

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Epidemiologia comparativa entre ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ e
‘*Candidatus Liberibacter americanus*’ em ambiente controlado**

Maria Cândida de Godoy Gasparoto

Tese apresentada para a obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Fitopatologia

**Piracicaba
2010**

Maria Cândida de Godoy Gasparoto
Engenheiro Agrônomo

**Epidemiologia comparativa entre ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ e
‘*Candidatus Liberibacter americanus*’ em ambiente controlado**

Orientador:
Prof^a. Dra. **LILIAN AMORIM**

Tese apresentada para a obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Fitopatologia

**Piracicaba
2010**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Gasparoto, Maria Cândida de Godoy

Epidemiologia comparativa entre `*Candidatus* Liberibacter asiaticus` e `*Candidatus* Liberibacter americanus` em ambiente controlado / Maria Cândida de Godoy Gasparoto. - - Piracicaba, 2010.
109 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.

1. Bactérias fitopatogênicas - Epidemiologia 2. Frutas cítricas 3. Greening (Doença de planta) 4. Insetos vetores 5. Laranja 6. Plantas hospedeiras I. Título

CDD 632.32
G249e

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

*Aos meus pais, Yeda e Mauri,
por todo amor, carinho, dedicação e apoio.*

*Ao Roberson,
por seu amor, companheirismo, tolerância,
respeito e admiração mútua.*

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial ao meu irmão Murilo, minha Vó Mima e a minha afilhada Maria Laura pelo amor e carinho de vocês.

À Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz' por minha formação profissional (graduação, mestrado e doutorado).

À Profa. Dra. Lilian Amorim pela convivência agradável, pelos muitos conselhos (pessoais e profissionais), pelas oportunidades que me proporcionou e pelos ensinamentos que me foram transmitidos.

Ao Prof. Dr. Armando Bergamin Filho pelo prazer de tê-lo como professor de epidemiologia e pela oportunidade de trabalhar em seu projeto.

Ao Prof. Dr. Bernhard Hau pela rápida, porém enriquecedora oportunidade de trabalhar ao seu lado. À sua esposa Heide pela atenção oferecida durante minha estada em Hannover/Alemanha.

À minha grande amiga, Silvia de Afonseca Lourenço, pelo companheirismo, pelas conversas, pela ajuda constante e por todos os momentos que passamos juntas.

Ao meu amigo - irmão Júlio Barbosa por sua amizade sincera.

Ao amigo Fabrício Packer por nossa amizade e pelas sugestões na elaboração da tese.

Aos colegas do Departamento de Fitopatologia, em especial aos amigos Alécio Moreira e Geraldo Junior, e às amigas Ana Raquel Soares, Sylvania Moraes, Daniela Flôres, Ana Paula Melo e Isolda Hass.

Aos estagiários da epidemiologia Juliana Baggio, Felipe Borezstein e Isabela Primiano.

Às amigas, dos momentos de alegria e tristeza, Thaís Martins e Maria Cristina Rappussi.

Aos amigos Luiz Montesino e Guilherme Frare pela ajuda essencial no andamento deste trabalho.

Ao Fundecitrus, na pessoa do pesquisador Dr. Renato Beozzo Bassanezi e ao Centro Apta Citros, na pessoa do pesquisador Dr. Helvecio Della Coletta Filho.

Aos funcionários do Departamento Científico do Fundecitrus, em especial à MSc. Elaine Martins e ao pesquisador Dr. Nelson Wulff.

Aos professores e funcionários do Departamento de Fitopatologia.

À FAPESP pela concessão da bolsa de doutorado.

“The greater our knowledge increases the more our ignorance unfolds.”
(John F. Kennedy)

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	15
REFERÊNCIAS.....	19
2 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA INFECÇÃO E NA EXPRESSÃO DOS SINTOMAS DE HUANGLONGBING EM AMBIENTE CONTROLADO	25
Resumo	25
Abstract	27
2.1 Introdução	29
2.2 Desenvolvimento.....	30
2.2.1 Revisão Bibliográfica.....	30
2.2.2 Material e Métodos.....	34
2.2.2.1 Plantas	34
2.2.2.2 Tratamentos	35
2.2.2.3 Avaliações	35
2.2.3 Resultados	36
2.2.4 Discussão.....	42
2.3 Conclusões.....	46
Referências	47
3 PROGRESSO ESPAÇO-TEMPORAL DO HUANGLONGBING EM CONDIÇÕES DE TELADO E COM DUAS DIFERENTES FONTES DE INÓCULO	51
Resumo	51
Abstract	53
3.1 Introdução	55
3.2 Desenvolvimento.....	57
3.2.1 Revisão Bibliográfica.....	57
3.2.2 Material e Métodos.....	62
3.2.2.1 Local.....	62
3.2.2.2 Plantas	62

3.2.2.3 Insetos	66
3.2.2.4 Avaliações	67
3.2.2.5 Análise dos dados.....	68
3.2.3 Resultados.....	70
3.2.4 Discussão	88
3.3 Conclusões	97
Referências.....	98
ANEXOS.....	105

RESUMO

Epidemiologia comparativa entre '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' e '*Candidatus Liberibacter americanus*' em ambiente controlado

Huanglongbing é a mais destrutiva doença da citricultura mundial. Seu recente relato no Brasil, em 2004, e a detecção de duas espécies bacterianas associadas à doença - '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' e '*Candidatus Liberibacter americanus*' - resultaram em poucos estudos do comportamento do Huanglongbing nas condições dos pomares brasileiros. Os objetivos deste trabalho foram (i) comparar a eficiência de infecção por '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' e '*Candidatus Liberibacter americanus*' em plantas cítricas inoculadas por meio de enxertia com as duas espécies bacterianas, separadamente, e mantidas sob diferentes temperaturas, e (ii) comparar o progresso temporal e espacial do Huanglongbing causado por ambas as espécies, a partir da infecção natural por *Diaphorina citri*, tendo plantas de citros ou *Murraya paniculata* (murta) como fonte primária de inóculo. Para alcançar o primeiro objetivo, dois experimentos foram conduzidos em câmaras de crescimento com temperatura e fotofase controladas. A incidência da doença foi determinada por Real-Time PCR de amostras foliares. As temperaturas mais amenas foram favoráveis à infecção por '*Candidatus Liberibacter americanus*', enquanto que altas temperaturas não afetaram a infecção de '*Candidatus Liberibacter asiaticus*'. A eficiência de infecção para esta última espécie foi favorecida nas temperaturas de 17/22°C e 22/27°C (noturna/diurna, respectivamente). Para cumprir com o segundo objetivo, um experimento foi conduzido com diferentes fontes de inóculo, que corresponderam aos seguintes tratamentos: (i) plantas de laranja doce da variedade Natal infectadas por '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' ou '*Candidatus Liberibacter americanus*', (ii) unicamente plantas de *Murraya paniculata* infectadas por '*Candidatus Liberibacter americanus*' e (iii) unicamente plantas de laranja doce da variedade Natal infectadas por '*Candidatus Liberibacter americanus*'. Cada tratamento foi aplicado em um compartimento isolado de uma casa-de-vegetação. O primeiro tratamento foi repetido. Em todos os compartimentos, 156 a 158 plantas de laranja doce da variedade Valência foram dispostas ao redor das plantas fonte de inóculo. Psilídeos livres das bactérias foram periodicamente confinados em plantas fonte de inóculo e, posteriormente foram liberados na casa-de-vegetação para livre movimentação e multiplicação. Quando as duas espécies bacterianas estavam presentes nas diferentes plantas cítricas utilizadas como fonte de inóculo, houve maior detecção de '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' e maior eficiência de aquisição desta espécie bacteriana por psilídeos. Quando somente '*Candidatus Liberibacter americanus*' estava presente nas plantas fonte de inóculo, a eficiência de transmissão foi maior quando *Murraya paniculata* foi utilizada como fonte de inóculo, mostrando que *Diaphorina citri* pode adquirir naturalmente '*Candidatus Liberibacter*

americanus' de *Murraya paniculata* e transmiti-la para plantas cítricas. A eficiência de aquisição da espécie 'Candidatus *Liberibacter americanus*' também foi maior tendo *Murraya paniculata* como planta fonte de inóculo e não citros.

Palavras-chave: Greening; *Citrus* spp.; Murta

ABSTRACT

Comparative epidemiology between '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' and '*Candidatus Liberibacter americanus*' under controlled environment

Huanglongbing is the most destructive disease of citrus worldwide. There are few studies on the behavior of Huanglongbing in the Brazilian orchards conditions due to the recent report in Brazil, in 2004. Two bacterial species were associated with the disease in Brazil: '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' and '*Candidatus Liberibacter americanus*'. The aims of this work were (i) to compare the efficiency of infection by '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' and '*Candidatus Liberibacter americanus*' in citrus graft-inoculated plants with both bacterial species, separately, and kept under different temperatures, and (ii) to compare the spatio-temporal progress of Huanglongbing caused by both species, naturally transmitted by *Diaphorina citri*, having infected citrus plants or *Murraya paniculata* (jasmine orange) as primary inoculum sources. To achieve the first objective, two experiments were carried out in plant growth chambers with controlled temperature and light. Disease incidence in the inoculated plants was determined by Real-Time PCR of the leaf samples. The milder temperatures were favorable to '*Candidatus Liberibacter americanus*' infection, while the higher temperatures did not affect the infection by '*Candidatus Liberibacter asiaticus*'. The infection by this latter species was favored by temperatures of 17/22°C and 22/27°C (night/day, respectively). To achieve the second objective, an experiment was carried out with different sources of inoculum, corresponding to the following treatments: (i) 'Natal' sweet orange plants infected by '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' or '*Candidatus Liberibacter americanus*', (ii) only *Murraya paniculata* plants infected by '*Candidatus Liberibacter americanus*' and (iii) only 'Natal' sweet orange plants infected by '*Candidatus Liberibacter americanus*'. Each treatment was applied in an isolated compartment of a greenhouse. The first treatment was repeated. In all of the compartments, from 156 to 158 Valencia sweet orange plants were located around the source of inoculum plants. Psyllids free of the bacteria were periodically confined in source of inoculum plants and, after this period, they were set free, and allowed to the free movement and multiplication inside the greenhouse. When both bacterial species were present in the different citrus plants as source of inoculum, there was higher detection of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' than '*Candidatus Liberibacter americanus*' and higher acquisition efficiency of the former bacterial species than the later by psyllids. When only '*Candidatus Liberibacter americanus*' was present in the source of inoculum plants, the higher transmission efficiency was reached when *Murraya paniculata* served as source of inoculum, showing that *Diaphorina citri* can naturally acquire '*Candidatus Liberibacter americanus*' from *Murraya paniculata* and transmit it to citrus plants. The acquisition efficiency of the

'*Candidatus Liberibacter americanus*' species was higher with *Murraya paniculata* as source of inoculum than with citrus plants was the source of inoculum.

Keywords: Greening; *Citrus* spp.; Jasmine orange

1 INTRODUÇÃO

O Huanglongbing (do chinês, “doença do ramo amarelo”), provavelmente, tem como origem a China (DA GRAÇA, 1991; BOVÉ, 2006), apesar de alguns relatos apontarem sua origem na Índia (HALBERT; MANJUNATH, 2004). No Brasil, o primeiro relato da doença foi em 2004 em pomares de laranja doce no Estado de São Paulo (COLLETA-FILHO et al., 2004). Foi a primeira constatação da doença no continente americano. Duas espécies foram detectadas: ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ (COLLETA-FILHO et al., 2004) e ‘*Candidatus Liberibacter americanus*’ (TEIXEIRA et al., 2005). Em 2005 ocorreu a primeira detecção da doença em Minas Gerais e em 2007 no Paraná (BELASQUE JUNIOR et al., 2009). A espécie asiática está presente, além da Ásia (DA GRAÇA, 1991; BOVÉ, 2006), no Brasil (COLLETA-FILHO et al., 2004) , na Flórida (HALBERT, 2005), em Cuba (MARTINEZ et al., 2009) e no México (BASSANEZI et al., 2010). A espécie americana foi detectada, até o momento, somente no Brasil (TEIXEIRA et al., 2005).

O Huanglongbing está associado a três espécies de bactérias, todas incitando, aparentemente, os mesmos sintomas em plantas cítricas. Essas bactérias são Gram negativas, de colonização restrita ao floema das plantas, de difícil cultivo *in vitro* (DAVIS et al., 2008; SECHLER et al., 2009) e são denominadas de acordo com o continente em que foram primeiramente detectadas: ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ (JAGOUEIX; BOVÉ; GARNIER, 1996), ‘*Candidatus Liberibacter africanus*’ (JAGOUEIX; BOVÉ; GARNIER, 1996) e ‘*Candidatus Liberibacter americanus*’ (TEIXEIRA et al., 2005)

No Brasil, além de ‘*Candidatus Liberibacter americanus*’ e ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’, um fitoplasma está associado aos sintomas do Huanglongbing, o qual através da análise do DNA ribossomal 16S (rDNA 16S) apresentou 99% de identidade com o *Pigeon Pea Witches’ broom Phytoplasma* pertencente ao grupo IX 16Sr na classificação dos fitoplasmas (TEIXEIRA et al., 2008).

As bactérias associadas ao Huanglongbing são transmitidas por duas espécies de psíldeos, pequenos insetos de dois a três milímetros de comprimento: *Diaphorina citri* é o vetor da espécie asiática (CAPOOR; RAO; VISWANATH, 1967) e americana (YAMAMOTO et al., 2006) da doença e *Trioza erytreae* é o vetor da espécie africana

(McCLEAN; OBERHOLZER, 1965). *Diaphorina citri* tem muitos hospedeiros na família *Rutaceae*, porém seus hospedeiros preferenciais são as plantas cítricas e a planta ornamental *Murraya paniculata* (conhecida vulgarmente como murta) (HALBERT; MANJUNATH, 2004). No Brasil, *Murraya paniculata* também é hospedeira das espécies asiática (LOPES, MARTINS, FRARE, 2006) e americana (LOPES, MARTINS, FRARE, 2005) de 'Candidatus Liberibacter'. 'Candidatus Liberibacter americanus' (GASPAROTO et al., 2010) e 'Candidatus Liberibacter asiaticus' (DAMSTEEG et al., 2010) podem ser naturalmente transmitidas de plantas de murta para citros.

Os sintomas iniciais da doença apresentam-se como um ou poucos ramos com folhas amareladas, geralmente em poucas plantas do pomar. As folhas dos ramos sintomáticos perdem parte de sua coloração verde, mostrando-se parcialmente amarelas, sem delimitação evidente entre as áreas verdes e amarelas. Este sintoma característico da doença é denominado de mosqueado e foi observado em todos os locais onde a doença foi encontrada, independentemente do agente causal, do hospedeiro e da condição ambiental (BOVÉ, 2006). As folhas de ramos sintomáticos podem apresentar-se curvadas, de tamanho reduzido, com nervuras mais grossas e escurecidas. Em estádios mais avançados da doença podem ocorrer desfolha e morte de ponteiros. Frutos de ramos sintomáticos podem apresentar-se de tamanho reduzido, assimétricos, incompletamente maduros e com a região estilar mantendo-se verde, diferentemente de frutos de ramos sadios. Cortes perpendiculares ao eixo desses frutos permitem a observação de assimetria dos mesmos e também de sementes abortadas e vasos alaranjados (BELASQUE et al., 2009).

O Huanglongbing não provoca a morte das plantas, as quais, com o passar dos anos, ficam debilitadas e improdutivas. Observações de pomares afetados em diferentes regiões citrícolas do mundo, inclusive em São Paulo, revelam que pomares inteiros podem tornar-se inviáveis economicamente entre sete e dez anos após o aparecimento da primeira planta sintomática, se medidas de controle não forem adotadas. Esse tempo pode ser menor para pomares jovens, de até quatro anos, os quais se tornam economicamente inviáveis em até cinco anos (GOTTWALD et al., 2007).

Os danos causados pelo Huanglongbing na produção de plantas doentes são consideráveis e o controle do psíldeo vetor da doença é bastante difícil e tem onerado os custos de produção de vários países onde ocorre de forma endêmica. Nestes países da Ásia e da África, a doença é apontada como a principal causa da perda de produção e de árvores (DA GRAÇA, 1991). Vários milhões de árvores foram e continuam sendo perdidas na Índia (FRASER et al., 1966), nas Filipinas (MARTINEZ; WALLACE, 1969; REDDY, 1971; ALTAMIRANO; GONZALES; VINAS, 1976), na Tailândia (BHAVAKUL et al., 1981), em Taiwan (SU; CHANG, 1976), na Indonésia (SALIBE; TIRTAWIDJAJA, 1984), no sudoeste da Arábia Saudita (BOVÉ, 1986) e na África do Sul (OBERHOLZER; VON STADEN; BASSON, 1965; SCHWARZ, 1967).

As plantas doentes declinam, a produção é reduzida e a qualidade do fruto é afetada. Com o aumento da severidade da doença, a produção é reduzida, principalmente pela queda precoce dos frutos de ramos doentes. Usualmente a redução na produção relativa é proporcionalmente maior que a área da planta com sintomas (BASSANEZI et al., 2009). Frutos sintomáticos são significativamente menores (redução no diâmetro e altura) que frutos normais e apresentam redução na concentração de sólidos solúveis totais e aumento da acidez (BASSANEZI; MONTESINO; STUCHI, 2009).

Embora sejam transmitidas pelo mesmo vetor (*Diaphorina citri*) e tenham *Murraya paniculata* como hospedeiro alternativo, as duas espécies bacterianas detectadas no Brasil, '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' e '*Candidatus Liberibacter americanus*', não se comportam da mesma maneira no que se refere à capacidade de transmissão, colonização e agressividade (LOPES et al., 2009a; LOPES et al., 2009b). Neste contexto, estudos epidemiológicos comparativos devem ser realizados para avaliar o progresso espaço-temporal da doença quando causada por uma ou outra espécie da bactéria e quando proveniente de uma ou outra fonte de inóculo (citros ou murta), além de estudos do comportamento das diferentes espécies bacterianas em condições de temperatura encontradas nos pomares brasileiros.

REFERÊNCIAS

ALTAMIRANO, D.M.; GONZALES, C.I.; VINAS, R.C. Analysis of the devastation of leaf-mottling (greening) disease of citrus and its control program in the Philippines. In: INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS (IOCV), VII, 1976, Riverside. **Proceedings ...** Riverside: IOCV, 1976. p.22-26.

BASSANEZI, R.B.; MONTESINO, L.H.; AMORIM, L.; GASPAROTO, M.C.G.; BERGAMIN FILHO, A. Yield reduction caused by Huanglongbing in different sweet orange cultivars in São Paulo, Brazil. In: INTERNATIONAL RESEARCH CONFERENCE ON HUANGLONGBING, 2008, Orlando. **Proceedings ...** Orlando: Plant Management Network, 2009. p. 270-273.

BASSANEZI, R.B.; MONTESINO, L.H.; STUCHI, E.S. Effects of Huanglongbing on fruit quality of sweet orange cultivars in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 125, p. 565-572, 2009.

BASSANEZI, R.B.; LOPES, S.A.; BELASQUE JUNIOR, J.; SPÓSITO, M.B.; YAMAMOTO, P.T.; MIRANDA, M.P.; TEIXEIRA, D.C.; WULFF, N.A. Epidemiologia do Huanglongbing e suas implicações para o manejo da doença. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v. 31, n. 1, p. 11-23, 2010.

BELASQUE JUNIOR, J.; BERGAMIN FILHO, A.; BASSANEZI, R.B.; BARBOSA, J.C.; GIMENES-FERNANDES, N.; YAMAMOTO, P.T.; LOPES, S.A.; MACHADO, M.A.; LEITE JUNIOR, R.P.; AYRES, A.J.; MASSARI, C.A. Base científica para a erradicação de plantas sintomáticas e assintomáticas de Huanglongbing (HLB, greening) visando o controle efetivo da doença. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 34, n. 3, p. 137-145, 2009.

BHAVAKUL, K.; INTAVIMOLSRI, S.; VICHITRANANDA, S.; KRATUREUK, C.; PROMMINTARA, M. The current citrus disease situation in Thailand with emphasis on citrus greening. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 1981, Tokyo. **Proceedings ...** Tokyo: International Society of Citriculture 1981, v. 1, p. 464-466.

BOVÉ, J.M. Greening in the Arab Peninsula: towards new techniques for its detection and control. **FAO Plant Protection Bulletin**, Rome, v. 34, p. 7-14, 1986.

BOVÉ, J.M. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 88, p. 7-37, 2006.

CAPOOR, S.P.; RAO, D.G.; VISWANATH, S.M. *Diaphorina citri* Kuwayama., a vector of greening disease of citrus in India. **Indian Journal of Agricultural Science**, v. 37, p. 572-576, 1967.

COLLETA-FILHO, H.D.; TAGON, M.L.P.N.; TAKITA, M.A.; DE NEGRI, J.D.; POMPEU JÚNIOR, J.; CARVALHO, A.S.; MACHADO, M.A. First report of the causal agent of Huanglongbing ('*Candidatus Liberibacter asiaticus*') in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 88, p.1382, 2004.

DA GRAÇA, J.V. Citrus greening disease. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 29, p. 109-136, 1991.

DAMSTEEGT, V.D.; POSTNIKOVA, E.N.; STONE, A.L.; KUHLMANN, M.; WILSON, C.; SCHAAD, N.W.; BRLANSKY, R.H.; SCHNEIDER, W.L. *Murraya paniculata* and related species as potential hosts and inoculum reservoirs of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*', causal agent of Huanglongbing. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 94, n. 5, p. 528-533, 2010.

DAVIS, M.J.; MONDAL, S.N.; CHEN, H.; ROGERS, M.E; BRLANSKY, R.H. Co-cultivation of "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" with *actinobacteria* from citrus with Huanglongbing. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 92, n. 11, p.1547–1550, 2008.

FRASER, L.R.; SINGH, D.; CAPOOR, S.P.; NARIANI, T.K. Greening virus, the likely cause of citrus dieback in India. **FAO Plant Protection Bulletin**, Rome, v.14, p. 127-130, 1966.

GASPAROTO, M.C.G.; BASSANEZI, R.B.; AMORIM, L.; MONTESINO, L.H.; LOURENÇO, S.A.; WULFF, N.A.; TEIXEIRA, D.C.; MARIANO, A.G.; MARTINS, E.C.; LEITE, A.P.R.; BERGAMIN FILHO, A. First report of 'Candidatus Liberibacter americanus' transmission from *Murraya paniculata* to sweet orange (*Citrus sinensis*) by Asian Citrus psyllid (*Diaphorina citri*). **Journal of Plant Pathology**, Bari, 2010. In press.

GOTTWALD, T.R.; DA GRAÇA J.V.; BASSANEZI, R.B. 2007. Citrus Huanglongbing: the pathogen and its impact. Plant Health Progress 6 September 2007. Online (doi: 10.1094/PHP-2007-0906-01-RV).

HALBERT, S.E.; MANJUNATH, K.L. Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: a literature review and assessment of risk in Florida. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 87, p. 330-353, 2004.

HALBERT, S.E. The discovery of Huanglongbing in Florida. In: INTERNATIONAL CITRUS CANKER AND HUANGLONGBING RESEARCH WORKSHOP, II, 2005, Orlando. **Proceedings ...** 2005. p.50.

JAGOUÉIX, S.; BOVÉ, J.P.; GARNIER, M. PCR detection of the two 'Candidatus' liberobacter species associated with greening disease of citrus. **Molecular and Cellular Probes**, London, v. 10, n. 1, p. 43-50, 1996.

LOPES, S.A.; MARTINS, E.C.; FRARE, G.F. Detecção de 'Candidatus Liberibacter americanus' em *Murraya paniculata*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 31, p. 48-49, 2005.

LOPES, S.A.; MARTINS, E.C.; FRARE, G.F. Detecção de 'Candidatus Liberibacter asiaticus' em *Murraya paniculata*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, 2006.

LOPES, S.A.; FRARE, G.F.; BERTOLINI, E.; CAMBRA, M.; FERNANDES, N.G.; AYRES, A.J.; MARIN, D.R. Liberibacters associated with Citrus Huanglongbing in Brazil: 'Candidatus Liberibacter asiaticus' is heat tolerant, 'Candidatus Liberibacter americanus' is heat sensitive. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 93, n.3, p.257-262, 2009a.

LOPES, S.A.; BERTOLINI, E.; FRARE, G.F.; MARTINS, E.C.; WULFF, N.A.; TEIXEIRA, D.C.; FERNANDES, N.G.; CAMBRA, M. Graft transmission efficiencies and multiplication of '*Candidatus Liberibacter americanus*' and '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' in citrus plants. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 99, n. 3, p. 301-306, 2009b.

MARTINEZ, A.L.; WALLACE, J.M. Citrus greening disease in the Philippines. In: INTERNATIONAL CITRUS SYMPOSIUM, 1, 1969, Riverside. **Proceedings ...** Riverside: University of California, 1969. v. 3, p. 1427-1431.

MARTÍNEZ, Y.; LLAUGER, R.; BATISTA, L.; LUIS, M.; IGLESIA, A.; COLLAZO, C.; PEÑA, I.; CASÍN, J.C.; CUETO, J.; TABLADA, L.M. First report of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' associated with Huanglongbing in Cuba. **Plant Pathology**, Oxford, v. 58, p. 389, 2009.

McCLEAN, A.P.D.; OBERHOLZER, P.C.J. Citrus psylla, a vector of the greening disease of sweet orange. **South Africa Journal of Agricultural Science**, v. 8, p. 297-298, 1965.

OBERHOLZER, P.C.J.; VON STADEN, D.F.A.; BASSON, W.J. Greening disease of sweet orange in South Africa. In: International Organization of Citrus Virologists (IOCV), III, 1965, Gainesville. **Proceedings ...** Gainesville: University of Florida, 1965. p. 213-219.

REDDY, D.B. Outbreaks of pests and diseases and new records. **FAO Q. Newsletter**, Plant Protection Communication SE Asia Pac. Reg. v. 14, p. 5-15, 1971.

SALIBE, A.A.; TIRTAWIDJAJA, S. Incidência da doença "greening" em variedades cítricas na Indonésia. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.10, p. 35, 1984.

SCHWARZ, R.E. Results of greening survey on sweet orange in the major citrus growing areas of the Republic of South Africa. **South Africa Journal of Agricultural Science**, v. 10, p. 471-476, 1967.

