

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

SÉRGIO RICARDO SANCHES DO NASCIMENTO

**Variação sazonal e regional na concentração de *Candidatus
Liberibacter asiaticus* em brotos de laranjeira doce (*Citrus
sinensis* (L.) Osbeck)**

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

Orientador: Dr. Silvio Aparecido Lopes

**Araraquara
Março 2019**

SÉRGIO RICARDO SANCHES DO NASCIMENTO

**Variação sazonal e regional na concentração de *Candidatus*
Liberibacter asiaticus em brotos de laranjeira doce (*Citrus*
sinensis (L.) Osbeck)**

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

Orientador: Dr. Silvio Aparecido Lopes

**Araraquara
Março 2019**

N244v Nascimento, Sérgio Ricardo Sanches do
Variação sazonal e regional na concentração de
Candidatus Liberibacter asiaticus em brotos de laranja doce
(*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) / Sérgio Ricardo Sanches do
Nascimento, 2019.
32 f.

Orientador: Dr. Silvio Aparecido Lopes

Dissertação (Mestrado) – Fundo de Defesa da
Citricultura, Araraquara, 2019.

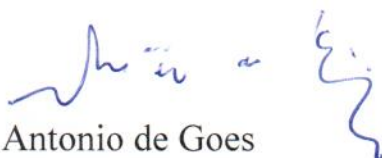
1. Broto 2. *Diaphorina Citri* 3. Clima 4. *Citrus* I.
Título

SÉRGIO RICARDO SANCHES DO NASCIMENTO

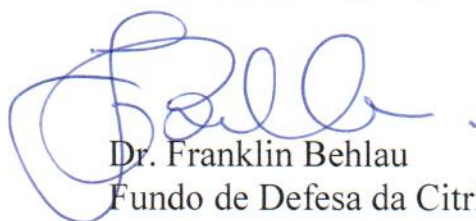
Dissertação apresentada ao Fundo de Defesa da Citricultura - Fundecitrus, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Fitossanidade.

Araraquara, 20 de março de 2019.

BANCA EXAMINADORA



Dr. Antonio de Goes
Universidade Estadual Paulista – UNESP, Jaboticabal/SP



Dr. Franklin Behlau
Fundo de Defesa da Citricultura - FUNDECITRUS, Araraquara/SP



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

Dedico

A minha esposa Marinete e ao meu filho João Ricardo pelo apoio, paciência, ajuda, compreensão, amor durante a elaboração deste trabalho.

A meus pais João e Marlene, que não mediram esforços e apoio na minha formação em Engenharia Agrônômica.

Ofereço

A todos colegas do Fundecitrus pelo apoio e que de alguma forma me ajudaram e orientaram na elaboração deste trabalho

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar forças para vencer os desafios determinados.

A minha esposa Marinete e meu filho João Ricardo, que são o esteio da minha vida.

Ao meu orientador Dr. Silvio Aparecido Lopes, pela orientação no desenvolvimento deste Mestrado, pelos ensinamentos a mim transferidos, pela ajuda, paciência e amizade adquirida neste período.

Ao amigo e colega de trabalho Ivaldo Sala, pela confiança e apoio.

Ao gerente de Pesquisa e Desenvolvimento MSc. Antonio Juliano Ayres.

A equipe Fernanda, Hermes, Priscila, e Luiz, nas avaliações e testes laboratoriais executados.

Ao colega Marco Antonio Tomaz, pelo apoio.

Aos engenheiros da equipe de Transferência de Tecnologia Bruno, Luis e Guilherme, e também a Júlio César Rodrigues e Valmir Campos pelas fotos e figuras apresentados neste estudo.

Aos Drs. Odimar Zanuzo Zanardi, Laudecir Lemos Raiol Júnior, João Alberto de Oliveira Júnior, Arthur Fernando Tomaseto e Juan Cifuentes-Arenas, pelas opiniões pertinentes e pontuais.

A Amanda Oliveira, pelas dicas e apoio na formatação deste trabalho.

Aos proprietários das fazendas que possibilitaram que este estudo fosse realizado.

A turma do ciclo III do Mestrado Profissionalizante, que foi onde tudo começou.

“Quem teme perder, já está vencido” (Jigoro Kano)

Variação sazonal e regional na concentração de *Candidatus Liberibacter asiaticus* em brotos de laranja doce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck

Autor: Sérgio Ricardo Sanches do Nascimento

Orientador: Silvio Aparecido Lopes

Resumo

O Huanglongbing (HLB) é a doença mais agressiva da citricultura mundial e sua constatação no Brasil, em 2004, trouxe muita preocupação aos citricultores. O cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo Mineiro possui 194,4 milhões de plantas (175,3 milhões produtivas) que produziram na safra de 2018/2019 285,9 milhões de caixas da fruta. Os “dez mandamentos” preconizados pelo Fundecitrus são as medidas recomendadas para o controle da doença. Entre estas medidas está o controle do inseto vetor. É muito difícil prever o momento certo para a aplicação do inseticida, mas para que seja eficiente, deve ser realizada quando há fluxo de brotação nas plantas. O broto é o órgão preferido para a alimentação e reprodução do inseto na planta cítrica. Saber o momento certo de proteger estes brotos é fundamental para se obter sucesso no controle da doença. O objetivo deste estudo foi avaliar variação sazonal na concentração de *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las) em brotos de plantas de laranja doce em condições naturais, de três regiões do estado de São Paulo, e suas relações com variáveis climáticas. Entre janeiro de 2017 e junho de 2018, dez plantas de laranja Valência, com idade entre 8 e 9 anos, sendo uma de área irrigada e enxertada sobre citrumeleiro ‘Swingle’ e duas de sequeiro, enxertadas sobre citrumeleiro ‘Swingle’ e outra sobre limoeiro ‘Cravo’, foram selecionadas, e com frequência bimestral, um ramo sintomático foi podado e desfolhado para emissão de novos brotos. Cerca de quinze dias após a poda, entre quinze e vinte brotos em estádio V2/V3 foram selecionados em cada avaliação, coletados e enviados para o laboratório do Fundecitrus. Cinco brotos por planta foram selecionados para análise de qPCR. Em cada avaliação, foi determinado o título bacteriano de *Ca.L.asiaticus* em brotos infectados de cada planta e de cada região. Este estudo demonstrou que a exposição das plantas a altas ou a baixas temperaturas podem ter influência na concentração bacteriana no broto, como foi já observado em estudos anteriores com plantas engaioladas, em ambiente protegido ou controlado. Mas neste estudo, o modelo matemático encontrado não explicou toda a variação nos títulos observados, o que requer mais estudos.

Palavras-chave: Broto, *Diaphorina citri*, clima, *Citrus*.

Seasonal and regional variation in the concentration of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in sweet orange (*Citrus sinensis* (L) Osbeck) shoots

Author: Sérgio Ricardo Sanches do Nascimento

Advisor: Silvio Aparecido Lopes

Abstract

Huanglongbing (HLB) is the most aggressive disease of citrus. It was found in Brazil in 2004, causing apprehension among citrus growers. The citrus area of São Paulo and Mineiro Triangle contained 194,4 million trees (175,3 million bearing fruits) and produced in the 2018/2019 285,9 million boxes of fruit. The "ten commandments" advocated by Fundecitrus are concepts that must be adopted to control the disease. Among these concepts is the control of the psyllid vector. It is very difficult to predict the right moment of spraying insecticides. To be efficient, it should be carried out when during flushing periods. Shoots are the preferred sites for feeding and reproduction of the vector. Knowing the right time to protect these shoots is important to succeed in disease control. The objective of this study was to evaluate seasonal variations in the concentration of *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las) in shoots from plants of sweet orange growing in three regions of São Paulo state, and to determine potential association of bacterium titer and climate. Between January of 2017 and June of 2018, ten Valencia orange plants, with ages between 8 and 9 years, one irrigated and grafted on the 'Swingle' citrumelo and two non-irrigated, one grafted on 'Swingle' and one grafted on Rangpur lime. Every two months, a symptomatic branch was pruned and defoliated for emission of new shoots. About fifteen days after pruning, 15 to 20 shoots in V2 / V3 stage were selected in each evaluation, collected and sent to the laboratory of Fundecitrus. Five shoots per plant were selected for qPCR analysis. In each evaluation, the bacterial titer of *Ca. L. asiaticus* was determined from infected shoots of each plant and each region. Exposure to high or low temperatures may have influenced the bacterial population in the shoot, as was seen in previous studies using caged trees, or potted plants maintained in protected or controlled environment. But the mathematical model found in this study did not explain all the variation in bacterium titers found in new shoots, which requires further studies.

Keywords: Shoot, *Diaphorina citri*, climate, *Citrus*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Huanglongbing (HLB).....	4
2.2 Disseminação do HLB.....	5
2.3 Histórico do HLB no Brasil.....	6
2.4 Evolução do manejo.....	7
3 MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1 Características dos locais e material de estudo.....	11
3.2 Avaliações	14
3.2.1 Campo.....	14
3.2.2 PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR).....	16
3.2.3 Análise de dados.....	17
4 RESULTADOS	18
5 DISCUSSÃO	23
6 CONCLUSÃO	25
REFERÊNCIAS	26

1. INTRODUÇÃO

A laranja (*Citrus sinensis* (L) Osbeck) é uma das principais espécies frutíferas cultivadas no mundo, a qual é principalmente comercializada *in natura* ou na forma de suco, natural ou concentrado. No Brasil, na forma de suco natural ou concentrado, que é o principal objetivo da produção da fruta, destacam-se como maiores produtores o estado de São Paulo (SP) e a região sul do Triângulo Mineiro (TM) (regiões também conhecidas como cinturão citrícola brasileiro). Diferentemente do que ocorre na América do Norte e países europeus como Alemanha e França, o consumo de suco concentrado no Brasil é baixo. Como consequência, o país exporta a maior parte do que produz (97%), o que equivale a 76% do volume total de suco de laranja comercializado no mundo (Neves e Trombin, 2017).

No Brasil, a maior produção citrícola está localizada em SP e TM. Na safra 2018/2019, as áreas ocupadas com variedades de laranja foram de 376,85 e 27,72 mil hectares em SP e TM, respectivamente, totalizando 194,4 milhões de plantas (175,3 milhões produtivas), que produziram 285,9 milhões de caixas da fruta. Este volume equivale a 95,5% de toda a laranja produzida no país (Fundo de Defesa da Citricultura, 2018a; Agriannual, 2018). Na mesma safra, a produção do Estado da Flórida, Estados Unidos da América, foi de apenas 45 milhões de caixas (*United States Department of Agriculture*, 2018), o que representa redução de 268% em relação à média histórica registrada naquele estado norte americano, na última década. Maior adensamento e emprego de técnicas mais adequadas de cultivo são as principais causas do aumento na produtividade no Brasil. Por outro lado, a frequente ocorrência de furacões seguidos de estresses abióticos (frio ou seca), além do rápido crescimento na incidência do Huanglongbing (HLB), são as principais causas da dramática queda na produtividade na Flórida.

