laranjas doces (Lopes et al, 2009). Em laranja o amarelo nas folhas é resultado do acúmulo de amido que por sua vez, em plantas com HLB, é resultante de bloqueio do floema. Este aspecto ainda não foi, aparentemente, investigado em limão.

## **5.3 Inoculações cruzadas**

*Liberibacter* de limão infectou laranja e vice-versa. Apesar de limão e laranja poder ser infectado em combinações heterólogas, a taxa de transmissão para os três casos estudados foi maior em combinações homólogas. Poderia se suspeitar haver diferenças na composição química do floema desses dois tipos de hospedeiro que venha a afetar o início da infecção resultando nas diferentes taxas de transmissão. No entanto, o fato de combinações heterólogas ter resultado em títulos até maiores que combinações homólogas exclui esta possibilidade.

O principal resultado desta parte do estudo foi, no entanto, ter sido observada transmissão bem sucedida da bactéria entre limões e laranja. Apesar de neste estudo não ter sido empregado o inseto vetor na inoculação, o resultado obtido sugere que, no campo, a bactéria poder estar migrando de um pomar a outro. A importância que um hospedeiro tem para outro como fonte de inóculo não pode ser avaliada neste estudo. Isto porque a transmissão envolve insetos e neste momento não se sabe o nível de atração e de multiplicação dos insetos nestes distintos hospedeiros. Estudos adicionais são necessários para esclarecer esta questão.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os sintomas ‘amarelecimento da nervura central’, ‘amarelecimento das nervuras secundárias’, ‘engrossamento da nervura central’, ‘engrossamento das nervuras secundárias’, ‘mosqueamento da base para a ponta’ e ‘mosqueamento da ponta para a base’ foram os que mais se associaram ao HLB em limão verdadeiro. Escala fotográfica envolvendo os sintomas mencionados foi desenvolvida para uso por inspetores visando facilitar a identificação de plantas com HLB.

Os títulos de *Liberibacter* foram similares em folhas coletadas de ramos doentes com e sem quaisquer sintomas visíveis. Fenômeno similar havia sido observado em plantas de laranja e podem indicar que tecidos assintomáticos de limão podem estar atuando como fontes de *Liberibacter* para plantas sadias de forma similar ao dos tecidos sintomáticos, reforçando a necessidade de constantes vistorias e eliminação das plantas doentes para minimizar este problema e aumentar a efetividade do controle da doença.

*Liberibacter* de plantas de limão infectou plantas de laranja e vice-versa, com maiores porcentagens de infecção em combinações homólogas que heterólogas. A importância que um hospedeiro tem como fonte de inóculo para o outro será mais bem determinada com a inclusão do inseto vetor nos estudos, nos quais, não somente a transmissão da bactéria como também o potencial dos hospedeiros em multiplicar *D. citri* seja investigado.