SECHLER, A.; SCHUENZEL, E.L.; COOKE, P.; DONNUA, S.; THAVEECHAI, N.; POSTNIKOVA, E.; STONE, A.L.; SCHNEIDER, W.L.; DAMSTEEGT, V.D.; SCHAAD, N.W. Cultivation of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*', '*Ca. L. africanus*', and '*Ca. L. americanus*' associated with Huanglongbing. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 99, n.5, p. 480-486, 2009.

SU, H.J.; CHANG, S.C. The responses of the likubin pathogen to antibiotics and heat therapy. In: INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS (IOCV), VII, 1976, Riverside. **Proceedings ...** Riverside: IOCV, 1976. p. 27-34.

TEIXEIRA D.C.; DANET J.L.; EVEILLARD, S.; MARTINS, E.C.; JESUS JUNIOR, W.C.; YAMAMOTO, P.T.; LOPES, S.A.; BASSANEZI, R.B.; AYRES, A.J.; SAILLARD, C.; BOVÉ, J.M.. Citrus Huanglongbing in São Paulo State, Brazil: PCR detection of the '*Candidatus Liberibacter*' species associated with the disease. **Molecular and Cellular Probes**, London, v. 19, p. 173-179, 2005.

TEIXEIRA, D.C.; WULFF, N.A.; MARTINS, E.C.; KITAJIMA, E.W.; BASSANEZI, R.B.; AYRES, A.J.; EVEILLARD, S.; SAILLARD, C.; BOVÉ, J.M. A Phytoplasma closely related to the *Pigeon Pea Witches' broom Phytoplasma* (16Sr IX) is associated with citrus Huanglongbing symptoms in the state of São Paulo, Brazil. **Phytopathology**, Saint Paul, v.98, n.9, p. 977-984, 2008.

YAMAMOTO, P.T.; FELIPPE M. R.; GARBIM, L.F.; COELHO, J.H.C.; MARTINS, E.C.; LEITE, A.P.R.; SOUSA, M.C.; ABRAHÃO, D.P.; BRAZ, J.D. *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera: Psyllidae): vector of the bacterium '*Candidatus Liberibacter americanus*'. In: HUANGLONGBING - GREENING INTERNATIONAL WORKSHOP, 2006, Ribeirão Preto. **Proceedings ...** Ribeirão Preto: 2006. p. 25-26

2 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA INFECÇÃO E NA EXPRESSÃO DOS SINTOMAS DE HUANGLONGBING EM AMBIENTE CONTROLADO

Resumo

Huanglongbing teve seu primeiro relato no Brasil em 2004 em pomares de laranja doce no Estado de São Paulo. Duas espécies bacterianas foram detectadas nas árvores afetadas pela doença: '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' e '*Candidatus Liberibacter americanus*'. Devido sua recente descoberta no Brasil, estudos do comportamento do Huanglongbing nas condições encontradas nos pomares brasileiros são necessários a fim de entender melhor a epidemiologia da doença. O objetivo deste trabalho foi comparar a eficiência de infecção por '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' e '*Candidatus Liberibacter americanus*' em mudas cítricas da variedade Valência inoculadas separadamente com as duas espécies bacterianas, e mantidas sob diferentes temperaturas. As mudas foram inoculadas por enxertia de borbulhas infectadas e, imediatamente após a enxertia, foram transferidas para câmaras de crescimento sob as seguintes condições de temperaturas noturna/diurna: 17/22°C, 22/27°C e 27/32°C, e fotofase noturna/diurna de 8/16h. Foram utilizadas catorze mudas por tratamento, além de quatro plantas controle (enxertadas com borbulhas provenientes de ramos de plantas sadias), em cada câmara de crescimento. Amostras foliares foram submetidas à Real-Time PCR para confirmação da infecção bacteriana. A eficiência de infecção para cada bactéria, nas diferentes temperaturas, foi calculada. Independentemente das temperaturas estudadas, '*Candidatus Liberibacter americanus*' teve menor eficiência de infecção que '*Candidatus Liberibacter asiaticus*'. Temperaturas mais amenas foram favoráveis à infecção por '*Candidatus Liberibacter americanus*', enquanto que altas temperaturas não afetaram a infecção por '*Candidatus Liberibacter asiaticus*', a qual pode ser detectada em plantas mantidas em todas as temperaturas estudadas. A eficiência de infecção para esta última espécie foi favorecida nas temperaturas de 17/22°C e 22/27°C. O sintoma de mosqueado foliar, característico de Huanglongbing em plantas de laranja doce em condições de campo, não foi observado em nenhuma das plantas enxertadas. Deficiência mineral, folhas pouco desenvolvidas, coriáceas e em pequeno número foram os sintomas geralmente observados em plantas infectadas por '*Candidatus Liberibacter asiaticus*'. Para plantas infectadas por '*Candidatus Liberibacter americanus*' o sintoma predominantemente encontrado foi de intensa clorose foliar.

Palavras-chave: Enxertia; *Citrus* sp.; Greening

INFLUENCE OF TEMPERATURE ON HUANGLONGBING INFECTION AND SYMPTOM EXPRESSION UNDER CONTROLLED ENVIRONMENT

Abstract

In Brazil, Huanglongbing was first reported in 2004 in sweet orange orchards in São Paulo State. Two bacterial species were detected in affected trees in Brazil: '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' and '*Candidatus Liberibacter americanus*'. Due to the recent discovery in Brazil, studies on the Huanglongbing behavior in the conditions found in Brazilian orchards are necessary in order to better understand the disease epidemiology. The objective of this work was to compare the efficiency of infection by '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' and '*Candidatus Liberibacter americanus*' in 'Valencia' citrus seedlings inoculated separately with both bacterial species, and kept under different temperatures. The seedlings were grafted with infected budsticks and, immediately after, they were transferred to growth chambers under the following conditions of night/day temperatures: 17/22°C, 22/27°C and 27/32°C, and a dark/light photoperiod of 8/16h. Fourteen seedlings were used per treatment in addition to four control seedlings (grafted with budsticks from shoots of healthy plants), in each growth chamber. Leaf samples were submitted to Real-Time PCR to confirm the bacterial infection. The efficiency of infection with each bacterium, in the different temperatures, was calculated. Regardless of temperatures studied, '*Candidatus Liberibacter americanus*' had lower efficiency of infection than '*Candidatus Liberibacter asiaticus*'. The milder temperatures were favorable to '*Candidatus Liberibacter americanus*' infection, while the higher temperatures did not affect the infection by '*Candidatus Liberibacter asiaticus*', which can be detected in plants kept in all studied temperatures. The efficiency of infection by this latter species was favored in the temperatures of 17/22°C and 22/27°C. The leaf mottling symptom, characteristic of Huanglongbing in sweet orange plants in field conditions, was not observed in any of the grafted plants. Mineral deficiency, poorly developed leaves, coriaceous and in small number were the usually observed symptoms in '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' infected plants. '*Candidatus Liberibacter americanus*' infected plants showed strong leaf chlorosis as predominant symptom.

Keywords: Grafting; *Citrus* sp.; Greening

2.1 Introdução

No Estado de São Paulo, duas bactérias restritas ao floema das plantas infectadas estão associadas aos sintomas de Huanglongbing: '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' e '*Candidatus Liberibacter americanus*'. Desde seu relato em pomares paulistas no ano de 2004 até 2007, '*Candidatus Liberibacter americanus*' prevalecia entre as plantas infectadas, estando presente em quase 90% das amostras em 2005 e decaindo para 60% das amostras em 2007 (COLETTA-FILHO et al., 2010). A partir de 2008, a situação inverteu-se, prevalecendo, atualmente, plantas infectadas por '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' nos pomares do Estado de São Paulo (BOVÉ et al., 2009).

Levantamentos anuais realizados pelo Fundecitrus nos anos de 2004, 2007, 2008 e 2009 mostram um aumento da incidência da doença no tempo. Em 2004 apenas 3,4% dos talhões do Estado apresentavam a doença e em 2009 este número subiu para, aproximadamente, 24% (BELASQUE JUNIOR et al., 2010). O número de municípios paulistas afetados pela doença também subiu de 15 em 2004 para 216 em 2009 (FUNDECITRUS, 2010). No primeiro levantamento amostral realizado pelo Fundecitrus em 2004, apenas as regiões Sul e Centro do Estado de São Paulo possuíam talhões com a doença (BELASQUE JUNIOR et al., 2010). Com o passar dos anos, a doença se expandiu para todas as regiões citrícolas do Estado, sendo que as regiões Sul e Centro continuaram com as maiores incidências e a região Noroeste com a menor incidência de talhões doentes, apenas 0,1% (BELASQUE JUNIOR et al., 2010).

A diferença na sensibilidade térmica observada entre as espécies anteriormente conhecidas, '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' e '*Candidatus Liberibacter africanus*' (BOVÉ, 2006), motivou estudos na tentativa de explicar a distribuição irregular da doença no Estado, além da prevalência de uma espécie em detrimento da outra, ambas relatadas no Brasil: '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' e '*Candidatus Liberibacter americanus*'.

Este trabalho buscou comparar a eficiência de infecção por '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' e '*Candidatus Liberibacter americanus*' em plantas cítricas da

variedade Valência inoculadas com as duas espécies bacterianas presentes no Brasil, e mantidas sob diferentes temperaturas.

2.2 Desenvolvimento

2.2.1 Revisão Bibliográfica

A distribuição da citricultura no mundo é altamente dependente das condições climáticas e, a temperatura é um das principais variáveis climáticas a influenciar esta distribuição (SENTELHAS, 2005). Porém, a cultura dos citros desenvolve-se em uma larga faixa de temperatura, adaptando-se a diferentes condições climáticas (VOLPE; SCHÖFFEL; RIBEIRO, 2009), o que é notoriamente observado nas várias áreas produtoras de citros no Estado de São Paulo (SENTELHAS, 2005).

Além de influenciar o desenvolvimento da planta cítrica, a temperatura exerce importante papel sobre os patógenos que atacam esta planta hospedeira e na interação planta cítrica- patógeno (BEDENDO, 1995). Sendo assim, a temperatura e os outros fatores ambientais têm importante contribuição na intensidade e distribuição espacial de uma doença.

A partir da primeira detecção do Huanglongbing no Estado de São Paulo em 2004, levantamentos amostrais realizados anualmente mostram que a doença está alcançando novos pomares e regiões. Desde o primeiro relato no Estado, o número de pomares com, no mínimo, uma planta com sintomas da infecção, aumentou de 3,41% em 2004 para 24,02% em 2009 (BELASQUE JUNIOR et al., 2010) (Figura 2.1).

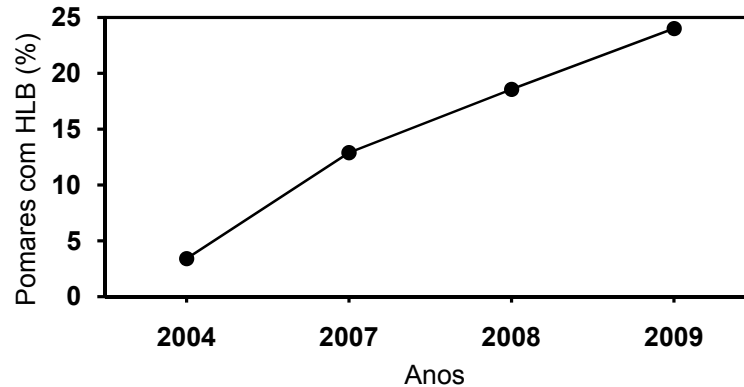


Figura 2.1 - Pomares infectados com Huanglongbing (HLB), segundo levantamentos amostrais realizado pelo FUNDECITRUS

Os levantamentos mostram que a doença está irregularmente distribuída no Estado, sendo que as regiões Sul e Centro possuem maior número de talhões com Huanglongbing. As regiões Norte e Noroeste, caracterizadas por possuírem as maiores temperaturas anuais registradas nas áreas produtoras de citros do Estado de São Paulo, permanecem menos afetadas pela doença (Figura 2.2).

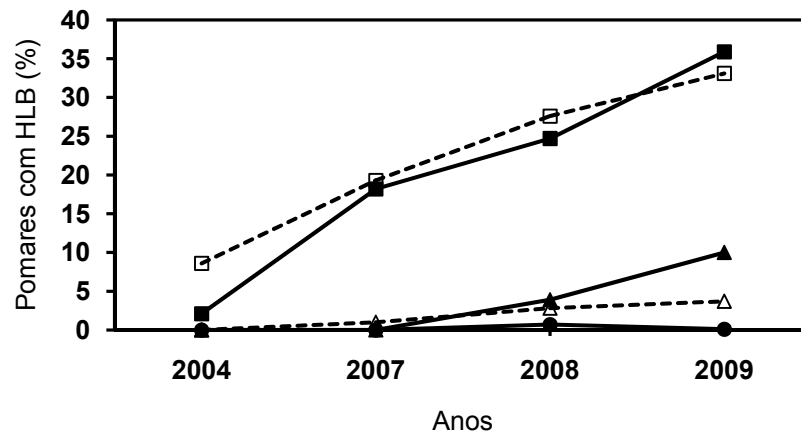


Figura 2.2 - Incidência de talhões com Huanglongbing (HLB), segundo levantamentos amostrais realizados pelo FUNDECITRUS, nas diferentes regiões citrícolas paulista: Sul (quadrado preenchido e linha sólida), Centro (quadrado sem preenchimento e linha tracejada), Oeste (triângulo preenchido e linha sólida), Norte (triângulo sem preenchimento e linha tracejada) e Noroeste (círculo preenchido e linha sólida)

Em 2004, '*Candidatus Liberibacter americanus*' era a espécie predominante nestes pomares e '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' era detectada em poucas árvores doentes. Em 2008, a situação inverteu-se, com maior frequência de detecção de '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' em plantas doentes (BOVÉ et al., 2009).

A distribuição irregular da doença no Estado, além da prevalência de uma espécie em detrimento da outra são indicativos da diferença no comportamento das espécies bacterianas presentes no Estado de São Paulo em relação à capacidade de transmissão, colonização e agressividade.

O sintoma característico de mosqueado das folhas não se desenvolveu em plantas inoculadas com '*Candidatus Liberibacter americanus*' quando mantidas em temperaturas de 32°C e o título bacteriano nestas plantas foi baixo ou não detectável, sendo, portanto, '*Candidatus Liberibacter americanus*' sensível a altas temperaturas (LOPES et al., 2009). Somente elevadas temperaturas, acima de 38°C, afetaram a multiplicação de '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' (LOPES et al., 2009).

Estudos da influência da temperatura na infecção de Huanglongbing se fazem necessários com temperaturas mais amenas (temperaturas diurnas inferiores a 24°C e noturnas inferiores a 22°C), uma vez que nas regiões Sul e Centro do Estado de São Paulo, a média de temperatura mínima anual é de 15,4°C, enquanto que nas regiões Norte e Noroeste é de 16,8°C (CEPAGRI, 2010). Além disto, nos períodos de menores temperaturas (outono e inverno) é que ocorre a máxima detecção de plantas com a doença, possivelmente devido às menores temperaturas não reduzirem a multiplicação bacteriana nos tecidos da planta (BASSANEZI et al., 2010).

Os recentes estudos de multiplicação de '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' no interior dos tecidos das plantas cítricas são, na maioria das vezes, resultantes da inoculação por enxertia de ramos sintomáticos. Apesar das bactérias '*Candidatus Liberibacter spp.*' serem transmitidas de plantas doentes para sadias através de seus insetos vetores, *Cuscuta spp.* ou enxertia (BOVÉ, 2006), a técnica de enxertia, apesar de artificial, garante uma maior eficiência na transmissão do patógeno e, por isto, vem sendo utilizada em estudos da doença (LI; LEVY; HARTUNG, 2009; LOPES, et al., 2009; COLETTA-FILHO et al., 2010). Para estes estudos, amostras destrutivas de

diferentes plantas através do tempo mostram os mesmos resultados que aqueles com amostras coletadas da mesma planta através do tempo (COLETTA-FILHO et al., 2010).

A concentração bacteriana na árvore utilizada como fonte de inóculo para a enxertia está diretamente relacionada à eficiência na eficiência de infecção, podendo o ramo infectado, que servirá como fonte de inóculo, mostrar-se como sintomático ou não (COLETTA-FILHO et al., 2010). A população de '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' na região da enxertia é baixa, aumentando à medida que se caminha para cima ou para baixo, chegando inclusive nas raízes (LI; LEVY; HARTUNG, 2009). A presença bacteriana nas raízes aumenta significativamente com o passar dos dias (LI; LEVY; HARTUNG, 2009).

A multiplicação de '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' é mais rápida no floema de plantas cítricas jovens (COLETTA-FILHO et al., 2010), sendo grande a variação do título bacteriano entre plantas de diferentes variedades e entre diferentes tecidos de uma mesma planta (LI; LEVY; HARTUNG, 2009). Menor população de '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' foi encontrada em frutos cítricos (LI; LEVY; HARTUNG, 2009), apesar de o pedúnculo mostrar alto título bacteriano (TATINENI et al., 2008). A nervura central possui maior população bacteriana que o limbo foliar (LI; LEVY; HARTUNG, 2009).

A bactéria atinge diferentes partes da planta, como folhas novas, frutos, flores e raízes devido ao movimento sistêmico a partir do ponto de infecção sendo, entretanto, uma colonização irregular do vaso do floema (TATINENI et al., 2008), com diferentes pontos onde a bactéria pode ser adquirida pelo inseto vetor (GOTTWALD et al., 2009).

A distribuição irregular da bactéria no interior dos tecidos vegetais torna comum o aparecimento de PCR com resultados "falso-negativos" em coletas de plantas com sintomas iniciais da doença (TATINENI et al., 2008). Este tipo de resultado em adição aos "falso-positivos" são também comuns devido à presença de inibidores da amplificação da PCR encontrados no floema da planta, além da amplificação não-específica da PCR (TATINENI et al., 2008).

2.2.2 Material e Métodos

2.2.2.1 Plantas

Plantas de laranjeira 'Valência', originárias de sementes, com aproximadamente seis meses de idade, foram inoculadas artificialmente, com '*Candidatus Liberibacter americanus*' ou '*Candidatus Liberibacter asiaticus*', através da enxertia com segmentos de ramos sintomáticos, os quais foram retirados de plantas de pomar afetado pelo Huanglongbing e que apresentavam sintomas da doença. Previamente, as árvores que serviram de fonte destes ramos sintomáticos foram submetidas à PCR para confirmação de sua infecção com, exclusivamente, um tipo de bactéria: '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' ou '*Candidatus Liberibacter americanus*'.

Os ramos foram coletados e, em seguida, procedeu-se a enxertia das plantas de 'Valência' (Figura 2.3). Os segmentos de ramos foram firmemente fixados nas plantas com fita plástica transparente, a qual foi mantida por, aproximadamente, quarenta dias para a total cicatrização da região da enxertia e, provável transmissão da bactéria. Mesmo procedimento foi adotado nas plantas controle (sem inoculação das bactérias), exceto que os segmentos de ramos enxertados eram provenientes de plantas assintomáticas do mesmo pomar (comprovadamente livres das bactérias).



Figura 2.3 - Parte do ramo sintomático utilizado como fonte de inóculo (A); encostia de ramo sintomático com muda de 'Valência' (B); fita plástica usada para assegurar a cicatrização da região de enxertia (C)

2.2.2.2 Tratamentos

Imediatamente após a enxertia, as plantas foram transferidas para câmaras de crescimento Conviron® sob as seguintes condições de temperaturas noturna/diurna: 17/22°C, 22/27°C e 27/32 C, e fotofase noturna/diurna de 8/16h. Estas condições são similares àquelas encontradas nas regiões citrícolas do Estado de São Paulo.

Foram utilizadas catorze mudas por tratamento, além de quatro plantas controle (enxertadas com borbulhas provenientes de ramos de plantas sadias), em cada câmara de crescimento. As plantas, mantidas em câmaras de crescimento, foram periodicamente adubadas com Nitrato de cálcio (0,8 g/L), Peters Professional Tropical Foliage 24-8-16 (0,8 g/L) mais Fe-EDTA ou tenso Fe (0,04 g/L) e Kristalon Lilás 20-8-8 (0,8g /L), uma vez que o substrato foi insuficiente para mantê-las em bom estado nutricional por períodos de tempo prolongados. As plantas foram podadas após cada coleta de folhas para realização de PCR.

Foram instalados dois experimentos com os mesmos tratamentos, o primeiro em 25 de agosto de 2005 e o segundo em 24 de julho de 2007.

2.2.2.3 Avaliações

No primeiro experimento, amostras foliares foram coletadas aos 190, 251 e 343 dias após a inoculação. Estas amostras constituíram-se de dez folhas por planta, com exceção à primeira coleta (190 dias após a inoculação) em que apenas uma amostra composta das catorze plantas (uma folha por planta) foi coletada para cada tratamento. As amostras foram submetidas à Real-Time PCR para confirmação da infecção bacteriana.

No segundo experimento, coletaram-se amostras foliares aos 141, 282 e 423 dias após a inoculação, as quais constituíram-se de dez folhas por planta. As amostras foram submetidas à Real-Time PCR para confirmação da infecção bacteriana.

A eficiência de infecção, definida como a porcentagem de plantas com resultado positivo em Real-Time PCR, foi estimada para cada combinação temperatura/espécie bacteriana. O valor de Ct (Cycle Threshold), definido como o ponto que detecta o ciclo na qual a reação atinge o limiar da fase exponencial (ou seja, Ct é inversamente proporcional ao número de células bacterianas presentes na amostra), foi obtido por

Real-Time PCR. Observou-se a expressão dos sintomas de Huanglongbing, confirmados por meio de Real-Time PCR, e determinou-se o número de plantas mortas que estavam previamente infectadas.

2.2.3 Resultados

No experimento 1, resultados positivos para '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' foram obtidos já à partir da primeira coleta. No entanto, a eficiência de infecção não pôde ser calculada devido à amostragem realizada. A partir da segunda coleta pôde-se detectar a bactéria apenas em plantas inoculadas com '*Candidatus Liberibacter asiaticus*', independentemente da temperatura estudada (Figura 2.4).

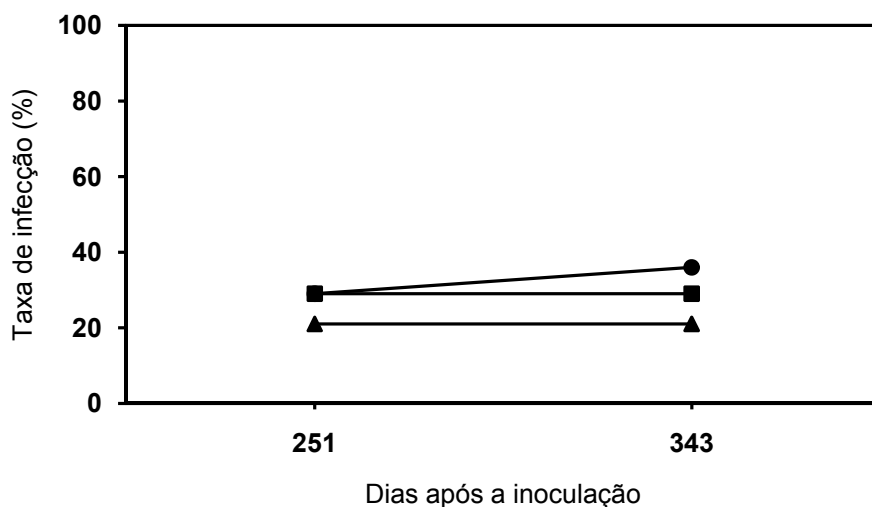


Figura 2.4 - Eficiência de infecção (%) de plantas inoculadas com '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' no experimento 1. Círculos representam plantas mantidas nas temperaturas de 17/22°C (noturna/diurna, respectivamente), quadrados temperaturas de 22/27°C (noturna/diurna, respectivamente), e triângulos, 27/32°C (noturna/diurna, respectivamente)

A maior eficiência de infecção foi alcançada nas temperaturas de 17/22°C (noturna/diurna, respectivamente), seguida das temperaturas de 22/27°C (noturna/diurna, respectivamente). Nas temperaturas de 27/32°C (noturna/diurna, respectivamente), apenas 21% das plantas inoculadas mostraram-se infectadas durante todo o período do experimento. A maior eficiência de infecção foi de 36% aos

343 dias após a inoculação em plantas mantidas nas temperaturas de 17/22°C (noturna/diurna, respectivamente).

No experimento 2, plantas inoculadas com '*Candidatus Liberibacter americanus*' mostraram-se positivas quando submetidas à Real-Time PCR, porém com menor eficiência de infecção que plantas inoculadas com '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' (Figura 2.5).

Para plantas inoculadas com '*Candidatus Liberibacter asiaticus*', nas três datas de avaliação, a maior eficiência de infecção foi obtida nas temperaturas de 22/27°C (noturna/diurna, respectivamente), seguida das temperaturas de 17/22°C (noturna/diurna, respectivamente). Plantas mantidas nas temperaturas de 27/32°C (noturna/diurna, respectivamente) resultaram em menor eficiência de infecção aos 141 e 282 dias após a inoculação, sendo que na última data de avaliação (423 dias após a inoculação), estas plantas obtiveram mesma eficiência de infecção (79%) que as plantas mantidas em 17/22°C (noturna/diurna, respectivamente). Neste segundo experimento (Figura 2.5), a eficiência de infecção alcançada para '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' foi maior que as alcançadas no experimento 1, em todas as temperaturas estudadas (Figura 2.4).

A maior eficiência de infecção por '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' foi de 93% aos 423 dias após a inoculação, em plantas mantidas em temperaturas de 22/27°C (Figura 2.5). Nesta mesma condição de temperatura, desde a primeira data de avaliação, a eficiência de infecção foi alta com 71% de plantas infectadas já aos 141 dias após a inoculação e, 86% aos 282 dias após a inoculação.

Plantas inoculadas com '*Candidatus Liberibacter americanus*' apresentaram-se infectadas apenas nas temperaturas de 17/22°C e 22/27°C (noturna/diurna, respectivamente) durante o experimento 2. A maior eficiência de infecção foi obtida nas temperaturas de 17/22°C (noturna/diurna, respectivamente), sendo a maior eficiência de infecção de 36% aos 282 dias após a inoculação, a qual foi mantidas aos 423 dias após a inoculação. Nas temperaturas de 22/27°C (noturna/diurna, respectivamente), durante todo o experimento, apenas 21% das plantas mostraram-se infectadas.