O HLB é uma doença bacteriana sistêmica, sem cura, que afeta todas as variedades de citros, com seu agente causal mais frequente *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las) transmitido pelo psílido asiático dos citros (*Diaphorina citri* Kuwayama, Hemiptera:Liviidae) (Bové, 2006). A doença, que ocorre nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Paraná, altamente destrutiva e de rápida disseminação em decorrência do alto poder reprodutivo do inseto vetor. Quando a infecção inicial ocorre em plantas ainda jovens (<3 anos), não produtivas, dependendo do nível de infecção, nem chegam a produzir. Quando a infecção inicial acontece em plantas adultas, a produção declina gradualmente à medida em que os sintomas avançam na copa das plantas. Ainda há de se considerar que o suco dos frutos de plantas doentes (que não caem prematuramente) é mais ácido e de qualidade muito inferior ao suco de frutos sadios

(Fundo Defesa da Citricultura, 2017a). O HLB tem causado muitos danos, principalmente em pequenas propriedades localizadas nas regiões centro sul de SP (Maschio, 2011). Estima-se que 7,7 milhões de caixas de laranja deixaram de ser produzidas em todo o parque citrícola na safra 2018/2019 em consequência da taxa de queda por HLB (Fundo Defesa da Citricultura, 2018b). A contenção da disseminação do HLB requer rigorosa adoção de medidas preventivas como aplicações frequentes de inseticidas e eliminação de plantas doentes (Yamamoto et al, 2014). Essas medidas deveriam ser adotadas de forma rigorosa e em nível regional (Bassanezi et al, 2009). Como, por diversas razões, isto não tem acontecido, a incidência da doença aumentou de 0,6% em 2008 para 18,1% em 2018 (Fundo de Defesa da Citricultura, 2018c). Este aumento não foi uniforme, sendo mais lento no norte e noroeste do cinturão citrícola, que são regiões de temperaturas mais elevadas e de maior déficit hídrico que as demais, sugerindo que a variação do clima pode afetar a disseminação da bactéria.

Para que ocorra a disseminação do HLB é preciso que o inseto vetor se alimente da seiva do floema de plantas doentes (onde vive a bactéria do HLB e de onde ela é adquirida), e posteriormente em plantas sadias (quando ela é inoculada). Sabe-se que o inseto evita alimentar-se de tecidos mais fibrosos ou lenhosos, como folhas e ramos maduros, preferindo os brotos que são tenros e ricos em nutrientes (Setamou et al., 2016; Cifuentes-Arenas et al., 2018). Além disso, maiores taxas de aquisição e inoculação de *Ca. Liberibacter asiaticus* foram observadas quando psilídeos se alimentaram de plantas de citros que apresentavam brotações (Hall et al., 2016; Setamou et al, 2016). Portanto, embora a planta cítrica seja altamente suscetível, a vulnerabilidade a infecções é maior nos períodos de fluxos vegetativos, que, por sua vez, é o período de maior densidade populacional do inseto vetor nos pomares (Yamamoto et al., 2001; Beloti et.al., 2013). Por apresentar maior eficiência de inoculação da bactéria ao se alimentar de plantas com brotações (Hall et al., 2016), mais importante do que conhecer a densidade populacional do psilídeo, é determinar a população de psilídeos portadores da bactéria do HLB que, por sua vez, vai depender tanto do número de brotos nas plantas doentes, como da concentração da bactéria nos brotos (Lopes et al., 2013; Lopes et al., 2017). Interessante notar que todos os componentes envolvidos na disseminação do HLB, ou seja, broto, inseto vetor e bactéria, têm seus ciclos de vida altamente influenciados pelo clima. Desta forma, espera-se que o clima tenha algum impacto nas menores taxas de disseminação do HLB, observadas nas regiões norte e noroeste de SP.

De fato, estudo recente conduzido com plantas de citros adultas protegidas, mostrou que na região norte a concentração de *Ca. L. asiaticus* e o número de brotos com a bactéria são menores que na região central do parque citrícola (Lopes et al., 2017). Contudo, mesmo na

região central houve épocas do ano em que a concentração da bactéria foi baixa, em particular no verão, quando são registradas as temperaturas mais elevadas. A menor concentração da bactéria no verão resultou em menor taxa de aquisição e transmissão do patógeno pelo inseto vetor.

Com base nos resultados obtidos por Lopes et al. (2017), a frequência de aplicações de inseticidas usadas no controle do vetor, poderia ser aumentada nos períodos de temperaturas mais amenas e reduzidas no verão. Porém, por falta de resultados mais consistentes, considerou-se temerária tal recomendação. Isto porque o estudo mencionado, embora realizado por mais de três anos seguidos, foi conduzido em somente duas regiões do parque citrícola e empregando-se plantas adultas protegidas por ‘gaiolas’ revestidas de tela anti-afídicas. A gaiola foi usada para evitar que no período de estudo as plantas fossem visitadas por psílídeos, servindo de fontes de inóculo para as plantas sadias. O seu uso também alterou o ambiente ao qual as plantas foram expostas, pois dentro delas tanto a temperatura como a umidade do ar foram alteradas em relação ao ambiente externo. A temperatura, por exemplo, foi mais alta, não refletindo totalmente as condições naturais de cultivo (Lopes et al., 2017).

Nos últimos anos, o considerável aumento da incidência do HLB levou diversos produtores a deixarem de eliminar plantas doentes. Esta situação permitiu que o estudo da dinâmica da concentração bacteriana em brotos pudesse ser feito, em condições naturais e em diferentes regiões do parque citrícola. Assim, visando trazer informações de cunho aplicado que pudessem ajudar a aprimorar o controle do inseto vetor e, conseqüentemente, da doença, o presente trabalho teve como objetivos avaliar em plantas em ambientes naturais, de diferentes regiões climáticas, a concentração de *Ca. L. asiaticus* nos brotos de plantas com HLB e suas possíveis relações com fatores climáticos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Huanglongbing (HLB)

O Huanglongbing (HLB) é uma doença associada a bactérias que colonizam os vasos do floema de plantas de citros (Teixeira et al, 2008). Há três espécies de bactérias, todas Gram negativas e pertencentes ao grupo das alfa-proteobactérias (Garnier et al, 1984; Jagoueix et al, 1994). São elas: ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ (Las), ‘*Candidatus Liberibacter americanus*’ (Lam) e ‘*Candidatus Liberibacter africanus*’ (Laf) (Teixeira et al, 2005; Bové et al., 2008). No Brasil, ocorre *Ca. L. asiaticus* e *Ca. L. americanus*, mas não ocorre *Ca. L. africanus*, e nem seu inseto vetor, *Triozia erytrae* (Del Guercio). *Ca. L. asiaticus* foi a primeira bactéria a ser detectada no continente americano, em 2004, no município de Araraquara (Coletta-Filho et al.,2004), e no mesmo ano *Ca. L. americanus* (Teixeira et al., 2005). Logo que foram detectadas, *Ca. L. americanus* era a espécie predominante, estando presente em mais de 99% das plantas com HLB. No entanto, a partir de 2008, houve inversão na frequência de ocorrência das bactérias, muito provavelmente pela menor concentração de *Ca. L. americanus* nas plantas e por sua maior sensibilidade às altas temperaturas, quando comparado a *Ca. L. asiaticus*, desfavorecendo sua disseminação pelo inseto vetor (Lopes & Frare, 2008).

Os sintomas iniciais de HLB caracterizam-se por um ou mais ramos com folhas amareladas, em poucas plantas do pomar. Os ramos sintomáticos vão perdendo a coloração verde, tornando-se amareladas, sem delimitação entre o verde e o amarelo (mosqueado), e foi observado em todos os locais, independente do agente causal (Bové, 2006). Num estágio mais avançado, as plantas mostram também deficiência de zinco e manganês nas folhas jovens, e de nitrogênio e boro nas folhas velhas. A nervura central e secundárias também se tornam salientes e corticosas. Plantas infectadas podem florescer mais cedo e com maior intensidade do que plantas saudáveis. A produção é drasticamente reduzida e os frutos produzidos são deformados, exibem coloração desuniforme, amadurecem mais cedo e caem precocemente. O enraizamento é comprometido e a desfolha torna-se severa. Plantas jovens com menos de sete anos têm sua produção comprometida em menos de dois anos após a infecção inicial. Quando a infecção ocorre em mudas, estas nem chegam a produzir. Plantas mais velhas (acima de sete anos) têm sua produção comprometida a partir do segundo ano após a detecção dos primeiros sintomas (Hsiang, 1956). Estudo conduzido no Estado de São Paulo mostrou que a queda na produção é diretamente proporcional à severidade dos sintomas (Bassanezi et al, 2011). Além disso, frutos

doentes remanescentes em plantas afetadas apresentam baixa qualidade e menor peso, tamanho, teor de brix, 'ratio' e sólidos solúveis, e maior teor de acidez (Bassanezzi et al, 2009).

2.2 Disseminação do HLB

O inseto responsável pela transmissão de *Ca. L. asiaticus* e *Ca. L. americanus* é o psilídeo asiático dos citros *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) (Yamamoto et al, 2006). Apesar da doença ter sido identificada somente em 2004 nos pomares paulistas, o psilídeo está presente no Brasil desde o ano de 1942, quando foi detectado pela primeira vez no Rio de Janeiro (Costa Lima, 1942). Até 2004, o psilídeo era considerado uma praga secundária, com medidas de controle adotadas apenas quando este ocorria em altas populações, condição que pode levar a um atraso no desenvolvimento da planta, resultante do enrolamento de folhas, engruvinhamento das brotações e morte da gema apical (Gallo et al., 2002). Com a confirmação da presença do HLB em nosso meio, o psilídeo assumiu o status de praga chave e alvo de intenso controle.