## REFERÊNCIAS

- Alves, F.L. 1986. Características físicas, químicas e físico-químicas de frutos de cultivares de limão *Citrus limon* (L.) Burm. 206 f. **Dissertação de Mestrado**. Botucatu, SP: Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.
- Bové, J.M. 2006. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. **Journal of Plant Pathology** 88:7-37.
- Coggins, C. 1984. A basic view of the complexities of Lemon production. **Citrograph** 69: 93-7.
- Davis, M.J. Mondal, S.N., Chen, H., Rogers, M.E., Brlansky, R.H. 2008. Co-cultivation of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ with actinobacteria from citrus with huanglongbing. **Plant Disease** 92:1547-1550.
- Fundecitrus. Fundo de Defesa da Citricultura. 2013a. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/noticias/integra/greening-e-responsavel-pela-eliminacao-de-267-milhoes-de-plantas-em-oito-anos/199>>. Acesso em: 15 abr. 2014.
- Fundecitrus. Fundo de Defesa da Citricultura. 2013b. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/noticias/integra/produtores-argentinos-de-limao-visitam-o-fundecitrus-em-busca-de-orientacoes-sobre-o-hlb/202>>. Acesso em 15 abr. 2014.
- Hodgson, R.W. 1967. Horticultural varieties of citrus. In: Reuther, W., Webber, H.J., Batchelor, L.D. Eds. **The Citrus Industry**. California: University of California. cap. 4. p.552-80. v.1.
- Hung, T.H., Hung, S.C., Chen, C.N., Hsu, M.H., Su., H.J. 2004. Detection by PCR of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the bacterium causing citrus huanglongbing in vector psyllids: application to the study of vector-pathogen relationships. **Plant Pathology** 53:96-102.
- Lopes, S.A., Frare, G.F., Yamamoto, P.T., Ayres, A.J. 2006. Ineficácia da poda no controle do huanglongbing dos citros no Brasil. **Huanglongbing-Greening International Workshop**. Ribeirão Preto. 2006. p. 50-50.
- Lopes, S.A., Frare, G.F. 2008. Graft transmission and cultivar reaction of citrus to ‘*Candidatus Liberibacter americanus*’. **Plant Disease** 92:21–24.
- Lopes, S.A., Bertolini, E., Frare, G.F., Martins, E.C., Wulff, N.A., Teixeira, D.C., Fernandes, N.G., Cambra, M. 2009. 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., Camargo, L.E.A., Wulff, N.A., Teixeira, D.C., Bassanezi, R.B., Beattie, G.A.C., Ayres, A.J. 2010. Liberibacters associated with orange jasmine in Brazil: incidence in urban areas and relatedness to citrus liberibacters. **Plant Pathology** 59:1044-1053.
- Mendonça, W.J.Q.F. 2015. Evolução da infecção por *Candidatus Liberibacter asiaticus* e dos

sinomas de huanglongbing em plantas cítricas no sul do Triângulo Mineiro e região central do Estado de São Paulo. 43 f. **Dissertação de Mestrado**. Araraquara SP: Fundo de Defesa da Citricultura.

Moreira, S. 1963. **Citrus varieties in the old collection**. Campinas: Instituto Agrônômico Limeira Experiment Station. 74 p.

Neves, M.F. 1994. Limão: produtos derivados e estratégia de mercado. **Rascunho** 29:43.

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

Reuther, W. (Ed.). 1973. Climate and citrus behavior; monthly temperature and rainfall data for some major citrus-producing regions. In:\_\_\_\_\_. **The citrus industry**. Los Angeles: Univ. California. cap. 9. p.497-504. v. 3.

Sinclair, W. 1984. **The biochemistry and the physiology of the lemon and other citrus fruits**. California: Univ California, Division of Agriculture and Natural Resources. 946 p.

Swingle, W.T., Reece, P.C. 1967. The botany of citrus and its wild relative. In: Reuther, W., Webber, H.J., Batchelor, L.D. (Ed.). **The citrus industry**. Berkeley: University of California, cap. 3. p. 190-430. v. 1.

Teixeira, D. C., Dane, J. L., Eveillard, S., Martins, E. C., Jesus, W. C., Jr., Yamamoto, P. T., Lopes, S. A., Bassanezi, R. B., Ayres, A. J., Saillard, C., and Bové, J. M. 2005. Citrus huanglongbing in São Paulo State, Brazil: PCR detection of the “*Candidatus*” *Liberibacter* species associated with the disease. **Mol. Cell. Probes** 19:173-179.

Van Vuuren, S.P. 1996. Huanglongbing. The oficial name for greening disease of citrus. **Inligtings bulletin Instituut vir Tropiese en Subtropiese Gewasse, Nelspruit, South Africa**. p. 5-6.

Webber, H.J. 1943. Plant characterisitics and climatology. In: Batchelor, L.D., Webber, H.J. (Ed). **The citrus industry**. Berkeley: University of California. p. 41-70. v. 1.

## Anexo 1



**Figura 16.** Seleção de imagens de sintomas de HLB em plantas de limão verdadeiro no campo.