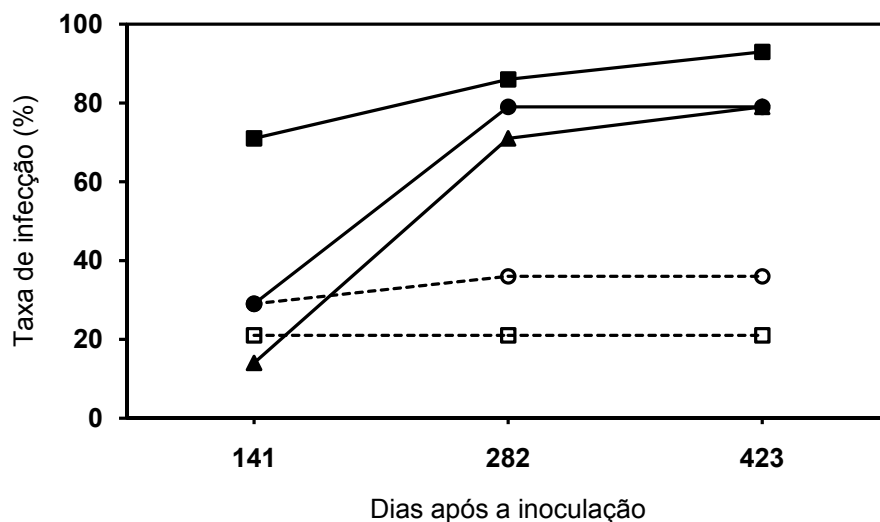


Figura 2.5 - Eficiência de infecção (%) de plantas inoculadas com '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' (símbolos preenchidos e linha sólida) e '*Candidatus Liberibacter americanus*' (símbolos sem preenchimento e linha tracejada) no experimento 2. Círculos representam plantas mantidas nas temperaturas de 17/22°C (noturna/diurna, respectivamente), quadrados temperaturas de 22/27°C (noturna/diurna, respectivamente), e triângulos, 27/32°C (noturna/diurna, respectivamente)

No experimento 1, quanto maiores as temperaturas em que as plantas estavam mantidas, maior o Ct médio das plantas infectadas por '*Candidatus Liberibacter asiaticus*'. Não houve plantas infectadas por '*Candidatus Liberibacter americanus*' neste experimento (Figura 2.6A).

No experimento 2, o Ct médio das plantas infectadas por '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' mantidas nas temperaturas de 27/32°C (noturna/diurna, respectivamente) foi menor que das plantas nas temperaturas de 22/27°C (noturna/diurna, respectivamente), porém, o menor Ct médio determinado foi nas temperaturas de 17/22°C (noturna/diurna, respectivamente). Para plantas infectadas por '*Candidatus Liberibacter americanus*' o maior Ct médio ocorreu nas plantas mantidas nas temperaturas de 17/22°C (noturna/diurna, respectivamente) (Figura 2.6B). Nas temperaturas de 17/22°C, plantas infectadas por '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' apresentaram menor Ct que plantas infectadas por '*Candidatus Liberibacter americanus*'. Nas temperaturas de 22/27°C, plantas inoculadas com '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' apresentaram, aproximadamente, o mesmo Ct que plantas inoculadas com '*Candidatus Liberibacter americanus*'.

Quando se compara o Ct médio das plantas infectadas por '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' entre os experimentos, observa-se que o experimento 1 apresentou maiores Ct médios para estas plantas dentro de cada temperatura.

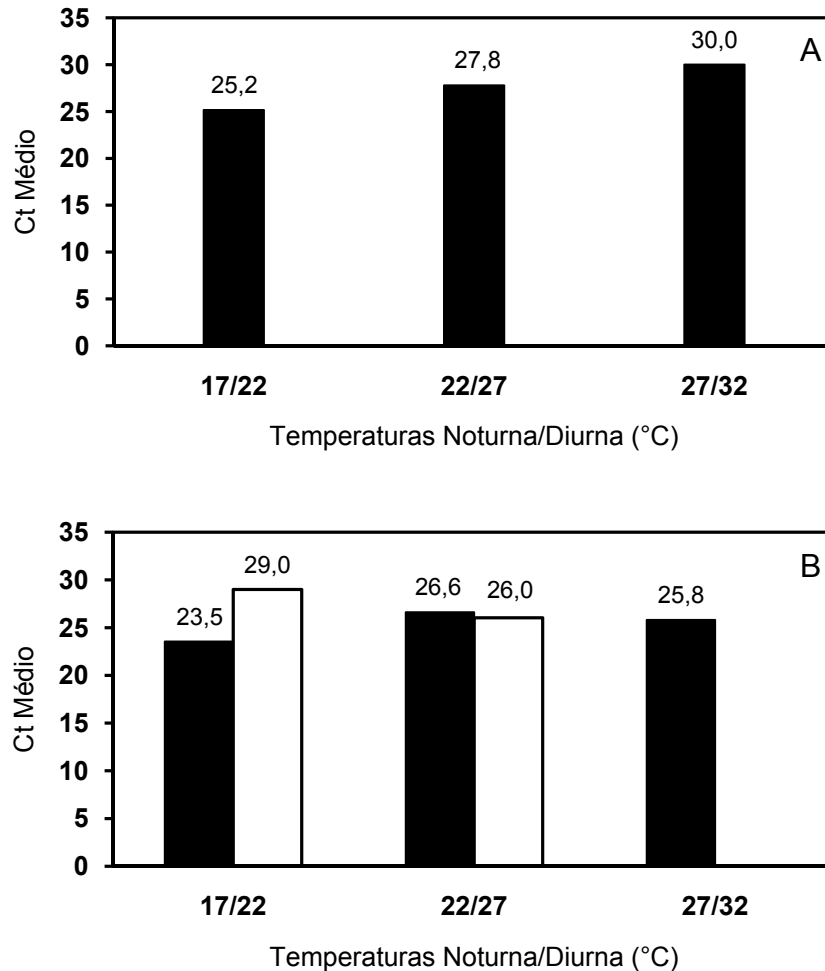


Figura 2.6 - Valores médios de Ct (Cycle Threshold) obtidos por Real-Time PCR nos experimentos 1 (A) e 2 (B). Colunas em preto representam inoculação com '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' e em branco, inoculação com '*Candidatus Liberibacter americanus*'

Plantas infectadas com '*Candidatus Liberibacter americanus*' apresentaram intensa clorose foliar como sintoma predominante (Figura 2.7A). Deficiência mineral de ferro, manganês e zinco, folhas pouco desenvolvidas, coriáceas e em pequeno número foram os sintomas geralmente observados em plantas com resultado positivo em PCR para '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' (Figura 2.8A). Plantas infectadas, independentemente da espécie bacteriana e da temperatura em que foram mantidas,

mostraram tamanho bastante reduzido quando comparadas às plantas controle (Figuras 2.7B e 2.8B). Mosqueado irregular das folhas, sintoma característico de Huanglongbing em folhas de laranjeira doce em condições de campo, não foi observado em nenhuma das plantas em ambos os experimentos.

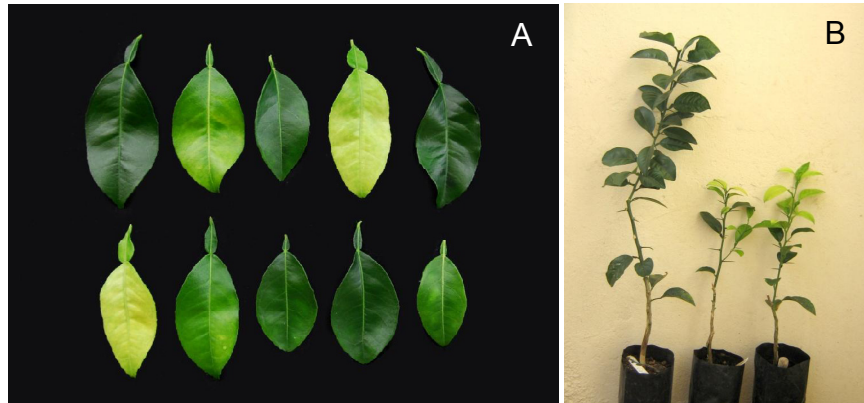


Figura 2.7 - Exemplo de amostra PCR positivo para '*Candidatus Liberibacter americanus*' (A) e planta controle (à esquerda) em comparação a duas plantas infectadas por '*Candidatus Liberibacter americanus*' (centro e à direita) (B)

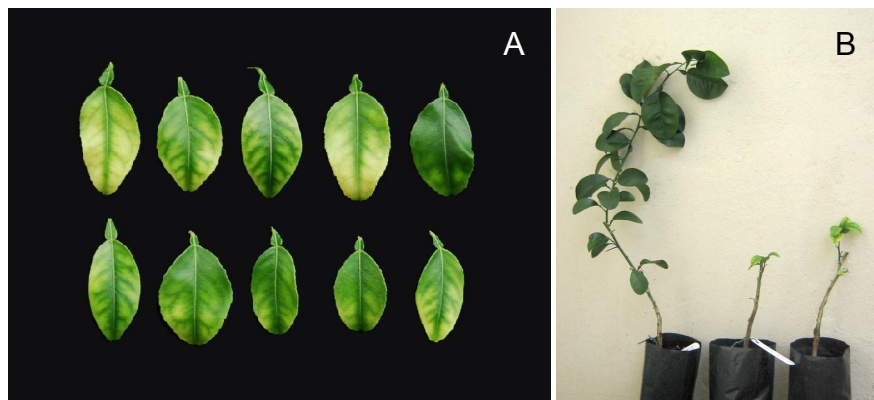


Figura 2.8 - Exemplo de amostra PCR positivo para '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' (A) e planta controle (à esquerda) em comparação a duas plantas infectadas por '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' (centro e à direita) (B)

A avaliação dos sintomas visuais da doença no experimento 2 mostrou que, entre as plantas consideradas assintomáticas, 13% resultaram em Real-Time PCR positivo para uma ou outra espécie bacteriana, enquanto que entre as plantas sintomáticas, 68% foram positivas. Durante o experimento, o número de plantas

consideradas assintomáticas, e com posterior resultado positivo de Real-Time PCR, diminuiu ao longo dos dias após a inoculação, enquanto que o número de plantas consideradas sintomáticas, e que realmente estavam infectadas (confirmação posterior do sintoma visual por Real-Time PCR), aumentou do início ao fim do experimento (Figura 2.9).

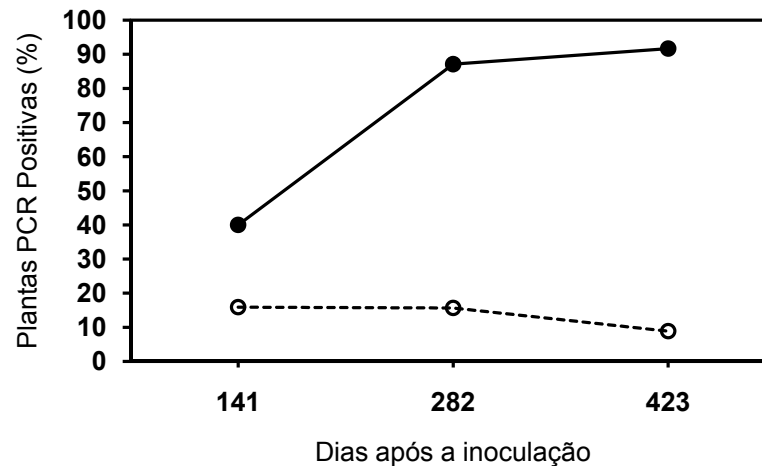


Figura 2.9 - Porcentagem de plantas infectadas (PCR positivas para '*Candidatus Liberibacter americanus*' ou '*Candidatus Liberibacter asiaticus*') em relação às plantas sintomáticas (círculos preenchidos e linha sólida) e às plantas assintomáticas (círculos sem preenchimento e linha tracejada)

No experimento 2, aos 282 dias após a inoculação houve morte de 10% das plantas infectadas com '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' nas temperaturas de 27/32°C (noturna/diurna, respectivamente) e aos 423 dias após a inoculação, houve morte de 36% em 27/32°C (noturna/diurna, respectivamente) e 27% em 17/22°C (noturna/diurna, respectivamente), e 23% em 22/27°C (noturna/diurna, respectivamente). Em média, o Ct das plantas infectadas em cada data de avaliação foi maior que o Ct das plantas mortas. Para plantas infectadas com '*Candidatus Liberibacter americanus*' houve morte de 20% nas temperaturas de 17/22°C (noturna/diurna, respectivamente) aos 423 dias após a inoculação, não havendo plantas infectadas mortas em outras temperaturas e nos dias anteriores de avaliação. Novamente, o Ct médio das plantas infectadas que permaneceram vivas foi, a cada avaliação, superior àquele das plantas infectadas mortas.

2.2.4 Discussão

O amplo espectro de temperaturas em que houve infecção por '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' pode explicar, em parte, a prevalência desta espécie bacteriana nos pomares citrícolas paulistas nos dias atuais (BOVÉ et al., 2009). Outro aspecto importante, que não foi abordado neste estudo, é a eficiência de aquisição e inoculação de *Diaphorina citri* das diferentes espécies bacterianas, sob diferentes condições de temperatura.

Temperaturas acima de 35°C não afetam a multiplicação de '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' em plantas cítricas (LOPES et al, 2009), porém, quando plantas cítricas foram mantidas por longos períodos (até 423 dias) em temperaturas de 27/32°C (8h noturna/ 16h diurna, respectivamente), observou-se redução na eficiência de infecção. Temperaturas de 17/22°C (noturna/diurna, respectivamente) e de 27/32°C (noturna/diurna, respectivamente) resultaram em alta eficiência de infecção no final do experimento 2, porém estas só foram alcançadas a partir dos 282 dias após a inoculação, ao contrário das temperaturas de 22/27°C (noturna/diurna, respectivamente) que aos 141 dias após a inoculação já mostravam 71% das plantas infectadas. Para '*Candidatus Liberibacter americanus*', durante todo o experimento 2, a maior eficiência de infecção aconteceu nas temperaturas de 17/22°C (noturna/diurna, respectivamente), não havendo plantas infectadas nas temperaturas de 27/32°C (noturna/diurna, respectivamente), o que está de acordo com LOPES et al. (2009).

Apesar da maior sensibilidade da técnica de Real-Time PCR em comparação à PCR convencional para detecção de '*Candidatus Liberibacter spp.*' (LI et al., 2007; TEIXEIRA et al., 2008), a baixa concentração de '*Candidatus Liberibacter americanus*' no tecido foliar pode ser responsável pela menor eficiência de infecção de plantas inoculadas com esta bactéria quando comparadas às de plantas inoculadas com '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' (LOPES et al., 2009). A concentração bacteriana na árvore utilizada como fonte de inóculo para a enxertia pode ser responsável pela menor eficiência de infecção do experimento 1 quando comparada à eficiência do experimento 2 (COLETTA-FILHO et al., 2010), o que está de acordo com o maior Ct médio das

plantas inoculadas com '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' no experimento 1 em comparação ao experimento 2.

O principal sintoma observado em plantas infectadas por '*Candidatus Liberibacter americanus*' foi de intensa clorose foliar. Esta coloração amarelada em folhas é o sintoma inicial da doença no campo e permite que estas plantas sejam mais facilmente diferenciadas, uma vez que aparecem em um ramo ou galho setorizado na planta, destacando-se das demais folhas assintomáticas (FEICHTENBERGER et al., 2005).

A expressão dos sintomas da doença por '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' ocorreu em todas as temperaturas estudadas, apresentando-se como folhas nutricionalmente deficientes, pouco desenvolvidas, coriáceas e em pequeno número. Independentemente da temperatura, plantas infectadas por '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' mostraram-se de tamanho bastante reduzido quando comparadas às plantas controle. O sintoma pronunciado da doença em câmaras de crescimento deve ser resultado da alta concentração bacteriana no tecido de plantas cítricas jovens (COLETTA-FILHO et al., 2010).

O número de plantas consideradas sintomáticas por meio do sintoma visual e com posterior resultado positivo em Real-Time PCR foi aumentando a cada avaliação do experimento, indicando que o sintoma da doença pode ter sido confundido com desordens nutricionais entre outros sintomas no início do experimento. Outra possibilidade de plantas previamente consideradas sintomáticas, porém com resultado negativo em Real-Time PCR pode ser devido a erro de amostragem resultante da distribuição irregular da bactéria na planta com pontos em que não se consegue a detecção por PCR (GOTTWALD et al., 2009). Provavelmente este erro diminuiu ao longo do experimento devido ao movimento sistêmico da bactéria para novas partes da planta a partir do local de enxertia (TATINENI et al., 2008). Dificuldade na diferenciação de sintomas iniciais da doença pode ser responsável pela queda no número de plantas que foram consideradas assintomáticas previamente e que com posterior Real-Time PCR, resultaram em plantas positivas. A queda deve-se ao fato de que com o passar dos dias de avaliação os sintomas tornaram-se mais evidentes, sendo mais facilmente distinguidos de outras anomalias.

A morte de plantas infectadas por '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' teve início aos 282 dias após a inoculação nas temperaturas de 27/32°C (noturna/diurna, respectivamente), e nesta mesma temperatura aos 423 dias após a inoculação ocorreu o maior número de plantas mortas infectadas por esta espécie bacteriana quando comparada as outras temperaturas estudadas. A morte de plantas infectadas por '*Candidatus Liberibacter americanus*' ocorreu somente aos 423 dias após a inoculação e somente nas temperaturas de 17/22°C (noturna/diurna, respectivamente), com 20% de plantas mortas, possivelmente, porque apenas neste dia, o número de bactérias no interior destas plantas alcançou níveis capazes de causar suas mortes. A observação do Ct de plantas infectadas que permaneceram vivas ao final do experimento mostrou que estas plantas, em média possuíam Ct maior que as plantas infectadas que morreram. Isto indica que a colonização bacteriana das plantas infectadas possivelmente foi mais agressiva nas plantas que morreram ao final da avaliação.

Os resultados estão de acordo com o observado em pomares do Estado de São Paulo. O levantamento amostral de Huanglongbing realizado pelo FUNDECITRUS em 2009 mostra que as regiões Sul e Centro são responsáveis pelo maior número de talhões com a doença (Figura 2.2). Nestas regiões do Estado de São Paulo a temperatura média anual é de 21,9°C, com mínima de 15,4°C e máxima de 27,8°C (CEPAGRI, 2010). A média de temperatura máxima anual destas regiões está muito próxima da faixa de temperatura considerada ideal para a infecção por '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' (22/27°C, noturna/diurna, respectivamente). A região Oeste, com 10% de talhões infectados por Huanglongbing, possui temperatura média anual e mínima (15,6°C e 22°C, respectivamente) equivalentes às encontradas nas duas regiões anteriores, porém, sua média de temperatura máxima anual é de 28,5°C (CEPAGRI, 2010). Esta temperatura está na faixa de temperaturas elevadas (27/32°C, noturna/diurna, respectivamente) e que é considerada menos favorável à infecção por '*Candidatus Liberibacter asiaticus*'. Aliado ao fator temperatura, a região Oeste possui o menor número de plantas cítricas do Estado de São Paulo (aproximadamente 8.250.000 de árvores) e as regiões Centro e Sul são responsáveis por, aproximadamente 71.000.000 de árvores cada uma (CATI, 2010). Sabendo que a velocidade com que novas plantas são infectadas depende da quantidade de plantas

fonte de inóculo (plantas já infectadas) e da proximidade destas plantas já infectadas com as novas plantas (BASSANEZI et al., 2010), espera-se que na região Oeste a velocidade da doença seja mais baixa que nas regiões Centro e Sul. As baixas incidências da doença nas regiões Norte (3,7% de talhões infectados por Huanglongbing) e Noroeste (0,1% dos talhões doentes), provavelmente, devem-se ao fato de que estas possuem média de temperatura máxima anual de 30,3°C (CEPAGRI, 2010), ou seja, possuem as maiores temperaturas anuais registradas nas regiões produtoras de citros do Estado de São Paulo.

Os resultados deste estudo corroboram resultados anteriores em que plantas infectadas com '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' são tolerantes a temperaturas mais elevadas, enquanto que infectadas com '*Candidatus Liberibacter americanus*' são sensíveis a estas temperaturas (LOPES et al., 2009).

Além de influenciar a eficiência de infecção pelas diferentes espécies bacterianas, a temperatura tem efeito na biologia e no ciclo de vida do vetor da doença, o psílídeo *Diaphorina citri*, resultando em diferentes incidências da doença nas diferentes regiões do Estado de São Paulo. A temperatura ideal de crescimento para *Diaphorina citri* é de 25 a 28°C (LIU; TSAI, 2000). Nas regiões citrícolas em que as temperaturas anuais ultrapassam facilmente os 30°C no período de verão (regiões Norte e Noroeste), o ciclo de vida, a sobrevivência do vetor, entre outros parâmetros biológicos (LIU; TSAI, 2000), são profundamente afetados (LIU; TSAI, 2000), acarretando em menor número de insetos e, conseqüentemente, menor disseminação da doença.

2.3 Conclusões

- Independentemente das temperaturas estudadas, '*Candidatus Liberibacter americanus*' tem menor eficiência de infecção que '*Candidatus Liberibacter asiaticus*'.
- Temperaturas de 17/22°C (noturna/diurna, respectivamente) são mais favoráveis a infecção de '*Candidatus Liberibacter americanus*', não havendo plantas infectadas nas temperaturas de 27/32°C (noturna/diurna, respectivamente).
- Ampla faixa de temperatura não afeta a infecção de '*Candidatus Liberibacter asiaticus*', a qual pode ser detectada em plantas mantidas em todas as temperaturas estudadas (17 a 32°C), porém há menor eficiência de infecção desta espécie bacteriana em temperaturas de 27/32°C (noturna/diurna, respectivamente).

Referências

BASSANEZI, R.B.; LOPES, S.A.; BELASQUE JUNIOR, J.; SPÓSITO, M.B.; YAMAMOTO, P.T.; MIRANDA, M.P.; TEIXEIRA, D.C.; WULFF, N.A. Epidemiologia do Huanglongbing e suas implicações para o manejo da doença. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v. 31, n. 1, p. 11-23, 2010.

BEDENDO, I.P. Ambiente e doença. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de Fitopatologia**. 3. ed. São Paulo: Ceres. 1995. v. 1, p. 602- 626.

BELASQUE JUNIOR, J.; BASSANEZI, R.B.; BARBOSA, J.C.; AYRES, A.J.; LIBANORE, A.C.; MASSARI, C.A. O greening continua se espalhando. In: _____. **Agrianual 2010**: anuário de agricultura brasileira. São Paulo, p. 284-285.

BOVÉ, J.M. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 88, p. 7-37, 2006.

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. Several Liberibacter and Phytoplasma species are individually associated with HLB. In: INTERNATIONAL RESEARCH CONFERENCE ON HUANGLONGBING, 2008, Orlando. **Proceedings ...** Orlando: Plant Management Network, 2009. p. 152-155.

COLETTA-FILHO, H.D.; CARLOS, E.F.; ALVES, K.C.S.; PEREIRA, M.A.R.; BOSCARIOL-CAMARGO, R.L.; DE SOUZA, A.A.; MACHADO, M.A. *In planta* multiplication and graft transmission of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' revealed by Real-Time PCR. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 126, n.1, p. 53-60, 2010.

CATI. **Coordenadoria de Assistência Técnica Integral**. 2010. Disponível em: <<http://www.cati.sp.gov.br/projetolupa/mapaculturas.php>> Acesso em: 10 jul. 2010.

CEPAGRI. **Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas à Agricultura**. 2010. Disponível em: <<http://www.cpa.unicamp.br/outras-informacoes/clima-dos-municipios-paulistas.html>> Acesso em: 10 jul. 2010.

FEICHTENBERGER, E.; BASSANEZI, R.B.; SPÓSITO, M.B.; BELASQUE JUNIOR, J. Doenças dos citros (*Citrus* spp.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de Fitopatologia**: Doenças das plantas cultivadas. 4. ed. São Paulo: Ceres. 2005. v. 2, p. 239-269.

FUNDECITRUS. **Fundo de Defesa da Citricultura**. 2010. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br>> Acesso em: 10 jul. 2010.

GOTTWALD, T.R.; PARNELL, S.; TAYLOR, E.; POOLE, K.; HODGE, J.; FORD, A.; THERRIEN, L.; MAYO, S.; IREY, M. Within-tree distribution of 'Candidatus Liberibacter asiaticus'. In: INTERNATIONAL RESEARCH CONFERENCE ON HUANGLONGBING, 2008, Orlando. **Proceedings ...** Orlando: Plant Management Network, 2009. p. 310-313.

LI, W.; HARTUNG, J.S.; LEVY, L. Evaluation of DNA amplification methods for improved detection of 'Candidatus Liberibacter species' associated with citrus Huanglongbing. **Plant Disease**, Saint Paul v. 91, n. 1, p. 51-58, 2007.

LI, W.; LEVY, L.; HARTUNG, J.S. Quantitative distribution of 'Candidatus Liberibacter asiaticus' in citrus plants with Citrus Huanglongbing. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 99, n. 2, p. 139-144, 2009.

LIU, Y.H.; TSAI, J.H. Effects of temperature on biology and life table parameters of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae). **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 137, n. 3, p. 201-206, 2000.

LOPES, S.A.; FRARE, G F.; BERTOLINI, E.; CAMBRA, M.; FERNANDES, N.G.; AYRES, A.J.; MARIN, D.R. Liberibacters associated with Citrus Huanglongbing in Brazil: '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' is heat tolerant, '*Candidatus Liberibacter americanus*' is heat sensitive. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 93, n.3, p.257-262, 2009.

SENTELHAS, P.C. Agrometeorologia dos citros. In: MATTOS JUNIOR, D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico e Fundag. 2005. p. 319-344.

TATINENI, S.; SAGARAM, U.S.; GOWDA, S.; ROBERTSON, C.J.; DAWSON, W.O.; IWANAMI, T.; WANG, N. *In planta* distribution of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' as revealed by Polymerase Chain Reaction (PCR) and Real-Time PCR. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 98, n.5, p. 592-599, 2008.