A reprodução de *D. citri* ocorre preferencialmente durante os fluxos vegetativos, sendo os ovos colocados exclusivamente nos brotos, quando os folíolos ainda estão fechados (Hall et al., 2013, Cifuentes-Arenas, 2018). As fêmeas colocam de 200 a 800 ovos, com a taxa de viabilidade podendo variar de 54% a 94%, de acordo com o hospedeiro (Parra et al., 2010). A murta de cheiro [(*Murraya paniculata* (L) Jack (Sapindales:Rutaceae)] e o limoeiro 'Cravo' [*Citrus limonia* Osbeck (Sapindales:Rutaceae)] são considerados hospedeiros mais adequados para reprodução do que a tangerina Sunki [*Citrus reticulata* Blanco (Sapindales:Rutaceae)] (Nava, et al., 2007). Os ovos são de coloração amarela, de formato alongado, com cerca de 0,3 mm de comprimento. O período de incubação varia de 3 a 10 dias dependendo das condições ambientais (Yamamoto, 2008). As ninfas passam por cinco estádios de desenvolvimento, que duram aproximadamente 40 dias a 18°C, e aproximadamente 11 dias a 30°C (Nava et.al., 2007). Os adultos medem cerca de 2 a 3 milímetros de comprimento, têm coloração cinza com manchas escuras nas asas, e vivem até 120 dias. Apesar de presente no período seco e frio (outono/inverno), a população é baixa nestas épocas, e os adultos somente se alimentam a espera de brotações para iniciar a reprodução (Yamamoto, 2008). Os picos populacionais ocorrem no final da primavera e início do verão (Yamamoto et al., 2001). Os adultos podem dispersar-se a curtas (<200m) e longas (> 2 km) distâncias (Boina et.al., 2009; Lewis-Rosenblum et.al., 2015; Tomaseto et.al., 2016), favorecido por ventos, disseminando a bactéria dentro e entre pomares (Gottwald et al, 2007).

Tanto ninfas como adultos podem adquirir e transmitir a bactéria, mas a maior eficiência de aquisição se dá pelas ninfas a partir do 3º instar (Inoue et al., 2009). Quando a aquisição ocorre na fase ninfal, o adulto proveniente desta ninfa irá transmitir a bactéria com maior eficiência do que se a aquisição tivesse ocorrida somente na fase adulta. Após a aquisição, a bactéria necessita de um período médio de latência entre 17 e 18 dias no corpo do inseto antes de tornar-se apta a infectar plantas sadias (Canale et al., 2017). Sabe-se que apenas 30 minutos de alimentação de um adulto sadio em uma planta infectada é suficiente para que haja a aquisição (Rogers e Stansly, 2012) e, após o período de latência, somente 15 minutos de alimentação para transmitir a bactéria. Com uma hora de alimentação, a taxa de transmissão pode chegar a 100% (Cappor et al. 1974; Mead & Fasulo, 2011). Transmissão transovariana foi detectada, onde somente 2 a 6% dos ovos da fêmea que se alimentou em plantas doentes podem resultar em indivíduos infectivos (Pels-Stelinski et al., 2010).

A aquisição da bactéria depende, além da idade do inseto, da concentração da bactéria no broto, e esta por sua vez depende da temperatura. Lopes et al. (2013) mostraram que sob altas temperaturas (acima de 30°C diária nos últimos 15 dias) *Ca. L. asiaticus* atinge menores títulos nos brotos, o que reflete em menores taxas de aquisição.

2.3 Histórico do HLB no Brasil

O HLB foi relatado pela primeira vez no Brasil em 2004, no estado de São Paulo, no município de Araraquara (Coleta Filho et al., 2004). No ano de 2005, foi relatado em Minas Gerais (Castro et al., 2010), e em 2007 no estado do Paraná (Nunes, 2007). Desde a constatação do HLB no estado de São Paulo o Fundecitrus tem realizado levantamentos amostrais periódicos em todo o cinturão citrícola (SP e MG), que revelaram a progressão na incidência de talhões e de plantas com a doença. A taxa de progresso da doença não tem sido uniforme em todas as regiões. De 2008 a 2018, a incidência de plantas doentes subiu de 0,01% para 2,95% no Noroeste, de 0,04% para 5,21% no Norte, de 0,06% para 8,20% no Sudoeste, de 1,20% para 31,59% no Centro, e de 0,63% para 30,67% no Sul (Figura 1). Em Minas Gerais, a doença também foi relatada em outras regiões, além do Triângulo Mineiro, região mineira incluída nos levantamentos do Fundecitrus. No Paraná, o Norte e Noroeste são as regiões mais afetadas, e já foram erradicados mais de 1,8 milhões de plantas (Amorim, 2016). Em São Paulo foram eliminadas mais de 46 milhões plantas até o primeiro semestre de 2018 (Coordenaria de Defesa Agropecuária do Estado de São Paulo, 2018). Este número se baseia em dados enviados à CDA pelos próprios citricultores.

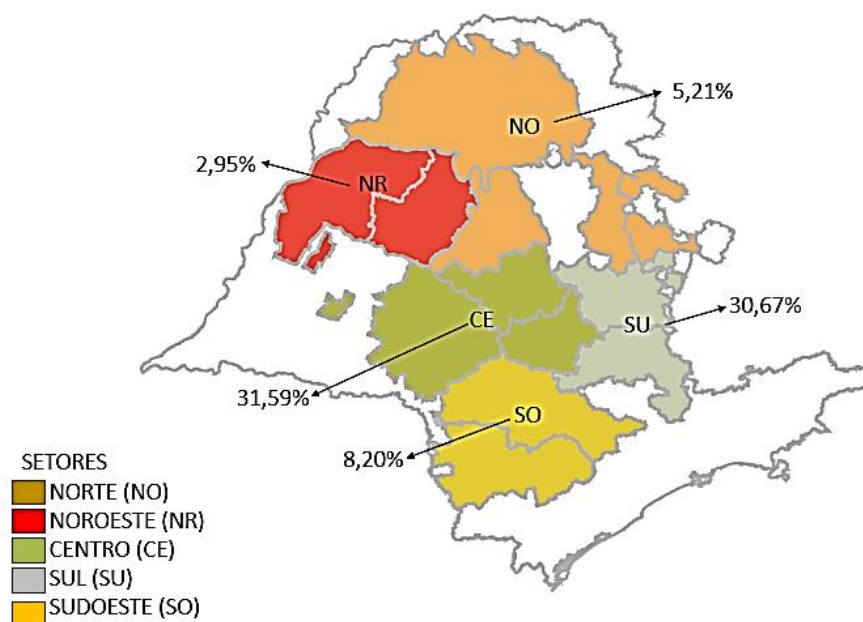


Figura 1. Incidência (%) de plantas com HLB no estado de São Paulo e Triângulo Mineiro (região NO) no ano de 2018. Fonte: (Fundo de Defesa da Citricultura, 2018c)

2.4 Evolução do manejo

Desconhecimento sobre a gravidade da doença e a complexidade na identificação dos sintomas, principalmente devido a semelhança com aqueles que caracterizam deficiências nutricionais e fatores abióticos, como frio, fizeram com que muitos produtores relutassem em seguir o que vinha sendo recomendado, que era erradicação de plantas doentes e pulverizações com inseticidas para controle de *D. citri*. Deste modo, a partir de 2004, esses fatores contribuíram para a disseminação da doença. No entanto, com o desenvolvimento de teste laboratorial para correta diagnose foi possível treinar pessoas, e avaliar a real incidência da doença em todas as regiões do cinturão citrícola (Wulff et al., 2006).

No ano de 2005, o Fundecitrus passou a recomendar o tripé de medidas para o manejo da doença que consiste em eliminar plantas sintomáticas, utilizar mudas sadias e controlar o vetor (Belasque Junior et al, 2009). É preciso eliminar plantas sintomáticas porque não há métodos curativos para a doença. Tentativas de cura foram realizadas através de injeção de antibióticos (Bové, 2006), poda de ramos sintomáticos (Lopes et al., 2007) e termoterapia (Lopes et al., 2013), mas nenhuma funcionou adequadamente. Para o coreto manejo, a primeira medida a ser adotada é o plantio de mudas sadias. Desde 2003, no estado de São Paulo, toda

muda comercializada deve ser proveniente de viveiros protegidos por telas anti-afídicas (que também evitam a entrada do psílídeo), cadastrados e fiscalizados pela Coordenaria de Defesa Agropecuária (São Paulo, 2003). O controle do inseto vetor deve ser iniciado antes da saída da muda do viveiro para o campo, com aplicação de inseticidas sistêmicos feitas de 7 a 10 dias antes, e após o plantio, aplicações via tronco e ‘drench’, até a planta completar três anos, intercalando as pulverizações de sistêmicos com pulverizações foliares de inseticidas de contato (Ulian, 2016). Em plantas acima de 3 anos, recomenda-se a aplicação apenas de inseticidas de contato, com intervalo de aplicação de 7 a 30 dias, rotacionando princípios ativos e modos de ação dos inseticidas (Yamamoto & Miranda, 2009).

Ainda em 2005 foi criado pelo Fundecitrus uma equipe de agrônomos denominada “Equipe de Conscientização contra o HLB”, para dar suporte aos produtores. O processo de conscientização era feito por meio de visitas técnicas, palestras, treinamentos de equipes de inspeção nas propriedades, auxiliando-os no combate à doença. Isto foi necessário porque com a criação da Instrução Normativa (I.N.) nº 10, de março de 2005 (Brasil, 2005), todos produtores eram obrigados a inspecionar e eliminar todas as plantas sintomáticas, com a fiscalização de responsabilidade do Fundecitrus e Coordenadoria de Defesa Agropecuária do Estado de São Paulo (CDA).

No início, houve muita resistência do produtor em eliminar plantas doentes, principalmente quando havia melhora no preço da fruta. Os produtores também procuravam controlar a doença de forma incorreta, através de podas, uso de coquetéis nutritivos ou pulverizações de inseticidas em dose e frequência insuficientes para o controle do inseto vetor. Em setembro de 2006, entra em vigor a I.N. nº 32 (Brasil, 2006), que revoga a I.N. nº 10, obrigando o produtor a inspecionar seus pomares a cada três meses. Em outubro de 2008, entra em vigor a I.N. nº 53 (Brasil, 2008), revogando a I.N. nº 32, que obriga os produtores a realizar as inspeções trimestrais e entregar dois relatórios anuais, um em cada semestre (até 15 de julho e até 15 de janeiro), assim como erradicar as plantas sintomáticas. Em 2010, o Fundecitrus deixou de fazer as inspeções de fiscalização, ficando assim o produtor com toda a responsabilidade das inspeções/erradicações, sob fiscalização direta do Estado, via CDA.

Entre 2010/2011, a citricultura passou por um momento econômico difícil, quando o citricultor não conseguia vender a safra ou, quando conseguia, por um valor muito abaixo do custo de produção. Isto levou muitos citricultores a desistirem do negócio, ou abandonar seus pomares (Fagundes et al., 2015). O não cumprimento da lei, aliado ao controle deficiente de *D. citri* fez com que o HLB continuasse a progredir. Os proprietários que ainda lutavam para se manter no negócio não estavam conseguindo diminuir a incidência da doença, apesar de todos

os esforços. Em 2013, Bassanezi et al. demonstram que em área experimental onde as medidas de controle do HLB ocorriam em grandes extensões no seu entorno, o aumento da incidência era muito menor do que em área sem qualquer medida de controle ou onde as medidas eram apenas em nível local (somente nas parcelas experimentais). Daí surgiu o conceito de manejo regional, único apto a conter o avanço da doença.