TEIXEIRA, D.C.; SAILLARD, C.; COUTRE, C.; MARTINS, E.; WULFF, N.A.; YAMAMOTO, P.T.; EVEILLARD-JAGOUÉIX, S.; AYRES, A.J.; BOVÉ, J.M. '*Candidatus Liberibacter americanus*', agent of Huanglongbing disease of citrus in São Paulo State, Brasil: Distribution and quantification of the Liberibacter in leaves of an affected sweet orange tree as determined by PCR methods. **Molecular and Cellular Probes**, London, v. 22, p. 139-150, 2008.

VOLPE, C.A.; SCHÖFFEL, E.R.; RIBEIRO, R.V. Citros. In: MONTEIRO, J.E.B.A. (Ed.). **Agrometeorologia dos cultivos**: o fator meteorológico na produção agrícola. Brasília: INMET. 2009. p. 375-391.

3 PROGRESSO ESPAÇO-TEMPORAL DO HUANGLONGBING EM CONDIÇÕES DE TELADO E COM DUAS DIFERENTES FONTES DE INÓCULO

Resumo

A epidemia de Huanglongbing é pouco estudada devido à natureza poliética da doença e, conseqüentemente, necessidade de vários anos de observações e coletas de dados, entre outras dificuldades. O objetivo deste trabalho foi comparar o progresso temporal e espacial do Huanglongbing causado por '*Candidatus Liberibacter americanus*' e por '*Candidatus Liberibacter asiaticus*', a partir da infecção natural por *Diaphorina citri* em condições de telado, tendo plantas de citros ou *Murraya paniculata* (murta) como fonte primária de inóculo. O experimento foi conduzido com diferentes fontes de inóculo, que corresponderam aos seguintes tratamentos: (i) plantas de laranja doce da variedade Natal infectadas por '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' ou '*Candidatus Liberibacter americanus*', (ii) unicamente plantas de *Murraya paniculata* infectadas por '*Candidatus Liberibacter americanus*' e (iii) unicamente plantas de laranja doce da variedade Natal infectadas por '*Candidatus Liberibacter americanus*'. Cada tratamento foi aplicado em um compartimento isolado de uma casa-de-vegetação. O primeiro tratamento foi repetido. Em todos os compartimentos, 156 a 158 plantas de laranja doce da variedade Valência foram dispostas ao redor das plantas fonte de inóculo. Psíldeos livres das bactérias foram periodicamente confinados nas plantas fonte de inóculo e, posteriormente, liberados na casa-de-vegetação para livre movimentação e multiplicação. Amostras foliares e de psíldeos foram coletadas periodicamente para detecção bacteriana por PCR. Quinzenalmente, a população de psíldeos foi monitorada. Quando as duas espécies bacterianas estavam presentes nas diferentes plantas cítricas utilizadas como fonte de inóculo, houve maior detecção de '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' nas plantas teste e a eficiência de aquisição de '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' por psíldeos foi maior que a de '*Candidatus Liberibacter americanus*'. Quando somente '*Candidatus Liberibacter americanus*' estava presente nas plantas fonte de inóculo, a eficiência de transmissão para plantas teste foi maior quando *Murraya paniculata* foi utilizada como fonte de inóculo, mostrando que *Diaphorina citri* pode adquirir naturalmente '*Candidatus Liberibacter americanus*' de *Murraya paniculata* e transmiti-la para plantas cítricas. A eficiência de aquisição da espécie '*Candidatus Liberibacter americanus*' também foi maior tendo *Murraya paniculata* como planta fonte de inóculo e não citros.

Palavras-chave: Epidemiologia; Greening; *Citrus* spp.; Murta; Transmissão

SPATIO-TEMPORAL PROGRESS OF HUANGLONGBING UNDER SCREENHOUSE CONDITIONS AND WITH TWO DIFFERENT SOURCE OF INOCULUM PLANTS

Abstract

There are few studies about Huanglongbing epidemiology due to its polietic nature and, consequently, it is necessary observation and data collection over multiple years, among other difficulties. The objective of this work was to compare the spatio-temporal progress of Huanglongbing caused by '*Candidatus Liberibacter americanus*' and '*Candidatus Liberibacter asiaticus*', naturally transmitted by *Diaphorina citri* under screenhouse conditions, having infected citrus plants or *Murraya paniculata* (jasmine orange) as primary inoculum sources. The experiment was carried out with different sources of inoculum, corresponding to the following treatments: (i) 'Natal' sweet orange plants infected by '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' or '*Candidatus Liberibacter americanus*', (ii) only *Murraya paniculata* plants infected by '*Candidatus Liberibacter americanus*' and (iii) only 'Natal' sweet orange plants infected by '*Candidatus Liberibacter americanus*'. Each treatment was applied in an isolated compartment of a screenhouse. The first treatment was repeated. In all of the compartments, from 156 to 158 'Valencia' sweet orange plants were located around the source of inoculum plants. Psyllids free of the bacteria were periodically confined in source of inoculum plants and, after this period, they were set free, and allowed to the free movement and multiplication inside the screenhouse. Leaf and psyllid samples were collected periodically to the bacterial detection by PCR. Fortnightly, the psyllid population was monitored. When both bacterial species were present in the different citrus plants as source of inoculum, there was higher detection of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' than '*Candidatus Liberibacter americanus*' and higher acquisition efficiency of the former bacterial species than the later by psyllids. When only '*Candidatus Liberibacter americanus*' was present in the source of inoculum plants, the transmission efficiency was higher when *Murraya paniculata* was served as source of inoculum, showing that *Diaphorina citri* can naturally acquire '*Candidatus Liberibacter americanus*' from *Murraya paniculata* and transmit it to citrus plants. The acquisition efficiency of the '*Candidatus Liberibacter americanus*' species was higher with *Murraya paniculata* as source of inoculum than with citrus plants was the source of inoculum.

Keywords: Epidemiology; Greening; *Citrus* spp.; Jasmine orange; Transmission

3.1 Introdução

Huanglongbing é uma doença associada a bactérias do gênero '*Candidatus Liberibacter*' (JAGOUEIX; BOVÉ; GARNIER, 1996; TEIXEIRA et al., 2005), as quais são restritas ao floema das plantas hospedeiras e são transmitidas naturalmente por psílídeos (McCLEAN; OBERHOLZER, 1965; CAPOOR; RAO; VISWANATH, 1967; YAMAMOTO et al., 2006). Algumas características da doença tornam-na de difícil controle uma vez presente em determinada área, entre elas podem-se citar seu prolongado período de incubação e a disseminação regional do patógeno pelo psílídeo vetor (GOTTWALD, 2010).

Por muito tempo o Huanglongbing permaneceu restrito a países onde o cultivo de citros é feito em pequena escala e, conseqüentemente, poucas informações estavam disponíveis a respeito do comportamento da doença. Sua recente detecção em algumas das maiores regiões citrícolas mundiais, como no Brasil em 2004 (COLLETA-FILHO et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2005) e nos EUA em 2005 (HALBERT, 2005), resultou na necessidade de estudos mais detalhados da epidemia de Huanglongbing, com o objetivo de alcançar medidas mais efetivas de controle da doença.

Como no Brasil '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' e '*Candidatus Liberibacter americanus*' estão associadas à doença, estudos epidemiológicos comparativos entre as duas espécies bacterianas fazem-se necessários, para avaliar o padrão temporal e espacial da doença na presença de ambas as bactérias, e de seus hospedeiros preferenciais, murta e citros, como fonte de inóculo primário (HALBERT; MANJUNATH, 2004), por meio da disseminação natural do patógeno pelo psílídeo vetor.

3.2 Desenvolvimento

3.2.1 Revisão Bibliográfica

Por muitos anos o Huanglongbing permaneceu geograficamente restrito a países asiáticos e ao continente africano, resultando em escassas informações a respeito do comportamento desta doença. Seu recente relato em importantes regiões citrícolas mundiais, principalmente no Brasil em 2004 (COLLETA-FILHO et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2005) e nos EUA (HALBERT, 2005), deu início a estudos epidemiológicos da doença. Porém, muitos são os entraves para o estudo deste patossistema, entre eles pode-se citar o longo período de incubação em plantas naturalmente infectadas por psilídeos (YAMAMOTO et al., 2006), sazonalidade de infecção e expressão dos sintomas (BASSANEZI et al., 2010) e a dependência de técnicas moleculares para avaliação da doença (TEIXEIRA et al., 2005).

O desenvolvimento dos primeiros sintomas visuais da doença acontece, aproximadamente, dez meses após a transmissão da bactéria pelo psilídeo (YAMAMOTO et al., 2006). A intensidade dos sintomas visuais mostra-se dependente de fatores como idade da planta (DA GRAÇA; KORSTEN, 2004), época do ano (AUBERT, 1987) e variedade da copa (KOIZUMI et al., 1997), sendo que observa-se o maior número de plantas sintomáticas nos períodos de outono e inverno e o maior número de plantas infectadas (sintomáticas e assintomáticas) na primavera e verão (BASSANEZI et al., 2010).

Quando comparada a inspeções visuais, a técnica de Real-Time PCR é comprovadamente melhor instrumento na detecção de plantas infectadas (IREY; GAST; GOTTWALD, 2006). A evidente sensibilidade da técnica, independentemente do tecido amostrado, contrapõe-se aos resultados que, geralmente, são positivos apenas para amostras com sintomas típicos de Huanglongbing, possivelmente devido à distribuição irregular da bactéria nos tecidos da planta ou pelo baixo título da mesma no tecido amostrado (TATINENI et al., 2008). A técnica de Real-Time PCR exige mão-de-obra qualificada, consome tempo, além dos custos com reagentes e equipamentos.

Análises espaço-temporais do Huanglongbing em condições naturais da epidemia seriam úteis no entendimento do comportamento da doença. Para estes estudos, seria necessário o acompanhamento, por longos períodos (anos), de áreas citrícolas sem a adoção de qualquer medida de controle que estivessem próximas a locais comprovadamente com a doença. Devido ao grande potencial destrutivo do Huanglongbing, com perdas na produção (BASSANEZI et al., 2009) e na qualidade dos frutos (BASSANEZI; MONTESINO; STUCHI, 2009), a manutenção de áreas sem controle da doença é um risco que nenhum citricultor quer enfrentar.

Apesar de todas as dificuldades anteriormente descritas, importantes estudos epidemiológicos vêm sendo realizados com a doença nos últimos anos (BASSANEZI ET AL., 2005; BERGAMIN FILHO et al., 2009; GOTTWALD; IREY, 2009; GOTTWALD; IREY; TAYLOR, 2009; BASSANEZI; BASSANEZI, 2009; GOTTWALD et al., 2009) e, a partir deles, algumas inferências já podem ser feitas a respeito do progresso temporal e espacial da doença.

Epidemias de Huanglongbing em cultivo comercial necessitam de muitos anos para mostrarem aumento significativo no número de plantas doentes, (GOTTWALD; AUBERT; XUE-YUAN, 1989), caracterizando-se, portanto, como epidemia poliética (ZADOKS, 1974). A doença é considerada rápida e devastadora devido tratar-se de uma cultura perene, com expectativa de vida econômica maior que quinze anos e com retorno econômico do capital investido após sete anos (BASSANEZI et al., 2010).

Modelos matemáticos como o exponencial, logístico e Gompertz têm se ajustado adequadamente aos dados observados em pomares com a doença (GOTTWALD; AUBERT; XUE-YUAN, 1989; BERGAMIN FILHO et al., 2009; GOTTWALD et al., 2010). A taxa de progresso do Huanglongbing, definida como o velocímetro da epidemia (VANDERPLANK, 1975), depende (1) da extensão e proximidade de plantas fonte de inóculo, (2) da população local do vetor, e (3) da idade das plantas na primeira infecção (BASSANEZI et al., 2010).

Com base em curvas de progresso da doença, resultantes do ajuste do modelo de Gompertz a dados provenientes de dezessete pomares do Estado de São Paulo, foi estimado o tempo necessário para atingir-se 50% de plantas doentes, quando estes pomares estão localizados próximos ou distantes de outros pomares sem controle do

Huanglongbing (BELASQUE et al., 2009). Quando estes pomares não realizam o controle de Huanglongbing e estão próximos a pomares sem controle da doença (sob alta pressão de inóculo externo), são necessários apenas três anos para 50% de suas plantas apresentarem-se doentes. Nesta mesma situação de alta pressão de inóculo externo, se estes mesmos pomares realizarem controle de Huanglongbing, aumenta para doze anos o tempo necessário para que 50% de suas plantas tornem-se infectadas. Em pomares com controle da doença e distantes de pomares sem controle do Huanglongbing (baixa pressão de inóculo externo), mais de vinte anos seriam necessários para atingir 50% de incidência da doença (BELASQUE et al., 2009).

O maior número de psíldeos está relacionado com a disponibilidade de novos fluxos vegetativos em plantas preferenciais ao inseto (TSAI; WANG; LIU, 2002), fazendo com que sua população possivelmente seja maior nos períodos de primavera e verão. Na presença bacteriana e com o maior número de tecidos jovens nestes períodos, mesmos que assintomáticos, a aquisição bacteriana pelo psíldeo vetor também é alta (BONANI et al., 2009), resultando em maior eficiência de infecção por Huanglongbing. Contrariamente, na Flórida, amostragens de psíldeos em pomares, áreas residenciais e outros locais com plantas hospedeiras ao inseto, mostraram que o maior número de insetos infectados com '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' ocorreu no outono, onde a população do vetor é menor (MANJUNATH et al., 2008). Possivelmente, o fator temperatura pode estar influenciando a aquisição bacteriana pelo psíldeo vetor, ou seja, temperaturas amenas estão favorecendo a aquisição de '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' (BARBOSA¹, comunicação pessoal), do mesmo modo que ocorre com '*Candidatus Liberibacter americanus*' (BARBOSA et al., 2010).

Pomares constituídos por plantas mais jovens, infectados com um a quatro anos de idade, teriam drástica redução em sua produtividade de três a sete anos após o aparecimento das primeiras plantas com sintomas, enquanto que para pomares com plantas de oito a dez anos de idade, esta redução de produtividade só aconteceria após treze anos (BASSANEZI; BASSANEZI, 2009). A constante emissão de brotações, ocasionando maior atratividade ao psíldeo vetor, acrescido ao fato da maior atividade

¹ BARBOSA, J.C. ESALQ/USP

do fluxo de seiva nas plantas jovens, possivelmente podem explicar a maior rapidez no progresso da doença em pomares jovens (BASSANEZI et al., 2010).

Estudos da dinâmica espacial do Huanglongbing mostram que a doença possui características como: (1) padrão levemente agregado, (2) presença de focos secundários ou satélites associados com focos principais, (3) efeito de borda e, (4) dispersão resultante de dois processos: disseminação primária e disseminação secundária.

Alguma evidência de agregação entre plantas com Huanglongbing imediatamente adjacentes foi observada, porém este padrão espacial de agregação não é forte. Em muitos casos, a agregação é maior dentro da linha de plantio que nas entrelinhas (GOTTWALD; AUBERT; XUE-YUAN, 1989; GOTTWALD; AUBERT; LONG, 1991; BASSANEZI et al., 2005). O grau de agregação encontrado é função da incidência da doença, ou seja, agregação não foi observada quando a incidência da doença foi baixa (BASSANEZI et al., 2005). Isto indica que no início da epidemia os psilídeos estabelecem-se em plantas ao acaso dentro dos talhões ou que eles voam ao acaso, disseminando o patógeno, antes de se estabelecerem em uma planta (BASSANEZI et al., 2005).

Observou-se a presença de focos satélites ou secundários de plantas com Huanglongbing associados com focos principais até uma distância de 25 a 50 metros. Isto indica que o movimento do vetor acontece através de plantas imediatamente adjacentes ou de plantas distantes em um raio de 25 a 50 metros, onde inicia um novo foco de infecção (GOTTWALD; AUBERT; LONG, 1991; BASSANEZI et al., 2005).

Maior número de plantas com Huanglongbing ocorre próximo às divisas de talhões, de propriedades e outros locais onde as plantas encontram-se próximas a lagos, canais e estradas (BASSANEZI et al., 2005; GOTTWALD; IREY, 2009). O gradiente da doença em pomares comerciais pode ser explicado pela função potência inversa, com maior incidência de plantas doentes nas bordaduras, decrescendo curvilinearmente em direção ao centro dos talhões (GOTTWALD; IREY, 2009). Este fenômeno é denominado efeito bordadura e, possivelmente, o processo espacial por ele responsável é o movimento do inseto vetor transmitindo o patógeno. O efeito bordadura indica que ao procurar novas plantas para se alimentar, a maioria dos psilídeos não

penetra o pomar, permanecendo nas primeiras plantas com as quais têm contato nas bordaduras dos talhões ou propriedades. Assim, a distribuição da doença é uma indicação indireta da preferência migratória e alimentar dos psíldeos (GOTTWALD; IREY, 2009).

O efeito bordadura, descrito anteriormente, é resultado da migração de psíldeos infectivos de fontes de inóculo externas ao talhão ou propriedade. Esta disseminação primária do patógeno, juntamente com a disseminação secundária (disseminação do patógeno pelo psíldeo a curtas ou médias distâncias dentro do talhão ou propriedade), são os dois importantes processos responsáveis pelo progresso espacial da doença (BASSANEZI et al., 2005; GOTTWALD; IREY; TAYLOR, 2009; GOTTWALD et al., 2010). A disseminação primária é menos freqüente, sendo mais comum a ocorrência da disseminação secundária. Porém, a ocorrência simultânea dos dois tipos de disseminação é a forma mais freqüente de disseminação do patógeno pelo psíldeo vetor (GOTTWALD, 2010). Embora ainda não conclusiva, a disseminação a longas distâncias do patógeno causador do Huanglongbing pelo psíldeo vetor é possível, podendo estar relacionada ao movimento de massas de ar, furacões e tempestades (GOTTWALD, 2010).

O papel de hospedeiros alternativos na dinâmica temporal e espacial do Huanglongbing é pouco estudado. Sabe-se que, além das plantas cítricas, a planta ornamental conhecida vulgarmente como murta (*Murraya paniculata*) é hospedeira do psíldeo vetor e também das bactérias causadoras da doença (HALBERT; MANJUNATH, 2004; LOPES, MARTINS, FRARE, 2005; LOPES, MARTINS, FRARE, 2006).

O número médio de psíldeos por ramos não difere em plantas de murta e em pomelo, indicando que *Diaphorina citri* não prefere um hospedeiro em detrimento ao outro, desde que ambos possuam brotações (TSAI; WANG; LIU, 2002). Como a emissão de fluxos vegetativos é mais freqüente nas plantas de murta que nas plantas cítricas em geral, estas hospedeiras podem ter importante papel na manutenção de altas populações do psíldeo vetor quando fluxos vegetativos não estão disponíveis nos pomares comerciais de citros (TSAI; WANG; LIU, 2002).

A confirmação da transmissão da bactéria associada ao Huanglongbing por psilídeos, de plantas de murta infectadas para plantas cítricas sadias (GASPAROTO et al., 2010; DAMSTEEG et al., 2010), impõe restrições ao cultivo desta planta ornamental. Sabendo-se que a velocidade de progresso da doença depende não somente do número total de psilídeos em uma população, mas também da porcentagem de psilídeos infectados com as bactérias associadas à doença, esta planta ornamental além de manter altas populações dos psilídeos, pode estar infectada, e estes psilídeos podem disseminar o patógeno para pomares comerciais de citros, agravando-se a incidência do Huanglongbing.

3.2.2 Material e Métodos

3.2.2.1 Local

O experimento foi conduzido em casa-de-vegetação com tela antiafídica de 600 m², localizada na sede do Fundo de Defesa da Citricultura (FUNDECITRUS), na cidade de Araraquara/SP. A casa-de-vegetação foi dividida em quatro compartimentos de 150 m², com entradas e antecâmaras individuais. Os compartimentos foram numerados de 1 a 4 e denominados conforme as plantas fonte de inóculo que possuíam.

3.2.2.2 Plantas

Nos compartimentos 1 e 2, foram colocadas cento e cinquenta e seis mudas de laranjeira 'Valência' enxertadas em limoeiro 'Cravo', livres da doença e plantadas em vasos de doze litros (plantas teste). No centro de cada um dos compartimentos foram colocadas quatro plantas cítricas da variedade Natal, sintomáticas, previamente inoculadas pela enxertia de três borbulhas de ramos sintomáticos de plantas doentes com a respectiva espécie de bactéria a ser avaliada. Duas plantas foram inoculadas com '*Candidatus Liberibacter americanus*' e foram dispostas diagonalmente. Da mesma maneira procedeu-se com os outros dois vasos contendo plantas inoculadas com '*Candidatus Liberibacter asiaticus*'. Denominou-se CiAsAm1 para o compartimento 1 e CiAsAm2 para o compartimento 2 (pois possuíam plantas cítricas como fonte de inóculo inoculadas, individualmente, com as duas espécies bacterianas). Estas plantas centrais,

previamente inoculadas com as respectivas bactérias, serviram de fonte de inóculo (plantas fonte) para as outras plantas saudáveis presentes no mesmo compartimento (Figura 3.1).



Figura 3.1 - Compartimento com plantas cítricas previamente inoculadas: duas plantas, diagonalmente dispostas, inoculadas com '*Candidatus Liberibacter americanus*' e, outras duas, com '*Candidatus Liberibacter asiaticus*', servindo de fonte de inóculo para as plantas teste saudáveis. Compartimentos denominados CiAsAm1 e CiAsAm2

Nos compartimentos 3 e 4, foram colocadas cento e cinquenta e oito mudas de laranjeira 'Valência' enxertadas em limoeiro 'Cravo', livres da doença e plantadas em vasos de doze litros (plantas teste). No centro de cada compartimento foram colocadas duas plantas sintomáticas previamente inoculadas com a bactéria '*Candidatus Liberibacter americanus*', através da enxertia de três borbulhas de ramos sintomáticos de plantas doentes (plantas fonte). No compartimento 3, as fontes de inóculo eram plantas cítricas da variedade Natal previamente inoculadas com '*Candidatus Liberibacter americanus*' e no compartimento 4, eram murta (*Murraya paniculata*) também previamente inoculadas com '*Candidatus Liberibacter americanus*' (Figura 3.2). Denominou-se CiAm para o compartimento 3 (pois possuía plantas cítricas inoculadas com '*Candidatus Liberibacter americanus*' como fonte de inóculo) e MurAm para o compartimento 4 (com murta inoculadas com '*Candidatus Liberibacter americanus*' como fontes de inóculo). O croqui das plantas em cada compartimento está mostrado na Figura 3.3.

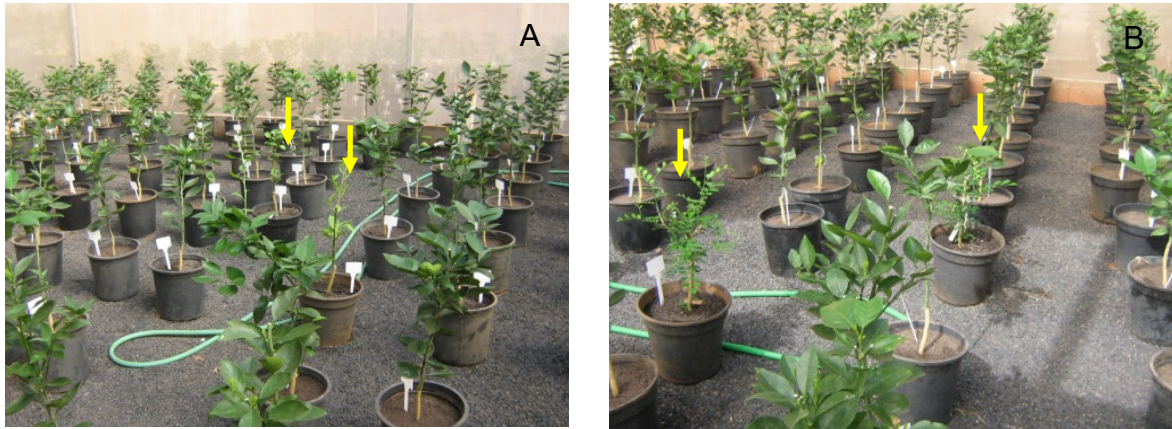


Figura 3.2 - Compartimento com duas plantas cítricas, diagonalmente dispostas, previamente inoculadas com '*Candidatus Liberibacter americanus*', denominado CiAm (A) e compartimento com duas plantas de murta inoculadas com '*Candidatus Liberibacter americanus*' (B), servindo de fonte de inóculo para as plantas teste saudáveis, denominado MurAm

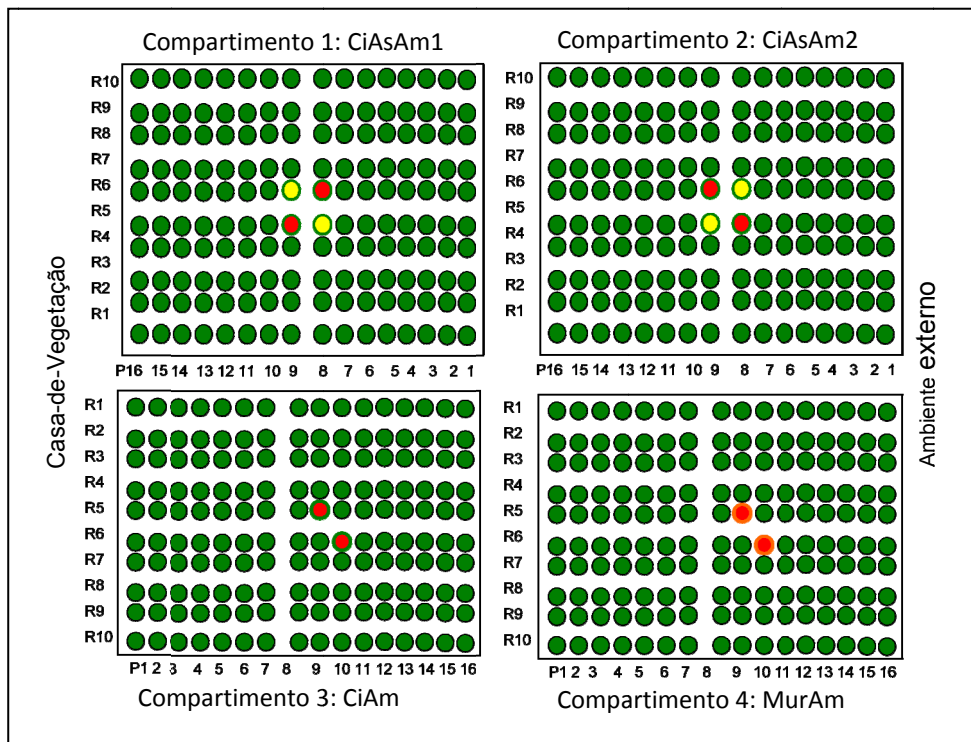


Figura 3.3 - Croqui da casa-de-vegetação, com seus quatro compartimentos individualizados

- Plantas de citros saudáveis (plantas teste)
- Citros com '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' (plantas fonte)
- Citros com '*Candidatus Liberibacter americanus*' (plantas fonte)
- Murta com '*Candidatus Liberibacter americanus*' (plantas fonte)

A identificação da espécie bacteriana presente nas plantas inoculadas e mantidas na casa-de-vegetação como plantas fonte de inóculo foi previamente confirmada por PCR. Estas plantas sintomáticas permaneceram na casa-de-vegetação durante todo o período do experimento, permitindo a disseminação natural do patógeno pelos psilídeos que foram posteriormente introduzidos.

O experimento teve início em 09 de abril de 2008, com o primeiro confinamento de psilídeos nas plantas fonte de inóculo (Figura 3.4). Poda de todas as plantas fonte de inóculo foi realizada aos vinte e oito dias antes do início do experimento, para que no primeiro confinamento dos insetos, estas plantas estivessem com brotações, locais preferenciais para oviposição dos insetos adultos. Para as plantas teste sadias, a poda foi realizada vinte e um dias antes do início do experimento, de modo que as mesmas estivessem com brotações no dia em que os psilídeos fossem liberados, após confinamento nas plantas fonte de inóculo.

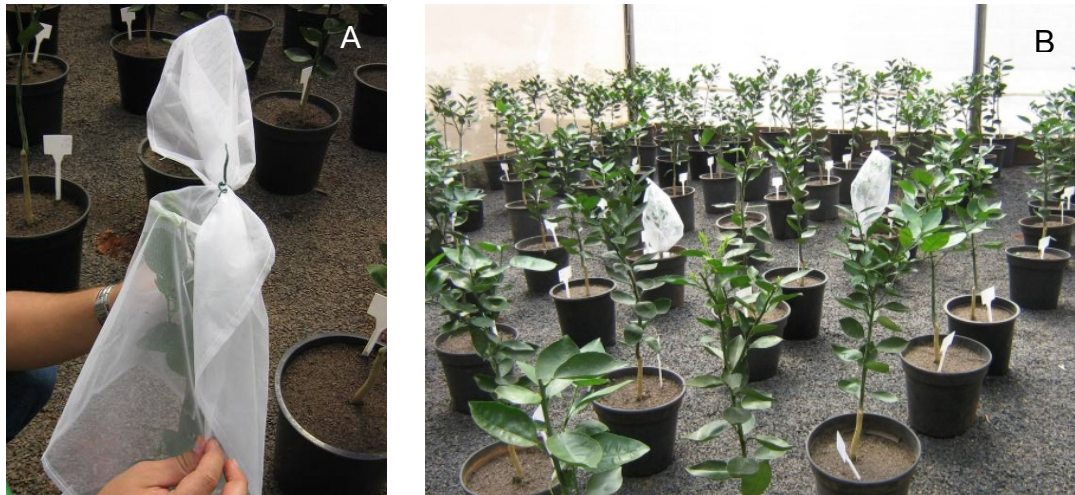


Figura 3.4 - Confinamento de psilídeos adultos, livres de '*Candidatus Liberibacter spp.*', em planta fonte de inóculo (A); Visão geral de um dos compartimentos da casa-de-vegetação, durante os sete dias de confinamento dos psilídeos nas plantas fonte de inóculo (B)

3.2.2.3 Insetos

Psilídeos adultos livres de '*Candidatus Liberibacter spp.*' foram criados em plantas saudáveis de murta. As plantas eram mantidas individualmente em gaiolas (Figura 3.5), as quais permaneciam em ambiente controlado, com temperaturas de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade de $70\% \pm 20\%$ e fotoperíodo de 14h de luz e 10h de escuro (NAVA et al., 2007).



Figura 3.5 - Gaiolas individuais com plantas de murta para criação de psilídeos

Nos compartimentos CiAsAm1 e CiAsAm2, foram confinados vinte e cinco psilídeos adultos, livres de '*Candidatus Liberibacter spp.*' em cada planta fonte de inóculo. Nos compartimentos CiAm e MurAm, cinquenta psilídeos adultos foram aprisionados por planta, de tal forma que totalizassem cem insetos confinados em cada compartimento. Após este período de acesso à aquisição, permitiu-se a livre movimentação e multiplicação dos insetos dentro de cada compartimento, esperando que assim, os insetos que supostamente adquiriram a bactéria passassem a transmiti-la para outras plantas saudáveis dentro de cada compartimento. Devido à grande mortalidade dos psilídeos, os procedimentos de confinamento e liberação dos insetos foram realizados a cada mês, a partir de junho de 2008.

Durante o experimento, monitorou-se a presença de pragas (ácaros, cochonilhas, etc) nos compartimentos e, após constatação das mesmas, procedia-se com a imediata eliminação por meio de técnicas que não afetassem a população de

psilídeos como lavagem com água apenas das folhas infestadas e controle manual das pragas. Em alguns momentos, mesmo com o monitoramento e com as técnicas de controle adotadas, a população das pragas alcançou altos níveis, fazendo-se necessário a aplicação de inseticidas e/ou acaricidas nas plantas, o que afetou a população de psilídeos nos diferentes compartimentos.

3.2.2.4 Avaliações

Quinzenalmente, a população de psilídeos dentro de cada compartimento foi monitorada. Em cada avaliação realizou-se contagens dos insetos (ninfas e adultos) observados em três ramos de plantas previamente determinadas, distribuídas sistematicamente por toda área. Considerou-se como dia 1, a data do primeiro confinamento de psilídeos livres das bactérias nas plantas fonte de inóculo e, portanto, a primeira avaliação da população de psilídeos aconteceu aos 21 dias após o primeiro confinamento, estendendo-se até os 617 dias após o confinamento, totalizando 42 avaliações. As datas de avaliação foram também classificadas de acordo com a estação do ano em que ocorreram.

Periodicamente, psilídeos adultos foram coletados nas plantas teste por toda área e nas plantas fonte de inóculo, para avaliação da infectividade dos vetores por PCR convencional. Como considerou-se como dia 1, a data do primeiro confinamento de psilídeos livres das bactérias nas plantas fonte de inóculo, a primeira coleta para avaliação da infectividade aconteceu aos 105 dias após o primeiro confinamento. As datas de avaliação foram também classificadas de acordo com a estação do ano em que ocorreram.

Mensalmente foram realizadas avaliações visuais em todas as plantas do experimento para observação dos sintomas de Huanglongbing. Periodicamente, amostras foliares foram submetidas a reações de PCR (convencional e Real-Time), para detecção e identificação da espécie bacteriana, mesmo que em plantas assintomáticas. As amostras foram compostas de folhas de quatro plantas próximas e, caso houvesse resultado positivo, amostras individuais eram coletadas de cada planta pertencente à amostra composta e, novamente submetidas à PCR (convencional e Real-Time) para identificar qual(is) a(s) planta(s) responsável (is) pelo resultado

positivo. A estas coletas periódicas de amostras foliares denominou-se “Coleta Geral”. A qualquer momento, caso fosse observado ocorrência de algum sintoma visual típico da doença (mosqueado foliar) ou sintomas menos característicos da doença, porém que causassem dúvida quanto à infecção da planta (deficiência nutricional, nervura saliente, etc), amostras individuais eram coletadas destas plantas e submetidas a PCR convencional para confirmação da doença. A estas coletas denominou-se “Coletas Intermediárias”. A incidência da doença foi calculada como a proporção acumulada de plantas individuais com resultado positivo em PCR (convencional e/ou Real-Time) e o Ct de cada planta doente foi determinado por meio de Real-Time PCR.

Durante todo o período do experimento, informações de temperatura e umidade (máximas e mínimas) foram obtidas diariamente por leitura em termohigrômetros, localizados na área central de cada compartimento. Leituras de radiação fotossinteticamente ativa (PAR) foram realizadas nos períodos da manhã, meio do dia e tarde, com o uso do equipamento LAI-2000.

3.2.2.5 Análise dos dados

O número médio de psilídeos (ninfas e/ou adultos) por planta avaliada (plantas fonte de inóculo e plantas teste) foi calculado em cada compartimento, durante todo o período do experimento, e foi transformado em $\sqrt{(x+0,5)}$ para comparação pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (ZAR, 1999).

Os dados obtidos com a avaliação da infectividade dos psilídeos em cada compartimento foram analisados por meio de teste não paramétrico de comparação de duas proporções a 5% de probabilidade (ZAR, 1999). A porcentagem de psilídeos infectivos em CiAsAm1 e CiAsAm2 foi analisada conjuntamente pois, ambos os compartimentos possuíam o mesmo tratamento (vide número de plantas teste, fonte de inóculo e espécies bacterianas) e a análise individual de cada um destes comportamentos foi igual.

Em cada compartimento, modelos epidemiológicos foram ajustados aos dados da incidência acumulada da doença (proporção) em função do tempo (dias). Considerou-se como dia 1, a data do(s) primeiro(s) resultado(s) positivo(s) em PCR (convencional e/ou Real-Time) para plantas individuais em cada compartimento, ou

seja, o primeiro dia em que a doença comprovadamente estava presente em determinado compartimento (aparecimento da doença). Para todos os compartimentos em que a doença ocorreu (CiAsAm1, CiAsAm2 e MurAm), o dia de aparecimento foi o mesmo. Foram testados os modelos logístico ($y=1/(1+b_1\exp(-rt))$) e Gompertz ($y=\exp(-b_1\exp(-rt))$), onde y é a incidência da doença (em proporção), r , a taxa de progresso dos sintomas, t , o tempo (CAMPBELL, MADDEN, 1990) e b_1 é um parâmetro relacionado ao inóculo inicial. O grau de ajuste de cada modelo aos dados foi avaliado em função dos valores do coeficiente de determinação (R^2) e do padrão dos resíduos (CORNELL, BERGER, 1987; NETER ET AL., 1996). O aplicativo STATISTICA (StatSoft, Tulsa, EUA) foi utilizado nas análises. Os parâmetros estimados foram analisados estatisticamente para cada modelo pelo teste t a 5% de probabilidade.

A distribuição espacial da doença em cada compartimento foi caracterizada por meio de análise espacial de plantas infectadas. Dados da incidência final da doença foram examinados para a constatação da presença ou não de agregação entre plantas doentes em sub-áreas de cada compartimento denominadas *quadrats* (MADDEN; HUGHES, 1995). A área de cada compartimento (150 m²) restringiu a análise espacial da doença a *quadrats* de tamanho 2X2. Para cada *quadrat* foi determinada a proporção de plantas doentes e calculada a incidência (p) na parcela, variável que pode ser definida como a estimativa da probabilidade de uma planta estar sintomática numa determinada área (MADDEN, HUGHES, 1995) e é calculada por $p = X_i/nN$, onde X_i é o somatório do número de plantas sintomáticas em cada *quadrat* i , n é o número de plantas em cada *quadrat* e N é o número total de *quadrats* em cada área. Incidência (p), assim calculada, é a base para o cálculo do índice de dispersão (D) (MADDEN; HUGHES, 1995), o qual é função da variância observada (V_{obs}) e da variância binomial (V_{bin}), ou seja, $D= V_{obs}/V_{bin}$. A significância do índice de dispersão foi verificada por meio do teste de qui-quadrado ao nível de 5% de probabilidade. A hipótese nula foi de que o padrão espacial apresentado pela doença era aleatório e a hipótese alternativa foi de que o padrão era agregado. Os valores de D que não diferiram estatisticamente de 1 foram considerados como indicativo de aleatoriedade. Já valores estatisticamente superiores a 1 foram considerados como indicativo de agregação.

3.2.3 Resultados

Os compartimentos CiAsAm2 e MurAm apresentaram o maior número de insetos (entenda-se por insetos a soma de psílídeos, ninfas e adultos) no período do experimento, além do maior número de ninfas e adultos, separadamente (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 - Número médio de psílídeos por planta avaliada (fonte de inóculo e teste) nos diferentes compartimentos, durante todo o período do experimento

Compartimentos	Ninfas	Adultos	Ninfas + Adultos
CiAsAm1	55,42 b	56,60 b	112,03 b
CiAsAm2	199,30 a	330,90 a	530,22 a
CiAm	47,67 b	33,70 b	81,39 b
MurAm	277,24 a	339,60 a	616,88 a

* Médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; dados transformados em $\sqrt{(x+0,5)}$

O número de psílídeos (adultos e ninfas, separadamente) por planta fonte de inóculo em cada compartimento foi calculado nas diferentes datas de avaliação (Figuras 3.6 a 3.10).

Nos compartimentos CiAsAm1 e CiAsAm2 (Figuras 3.6 e 3.7), os resultados mostram que o comportamento dos insetos diante das plantas cítricas inoculadas com as duas diferentes espécies bacterianas foi semelhante durante o período do experimento em cada compartimento. Nas diferentes datas de avaliação, não há evidência da preferência dos insetos por plantas cítricas inoculadas com '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' ou '*Candidatus Liberibacter americanus*'.

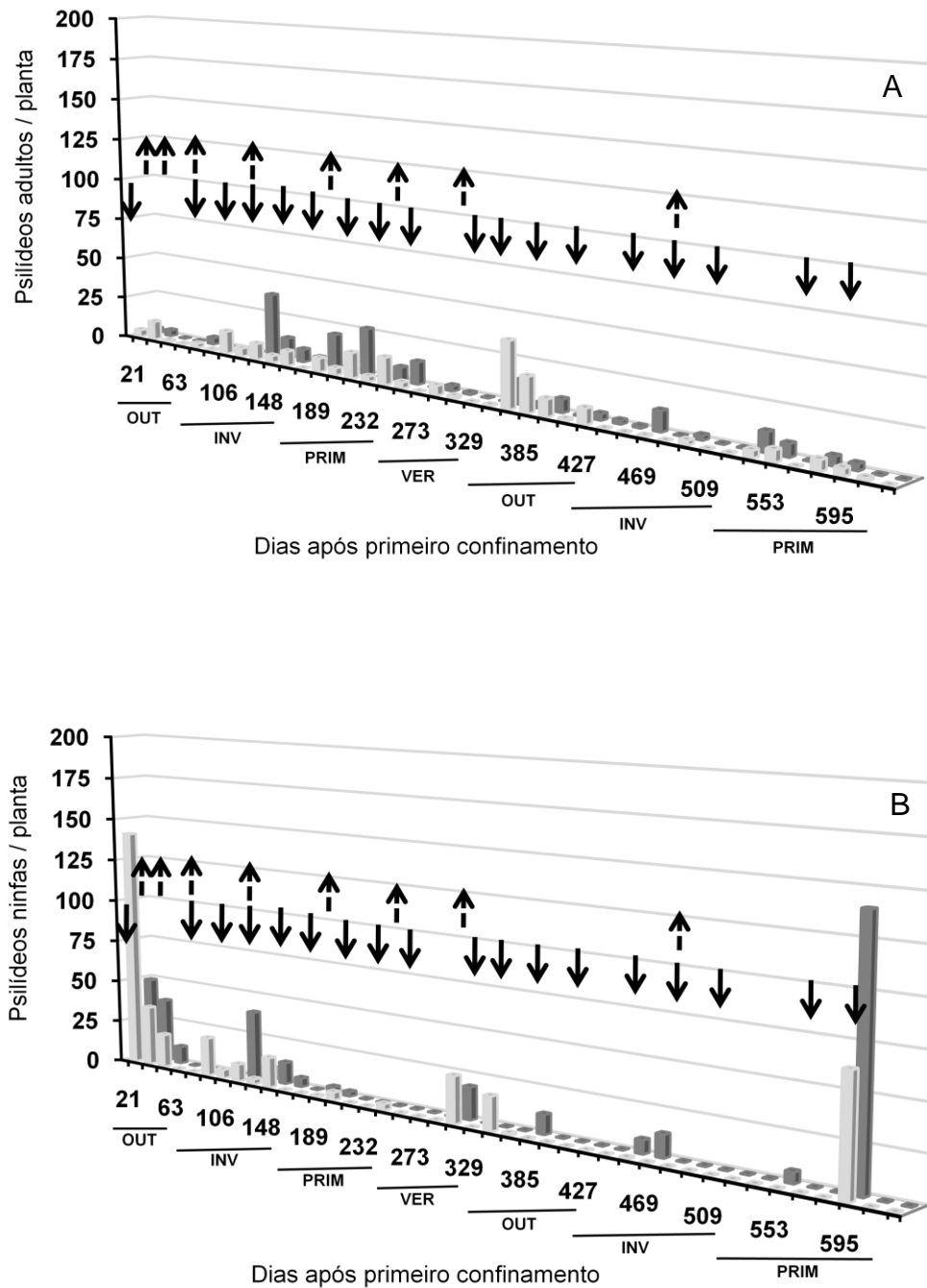


Figura 3.6 - Número de psilídeos adultos (A) e ninfas (B) por planta de citros fonte de inóculo no compartimento CiAsAm1. Colunas na cor cinza escuro representam plantas fonte de inóculo de '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' e colunas na cor cinza claro, '*Candidatus Liberibacter americanus*'. Setas representam as datas de pulverizações (indicação para cima) e as datas de confinamento dos insetos nas plantas fonte de inóculo (indicação para baixo)

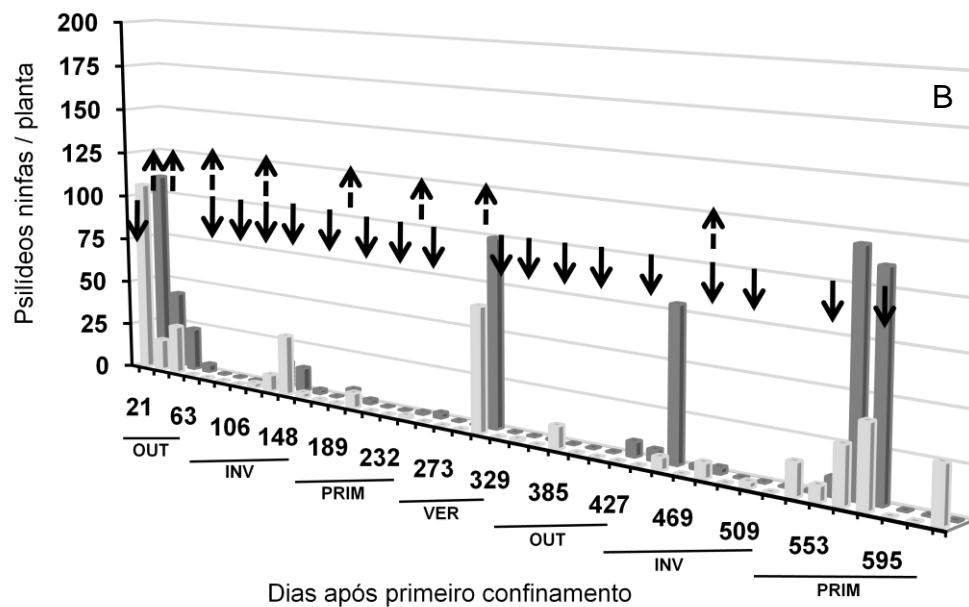
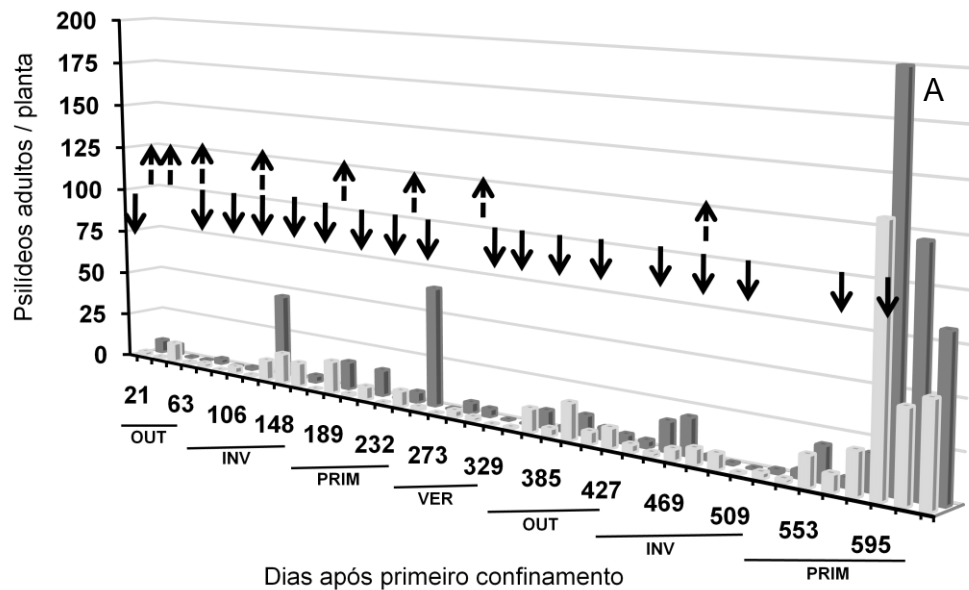


Figura 3.7 - Número de psilídeos adultos (A) e ninfas (B) por planta de citros fonte de inóculo no compartimento CiAsAm2. Colunas na cor cinza escuro representam plantas fonte de inóculo de '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' e colunas na cor cinza claro, '*Candidatus Liberibacter americanus*'. Setas representam as datas de pulverizações (indicação para cima) e as datas de confinamento dos insetos nas plantas fonte de inóculo (indicação para baixo)

Quando as plantas inoculadas com a mesma espécie bacteriana foram comparadas entre os compartimentos, novamente foi observado que os compartimentos CiAsAm1 e CiAsAm2 resultaram em padrões similares de comportamento dos psilídeos em plantas cítricas inoculadas com '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' (Figura 3.8) ou inoculadas com '*Candidatus Liberibacter americanus*' (Figura 3.9). Somente no final do experimento, psilídeos adultos do compartimento CiAsAm2 (colunas na cor cinza escuro) apresentaram-se em maior número que os do compartimento CiAsAm1 (colunas na cor cinza claro) para ambas as espécies bacterianas (Figuras 3.8A e 3.9A).

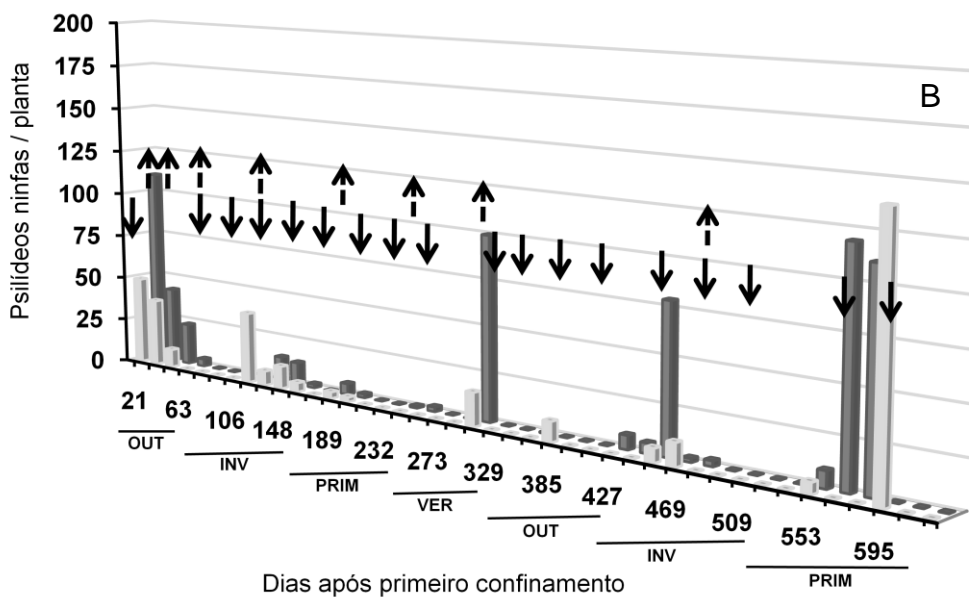
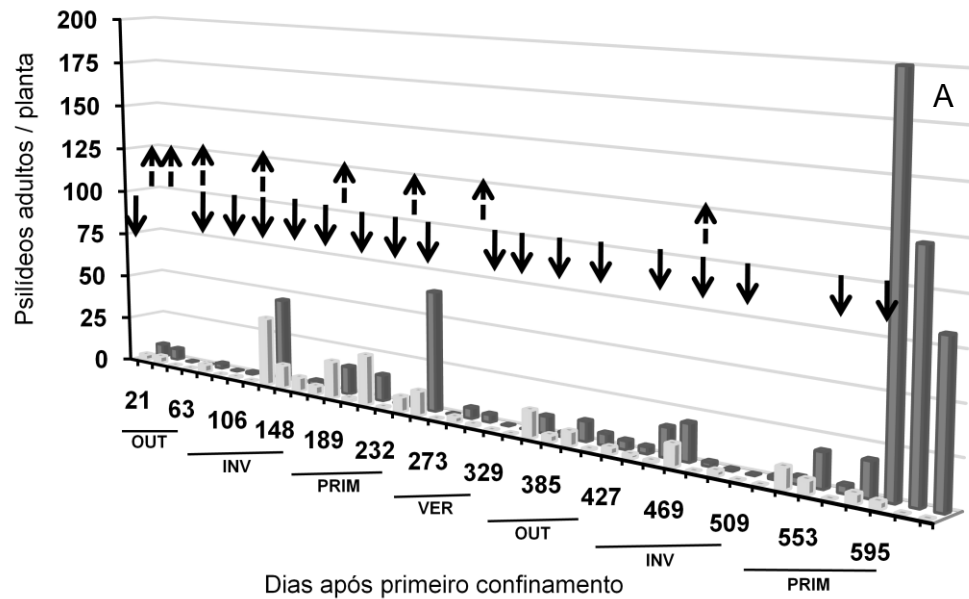


Figura 3.8 - Número de psilídeos adultos (A) e ninfas (B) por planta de citros fonte de inóculo de '*Candidatus Liberibacter asiaticus*'. Colunas na cor cinza claro representam plantas fonte de inóculo do compartimento CiAsAm1 e colunas na cor cinza escuro, plantas fonte de inóculo do compartimento CiAsAm2. Setas representam as datas de pulverizações (indicação para cima) e as datas de confinamento dos insetos nas plantas fonte de inóculo (indicação para baixo)