Em 2014, foram estabelecidos os “10 mandamentos” para o manejo do HLB, que envolvem a antecipação da produção, planejamento do plantio, renovação de pomares, implantação de pomares mais adensados nos primeiros 50 a 100 metros na borda e com as linhas de plantio do talhão das bordas da propriedade feitas paralelas aos carregadores para facilitar a pulverização, inspeção e monitoramento da população do psílídeo, rigor nas bordas quanto ao controle do vetor, ser parceiro do vizinho e participar do manejo regional estabelecido pelo sistema de Alerta Fitossanitário, instituído pelo Fundecitrus em 2013. O Alerta Fitossanitário baseia-se na quantidade de psílídeos encontrados em armadilhas amarelas localizados nas bordaduras dos talhões das propriedades e quintais, permite identificar o momento e local de entrada do inseto na propriedade (Miranda et al., 2011). As armadilhas são inspecionadas quinzenalmente, e havendo a constatação da tendência de aumento populacional do inseto, um alerta é disparado para toda região para que as medidas de controle sejam adotadas em conjunto por um maior número possível de produtores. O Alerta Fitossanitário cobre atualmente 12 regiões do estado de São Paulo e Triângulo Mineiro, totalizando mais de 60% do cinturão citrícola, além do noroeste do estado do Paraná, onde se concentra a citricultura daquele estado (Fundo de Defesa da Citricultura, 2017b, 2018d).

Apesar de todos os esforços e conhecimentos adquiridos em ações de controle, a doença continua a evoluir. Em 2018, a incidência de árvores doentes chegou a 18,1%, levando o Fundecitrus a criar neste mesmo ano, um novo plano de ação denominado de SICEG (Sistema Integrado de Controle e Erradicação de Greening). Este sistema está focado em auxiliar o produtor na identificação e eliminação de plantas cítricas e de murta em áreas externas (áreas abandonadas, quintais, chácaras, pastos, matas), que são locais com alta possibilidade de se tornarem fonte de multiplicação tanto do inseto vetor quanto das bactérias associadas ao HLB. Segundo Sassi (2016), 71% dos insetos da região de Santa Cruz do Rio Pardo, 68% da região de Avaré, 66% da região de Araraquara e 56% da região de Bebedouro são portadores de *Liberibacter*, os quais possivelmente adquiriram este fitopatógeno em plantas de áreas externas à de produção comercial. De setembro de 2017 a maio de 2018, já foram eliminadas mais de 300.000 plantas em áreas externas aos pomares em todo estado de São Paulo, o que levou o

Fundecitrus a aumentar a equipe e intensificar o trabalho, com projeção de eliminação de 1,2 milhões de plantas num prazo de três anos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Características dos locais e material de estudo

O estudo foi realizado no período de janeiro de 2017 a junho de 2018, em propriedades comerciais de três municípios das regiões centro e norte do estado de São Paulo. Os pomares eram constituídos pela variedade de laranja Valência e dois porta enxertos. Na região norte, a propriedade estava localizada em Altair e na região centro em Analândia e em Guaimbê. Em Altair o porta-enxerto foi o citrumeleiro ‘Swingle’ [*Citrus paradisi* Macf. X *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.], as plantas tinham oito anos e o talhão não era irrigado. Em Analândia, o porta-enxerto foi o citrumeleiro ‘Swingle’, as plantas tinham nove anos de idade e o talhão era irrigado. Em Guaimbê o porta-enxerto foi o limoeiro Cravo (*Citrus limonia* L. Osbeck), as plantas tinham oito anos e o talhão não era irrigado (Tabela 1). Em todos os locais procurou-se selecionar plantas com sintomas que ocupavam de 75 a 100 % da copa (Figura 2).

Tabela 1. Variedade, porta enxerto (PE), idade (anos), irrigação e coordenadas geográficas das localidades estudadas.

Local	Variedade/P.E	Idade (anos)	Irrigação	Latitude	Longitude
Altair	Valência/Swingle	8	não	20° 33' 15.85"S	49° 08' 09.81"O
Guaimbê	Valência/Cravo	8	não	21° 46' 54.47"S	49° 48' 59.71"O
Analândia	Valência/Swingle	9	sim	21° 58' 51.77"S	47° 42' 36.77"O



Figura 2. Planta sintomática com HLB, de laranja Valência enxertada sobre limoeiro Cravo com oito anos de idade na propriedade de Guaimbê, região centro do estado de São Paulo utilizada no presente estudo.

Na Tabela 2 são apresentadas as características edafoclimáticas das regiões selecionadas e a Figura 3 indica a localização geográfica das propriedades. Os tratos culturais, adubações, pulverizações de inseticidas e herbicidas, foram os adotados pelos produtores locais.

Tabela 2. Médias de temperatura (°C) e de chuva acumulada (mm) para o quinquênio 2013-2017, localização no estado de São Paulo e características edafoclimáticas das propriedades utilizadas neste estudo.

Região	Município	Altitude (m a.n.m)	Clima ¹	Solo ²	Setembro a abril ³		Maio a agosto ³	
					Temperatura	Chuva	Temperatura	Chuva
Norte	Altair	506	Aw	LV	17,7 e 30,4	1.329	14,3 e 28,4	155
Centro-oeste	Guaimbê	419	Cfa	AVA	19,3 e 30,8	1.041	14,6 e 26,7	212
Centro-leste	Analândia	591	Cwa	LVA	16,7 e 28,4	1.137	13,0 e 25,7	247

¹ Aw – tropical, Cfa – temperado quente, Cwa – temperado; ² LVA- Latossolo Vermelho Amarelo, AVA – Argissolo Vermelho Amarelo, LV – Latossolo Vermelho; ³ Fonte: SOMAR.

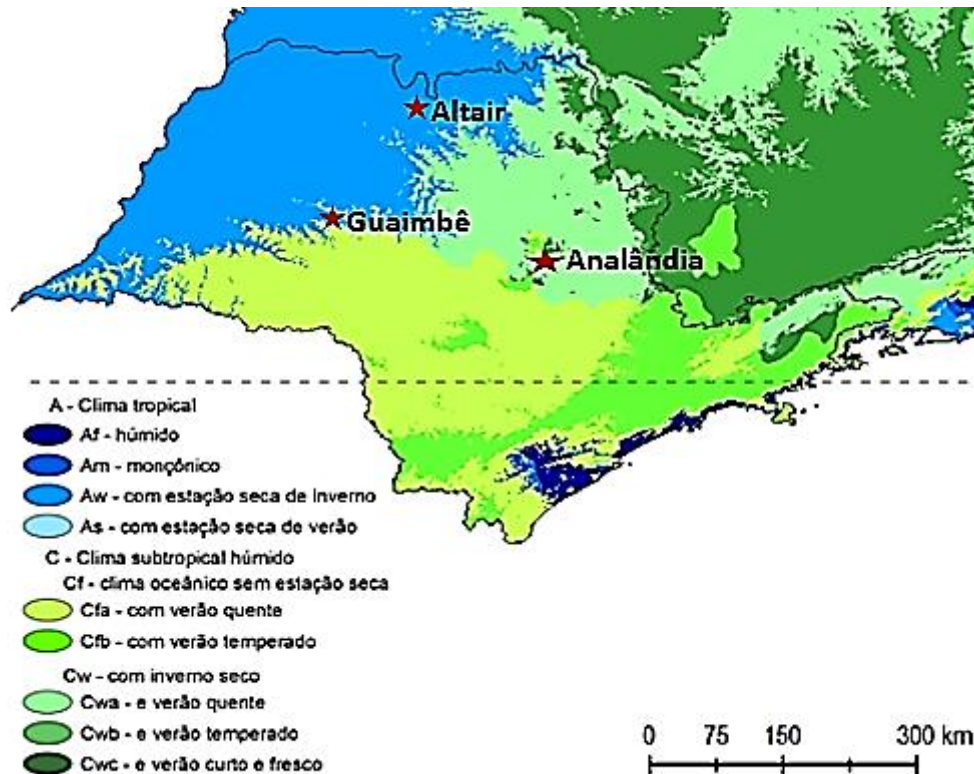


Figura 3. Localização das propriedades usadas neste estudo, identificadas sobre mapa indicando diferentes tipos climáticos, de acordo com a classificação de Köppen- Geiger. Fonte: Alvares et al., 2013.

De acordo com a classificação Köppen-Geiger (Alvares et al.,2013), Altair é do tipo Aw, que corresponde ao tropical com inverno seco, que apresenta como característica estação chuvosa no verão, sendo o mês de julho o mais seco. Nesta região, a precipitação acumulada ultrapassa os 750 mm anuais, podendo chegar a 1.800 mm. A temperatura média no mês mais frio é acima de 18°C. A região centro, onde está localizada a propriedade de Guaimbê o clima é do tipo Cfa, que corresponde ao temperado ou temperado quente e úmido, ocorrência de precipitações todo ano e sem estação seca definida, com pluviosidade média de 1.200 mm/ano. O clima na região onde está localizada a propriedade de Analândia é do tipo Cwa, que corresponde ao temperado, com temperaturas médias nos meses mais frios entre -3° e 18°C, com verões e invernos bem definidos e pluviosidade média de 1.300 mm/ano. No período de estudo, foram registradas temperatura e umidade do ar de hora em hora por meio de registrador eletrônico (Log Box, Novus, Porto Alegre). Os registradores foram instalados em caixas de madeira de 35 x 30 x 35 cm mantidos a 1,5 metros da superfície do solo, enquanto as chuvas

registradas por meio de pluviômetros de cunha de poliestireno cristal, com capacidade de 130 mm e área de captação de 15 cm², instaladas nas sedes das propriedades.

3.2 Avaliações

3.2.1 Campo

Em cada propriedade foram selecionadas dez plantas com presença de folhas mosqueadas. A cada dois meses, no período entre janeiro de 2017 a junho de 2018, um ramo sintomático de cada planta, que equivale de 15 a 20% da copa, era desfolhado e podado em sua extremidade, com o intuito de forçar a emissão de brotos fora do fluxo vegetativo normal, que geralmente ocorre de três a cinco vezes ao ano (Spiegel-Roy & Goldschmidt, 1996). Ao término da poda, este ramo foi marcado com fita plástica, apenas para identificar o local podado (Figura 4).