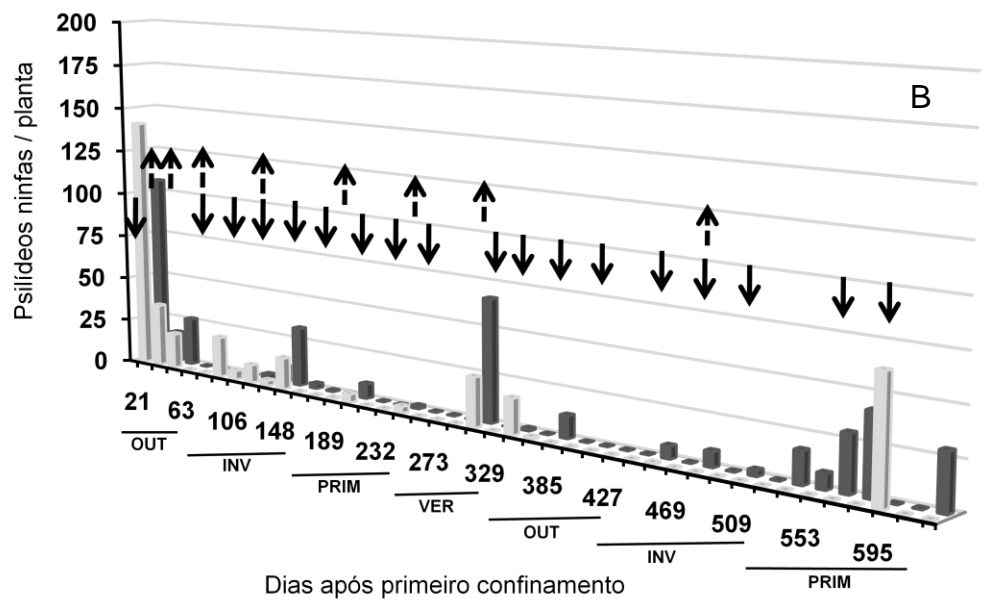
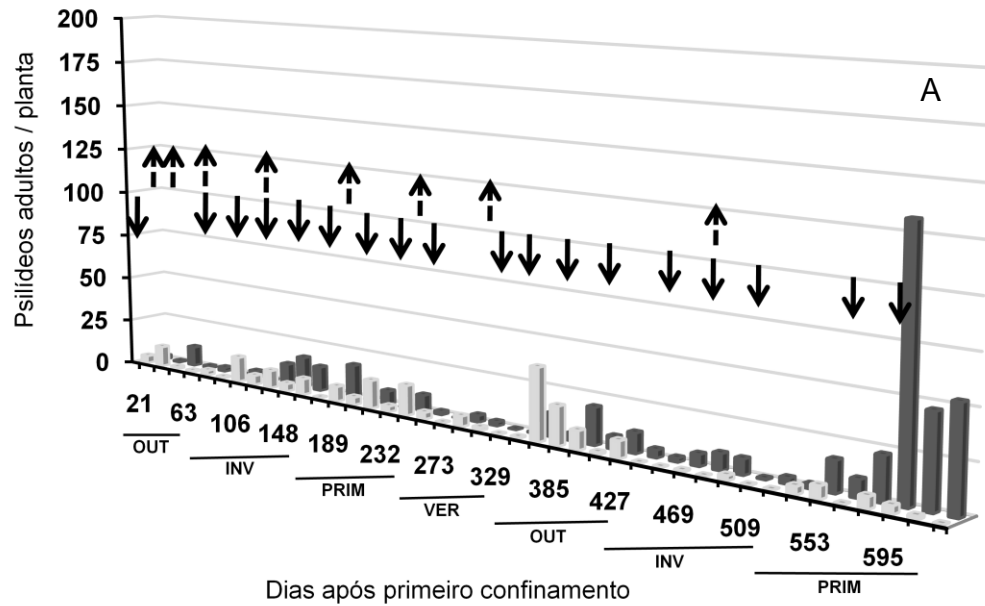


Figura 3.9 - Número de psilídeos adultos (A) e ninfas (B) por planta de citros fonte de inóculo de '*Candidatus Liberibacter americanus*'. Colunas na cor cinza claro representam plantas fonte de inóculo do compartimento CiAsAm1 e colunas na cor cinza escuro, plantas fonte de inóculo do compartimento CiAsAm2. Setas representam as datas de pulverizações (indicação para cima) e as datas de confinamento dos insetos nas plantas fonte de inóculo (indicação para baixo)

Para os compartimentos CiAm e MurAm, como apenas a espécie '*Candidatus Liberibacter americanus*' foi utilizada, a comparação deu-se entre as diferentes plantas fonte de inóculo utilizadas: citros em CiAm e murta em MurAm (Figura 3.10). As plantas de murta utilizadas como fonte de inóculo no compartimento MurAm mostraram, durante todo o experimento, elevado número de psílídeos (colunas na cor cinza escuro), principalmente ninfas (Figura 3.10B), indicando que a reprodução do inseto nas plantas de murta foi maior que nas plantas cítricas.

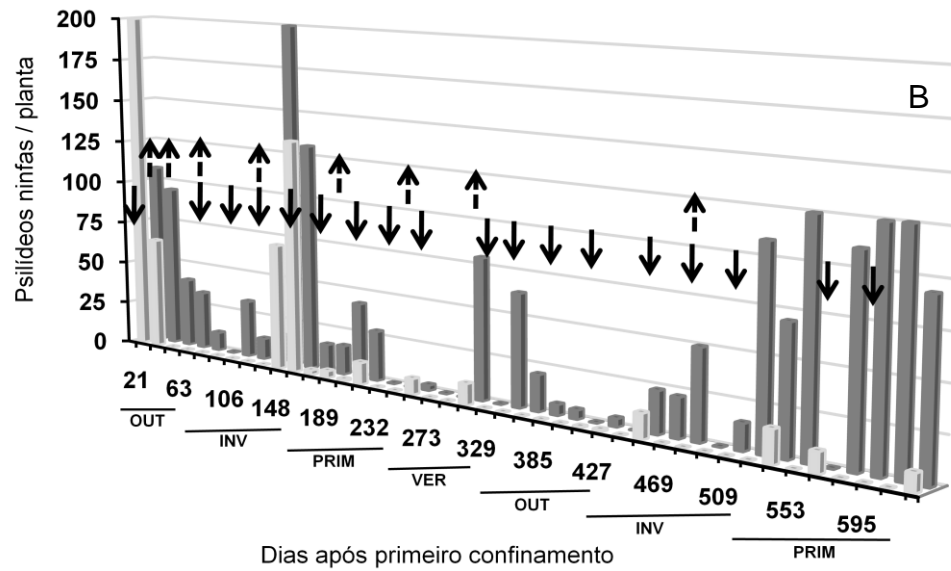
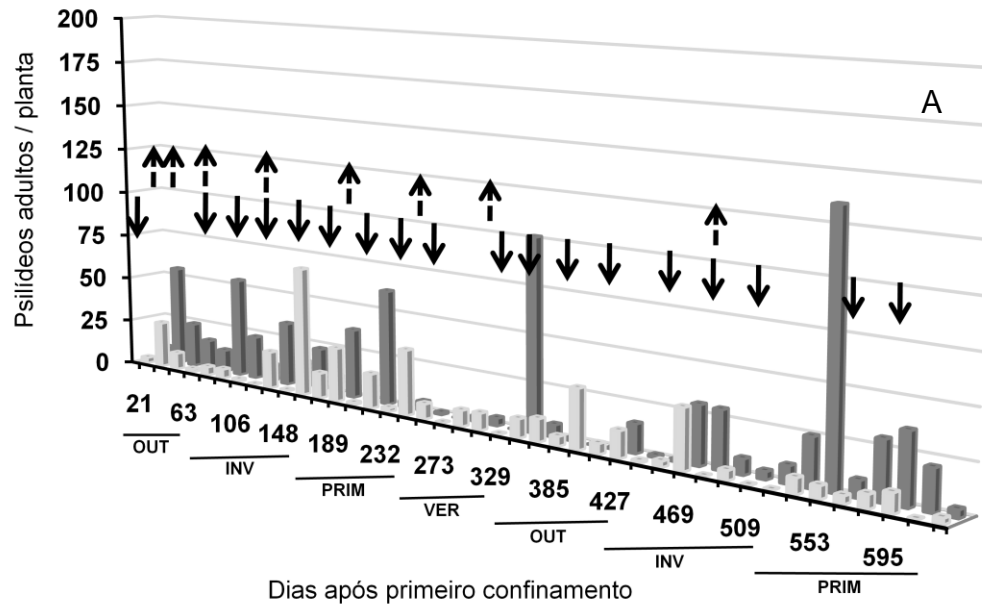


Figura 3.10 - Número de psilídeos adultos (A) e ninfas (B) por planta fonte de inóculo de '*Candidatus Liberibacter americanus*'. Colunas na cor cinza claro representam plantas cítricas como fonte de inóculo do compartimento CiAm e na cor cinza escuro, plantas de murta como fonte de inóculo do compartimento MurAm. Setas representam as datas de pulverizações (indicação para cima) e as datas de confinamento dos insetos nas plantas fonte de inóculo (indicação para baixo)

O número de psílídeos (adultos e ninfas, separadamente) por planta teste (plantas cítricas previamente saudáveis) também foi calculado em cada compartimento, nas diferentes datas de avaliação (Figuras 3.11 e 3.12).

No compartimento CiAsAm1 as plantas teste mostraram maior número de psílídeos adultos no período compreendido entre os dias 134 a 258 após o primeiro confinamento, enquanto que no compartimento CiAsAm2, o período compreendido entre os dias 539 e 617 após o primeiro confinamento foi o de maior número de insetos adultos (Figura 3.11A). O compartimento CiAsAm2 apresentou maior número de ninfas por planta teste, principalmente no período final do experimento (Figura 3.11B).

As plantas teste localizadas no compartimento MurAm apresentaram maior número de psílídeos adultos quando comparadas às plantas teste do compartimento CiAm, nos períodos entre os dias 176 a 273 e 539 a 617 dias após o primeiro confinamento (Figura 3.12). O número de ninfas também foi maior no compartimento MurAm. Durante todo o experimento, o compartimento CiAm mostrou-se com pequeno número de insetos nas plantas teste.

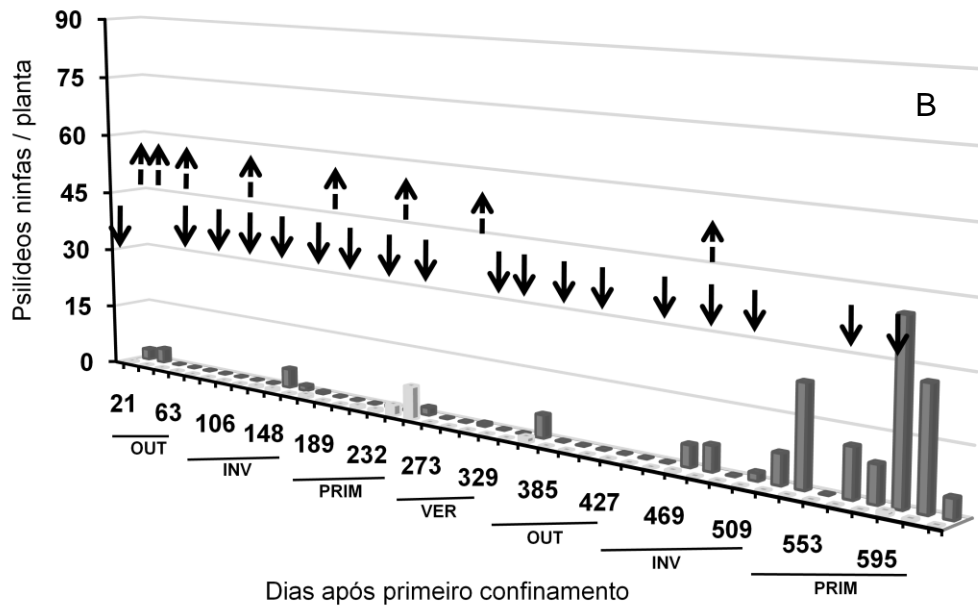
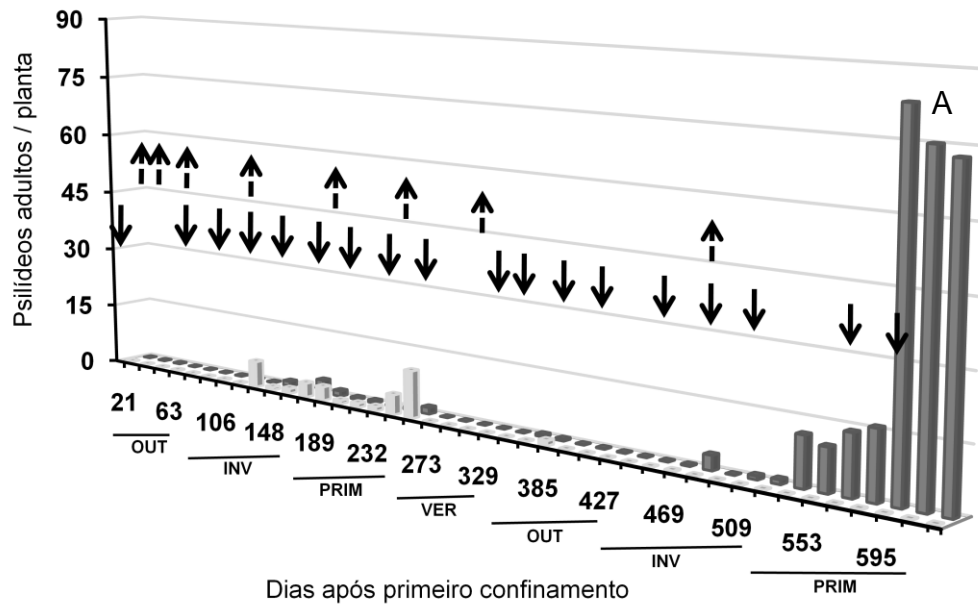


Figura 3.11 - Número de psilídeos adultos (A) e ninfas (B) por planta teste de citros. Colunas na cor cinza claro representam plantas do compartimento CiAsAm1 e colunas na cor cinza escuro, plantas do compartimento CiAsAm2. Setas representam as datas de pulverizações (indicação para cima) e as datas de confinamento dos insetos nas plantas fonte de inóculo (indicação para baixo)

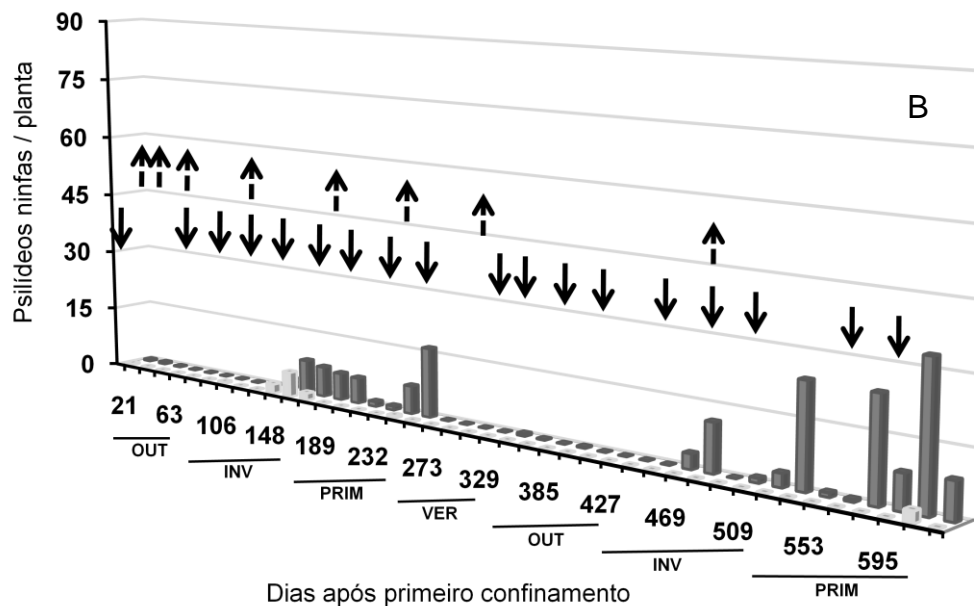
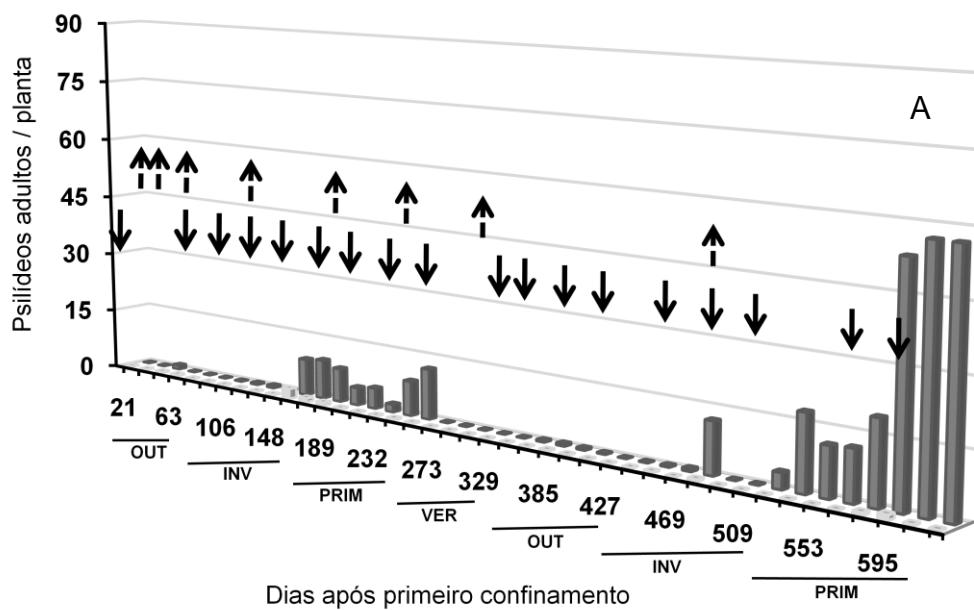


Figura 3.12 - Número de psilídeos adultos (A) e ninfas (B) por plantas teste de citros. Colunas na cor cinza claro representam plantas do compartimento CiAm, e colunas na cor cinza escuro, plantas do compartimento MurAm. Setas representam as datas de pulverizações (indicação para cima) e as datas de confinamento dos insetos nas plantas fonte de inóculo (indicação para baixo)

A porcentagem de psílídeos adultos infectivos distribuídos nas plantas fonte de inóculo e nas plantas teste foi calculada, em todo o período do experimento. Os compartimentos CiAsAm1 e CiAsAm2 foram agrupados com a finalidade de se comparar a aquisição de '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' e '*Candidatus Liberibacter americanus*' (Tabela 3.2). A porcentagem de psílídeos infectivos foi maior para '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' nas plantas fonte de inóculo e nas plantas teste. Já para os compartimentos CiAm e MurAm a comparação deu-se entre as diferentes plantas fonte de inóculo (Tabela 3.3), sendo que a porcentagem de psílídeos infectivos nas plantas do compartimento que teve murta como planta fonte de inóculo foi maior do que no compartimento com citros como fonte de inóculo.

Tabela 3.2 - Porcentagem de psílídeos infectivos nos compartimentos CiAsAm1 e CiAsAm2 (dados agrupados) em plantas fonte de inóculo, plantas testes e no total das plantas

Plantas	' <i>Candidatus L. asiaticus</i> '	' <i>Candidatus L. americanus</i> '
Fonte de inóculo	30,4% a*	0% b
Teste	8,4% a	0% b
Total	12% a	0% b

* Letras iguais na mesma linha não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste não paramétrico de comparação de duas proporções (ZAR, 1999)

Tabela 3.3 - Porcentagem de psílídeos infectivos nos compartimentos CiAm e MurAm em plantas fonte de inóculo, plantas testes e no total das plantas

Plantas	CiAm	MurAm
Fonte de inóculo	6,3% b*	46% a
Teste	4,7% b	9,4% a
Total	5,1% b	13,5% a

* Letras iguais na mesma linha não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste não paramétrico de comparação de duas proporções (ZAR, 1999)

Todos os psílídeos infectivos encontrados nos compartimentos CiAsAm1 e CiAsAm2 resultaram em PCR convencional positivo apenas para '*Candidatus Liberibacter asiaticus*', mesmo havendo nestes compartimentos plantas fonte de inóculo de '*Candidatus Liberibacter americanus*'. Os psílídeos infectivos encontrados nos compartimentos CiAm e MurAm apresentaram apenas resultados positivos em PCR convencional para '*Candidatus Liberibacter americanus*', conforme era previsto, visto

que as plantas fonte destes compartimentos foram inoculadas apenas com '*Candidatus Liberibacter americanus*'.

O número de psíldeos adultos infectivos distribuídos nas plantas fonte de inóculo e nas plantas teste foi calculado para cada compartimento, em cada data de avaliação (Figura 3.13).

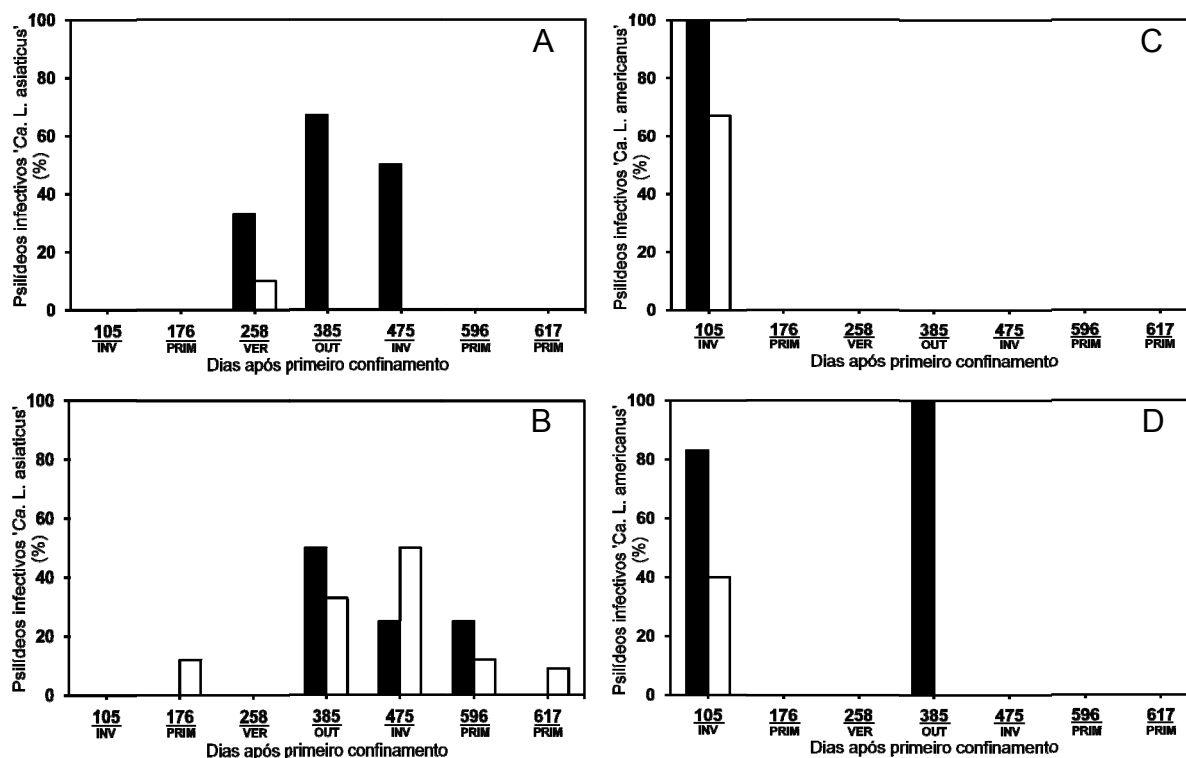


Figura 3.13 - Psíldeos infectivos (%) nos compartimentos CiAsAm1 (A), CiAsAm2 (B), CiAm (C) e MurAm (D) em cada data de avaliação. Colunas em preto representam plantas fonte de inóculo e colunas em branco, plantas teste. Infectividade nula (0% de psíldeos infectivos) indica que não houve amostras coletadas ou que nenhuma amostra coletada resultou em PCR positivo

O compartimento CiAsAm1 apresentou psíldeos infectivos distribuídos nas plantas fonte de inóculo aos 258, 385 e 475 dias após o primeiro confinamento e, somente aos 258 dias após o primeiro confinamento apresentou psíldeos infectivos nas plantas teste. No compartimento CiAsAm2, psíldeos infectivos foram encontrados nas plantas fonte de inóculo aos 385, 475 e 596 dias após o primeiro confinamento e, nas plantas teste, psíldeos infectivos não foram encontrados apenas em duas datas de coleta (105 e 258 dias após o primeiro confinamento). O compartimento CiAm apenas

apresentou psilídeos infectivos nas plantas fonte de inóculo e teste aos 105 dias após o primeiro confinamento. Durante todas as coletas seguintes, até o final do experimento, psilídeos coletados não se apresentaram infectivos neste compartimento. O compartimento MurAm apresentou psilídeos infectivos aos 105 e 385 dias após o primeiro confinamento nas plantas fonte de inóculo e, apenas aos 105 dias após o primeiro confinamento nas plantas teste.

O Ct médio das plantas fonte de inóculo de '*Candidatus Liberibacter americanus*' e de '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' durante todo o experimento foi determinado por meio de Real-Time PCR (Tabela 3.4). Nos compartimentos CiAsAm1 e CiAsAm2 o Ct médio das plantas fonte de inóculo de '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' foi menor que de '*Candidatus Liberibacter americanus*', indicando, portanto, maior concentração bacteriana.

As plantas teste infectadas por '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' apresentaram, em média, em detecção por Real-Time PCR, Ct de 24,3 no compartimento CiAsAm1 e 24,1 no compartimento CiAsAm2. Para '*Candidatus Liberibacter americanus*' no compartimento MurAm, o Ct médio foi de 29,4 e no compartimento CiAsAm2, onde duas plantas teste apresentaram-se infectadas por esta bactéria na última avaliação, o Ct médio foi de 34 (Tabela 3.4). Para todos os compartimentos citados acima, os primeiros sintomas da doença em plantas teste, que posteriormente foram confirmados em PCR (convencional e/ou Real-Time), foram observados no intervalo de 281 a 315 dias (aproximadamente, 9 a 10 meses) após o primeiro confinamento.

Tabela 3.4 - Valores médios de Ct (Cycle Threshold) para plantas infectadas (plantas fonte de inóculo e plantas teste)

Compartimentos	Plantas fonte de inóculo*		Plantas teste*	
	'Ca. L. asiaticus'	'Ca. L. americanus'	'Ca. L. asiaticus'	'Ca. L. americanus'
CiAsAm1	22,7	31,3	24,3	0 ***
CiAsAm2	20,5	27,4	24,1	34
CiAm	- **	26,7	-	0
MurAm	-	28,6	-	29,4

* Ct médio de plantas fonte de inóculo e de plantas teste durante todo o período do experimento

** - representa a inexistência de planta fonte de inóculo para '*Candidatus Liberibacter asiaticus*'

*** 0 indica que nenhuma planta teste foi detectada em Real-Time PCR para '*Candidatus Liberibacter americanus*'

Para a análise temporal da doença, a incidência de Huanglongbing nos compartimentos CiAsAm1, CiAsAm2 e MurAm foi ajustada aos modelos logístico e Gompertz (Figuras 3.14 e 3.15). Os dois modelos permitiram ajustes adequados aos dados obtidos nos compartimentos, com coeficientes de determinação (R^2) maiores que 70%. Apenas no compartimento CiAsAm1 o modelo de Gompertz apresentou maior coeficiente de determinação que o modelo logístico (Tabela 3.5). Nos compartimentos CiAsAm2 e MurAm, maiores coeficientes de determinação foram obtidos pelo modelo logístico, apesar de que os erros dos parâmetros estimados por este modelo foram maiores.

Nos compartimentos CiAsAm1 e CiAsAm2 as plantas doentes que contribuíram para os dados de incidência foram positivas em PCR (convencional e/ou Real-Time) apenas para '*Candidatus Liberibacter asiaticus*', apesar de haver nestes compartimentos plantas fonte de inóculo de '*Candidatus Liberibacter americanus*'. No compartimento CiAsAm2, apenas na última avaliação (383 dias após o aparecimento da doença) é que foram detectadas duas plantas infectadas por '*Candidatus Liberibacter americanus*', sendo que uma destas plantas também resultou em PCR positivo para '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' nesta mesma avaliação. CiAm não apresentou plantas doentes até a data da última avaliação e, portanto, não foi possível realizar análise temporal da doença neste compartimento.

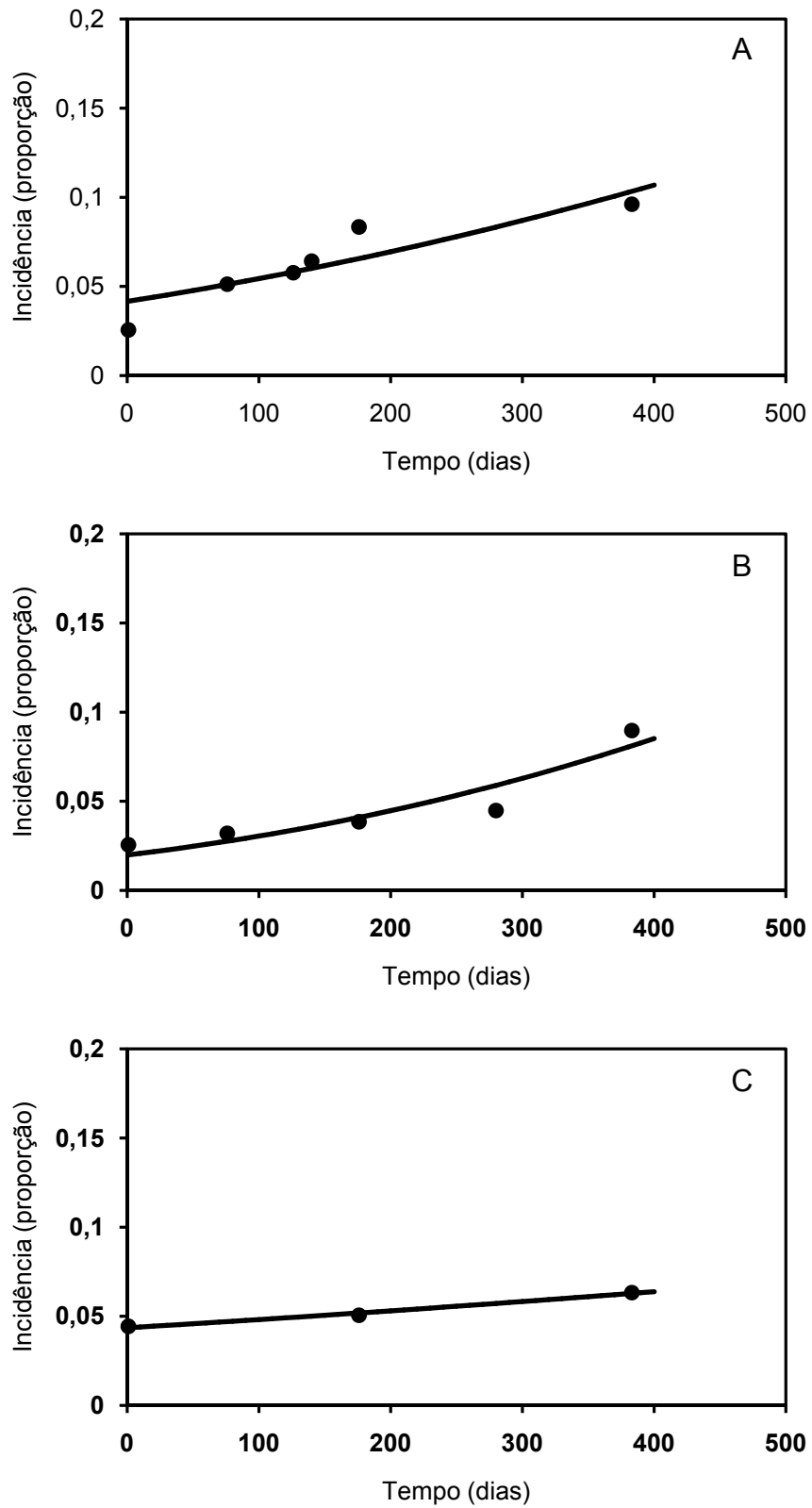


Figura 3.14 - Curvas de progresso de Huanglongbing, estimadas pelo modelo de Gompertz nos compartimentos CiAsAm1 (A), CiAsAm2 (B) e MurAm (C)

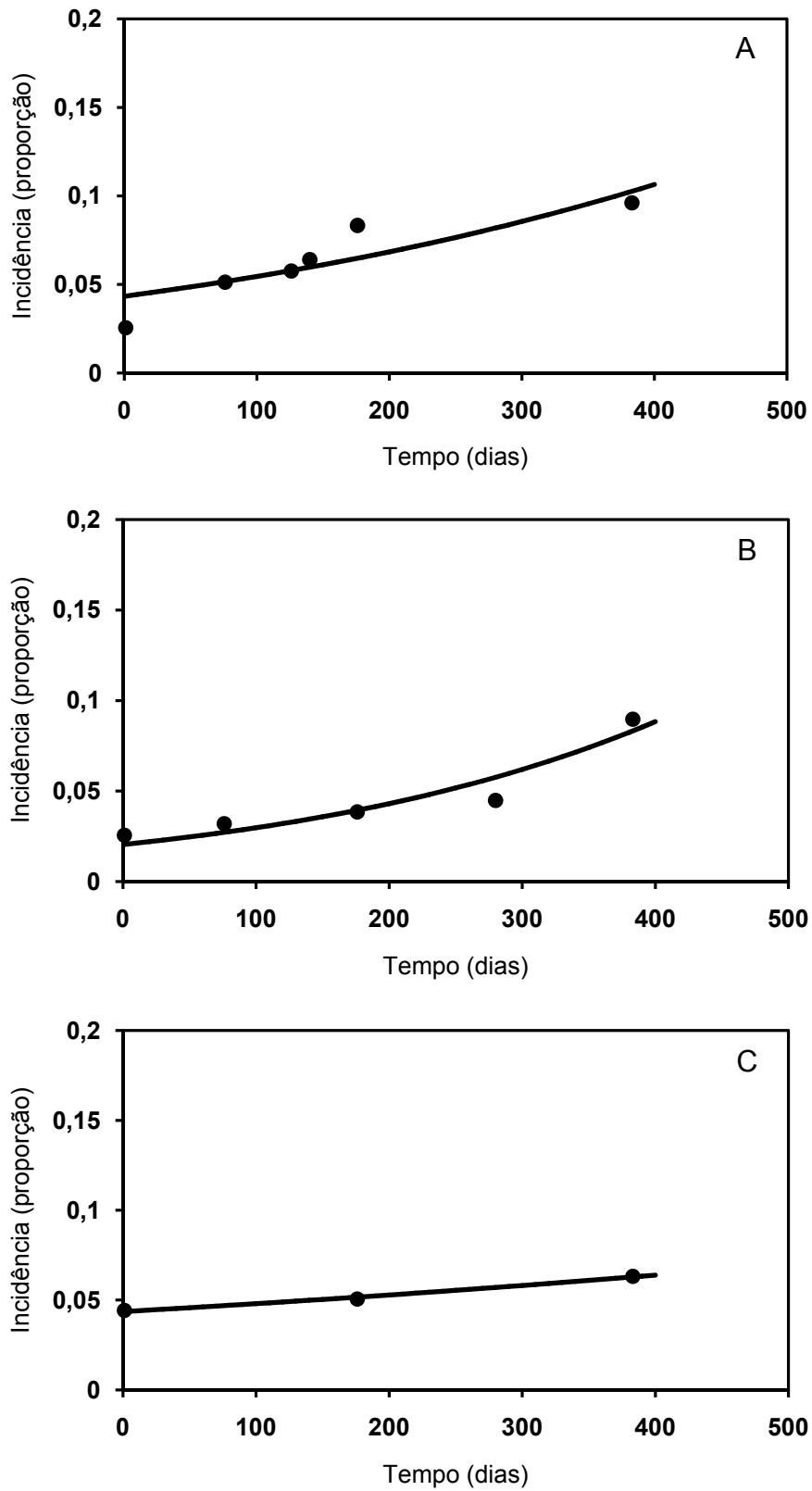


Figura 3.15 - Curvas de progresso de Huanglongbing, estimadas pelo modelo logístico, nos compartimentos CiAsAm1 (A), CiAsAm2 (B) e MurAm (C)

Os compartimentos CiAsAm1 e CiAsAm2 apresentaram maior incidência final quando comparados ao compartimento MurAm (Tabela 3.5). O parâmetro b_1 (relacionado à quantidade de inóculo inicial) foi diferente estatisticamente entre os compartimentos CiAsAm2 e MurAm, quando estimado pelo modelo de Gompertz, não havendo diferenças estatísticas entre os compartimentos para este parâmetro pelo modelo logístico. O parâmetro b_2 (taxa de progresso da doença) foi igual para os compartimentos CiAsAm1 e CiAsAm2, quando estimado pelo modelo de Gompertz e pelo modelo logístico. Para MurAm, a taxa de progresso da doença não diferiu estatisticamente de zero, quando estimada por ambos os modelos.

Tabela 3.5 - Incidência final e parâmetros estimados pelos modelos Gompertz e logístico

Compartimentos	Incidência (%)	Modelo	R ² (a)	b1 (b)	erro b1 (c)	b2 (b)	erro b2 (c)
CiAsAm1	9,61	Gompertz	0,7924	3,180 ab	0,168	0,0009 a	0,0002
		Logístico	0,7659	22,064 a	3,750	0,0024 a	0,0007
CiAsAm2	8,97	Gompertz	0,8718	3,923 a	0,314	0,0012 a	0,0003
		Logístico	0,9009	47,893 a	12,070	0,0038 a	0,0008
MurAm	6,33	Gompertz	0,9885	3,134 b	0,029	0,0003 ns	0,00003
		Logístico	0,9914	21,929 a	0,575	0,0010 ns	0,00009

(a) Coeficientes de determinação obtidos pelo modelo

(b) b_1 e b_2 são parâmetros estimados pelos modelos, onde b_1 está relacionado a quantidade de inóculo inicial e b_2 é a taxa de progresso da doença. Parâmetros comparáveis pelo teste t ($p < 0,05$). Médias seguidas das mesmas letras, dentro de cada modelo, não diferem entre si. Não significativo (ns), ou seja, não diferente de zero.

(c) erros obtidos para cada parâmetro estimado pelo modelo

A análise espacial da doença por meio do cálculo do índice de dispersão (D) em cada compartimento mostrou variação dos mesmos, sendo 1,61 para CiAsAm1, 1,53 para CiAsAm2 e 1,48 para MurAm. Todos os índices de dispersão apresentaram-se maiores que 1 ($p < 0,05$) pelo teste de Qui-quadrado, indicando agregação das plantas doentes.

3.2.4 Discussão

A maior população de insetos no período do experimento foi encontrada nos compartimentos CiAsAm2 e MurAm. Dados de temperatura, umidade e radiação fotossinteticamente ativa coletados durante todo o período do experimento, em cada compartimento, não mostraram diferenças ambientais que expliquem a diferença observada no número total de insetos entre estes dois compartimentos e os compartimentos CiAsAm1 e CiAm (Anexos).

Apesar da diferença significativa no número de insetos entre os compartimentos citados (CiAsAm2 e MurAm *versus* CiAsAm1 e CiAm), resultados apresentados para CiAsAm1 e CiAsAm2 mostram que estes compartimentos, os quais receberam o mesmo tratamento (vide número de plantas teste, fonte de inóculo e espécies bacterianas), foram semelhantes no que diz respeito à incidência final da doença e parâmetros estimados pelos modelos ajustados, indicando que, aparentemente, não houve influência da população de insetos no progresso temporal da doença. Isto está de acordo com BROADBENT (1957) que em sua revisão mostra que o número de insetos vetores de vírus presentes em uma determinada área não está proporcionalmente relacionado com a incidência da doença, ao contrário de insetos pragas, onde o dano causado é proporcional a população da praga presente. Capoor et al. (1974) mostrou em seu trabalho que 68% das plantas expostas a um único psilídeo apresentaram-se infectadas por Huanglongbing, enquanto que 100% das plantas tornaram-se doentes quando expostas a grupos de mais de 5 psilídeos. Por isso, devem ser considerados aspectos como o tempo de persistência do patógeno no vetor e o mecanismo de transmissão deste patógeno pelo inseto vetor (MADDEN; JEGER; VAN DEN BOSCH, 2000). Para Huanglongbing, esta relação bactéria- psilídeo é do tipo persistente propagativa, porém com aparentemente rápida aquisição e inoculação do patógeno (CAPOOR; RAO; VISWANATH, 1974).

A flutuação populacional de insetos (ninfas e adultos) foi semelhante, com mesmas épocas de alta e baixa densidade nas plantas cítricas fonte de inóculo de '*Candidatus Liberibacter americanus*' no compartimento CiAm e nas plantas de murta inoculadas com a mesma espécie bacteriana em MurAm, ao longo de todo o

experimento. Apesar da semelhança no comportamento, durante todo o período, plantas fonte de murta apresentaram maior número de insetos que plantas fonte de citros, principalmente em número de ninfas. Provavelmente, isto se deve ao fato de fluxos vegetativos serem mais comumente observados em plantas de murta, mesmo que inoculadas, contrapondo-se às plantas cítricas inoculadas as quais, devido aos severos sintomas da doença, vegetam em menor frequência e, conseqüentemente, tornam-se menos favoráveis à reprodução dos psíldeos (TSAI; WANG; LIU, 2002).

O compartimento MurAm apresentou maior porcentagem de psíldeos adultos infectivos nas plantas fonte de inóculo quando comparado ao compartimento CiAm. Não foram observados sintomas severos da doença em plantas fonte de inóculo de murta, as quais continuaram vegetando durante todo o período do experimento, com apenas leve deficiência mineral em poucas folhas. Possivelmente, a maior emissão de fluxos vegetativos em murta permitiu melhor eficiência de aquisição bacteriana pelos psíldeos nestas plantas fonte de inóculo do que nas plantas cítricas inoculadas com a mesma bactéria ('*Candidatus Liberibacter americanus*') no compartimento CiAm (BONANI et al., 2009). Neste compartimento (CiAm), apenas a primeira avaliação de infectividade de psíldeos resultou em PCR positivo. Provavelmente, os sintomas severos da doença ocasionados por '*Candidatus Liberibacter americanus*' nas plantas cítricas fonte de inóculo, como por exemplo, menor emissão de fluxos vegetativos e folhas coriáceas, podem ter influenciado a aquisição bacteriana pelos psíldeos adultos (BONANI et al., 2009).

Para ilustrar a diferença na sintomatologia existente entre plantas de citros (CiAm) e murta (MurAm), ambas fonte de inóculo de '*Candidatus Liberibacter americanus*', a figura 3.16A mostra uma planta fonte de inóculo de murta com folhas verdes (apenas leve deficiência mineral) e com algumas brotações, mesmo localizada ao lado de planta cítrica teste com intenso sintoma da doença (PCR positiva para a bactéria) e a figura 3.16B mostra planta cítrica fonte de inóculo da bactéria exibindo sintomas severos de Huanglongbing.



Figura 3.16 - Planta de murta como fonte de inóculo do compartimento MurAm sem sintomas da doença, ao lado de planta teste de citros com sintoma da doença (A) e planta sintomática de citros, fonte de inóculo de '*Candidatus Liberibacter americanus*' no compartimento CiAm (B)

A eficiência de aquisição de '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' por psíldeos adultos foi maior que de '*Candidatus Liberibacter americanus*' quando ambas as espécies estavam presentes em diferentes plantas cítricas fonte de inóculo primário (compartimentos CiAsAm1 e CiAsAm2). Possivelmente, os sintomas da doença, mais pronunciados nas plantas cítricas inoculadas com '*Candidatus Liberibacter americanus*' (Figura 3.17), resultaram na maior porcentagem de psíldeos infectivos para '*Candidatus Liberibacter asiaticus*', visto que as plantas cítricas inoculadas com '*Candidatus Liberibacter americanus*' apresentavam-se com pouca ou nenhuma brotação, além de suas folhas serem bastante coriáceas com nervuras salientes, dificultando a penetração do estilete do psíldeo vetor nos vasos do floema das plantas fonte de inóculo (BONANI et al., 2009).



Figura 3.17 - Sintomas de Huanglongbing em plantas cítricas, fonte de inóculo de '*Candidatus Liberibacter americanus*' (A) e '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' (B) nos compartimentos CiAsAm1 e CiASAm2

Além disto, os valores médios de Ct determinados nas plantas infectadas dos compartimentos CiAsAm1 e CiAsAm2 estão de acordo com os descritos na literatura, sabendo-se que o nível populacional de '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' nos tecidos de plantas infectadas é maior do que o de '*Candidatus Liberibacter americanus*' (LOPES et al., 2009). O menor Ct e, conseqüentemente, maior título bacteriano nas plantas fonte de inóculo de '*Candidatus Liberibacter asiaticus*', pode ter aumentado as chances dos insetos vetores adquirirem com maior eficiência esta bactéria do que '*Candidatus Liberibacter americanus*' (LOPES et al., 2009), o que também explicaria a maior porcentagem de psíldeos infectivos para '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' nos compartimentos CiAsAm1 e CiAsAm2. Estas podem ser algumas das explicações para a prevalência, nos dias atuais, da espécie asiática em pomares comerciais do Estado de São Paulo (BOVÉ et al., 2009).

Os mecanismos envolvidos na colonização dos vasos do floema de plantas cítricas pelas diferentes espécies bacterianas associadas ao Huanglongbing devem ser investigados de modo a proporcionar melhor entendimento dos sintomas causados por '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' e '*Candidatus Liberibacter americanus*'. Aparentemente, não há relação entre a população bacteriana presente nos vasos do floema e a severidade dos sintomas causados, visto que plantas fonte de inóculo de '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' apesar de apresentarem menores valores de Ct (indicando maior número de bactérias no tecido vegetal), proporcionaram sintomas visuais menos severos em plantas cítricas do que quando inoculadas com '*Candidatus Liberibacter americanus*'. É importante lembrar que os valores de Ct das plantas fonte de inóculo obtidos no presente trabalho são resultantes da inoculação artificial por meio de enxertia destas plantas, e não da transmissão bacteriana natural feita pelo psíldeo vetor.

A avaliação da infectividade de psíldeos adultos ao longo do experimento não mostrou prevalência de uma estação do ano em detrimento a outra, ou seja, em cada compartimento situações de infectividade em determinada estação do ano, necessariamente não se repetiram na mesma estação do ano em outro momento. Em cada avaliação, fatores como número de psíldeos e concentração bacteriana nas

plantas podem ter influenciado a infectividade dos insetos (TSAI; WANG; LIU, 2002; BONANI et al., 2009; LOPES et al., 2009; MANJUNATH et al., 2010).

Ao longo do experimento, a aplicação de inseticidas e/ou acaricidas, visando o controle de pragas, comprometeu as avaliações da população de psílídeos, visto que a flutuação populacional não foi natural, sendo muitas vezes influenciada por estas pulverizações. Durante todo o experimento, oito aplicações em curtos intervalos fizeram-se necessárias, as quais foram realizadas até o dia 497 após o primeiro confinamento. A partir deste dia, até o último dia de avaliação (617 dias após o primeiro confinamento), compreendendo um intervalo de 120 dias sem pulverizações, o que se observou foi uma recuperação nos níveis populacionais dos psílídeos que alcançaram as melhores médias nas plantas teste e fonte de inóculo dos compartimentos CiAsAm2 e MurAm. O maior intervalo sem pulverizações, ocorrido entre os dias 329 e 497 após o primeiro confinamento, não surtiu o mesmo efeito no incremento da população de psílídeos que o intervalo de 120 dias citados acima, possivelmente, devido ao fato de que o período entre os dias 497 e 617 após o primeiro confinamento correspondeu ao final do inverno e todo o período de primavera, onde a população de psílídeos é maior (TSAI; WANG; LIU, 2002), enquanto que o período entre os 329 e 497 dias após o confinamento, correspondeu ao final do verão, todo o período de outono e mais da metade do período de inverno.

Os modelos logístico e Gompertz resultaram em ajustes adequados aos dados de incidência de Huanglongbing em todos os compartimentos que apresentaram plantas doentes até a última avaliação. Estes modelos apresentaram bons coeficientes de determinação (R^2), maiores que 70%, sendo este um dos critérios considerados na escolha do modelo mais adequado para explicar o progresso de uma doença no tempo (BERGAMIN FILHO, 1995; MADDEN; HUGHES; VAN DEN BOSH, 2007). Os valores de resíduo (diferença entre incidência observada e incidência estimada pelo modelo) em função do tempo, também considerados na escolha do melhor modelo (BERGAMIN FILHO, 1995; MADDEN; HUGHES; VAN DEN BOSH, 2007), não mostraram tendência e foram similares para ambos os modelos, com valores entre -0,02 e 0,02 para os compartimentos CiAsAm1 e CiAsAm2 e, entre -0,007 e 0,001 para o compartimento MurAm (dados não apresentados), o que indica que ambos os modelos ajustaram-se

aos dados de maneira adequada. O erro padrão estimado para cada parâmetro do modelo é um procedimento aconselhável na escolha do melhor modelo (CAMPBELL; MADDEN, 1990) e, neste caso, os erros estimados para os parâmetros pelo modelo logístico, foram maiores que os estimados pelo modelo de Gompertz (Tabela 3.2) e, portanto a escolha do modelo Gompertz seria mais apropriada.

No campo, o progresso temporal de Huanglongbing vem sendo adequadamente descrito pelos modelos logístico, Gompertz e exponencial (GOTTWALD; AUBERT; XUE-YUAN, 1989; BERGAMIN FILHO et al., 2009; BELASQUE et al., 2009; GOTTWALD et al., 2010). Na maioria dos casos, os pomares tornam-se improdutivos e são removidos antes de se alcançar a assíntota da curva de progresso da doença e, conseqüentemente, com baixos níveis de incidência, na fase inicial da epidemia, qualquer dos três modelos citados acima são satisfatoriamente ajustados aos dados. Os dados de incidência de Huanglongbing analisados neste trabalho, apesar de terem sua origem em plantas mantidas em casa-de-vegetação, têm em comum com os trabalhos de campo a necessidade da manutenção das plantas por um período de tempo mais abrangente, pois a epidemia mostra-se em seu estágio inicial, dois anos após a instalação do experimento, não ultrapassando 10% de plantas doentes em cada compartimento.

A taxa de progresso de Huanglongbing em cada compartimento que apresentou a doença foi estimada pelos dois modelos e mostrou-se inferior aos trabalhos realizados no campo, em pomares comerciais. Pelo modelo de Gompertz, a taxa diária foi estimada em: 0,0003 para MurAm; 0,0009 para CiAsAm1 e 0,0012 para CiAsAm2 (correspondendo a uma taxa de progresso anual de, respectivamente: 0,11; 0,33 e 0,44), o que está de acordo com alguns talhões comerciais avaliados por Gottwald et al. (2010), o mesmo acontecendo para este parâmetro estimado pelo modelo logístico em: 0,001 para MurAm; 0,002 para CiAsAm1 e 0,004 para CiAsAm2 (correspondendo a uma taxa anual de, respectivamente: 0,4; 0,7 e 1,5). Gottwald et al. (1989) ajustaram o modelo logístico aos dados de incidência de Huanglongbing em pomares comerciais da China e Ilhas Reunião, obtendo taxas de progresso da doença variando entre 1 e 2,5 ao ano, sendo, portanto, coincidentes apenas com o compartimento CiAsAm2. É conveniente lembrar que em todos estes trabalhos, havia no campo apenas a presença

da espécie '*Candidatus Liberibacter asiaticus*', situação diferente da encontrada nas condições brasileiras onde '*Candidatus Liberibacter americanus*' também está presente, mesmo que em menor incidência nos dias atuais.

As taxas de progresso de Huanglongbing (*b2*) estimadas pelo modelo de Gompertz e logístico foram estatisticamente iguais nos compartimentos CiAsAm1 e CiAsAm2 e não foi diferente de zero (não significativo) em MurAm.