Antes de todas as podas, foram coletadas amostras de folhas para confirmação da presença da bactéria através de análise de RT-qPCR (Real Time – quantitative Polymerase Chain Reaction).



Figura 4. Ramos desfolhados e podados para indução de brotos em uma planta sintomática da variedade Valência enxertada sobre limoeiro Cravo com oito anos de idade na propriedade de Guaimbê, região central do estado de São Paulo.

Cerca de 15 dias após a poda, quando os brotos haviam atingido estádios V2-V3 (Figura 5), segundo escala elaborada por Cifuentes-Arenas et al. 2018 (Figura 6), foram coletados entre 15 e 20 brotos, colocados em sacos plásticos e acondicionados dentro de caixa térmica e enviados ao laboratório para quantificação bacteriana.



Figura 5. Brotos utilizados na quantificação bacteriana, estágio V2/V3 de planta de laranja Valência com oito anos de idade em propriedade localizada no município de Guaimbê.

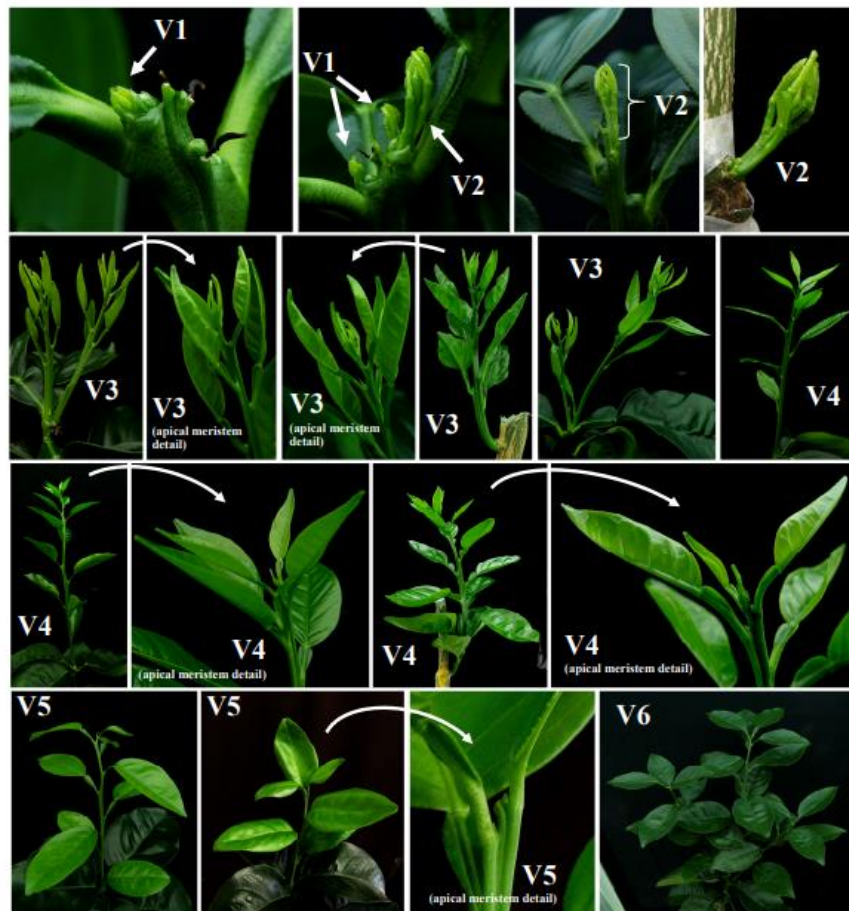


Figura 6. Escala de desenvolvimento de brotos em plantas de citros, utilizados na determinação dos estádios fenológicos, sendo V1 entumescimento da gema, V2 início da elongação do ramo, V3 expansão folha e fluxo vegetativo, V4 abertura e definição do número de folhas, V5 folha totalmente expandida, V6 folha madura (copiado de Cifuentes-Arenas et al., 2018).

No laboratório, foram selecionados cinco brotos por repetição (planta), identificados e submetidos a extração de DNA (Teixeira et al., 2005) e analisados por qPCR (Li et al. 2006).

3.2.2 PCR quantitativo em tempo real (RT – qPCR)

A quantificação da bactéria no broto foi baseada no valor de Ct, ou “Cycle Threshold” (ciclo limite), que é determinado pelo número de ciclos máximo necessário para se ter um valor mínimo de fluorescência aceitável como positivo. Ct acima de 34,0 foram considerados negativos para a presença da bactéria na amostra. Os valores de Ct foram transformados no logaritmo base 10 (log) do número de células bacterianas, empregando-se a fórmula $y = -0,2998Cq + 11,042$, $R^2=0,9981$ (Lopes et al., 2013), onde y é o log do número de células bacterianas e Cq é a quantificação da bactéria no broto (Ct).

Após a estimativa do valor do log, foi calculado a média de log de cada planta (repetição), e em seguida a média das dez plantas, para cada local e data de avaliação.

3.2.3 Análise de dados

Os dados de título bacteriano (log de *Ca. L. asiaticus* (Las) g⁻¹ de tecido) foram submetidos a uma análise de variância de dois fatores, sendo um deles a data de amostragem e o outro o local. Na última data de avaliação (junho 2018) as plantas podadas em Guaimbê não emitiram brotos e para poder incluir a análise da interação data*local, a análise de variância fatorial incluiu somente 9 datas (janeiro de 2017 até abril 2018). Quando o teste F indicou significância ($p < 0,05$), as médias foram separadas por meio de Teste Tukey. No caso de junho de 2018, foi realizada uma comparação dos logs médios do Ct de Analândia e Altair por meio de teste *t*. Para estudar a influência do clima na variação sazonal do título de *Ca. L. asiaticus* em brotos, foi realizada análise de regressão múltipla, cuja forma geral é $y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_k X_k$, onde *y* é a variável dependente (log de *Ca. L. asiaticus* (Las) g⁻¹ de tecido), *k* é o número de variáveis *X* e β são os coeficientes do modelo. As variáveis independentes incluíram os valores médios das temperaturas máximas, mínimas e médias, além da somatória de horas abaixo de 15°C e acima de 30 e 35°, assim como da quantidade de chuva aos 7, 15 e 30 dias anteriores a data da coleta de brotos. A seleção final foi feita por meio de ‘stepwise forward’.

4. RESULTADOS

Houve grande variação climática dentro e entre regiões, o que influenciou não só na brotação como também na concentração de *Ca. L. asiaticus*. Os meses de outubro e dezembro de 2017 foram os mais quentes em todos os locais. Os meses de junho de 2017 e 2018 foram os mais frios (Figura 7). A intensidade de calor e frio não foram iguais entre os locais, sendo Analândia o local onde ocorreram as menores médias de mínima e máxima, Altair e Guaimbê foi onde ocorreram as maiores médias de mínima e máxima (Tabela 3). A divisão realizada na Tabela 2 foi observando-se os períodos mais chuvosos e mais secos do ano. O acumulado de chuvas também não foi igual entre as regiões. De maio a agosto de 2017 foi registrado o maior volume em Guaimbê, e o menor em Altair. Entre setembro de 2017 e abril de 2018, Analândia foi onde o volume foi maior, e Guaimbê o menor, no mesmo período. O local onde o volume de chuva foi maior, no período estudado, foi Analândia (2.120 mm), e o menor em Altair (1.759 mm).

Tabela 3. Médias de temperatura (°C) e de chuva acumulada (mm) para o período entre janeiro de 2017 a junho de 2018, separados por épocas mais frias (maio a agosto) e épocas mais quentes (janeiro a abril).

Município	Jan/17 a Abr/17		Mai/17 a Ago/17		Set/17 a Abr/18		Mai/18 a Jun/18	
	Temp ¹ .	Chuva ²	Temp.	Chuva	Temp.	Chuva	Temp.	Chuva
Altair	20,0-33,6	542	13,3-30,5	97	19,6-34,4	1.120	14,3-31,4	0
Guaimbê	21,9-30,7	610	15,3-25,6	238	19,3-34,7	990	14,4-29,4	19
Analândia	18,0-30,6	672	13,0-26,6	157	17,3-31,1	1.279	14,2-27,9	12

¹ Médias temperaturas mínimas e máximas em °C; ² Chuva em milímetros (mm)

Nem todas as plantas selecionadas produziram brotos em todas as épocas avaliadas. Houve períodos em que as brotações ocorreram em menor intensidade ou nem ocorreram (Tabela 4). Nota-se que no período de janeiro a agosto de 2017, o número de plantas que brotaram foi uniforme em todas as localidades. No município de Altair houve a maior uniformidade no número de plantas que brotaram. O mês de junho de 2018 foi o mês onde ocorreram os menores números e maior desuniformidade nas três regiões (Tabela 4).

A concentração de *Ca. L. asiaticus* (log) no broto também foi desuniforme e variou em determinados períodos do ano, assim como também influenciada significativamente pelo local ($p < 0,0001$) e a data de avaliação ($p < 0,0001$). A interação data*local foi significativa ($p = 0,0003$), indicando variação do título bacteriano, dependendo do local ou a data. Desdobrando a interação, percebe-se que, no geral, os títulos de *Ca. L. asiaticus* foram maiores em Analândia,

porém em agosto de 2017 foi maior em Altair e, em outubro de 2017 maior em Guaimbê. Em abril de 2018, os títulos de *Ca. L. asiaticus* foram iguais em todos os locais (Tabela 3).

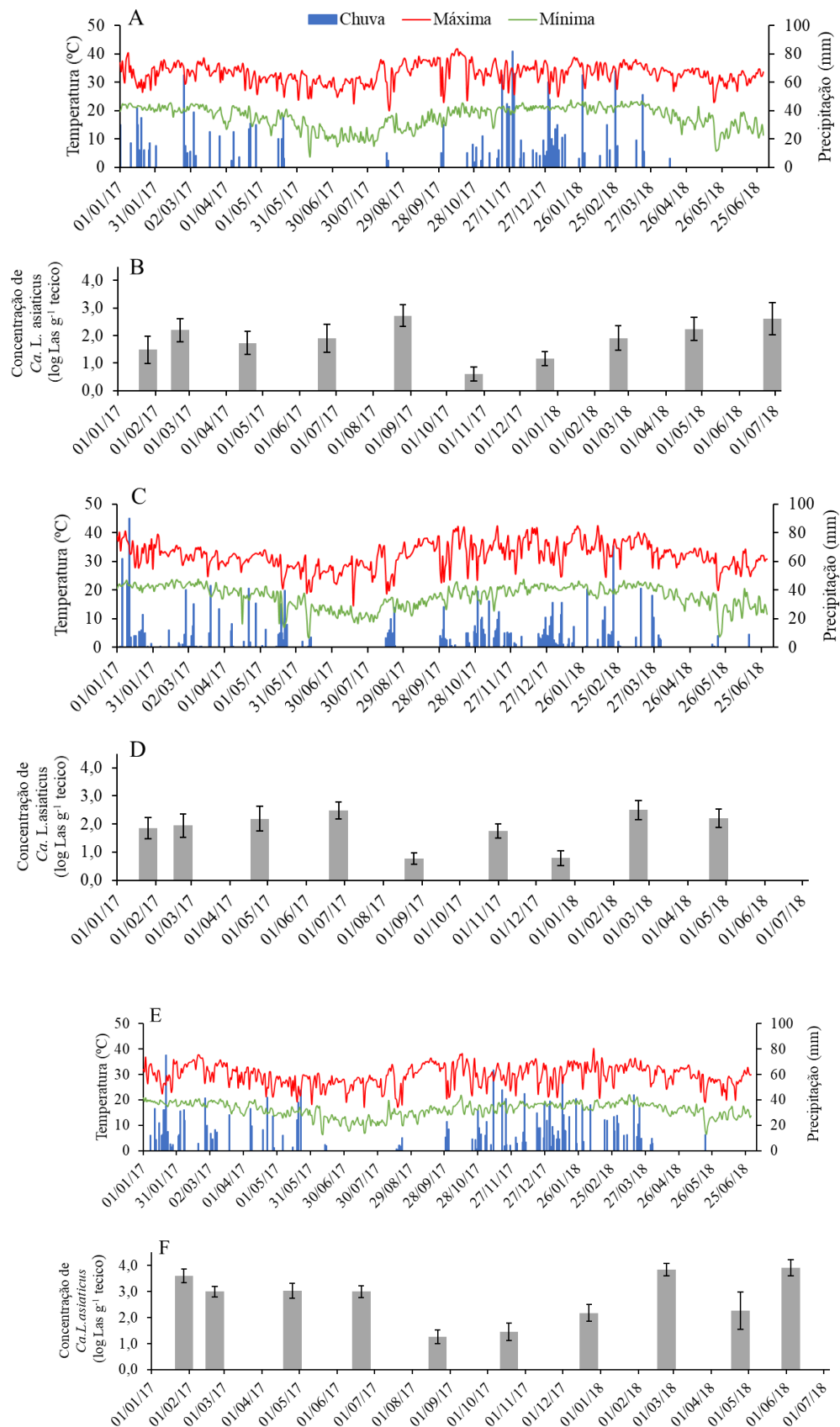


Figura 7. Temperaturas máximas, mínimas, precipitação acumulada e concentração de *Ca. L. asiaticus* (log médio Las) no broto em Altair (A e B), Guaimbê (C e D) e Analândia (E e F). Os dados climáticos são os que ocorreram entre a última e a penúltima avaliação.

Tabela 4. Variação sazonal na população de *Candidatus Liberibacter asiaticus* (log Las g⁻¹ tecido) e plantas amostradas que produziram brotos V2/V3 em laranja Valência com sintomas de huanglongbing, cultivadas em três propriedades localizadas nas regiões norte, centro oeste e centro leste do estado São Paulo, no período de janeiro de 2017 a junho de 2018.

Mês	Altair ¹		Guaimbê ¹		Analândia ¹		teste F ou t	valor p
	n	log±EP	n	log±EP	n	log±EP		
Janeiro/17	10	1,5±0,5 ab B	10	1,9±0,4 ab B	10	3,6±0,3 a A	7,99	0,0019
Fevereiro/17	10	2,2±0,4 ab A	10	2,0±0,4 ab A	10	3,0±0,2 ab A	2,38	0,1121
Abril/17	10	1,7±0,4 ab A	10	2,2±0,4 ab A	10	3,0±0,3 ab A	2,93	0,0707
Junho/17	10	1,9±0,5 ab A	9	2,5±0,3 a A	10	3,0±0,2 ab A	1,91	0,1684
Agosto/17	10	2,7±0,4 a A	10	0,8±0,2 b B	10	1,3±0,3 c B	11,78	0,0002
Outubro/17	10	0,6±0,3 b A	3	1,8±0,3 ab A	6	1,5±0,3 c A	3,85	0,043
Dezembro/17	10	1,2±0,3 ab B	9	0,8±0,3 b B	9	2,2±0,3 bc A	7,34	0,0031
Fevereiro/18	10	1,9±0,5 ab B	10	2,5±0,3 a B	9	3,8±0,2 a A	7,44	0,0028
Abril/18	10	2,2±0,4 ab A	9	2,2±0,3 ab A	4	2,3±0,7 abcA	0,01	0,9942
Junho/18 ²	7	2,6±0,6	0	n.a.	4	3,9±0,3	-1,59 ²	0,1464
Teste F		2,33		3,75		9,72		
valor p		0,0262		0,001		<0,0001		

¹ Médias seguidas pela mesma letra minúscula (dentro de coluna) ou maiúscula (entre colunas) não diferem pelo teste Tukey (p = 0,05); ² Teste t; n.a.: não avaliado; EP: Erro Padrão.

Independente da região avaliada, em agosto, outubro e dezembro de 2017 ocorreram as menores concentrações bacterianas e, em fevereiro e junho de 2018, as maiores. A concentração de *Ca. L. asiaticus* variou nas 3 regiões. De modo geral, a partir das avaliações realizadas em janeiro de 2017, foram observados redução dos títulos bacterianos (log), até chegar nos meses entre agosto e dezembro de 2017. Este número voltou a aumentar novamente a partir fevereiro de 2018, chegando ao mês de junho, onde foram observados títulos altos em ambos os anos avaliados, sendo 2018 o maior (Figura 7).

Analândia foi o local que teve a maior concentração de *Ca. L. asiaticus* dentre as três localidades, seguido de Altair e Guaimbê (Figura 7). A variação entre as maiores concentrações foi maior entre os locais do que as menores, que tiveram um período definido. A variação observada em Analândia foi menor que nos outros locais, sendo os meses de fevereiro (3,8 log células *Ca. L. asiaticus* por grama tecido) e junho de 2018 (3,9 log) com a maior concentração, e agosto (1,27 log) e outubro de 2017 (1,46 log) as menores. Guaimbê e Altair não seguiu o mesmo padrão como foi observado em Analândia. Em Guaimbê, os meses que tiveram as maiores concentrações foram junho de 2017 (2,48 log) e fevereiro de 2018 (2,49 log), e as menores em agosto (0,77 log) e dezembro de 2017 (0,78 log). Em Altair, as maiores populações foram observadas em agosto de 2017 (2,71 log) e junho de 2018 (2,61 log), e as menores em outubro (0,60 log) e dezembro de 2017 (1,17 log).

As variações climáticas dentro, e entre locais, indicam que o clima afetou a multiplicação da bactéria nos brotos (Figura 7). Para os fatores que estavam envolvidos, foi empregada regressão linear múltipla, com as médias das concentrações bacterianas sendo a variável dependente e os dados climáticos as variáveis independentes. Foram testados os seguintes dados climáticos: temperaturas mínima, máxima e média, horas abaixo de 15°C e horas acima de 30° e 35°C e acumulado de chuva aos 7, 15, 30 e 35 dias antes das coletas dos brotos. Entre todos dados analisados, o único que mostrou associação com título de *Ca. L. asiaticus* (log Las) foi o número de horas com temperaturas acima de 35°C nos últimos 30 dias antes da coleta do broto (Modelo: $F=9,77$, $p=0,0043$; Coeficientes: β_0 : $t=13,45$, $p<0,0001$; β_1 : $t=-3,13$, $p=0,0043$), com a equação que descreve a associação: $\text{Log Las} = 2,59738 - 0,0114956 \cdot \text{Hac35}_{30d}$. Porém, este modelo explica somente 24,5% (R^2) da variação no log observada.

5. DISCUSSÃO

Estudos anteriores foram realizados em plantas engaioladas, casa de vegetação ou em câmaras de crescimento, em ambientes onde a temperatura e condições adversas de clima são diferentes dos observados para uma planta em pomar comercial, a qual está sujeita a todas as intempéries climáticas (Lopes et al., 2013; Lopes et al., 2017; Mendonça, 2015). Em casas de vegetação ou câmaras de crescimento, as condições de temperatura foram controladas (temperatura e horas de exposição), e nas gaiolas as condições de temperatura foram até 3,8°C mais altas que o ambiente natural, com as máximas chegando a atingir, por determinados períodos, até 46°C, enquanto em condições naturais a máxima chegou a 42,5°C, em Guaimbê.

O número de plantas que brotaram não foi uniforme em todas as plantas e regiões. Apesar da área de Analândia ser irrigada, foi em Altair (não irrigado) onde houve maior número de plantas que emitiram brotos. Os fluxos vegetativos dependem de fatores genéticos, idade do ramo, temperatura e umidade (Guardiola et al., 1977; Moss, 1969). Oliveira (2017), em estudo realizado com plantas novas, identificou que não há influência do porta enxerto sobre as brotações. Em plantas adultas, em regiões de clima tropical e subtropical, podem ocorrer de três a cinco fluxos (Spiegel-Roy & Goldschmidt, 1996). As podas em plantas cítricas não são comuns, sendo realizadas apenas para retirar galhos secos, doentes ou rejuvenescer pomares velhos (Coordenadoria de Assistência Técnica Integral, 1973), e quando realizadas, ocorrem em períodos de baixa produção, próximos a primavera, apenas nos ramos mais finos. No presente estudo, as podas ou desfolhas foram realizadas em alguns momentos, fora do período ideal, o que pode ter sido a causa da desuniformidade de produção de brotos entre as plantas nas diferentes épocas. Fatores climáticos também podem ter afetado na brotação.

Entre os três locais estudados, o município de Analândia foi onde ocorreu maior média na concentração de *Ca. L. asiaticus*, seguido de Altair e Guaimbê. Os dados climáticos indicam que maiores concentrações de *Ca. L. asiaticus* ocorrem nos períodos de temperaturas mais amenas (fevereiro a junho, ambos os anos), com exceção de Altair, onde o maior título foi observado em agosto de 2017. Analândia, segundo dados do Fundo de Defesa da Citricultura (2018c), está localizada na região de Brotas, onde ocorre a maior incidência da doença no estado de São Paulo (58,16%), e também onde, neste estudo, foram observados os maiores títulos bacterianos. Em Altair, por sua vez, foram detectados os menores valores, também seguindo o que acontece na região de São José do Rio Preto (3,74%), onde Altair está localizada, seguindo a mesma divisão feita pelo do Fundecitrus. Assim como encontrado neste estudo, Lopes et al. (2017) em estudo realizado em plantas protegidas por gaiola de tela anti-afídica na região do

Triângulo Mineiro e Analândia também constataram menor concentração de *Ca. L. asiaticus* em períodos mais quentes em regiões mais ao norte, mas com menor efeito do que em estudo semelhante realizado em 2013, em câmaras de crescimento, onde o tempo de exposição a temperaturas altas foi maior.

Seguindo o que foi observado por Lopes et al. (2013), neste estudo houve associação da temperatura com a população de *Ca. L. asiaticus*. Menor população foi detectada nas regiões mais quentes e com maior número de horas acima de 35°C, nos últimos 30 dias antes da coleta dos brotos. Outros estudos também constataram que o calor afeta o desenvolvimento da bactéria, como Munyaneza et al. (2012) em *Ca. L. solanacearum*, com temperaturas acima de 32°C reduzindo sua reprodução. Hoffman et al. (2013) também relatam que temperaturas entre 40°e 42°C por pelo menos 48 horas em ambiente controlado (casa de vegetação), podem causar a redução ou eliminação da bactéria em mudas.

Por outro lado, Lopes et al. (2017) encontraram forte associação de *Ca. L. asiaticus* com temperaturas baixas (horas abaixo de 15°C), e chuva acumulada no período de 15 dias anteriores a amostragem dos brotos, o que não foi verificado neste estudo, apesar de terem ocorrido períodos muito frios dentro das regiões durante o período avaliado (Figura 7). Neste estudo, a associação só ocorreu com temperaturas acima de 35°C, que influenciou negativamente no desenvolvimento da bactéria.

O controle do HLB é focado no plantio de mudas saudáveis, eliminação das plantas doentes e controle do inseto vetor (Belasque Júnior et al., 2009). Atualmente, a pulverização para o controle do vetor é a medida mais empregada pelos citricultores, sendo realizada cada vez mais na forma de calendário, sem preocupação em monitorar se há ou não a presença do vetor no pomar. A utilização de armadilhas amarelas ou os dados do Alerta Fitossanitário do Fundecitrus podem ser um indicativo para direcionar melhor os momentos das pulverizações. Dados sobre a população bacteriana nos brotos também poderiam ajudar, pois quanto maiores são as populações bacterianas nos brotos, maiores são as taxas de aquisição pelo inseto (Lopes et al. 2017). Porém, a associação desta população com fatores climáticos, foi fraca neste estudo ($R^2 = 24,5\%$), o que limita sua aplicabilidade como parâmetro para direcionar as pulverizações. Há necessidade de se expandir este estudo para um número maior de áreas dentro do cinturão citrícola, aumentar a frequência de amostragem (mensal) para se formar um histórico mais detalhado dentro de cada local ou região. Com relação ao número de plantas e quantidade de brotos, o que foi utilizado neste estudo (10 plantas, 5 brotos por planta), seria suficiente para se ter um parâmetro indicativo da população de *Ca. L. asiaticus*.

6. CONCLUSÃO

Apesar de haver variações sazonais e entre locais nos fluxos vegetativos e na concentração bacteriana nas brotações, a associação entre clima e concentração bacteriana foi parcial. Por isso, não é possível prever a população bacteriana no broto apenas analisando as variáveis climáticas. Portanto, são necessários mais estudos a respeito do assunto, com maior frequência na amostragem dos brotos e maior número de regiões, que se encontra em andamento no Fundecitrus.

REFERÊNCIAS

- Agriannual: anuário da agricultura brasileira. São Paulo: Instituto FNP, 2018. 432 p.
- Alvares, C.A., Stape, J.L., Sentelhas, P.C., Gonçalves, J.L.M., Sparovek, G. 2013. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift** 22(6):711-728.
- Amorim A. 2016. Casos de greening do Brasil no Paraná. **Boletim Informativo FAEP** (1348): 10-12.
- Bassanezi, R.B., Montesino L.H., Stuchi, E.S. 2009. Effects of huanglongbing on fruit quality of sweet orange cultivars in Brazil. **European Journal of Plant Pathology** 125:565–572.
- Bassanezi, R.B., Montesino, L.H., Gasparoto, M.C.G., Bergamin Filho, A., Amorim, L. 2011. Yield loss caused by huanglongbing in different sweet orange cultivars in São Paulo, Brazil. **European Journal of Plant Pathology** 130:577-586.
- Bassanezi, R.B., Montesino, L.H., Gimenes-Fernandes, N., Yamamoto, P.T., Gottwald, T.R., Amorim, L., Bergamin Filho, A. 2013. Efficacy of area-wide inoculum reduction and vector control on temporal progress of huanglongbing in young sweet orange plantings. **Plant Disease** 97:789-796.
- Belasque Júnior, J., Bergamin Filho, A., Bassanezi, R.B., Barbosa, J.C., Fernandes, N.G., Yamamoto, P.T., Lopes, S.A., Machado, M.A., Leite Junior, R.P., Ayres, A.J., Massari, C.A. 2009. Base científica para a erradicação de plantas sintomáticas e assintomáticas de Huanglongbing (HLB, Greening) visando o controle efetivo da doença. **Tropical Plant Pathology** 34:(3)137-145.
- Beloti, V.H., Rugno, G.R., Felipe, M.R., Carmo-Uehara, A., Garbim, L.F., Godoy, W.A.C., Yamamoto, P.T. 2013. Population Dynamics of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) in Orchards of Valencia Orange, Ponkan Mandarin and Murcott Tangor Trees. **Florida Entomologist** 96:173-179.
- Boina, D.R., Meyer, W.L., Onagbola, E.O., Stelinski, L.L. 2009. Quantifying dispersal of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) by immunomarking and potential impact of unmanaged groves on commercial citrus management. **Environmental Entomology** 38:1250-1258.
- Bové, J.M. 2006. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. **Journal of Plant Pathology** 88(1):07-37.
- Bové, J.M., Teixeira, D.C., Wulff, N.A., Eveillard, S., Saillard, C., Bassanezi, R.B., Lopes, S.A., Yamamoto, P.T., Ayres, A.J. 2008. Several Liberibacter and phytoplasma species are individually associated with HLB. **Proceedings of the International Research Conference on Huanglongbing**. Orlando. p. 152-155.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 10, de 18 de março de 2005. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 22 de março de 2005. Disponível em: <http://www3.servicos.ms.gov.br/iagro_ged/pdf/2089_GED.pdf > Acesso em: 01 mar. 2018.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 32, de 29 de setembro de 2006. Prorroga os trabalhos de levantamento da ocorrência da praga denominada Huanglongbing (HLB). **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 02 de outubro de 2006. Disponível em: <<https://www.diariodasleis.com.br/busca/exibelinck.php?numlink=1-77-23-2006-09-29-32>>. Acesso em: 01 mar. 2018.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 53, de 16 de outubro de 2008. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 17 de outubro de 2008. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/sanidade-vegetal/arquivos-prevencao/IN53_2008HLB.pdf>. Acesso em: 01 mar. 2018.

Canale, M.C., Tomaseto, A.F., Haddad, M.L., Coletta-Filho, H.D., Lopes, J.R.S. 2017. Latency and persistence of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” in its Psyllid Vector, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). **Phytopatology** 107(3):264-272.

Capoor, S.P., Rao, D.G., Viswanath, S.M. 1974. Greening disease of citrus in the Deccan Trap Country and its relationship with the vector, *Diaphorina citri* Kuwayama. **VI Conference of the International Citrus Virology**. Riverside, CA, University of California. p. 43-49 .

Castro, M.E.A; Bezerra, A.R; Leite, W.A; Filho, W.N; Nogueira, N.D. 2010 Situação e ações do Estado de Minas Gerais frente ao huanglongbing. **Citrus Research & Technology** 31(2):163-168.

Cifuentes-Arenas, J.C., Goes, A., Miranda, M.P., Beattie, G.A.C., Lopes, A.S. 2018 Citrus flush shoot ontogeny modulates biotic potential of *Diaphorina citri*. **PLoS ONE** 13(1):e0190563.

Coletta-Filho, H.D., Targon, M.L.P.N., Takita, M.A., De Negri, J.D., Pompeu Junior, J., Machado, M.A. 2004. First report of the causal agent of huanglongbing (“*Candidatus Liberibacter asiaticus*”) in Brazil. **Plant Disease** 88:1382.

Coordenadoria de Defesa Agropecuária do Estado de São Paulo. 2005. Portaria CDA 5, de 3 de fevereiro de 2005. Estabelece normas de Medidas de Defesa Sanitária Vegetal e Certificação de Conformidade Fitossanitária de Mudanças Cítricas no Estado de São Paulo. **Diário Oficial do Estado de São Paulo**, São Paulo, SP, 04 fev. 2005. Disponível em: <<https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/portaria-cda-5-de-3-2-2005,642.html>>. Acesso em: 02 jan. 2018.

Coordenadoria de Defesa Agropecuária do Estado de São Paulo. 2018. **Dados da Citricultura Paulista**. Disponível em: <<http://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/www/gdsv/index.php?action=dadosCitriculturaPaulista>>. Acesso em: jan. 2019.

Coordenaria de Assistência Técnica Integral. 1973. **A cultura dos citros**. Campinas. 16 p. (CATI. Instrução prática, 154).

Costa Lima, A.M. 1942. **Insetos do Brasil**: homópteros. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Agronomia. 101 p. (Série didática; n. 4). 3º tomo.

Fagundes, P.R.S., Baptistella, C.S.L., Coelho, P.J. 2015. Os anos de 2011 a 2014 na citricultura paulista: divisor de águas? **Informações Econômicas** 45(5):40-58.

Fundo de Defesa da Citricultura. 2017a. **Greening (Huanglongbing)**. Disponível em: <<https://www.fundecitrus.com.br/doencas/greening>>. Acesso em: 01 out. 2017.

Fundo de Defesa da Citricultura. 2017b. **Fundecitrus monitora presença de inseto transmissor da pior doença da citricultura em 60% do parque citrícola**. Disponível em: <<https://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/noticias/integra/fundecitrus--monitora-presenca-de-inseto-transmissor-da-pior-doenca-da-citricultura-em--60-do-parque-citricola/523>>. Acesso em: 01 out. 2018.

Fundo de Defesa da Citricultura. 2018a. **Reestimativa da safra de laranja 2018/19 do Cinturão Citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro**: fechamento em abril/2018. Disponível em: <https://www.fundecitrus.com.br/pdf/pes_relatorios/0419_Reestimativa_da_Safra_de_Laranja.pdf>. Acesso em: 02 abr. 2019.

Fundo de Defesa da Citricultura. 2018b. **Tamanho de fruto e taxa de queda finais**: fechamento em abril/2018. Disponível em: <https://www.fundecitrus.com.br/pdf/pes_relatorios/0418_Tamanho_de_Fruto_e_Taxa_de_Queda_Finais1.pdf>. Acesso em: 02 abr. 2019.

Fundo de Defesa da Citricultura. 2018c. **Levantamento da incidência das doenças de citros greening, CVC, cancro cítrico 2018**. Disponível em: <<https://www.fundecitrus.com.br/pdf/levantamentos/LevantamentoDeDoencas2018-greening-cvc-cancroCitrico.pdf>>. Acesso em: 01 nov. 2018.

Fundo de Defesa da Citricultura. 2018d. **Alerta Fitossanitário** Disponível em: <<https://www.fundecitrus.com.br/alerta-fitossanitario>>. Acesso em: 20 fev. 2019.

Gallo, D., Nakano, O., Silveira Neto, S., Carvalho, R.P.L., Baptista, G.C., Berti Filho, E., Parra, J.R.P., Zucchi, R.A., Alves, S.B., Vendramin, J.D., Marchini, L.C., Lopes, J.R.S., Omoto, C. 2002. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ. 920 p.

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

Gottwald, T.R., Irej, M., Gast, T., Parnell, S., Taylor, E., Hilf, M.E. 2007. Spatio-temporal analysis of an HLB epidemic in Florida and implications for future spread. Proceedings. **17th Conference of International Organization of Citrus Virologists (IOCV)**. Riverside, University of California. p. 84-95.

Guardiola, J.L., Agustí, M., Garcia-Mari, F. 1977. Gibberellic acid and flower bud development in sweet orange. **Proc. Int. Soc. Citriculture**. 2:696-699.

Hall, D.G., Richardson, M.L., Ammar, E.D., Halbert, S.E. 2013. Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, vector of citrus huanglongbing disease. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 146:207–223.

- Hall, D.G., Albrecht, U., Bowman, K.D. 2016. Transmission rates of ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’ by Asian citrus psyllid are enhanced by the presence and developmental stage of citrus flush. **Journal of Economic Entomology** 109:558–563.
- Hoffman, M.T., Doud, M.S., Williams, L., Zhang, M.Q., Ding, F., Stover, E., Hall, D., Zhang, S., Jones, L., Gooch, M., Fleites, L., Dixon, W., Gabriel, D., Duan, Y.P. 2013. Heat treatment eliminates ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ from infected citrus trees under controlled conditions. **Phytopathology** 13:15-22.
- Inoue, H., Ohnishi, J., Ito, T., Tomimura, K., Miyata, S., Iwanami, T., Ashihara W. 2009. Enhanced proliferation and efficient transmission of *Candidatus Liberibacter asiaticus* by adult *Diaphorina citri* after acquisition feeding in the nymphal stage. **Annals of Applied Biology** 55:29-36.
- Jagoueix, S, Bové, J.M., Garnier, M. 1994. The phloem limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the subdivision of the proteobactéria. **International Journal of Systematic Bacteriology** 44(3):379-386.
- Lewis-Rosenblum, H., Martini, X., Tiwari, S., Stelinski, L.L. 2015. Seasonal movement patterns and long-range dispersal of Asian citrus psyllid in Florida citrus. **Journal of Economic Entomology** 108:3-10.
- Li, W., Hartung, J.S., Levy, L. 2006. Quantitative real time PCR for detection and identification of *Candidatus liberibacter* species associated with citrus huanglongbing. **Journal of Microbiological Methods** 66:104-115.
- Lopes, S.A., Frare, G.F., Yamamoto, P.T., Ayres, A.J., Barbosa, J.C. 2007. Ineffectiveness of pruning to control citrus huanglongbing caused by *Candidatus Liberibacter americanus*. **European Journal of Plant Pathology** 119(4):463-468.
- Lopes, S.A., Frare, G.F. 2008. Graft transmission and cultivar reaction of citrus to ‘*Candidatus Liberibacter americanus*’. **Plant Disease** 92:21-24.
- Lopes, S.A., Luiz, F.Q.B.F, Fassini, C.G., Oliveira, H.T., Oliveira, S.L.A. 2013. Limited success of heat treatments for curing HLB affected trees. Resumo. **Proceedings of the 3rd International Research Conference on Huanglongbing**. Orlando, IRCHLB. 2013. p. 201.
- Lopes, S.A., Luiz, F.Q.B.F, Oliveira, H.T., Arenas, J.C.C., Raiol Junior, L.L. 2017. Seasonal variation of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ titers in new shoots of citrus in distinct environments. **Plant disease** 101(4):583-590.
- Maschio F. 2011. Ações adotadas pelo citricultor para o manejo do huanglongbing (HLB. Greening) no parque citrícola paulista. 22 f. **Dissertação de Mestrado**. Araraquara, SP: Fundo de Defesa da Citricultura.
- Mead, F.W., Fasulo, T.R. 2011. **Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Insecta: Hemiptera: Psyllidae)**. Gainesville: University of Florida. 8 p. (IFAS Extension, 33).
- Mendonça, W.J.Q.F., 2015. Evolução da infecção por *Candidatus Liberibacter asiaticus* e dos sintomas de huanglongbing em plantas cítricas no sul do Triângulo Mineiro e região central do

Estado de São Paulo. 43 f. **Dissertação de Mestrado**. Araraquara, SP: Fundo de Defesa da Citricultura.

Miranda, M.P., Yamamoto, P.T., Noronha Junior, N.C. 2011. Utilização de cartões adesivos para monitoramento de *Diaphorina citri*. **Citricultura Atual** 81:8-9.

Moss, G.I. 1969. Influence of temperature and photoperiod on flower induction and inflorescence development in sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). **Journal Horticulture Science** 44:311-320.

Munyaneza, J.E., Sengoda, V.G., Buchman, J.L., Fisher, T.W. 2012. Effects of temperature on 'Candidatus *Liberibacter solanacearum*' and zebra chip potato disease symptom development. **Plant Disease** 96:18-23.

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

Neves, F.N., Trombin, V.G., 2017. **Anuário da Citricultura 2017**. São Paulo, SP: Citrus BR. 57 p.

Nunes, W.M.C., Zanutto C.A., Rinaldi, D.A.M.F., Croce Filho, J., Azevedo, M.L., Leite Júnior, R.P., Coletta Filho, H.D., Vicentini, S., Nunes, M.J.C. 2007. Primeira constatação de huanglongbing em pomar comercial de citros no Estado do Paraná. **Fitopatologia Brasileira** 32(1094):327.

Oliveira, H.T. 2017. Dinâmica de brotação em diferentes combinações de copa e porta-enxerto de citros em área irrigada e não irrigada. 37 f. **Dissertação de Mestrado**. Araraquara, SP: Fundo de Defesa de Citricultura.

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

Pelz-Stelinsky, K.S., Brlansky, R.H., Ebert, T.A., Rogers, M.E. 2010. Transmission parameters for *Candidatus Liberibacter asiaticus* by Asian citrus psyllid (Hemiptera: Psyllidae). **Journal of Economic Entomology** 103(5):1531-1541.

Rogers, M.E., Stansly, P.A. 2012. **Biology and management of the Asian citrus Psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama, in Florida Citrus**. Gainesville: University of Florida. 6 p. (IFAS Extension, ENY-739).

São Paulo (Estado). Portaria ADAESP nº 1 de 10 de fevereiro de 2003. Estabelece Medidas de Defesa Sanitária Vegetal, no Estado de São Paulo, para Mudanças Cítricas. **Diário Oficial do Estado de São Paulo**, São Paulo, SP, seção 3, 11 de fevereiro de 2003.

Sassi, R.S. 2016. Incidência e distribuição de *Diaphorina citri* portadores de *Candidatus Liberibacter asiaticus* em regiões cítricas com alerta fitossanitário no estado de São Paulo. 35 f. **Dissertação de Mestrado**. Araraquara, SP: Fundo de Defesa da Citricultura.

Setamou, M., Simpson, C.R., Alabi, O.J, Nelson, S.D., Telagamsetty, S., Jifon, J.L. 2016. Quality Matters: Influences of Citrus Flush Physicochemical Characteristics on Population Dynamics of the Asian Citrus Psyllid (Hemiptera: Liviidae). **PLoS ONE** 11(12): e0168997.

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

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. 2005. Citrus huanglongbing in São Paulo State, Brazil: PCR detection of the ‘*Candidatus*’ Liberibacter species associated with the disease. **Molecular and Cellular Probes** 19:173-179.

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

Tomaseto, A.F., Krugner, R., Lopes, J.R.S. 2016. Effect of plant barriers and citrus leaf age on dispersal of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). **Jornal of Applied Entomology** 140:91-102.

Ulian, L.F. 2016. *Diaphorina citri* e Huanglongbing: dinâmica, relações epidemiológicas e monitoramento do vetor em pomar de laranja com manejo da doença. 40 f. **Dissertação de Mestrado**. Araraquara, SP: Fundo de Defesa da Citricultura.

United States Department of Agriculture (USDA). 2018 National Agricultural Statistics Service Florida Field Office. Disponível em: <https://www.nass.usda.gov/Statistics_by_State/Florida/Publicatios/Citrus/Citrus_Forecast/2017-18/cit0318.pdf>. Acesso em: 27 mar. 2018.

Wulff, N.A., Teixeira, D.C., Martins, E.C., Padiar, N.R.H., Mariano, A.G., Carmo, A.E., Abrahao, D.P., Sousa, M.C., Ayres, A.J., Bové, J.M. 2006. Huanglongbing diagnosis. **Huanglongbing - Greening International Workshop**. Ribeirão Preto. p. 17.

Yamamoto, P.T. 2008. **Manejo Integrado de Pragas**. Piracicaba: CP 2. 336 p.

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

Yamamoto, P.T., Felipe, M.R., Garbim, L.F., Coelho J.H.C, Ximenes, N.L., Martins, E.C., Leite, A.P.R., Sousa, M.C., Abrahão, D.P., Braz, J.D. 2006. *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera: psyllidae): vector of the bacterium *Candidatus* Liberibacter americanus. **Proceedings of the Huanglongbing – greening International Workshop, 1**. Ribeirão Preto: Fundecitrus. p. 96.

Yamamoto, P.T., Miranda, M.P. 2009. Controle do psilídeo *Diaphorina citri*. **Ciência e Prática** 1:10-12

Yamamoto, P.T, Alves, G.R, Beloti, V.H. 2014. Manejo e controle do huanglongbing (HLB) dos cítricos. **Investiga. Agrar.** 16(2):69-82