Nos compartimentos onde plantas cítricas serviram como fonte de inóculo primário de ambas as espécies bacterianas, novas plantas foram infectadas com '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' mais precocemente que com '*Candidatus Liberibacter americanus*', ou seja, considerando-se como dia 1, o primeiro dia de aparecimento da doença causada pela espécie asiática, apenas 383 dias após (CiAsAm2) ou mais (CiAsAm1) a doença foi relatada no mesmo local sendo causada pela espécie americana. A necessidade de um período ainda maior de avaliações torna-se relevante a partir do aparecimento destas primeiras plantas infectadas por '*Candidatus Liberibacter americanus*' de modo a permitir o acompanhamento da epidemia agora na presença de ambas as espécies, não apenas nas plantas fonte de inóculo primário.

A não constatação de plantas doentes no compartimento CiAm também é um indicativo de que mais dias de avaliação serão necessários para a observação do aparecimento da doença neste compartimento e, posterior comparação com o progresso da epidemia no compartimento MurAm. No mínimo, duas possibilidades podem explicar a ausência da doença neste compartimento: (1) os psilídeos deixaram de adquirir a bactéria nas plantas fonte de inóculo logo após a primeira avaliação de infectividade, devido à elevada severidade da doença nestas plantas que dificultou a aquisição bacteriana pelos vetores ou (2) o período de incubação é tão longo que as plantas teste estão infectadas, porém com concentração bacteriana em níveis não detectáveis por PCR (convencional e Real-Time), o que explicaria a inexistência de plantas com sintomas evidentes da doença neste compartimento até o momento.

No compartimento MurAm, a detecção de '*Candidatus Liberibacter americanus*' em plantas cítricas previamente saudáveis possibilitou o primeiro relato de que psilídeos podem adquirir naturalmente a bactéria de plantas de murta infectadas e transmiti-la

para plantas cítricas (GASPAROTO et al., 2010). Esta constatação experimental impõe restrições à produção, transporte e comércio desta planta ornamental, uma vez que este arbusto além de aumentar a população de psílídeos (TSAI; WUNG; LIU, 2002) pode contribuir com o aumento da doença. Possivelmente, a aplicação de instruções normativas, como a IN 53 publicada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), possibilitarão melhor controle da doença causada pela espécie americana da bactéria.

Os índices de dispersão calculados mostraram agregação das plantas doentes em *quadrats* 2x2 em todos os compartimentos analisados, possivelmente relacionada à dinâmica dos psílídeos vetores dentro da casa-de-vegetação ser diferente daquela encontrada em condições de campo. Bassanezi et al. (2005), trabalhando com dados de incidência de Huanglongbing em campo no Brasil, não encontrou agregação de plantas doentes na maioria dos talhões analisados em *quadrats* 2x2. No entanto, os valores de incidência da doença encontrados na maioria destes talhões foram inferiores aos encontrados neste trabalho. Possivelmente, a área relativamente pequena de cada compartimento e a condição de ambiente controlado influenciou estes resultados, prejudicando a análise espacial da doença e, conseqüentemente informações conclusivas sobre a disseminação do patógeno pelo psílídeo vetor em cada condição estudada.

3.3 Conclusões

- Quando '*Candidatus Liberibacter americanus*' e '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' estão presentes em diferentes plantas cítricas utilizadas como fonte de inóculo, há maior transmissão de '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' para novas plantas cítricas por *Diaphorina citri*.

- A eficiência de aquisição de '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' por psílídeos adultos é maior que de '*Candidatus Liberibacter americanus*' quando ambas as espécies estão presentes em diferentes plantas cítricas fonte de inóculo primário.

- A eficiência na transmissão de '*Candidatus Liberibacter americanus*' para plantas cítricas por *Diaphorina citri* é maior quando *Murraya paniculata* (murta) é utilizada como fonte de inóculo desta bactéria, e não citros.

- A eficiência de aquisição de '*Candidatus Liberibacter americanus*' por psílídeos adultos é maior quando *Murraya paniculata* (murta) é utilizada como fonte de inóculo desta bactéria, e não citros.

- O psílídeo *Diaphorina citri* pode adquirir naturalmente '*Candidatus Liberibacter americanus*' de *Murraya paniculata* (murta) e transmiti-la para plantas cítricas.

Referências

AUBERT, B. *Trioza erytreae* Del Guercio and *Diaphorina citri* Kuwayama (*Homoptera: Psylloidea*), the two vectors of Citrus Greening Disease: Biological aspects and possible control strategies. **Fruits**, Paris, v. 42, n. 3, p.149-162, 1987.

BARBOSA, J.C.; ECKSTEIN, B.; GASPAROTO, M.C.G.; SILVA, R.; BELASQUE JUNIOR, J.; BERGAMIN FILHO, A. Influence of temperature in the acquisition of '*Candidatus Liberibacter americanus*' by *Diaphorina citri*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 100, n. 6 (supplement), p. S11, 2010.

BASSANEZI, R.B.; BUSATO, L.A.; BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L.; GOTTWALD, T.R. Preliminary spatial pattern analysis of Huanglongbing in São Paulo, Brazil. In: INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS (IOCV), XVI, 2005, Riverside. **Proceedings ...** Riverside: IOCV, 2005. p. 341-355.

BASSANEZI, R.B.; MONTESINO, L.H.; AMORIM, L.; GASPAROTO, M.C.G.; BERGAMIN FILHO, A. Yield reduction caused by Huanglongbing in different sweet orange cultivars in São Paulo, Brazil. In: INTERNATIONAL RESEARCH CONFERENCE ON HUANGLONGBING, 2008, Orlando. **Proceedings ...** Orlando: Plant Management Network, 2009. p. 270-273.

BASSANEZI, R.B.; BASSANEZI, R.C. An approach to model the impact of Huanglongbing on citrus yield. In: INTERNATIONAL RESEARCH CONFERENCE ON HUANGLONGBING, 2008, Orlando. **Proceedings ...** Orlando: Plant Management Network, 2009. p. 301-304.

BASSANEZI, R.B.; MONTESINO, L.H.; STUCHI, E.S. Effects of huanglongbing on fruit quality of sweet orange cultivars in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 125, p. 565-572, 2009.

BASSANEZI, R.B.; LOPES, S.A.; BELASQUE JUNIOR, J.; SPÓSITO, M.B.; YAMAMOTO, P.T.; MIRANDA, M.P.; TEIXEIRA, D.C.; WULFF, N.A. Epidemiologia do Huanglongbing e suas implicações para o manejo da doença. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v. 31, n. 1, p. 11-23, 2010.

BELASQUE JUNIOR, J.; BERGAMIN FILHO, A.; BASSANEZI, R.B.; BARBOSA, J.C.; GIMENES-FERNANDES, N.; YAMAMOTO, P.T.; LOPES, S.A.; MACHADO, M.A.; LEITE JUNIOR, R.P.; AYRES, A.J.; MASSARI, C.A. Base científica para a erradicação de plantas sintomáticas e assintomáticas de Huanglongbing (HLB, greening) visando o controle efetivo da doença. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 34, n. 3, p. 137-145, 2009.

BERGAMIN FILHO, A. Curvas de progresso da doença. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia**. 3. ed. São Paulo: Ceres. 1995. v. 1, p. 602- 626.

BERGAMIN FILHO, A. GASPAROTO, M.C.G.; BASSANEZI, R.B.; AMORIM, L. Relationship between insecticide sprays and Huanglongbing progress in a citrus orchard in São Paulo, Brazil. In: INTERNATIONAL RESEARCH CONFERENCE ON HUANGLONGBING, 2008, Orlando. **Proceedings ...** Orlando: Plant Management Network, 2009. p. 282-284.

BONANI, J.P.; APPEZZATO-DA-GLORIA, B.; FERERES, A.; ENGELS, F.E.; LOPES, J. R.S. Leaf age influencing acquisition of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' by the psyllid vector, *Diaphorina citri* Kuwayama. In: INTERNATIONAL RESEARCH CONFERENCE ON HUANGLONGBING, 2008, Orlando. **Proceedings ...** Orlando: Plant Management Network, 2009. p. 249.

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. Several Liberibacter and Phytoplasma species are individually associated with HLB. In: INTERNATIONAL RESEARCH CONFERENCE ON HUANGLONGBING, 2008, Orlando. **Proceedings ...** Orlando: Plant Management Network, 2009. p. 152-155.

BROADBENT, L. Insecticidal control of the plant viruses. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v.2, p. 339-354, 1957.

CAMPBELL, C.L.; MADDEN, L.V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: John Wiley. 1990. 532p.

CAPOOR, S.P.; RAO, D.G.; VISWANATH, S.M. *Diaphorina citri* Kuwayama., a vector of greening disease of citrus in India. **Indian Journal of Agricultural Science**, v. 37, p. 572-576, 1967.

CAPOOR, S.P.; RAO, D.G.; VISWANATH, S.M. Greening disease of citrus in the Deccan Trap Country and its relationship with the vector, *Diaphorina citri* Kuwayama. In: INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS (IOCV), VI, 1974, Riverside. **Proceedings ...** Riverside: IOCV, 1974. p. 43-49.

COLLETA-FILHO, H.D.; TAGON, M.L.P.N.; TAKITA, M.A.; DE NEGRI, J.D.; POMPEU JÚNIOR, J.; CARVALHO, A.S.; MACHADO, M.A. First report of the causal agent of Huanglongbing ('*Candidatus Liberibacter asiaticus*') in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 88, p.1382, 2004.

CORNELL, J.A.; BERGER, R.D. Factors that influence the coefficient of determination in single linear and nonlinear models. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 77, p. 63-70, 1987.

DA GRAÇA, J.V.; KORSTEN, L. Citrus Huanglongbing: review, present status and future strategies. In: NAQVI, S.A.M.H. (Ed.). **Diseases of fruits and vegetables**. Springer Netherlands. 2004. v. 1, p. 229-245.

DAMSTEEGT, V.D.; POSTNIKOVA, E.N.; STONE, A.L.; KUHLMANN, M.; WILSON, C.; SCHAAD, N.W.; BRLANSKY, R.H.; SCHNEIDER, W.L. *Murraya paniculata* and related species as potential hosts and inoculum reservoirs of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*', causal agent of Huanglongbing. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 94, n. 5, p. 528-533, 2010.

GASPAROTO, M.C.G.; BASSANEZI, R.B.; AMORIM, L.; MONTESINO, L.H.; LOURENÇO, S.A.; WULFF, N.A.; TEIXEIRA, D.C.; MARIANO, A.G.; MARTINS, E.C.; LEITE, A.P.R.; BERGAMIN FILHO, A. First report of '*Candidatus Liberibacter americanus*' transmission from *Murraya paniculata* to sweet orange (*Citrus sinensis*) by Asian Citrus psyllid (*Diaphorina citri*). **Journal of Plant Pathology**, Bari, 2010. In press.

GOTTWALD, T.R.; AUBERT, B.; XUE-YUAN, Z. Preliminary analysis of Citrus Greening (Huanglongbing) epidemics in the People's Republic of China and French Reunion Island. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 79, n. 6, p. 687-693, 1989.

GOTTWALD; T.R.; AUBERT, B.; LONG, H.K. Spatial pattern of Citrus Greening in Shantou, China. In: INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS (IOCV), XI, 1991, Riverside. **Proceedings ...** Riverside: IOCV, 1991. p. 421-427.

GOTTWALD, T.R.; IREY, M.; BERGAMIN FILHO, A.; BASSANEZI, R.B.; GILLIGAN, C.A. A stochastic spatiotemporal analysis of the contribution of primary versus secondary spread of Huanglongbing. In: INTERNATIONAL RESEARCH CONFERENCE ON HUANGLONGBING, 2008, Orlando. **Proceedings ...** Orlando: Plant Management Network, 2009. p. 285-290.

GOTTWALD, T.R.; IREY, M.; TAYLOR, E. Huanglongbing survival analysis - a spatiotemporal assessment of the threat of an Huanglongbing positive tree to its neighbors. In: INTERNATIONAL RESEARCH CONFERENCE ON HUANGLONGBING, 2008, Orlando. **Proceedings ...** Orlando: Plant Management Network, 2009. p. 291-295.

GOTTWALD, T.R.; IREY, M. The plantation edge effect of Huanglongbing - a geostatistical analysis. In: INTERNATIONAL RESEARCH CONFERENCE ON HUANGLONGBING, 2008, Orlando. **Proceedings ...** Orlando: Plant Management Network, 2009. p. 305-308.

GOTTWALD, T.R. Current epidemiological understanding of Citrus Huanglongbing. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 48, p. 6.1- 6.21, 2010.

GOTTWALD, T.R.; IREY, M.S.; GAST, T.; PARNELL, S.R.; TAYLOR, E.L.; HILF, M.E. Spatio-temporal analysis of an HLB epidemic in Florida and implications for spread. In: INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS (IOCV), XVII, 2010, Riverside. **Proceedings ...** Riverside: IOCV, 2010.

HALBERT, S.E.; MANJUNATH, K.L. Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: a literature review and assessment of risk in Florida. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 87, p. 330-353, 2004.

HALBERT, S.E. The discovery of Huanglongbing in Florida. In: INTERNATIONAL CITRUS CANCKER AND HUANGLONGBING RESEARCH WORKSHOP, II, 2005, Orlando. **Proceedings ...** 2005. p.50.

IREY, M.S.; GAST, T.; GOTTWALD, T.R. Comparison of visual assessment and Polymerase Chain Reaction assay testing to estimate the incidence of the Huanglongbing pathogen in commercial Florida citrus. In: FLORIDA STATE HORTICULTURAL SOCIETY, 2006. **Proceedings ...** 2006. p. 11-23.

JAGOUEIX, S.; BOVÉ, J.P.; GARNIER, M. PCR detection of the two 'Candidatus' liberobacter species associated with greening disease of citrus. **Molecular and Cellular Probes**, London, v. 10, n. 1, p. 43-50, 1996.

KOIZUMI, M.; PROMMINTARA, M.; LINWATTANA, G.; KAISUWAN, T. Epidemiological aspects of Citrus Huanglongbing (Greening) disease in Thailand. **Japan Agricultural Research Quarterly**, Tokyo, v. 31, p. 205-211, 1997.

LOPES, S.A.; MARTINS, E.C.; FRARE, G.F. Detecção de '*Candidatus* Liberibacter americanus' em *Murraya paniculata*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 31, p. 48-49, 2005.

LOPES, S.A.; MARTINS, E.C.; FRARE, G.F. Detecção de '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' em *Murraya paniculata*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, p. 303, 2006.

LOPES, S.A.; BERTOLINI, E.; FRARE, G. F.; MARTINS, E. C.; WULFF, N. A.; TEIXEIRA, D. C.; FERNANDES, N. G.; CAMBRA, M. Graft transmission efficiencies and multiplication of '*Candidatus Liberibacter americanus*' and '*Ca. Liberibacter asiaticus*' in citrus plants. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 99, n. 3, p. 301-306, 2009.

MADDEN, L.V.; HUGHES, G. Plant disease incidence: distributions, heterogeneity, and temporal analysis. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 33, p. 529-564, 1995.

MADDEN, L.V.; JEGER, M.J.; VAN DEN BOSH, F. A theoretical assessment of the effects of vector-virus transmission mechanism on plant virus disease epidemics. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 90, n. 6, p. 576-594, 2000.

MADDEN, L.V.; HUGHES, G.; VAN DEN BOSH, F. **The study of plant disease epidemics**. Saint Paul: APS Press, 2007. 421p.

MANJUNATH, K.L.; HALBERT, S.E.; RAMADUGU, C.; WEBB, S.; LEE, R.F. Detection of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' in *Diaphorina citri* and its importance in the management of Citrus Huanglongbing in Florida. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 98, n. 4, p. 387-396, 2008.

MCCLEAN, A.P.D.; OBERHOLZER, P.C.J. Citrus psylla, a vector of the greening disease of sweet orange. **South Africa Journal of Agricultural Science**, v. 8, p. 297-298, 1965.

NAVA, D.E.; TORRES, L.G.; RODRIGUES, M.D.L.; BENTO, J.M.S.; PARRA, J.R.P. Biology of *Diaphorina citri* (Hem., Psyllidae) on different hosts and at different temperatures. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 131, n. 9-10, p. 709-715, 2007.

TATINENI, S.; SAGARAM, U.S.; GOWDA, S.; ROBERTSON, C.J.; DAWSON, W.O.; IWANAMI, T.; WANG, N. *In planta* distribution of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' as revealed by Polymerase Chain Reaction (PCR) and Real-Time PCR. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 98, n.5, p. 592-599, 2008.

TEIXEIRA D.C.; DANET J.L.; EVEILLARD, S.; MARTINS, E.C.; JESUS JUNIOR, W.C.; YAMAMOTO, P.T.; LOPES, S.A.; BASSANEZI, R.B.; AYRES, A.J.; SAILLARD, C.; BOVÉ, J.M.. Citrus Huanglongbing in São Paulo State, Brazil: PCR detection of the '*Candidatus Liberibacter*' species associated with the disease. **Molecular and Cellular Probes**, London, v. 19, p. 173-179, 2005.

TSAI, J.H.; WANG, J.J.; LIU, Y.H. Seasonal abundance of the Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) in Southern Florida. **The Florida Entomologist**, Gainesville, v. 85, n. 3, p. 446-451, 2002.

VANDERPLANK, J.E. **Principles of plant infection**. New York: Academic Press. 1975. 216p.

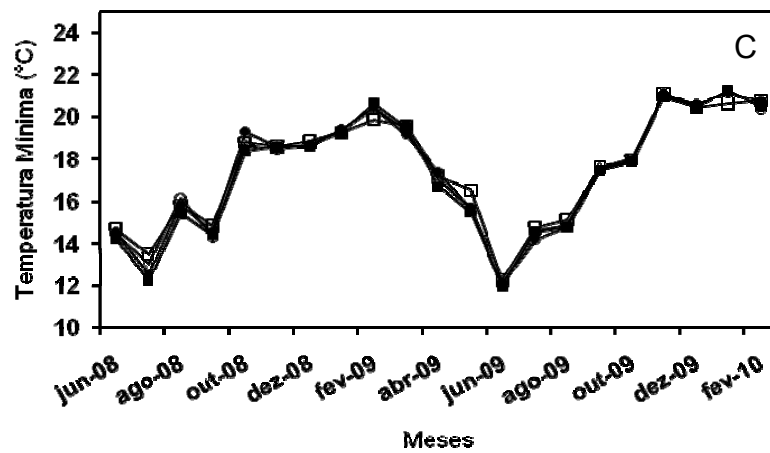
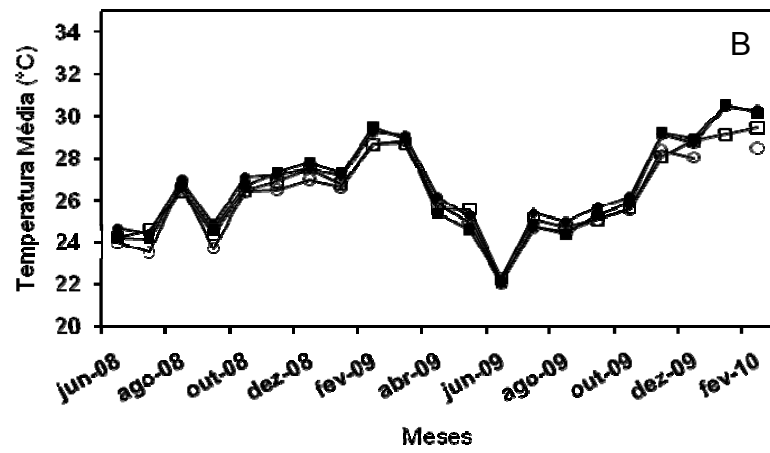
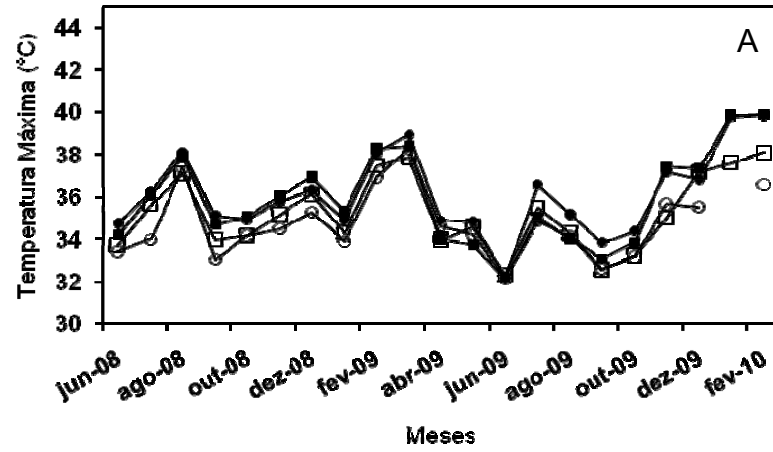
YAMAMOTO, P.T.; FELIPPE M.R.; GARBIM, L.F.; COELHO, J.H.C.; MARTINS, E.C.; LEITE, A.P.R.; SOUSA, M.C.; ABRAHÃO, D.P.; BRAZ, J.D. *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera: Psyllidae): vector of the bacterium '*Candidatus Liberibacter americanus*'. In: HUANGLONGBING - GREENING INTERNATIONAL WORKSHOP, 2006, Ribeirão Preto. **Proceedings ...** Ribeirão Preto: 2006. p. 25-26.

ZADOKS, J.C. The role of epidemiology in modern Phytopathology. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 64, p. 918-923, 1974.

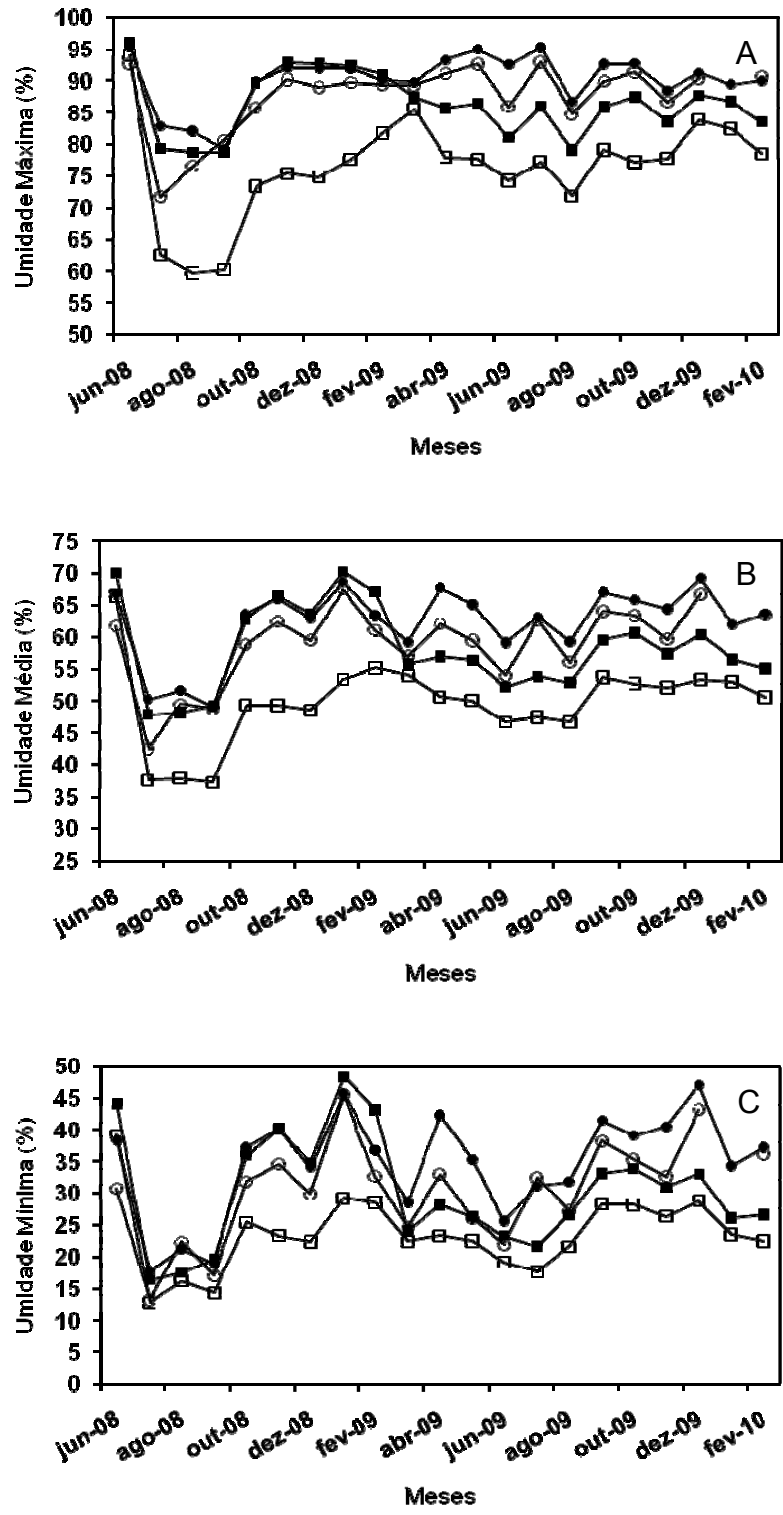
ZAR, J.H. More on dichotomous variables. In: ZAR, J.H. **Biostatistical analysis**. New Jersey: Prentice-Hall. 1999. p. 516-570.

ANEXOS

ANEXO A – Temperatura máxima (A), média (B) e mínima (C) para os compartimentos CiAsAm1 (círculos preenchidos), CiAsAm2 (círculos sem preenchimento), CiAm (quadrados preenchidos) e MurAm (quadrados sem preenchimento)



ANEXO B – Umidade máxima (A), média (B) e mínima (C) para os compartimentos CiAsAm1 (círculos preenchidos), CiAsAm2 (círculos sem preenchimento), CiAm (quadrados preenchidos) e MurAm (quadrados sem preenchimento)



ANEXO C – Leitura de PAR (Radiação Fotossinteticamente Ativa) em cada compartimento. Média de três leituras diárias (manhã, meio do dia e tarde) em três locais diferentes nos compartimentos (lado direito, lado esquerdo e centro)

Compartimentos	PAR médio ($\mu\text{mol. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$)
CiAsAm1	405,38a*
CiAsAm2	400,85a
CiAm	402,97a
MurAm	401,88a

* Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade