

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE MESTRADO**

**RESPOSTAS DE COMBINAÇÕES COPA E PORTA-
ENXERTO DE CITROS AO HUANGLONGBING E
CRITÉRIOS DE AMOSTRAGEM DE BROTAÇÕES**

EVERTON VIEIRA DE CARVALHO

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
FEVEREIRO - 2017**

RESPOSTAS DE COMBINAÇÕES COPA E PORTA-ENXERTO DE CITROS AO HUANGLONGBING E CRITÉRIOS DE AMOSTRAGEM DE BROTAÇÕES

Everton Vieira de Carvalho

Engenheiro Agrônomo

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2015

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Agrárias (Área de Concentração: Fitotecnia).

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Augusto Girardi

Coorientadores: Dr. Silvio Aparecido Lopes

Dr. Walter dos Santos Soares Filho

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA

FEVEREIRO - 2017

FICHA CATALOGRÁFICA

C331r

Carvalho, Everton Vieira de.

Respostas de combinações copa e porta-enxerto de citros ao huanglongbing e critérios de amostragem de brotações / Everton Vieira de Carvalho._ Cruz das Almas, BA, 2017.

96f.; il.

Orientador: Eduardo Augusto Girardi.

Coorientador: Silvio Aparecido Lopes.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.

1.Frutas cítricas – Doenças e pragas. 2.Cítricos – Propagação – Porta enxerto. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Souares Filho, Walter dos Santos. III.Título.

CDD: 634.3

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE MESTRADO**

**RESPOSTAS DE COMBINAÇÕES COPA E PORTA-ENXERTO DE
CITROS AO HUANGLONGBING E CRITÉRIOS DE AMOSTRAGEM
DE BROTAÇÕES**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
Everton Vieira de Carvalho**

Realizada em 13 de Fevereiro de 2017

Prof. Dr. Eduardo Augusto Girardi
Embrapa Mandioca e Fruticultura
Examinador Interno (Orientador)

Profa. Dra. Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Examinador Interno

Dr. Francisco Ferraz Laranjeira
Embrapa Mandioca e Fruticultura
Examinador Externo

Quem se arrisca a andar por areias nunca antes respiradas ou pensar fora da curva tem grandes chances de encontrar pedras no caminho. No entanto, ninguém é digno de contribuir para a ciência se não usar suas dores e insônias nesse processo. Não há céu sem tempestade. Risos sem lágrimas. Sucessos e fracassos, aplausos e vaias fazem parte do currículo de cada ser humano, em especial daqueles que são apaixonados por produzir novas ideias.

Augusto Cury

A meus pais, Luiz Jacson e Auderice, meus irmãos Felipe, Maria Helena, Maria Luiza e Juninho. Meus avós, Seu Dete e Dona Aurinha. Meus tios Elvis, Grécio e Alê. E meus queridos primos Rodrigo, Catarina, Gabriela e Pedro, por todo amor e saudade.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e a Maria Mãe da Igreja, por estar sempre comigo de mãos dadas.

Ao Dr. Eduardo Augusto Girardi, pelas conversas, ensinamentos, confiança e amizade. É muito mais do que um orientador.

Aos meus coorientadores, Dr. Silvio Aparecido Lopes e Dr. Walter dos Santos Soares Filho, por toda ajuda, incentivo e confiança.

A Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, o Programa de Pós-graduação em Ciência Agrárias e todo o corpo docente, em especial ao Prof. Dr. Carlos Alfredo Lopes de Carvalho, pelo apoio e aperfeiçoamento na minha formação.

A UNESP/FCAV em Jaboticabal, em especial ao Departamento de Fitopatologia, em nome do Prof. Dr. Antonio de Goes pelo apoio imprescindível neste trabalho, e ao Departamento de Produção Vegetal, pela oportunidade do Estágio Docência.

Ao Dr. Nelson Arno Wulff, e todo o pessoal do Departamento Científico e equipe do laboratório de diagnóstico do Fundecitrus.

Aos meus queridos da “Equipe Silvio”: Laudecir, Juan, Fernanda, Priscila, Hermes, Luis, Dayse e Patrícia, pelo total apoio na condução desta pesquisa, companhia e amizade.

A Estação Experimental de Citricultura de Bebedouro, em nome do Sr. Otávio Sempionato, pelo apoio e confiança. Ao Dr. Eduardo Sanches Stuchi, pelas considerações e amizade. E aos funcionários, em especial Patrick e Élio, pela amizade.

A Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado.

A república Coronel em Araraquara, seus moradores e ex-moradores, pela amizade e por me adotarem nas minhas viagens.

Aos meus amigos de Cruz, por sempre fazerem com que eu me sentisse perto de casa. Em especial a Guto, amigo fiel nessa jornada.

Enfim, a todos que de alguma forma me ajudaram a chegar até aqui, **MUITO OBRIGADO!**

SUMÁRIO

Página

RESUMO

ABSTRACT

INTRODUÇÃO	11
RESPOSTAS DE COMBINAÇÕES COPA E PORTA-ENXERTO DE CITROS À INOCULAÇÃO ARTIFICIAL COM <i>CANDIDATUS LIBERIBACTER ASIATICUS</i> ..	45
CRITÉRIOS DE AMOSTRAGEM PARA CARACTERIZAÇÃO DA DINÂMICA DE BROTAÇÕES EM PLANTAS DE CITROS.....	66
CONSIDERAÇÕES FINAIS	94

RESPOSTAS DE COMBINAÇÕES COPA E PORTA-ENXERTO DE CITROS AO HUANGLONGBING E CRITÉRIOS DE AMOSTRAGEM DE BROTAÇÕES

Autor: Everton Vieira de Carvalho

Orientador: Dr. Eduardo Augusto Girardi

RESUMO: O huanglongbing (HLB) é a doença mais destrutiva aos citros e sua presença no Brasil implica em adoção de práticas de manejo específicas. Estudos anteriores indicam que o porta-enxerto pode influenciar na manifestação da doença na variedade copa. Além disso, o monitoramento das brotações se tornou importante para direcionar o controle do inseto vetor e para avaliar a exposição de diferentes genótipos. Este trabalho teve como objetivos: 1) avaliar a titulação de bactéria em combinações copa e porta-enxerto após inoculação artificial com *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las); e 2) estabelecer critérios de amostragem de plantas cítricas para avaliação de suas brotações. O experimento de inoculação foi realizado em ambiente protegido em Jaboticabal, SP. Mudanças de laranjeiras 'Pera' e 'Folha Murcha' cultivadas em sacolas plásticas de 4 L foram avaliadas enxertadas em citrumelo 'Swingle', citrandarins 'Índio', 'San Diego' e 'Riverside' e em seis híbridos de trifoliata. As avaliações foram realizadas aos 3 e 6 meses após a inoculação (MAI). Na comparação múltipla entre todos os tratamentos, a titulação de Las não apresentou diferença significativa. Aos 6 MAI o grupo formado pela copa de laranjeira 'Pera' apresentou 19% a mais de genomas de Las ($p < 0,05$) em relação às plantas de pé-franco. Todos os materiais avaliados permitiram alta multiplicação de Las nos tecidos. O experimento sobre avaliação de brotações foi realizado em pomar de laranjeira 'Valência' enxertada em citrumelo 'Swingle' com quatro anos de idade em Bebedouro, SP. As avaliações foram realizadas por dois métodos, amostrando-se 160 plantas em intervalos de 21 dias. No primeiro método de caráter quantitativo, os brotos localizados dentro da projeção de uma moldura ($0,25 \text{ m}^2$) em cada lado da planta foram contados e classificados de acordo com o estágio fenológico. Na segunda metodologia, qualitativa, foi anotado o estágio do broto predominante (>50%) em oito quadrantes da copa, sendo quatro de cada lado da planta. Levando em consideração o número médio de brotos, o tamanho amostral da quantidade mínima de plantas foi de 21 e 26 plantas para o lado de sol e de sombra, respectivamente, sendo que seriam necessárias 13 plantas tomando os dois lados da copa para atingir uma variância relativa de 25%. A distribuição temporal e espacial dos brotos foi predominantemente aleatória. De modo geral, o lado do sol e os quadrantes superiores das plantas se associaram mais com os brotos mais jovens. O cálculo pela área abaixo da curva (AAC) e a avaliação dos dois lados da copa da planta sugerem um menor número de plantas amostradas para realizar a avaliação de brotações no campo.

Palavras chave: *Citrus* spp., *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., inoculação, resistência, fenologia, *Candidatus liberibacter asiaticus*.

RESPONSES OF SCION AND ROOTSTOCK CITRUS COMBINATIONS TO HUANGLONGBING AND SAMPLING CRITERIA OF CITRUS SHOOTS

Author: Everton Vieira de Carvalho
Adviser: Dr. Eduardo Augusto Girardi

ABSTRACT: Huanglongbing (HLB) is the most destructive disease for citrus and its presence in Brazil implies the adoption of specific management practices. Previous studies indicate that the rootstock may influence the manifestation of the disease in the scion variety. In addition, the monitoring of shoots became important to direct control of the insect vector and to evaluate the exposure of different genotypes. The objectives of this study were: 1) to evaluate the titration of bacteria in scion and rootstock combinations after artificial inoculation with *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las); and 2) establish sampling criteria of citrus plants to evaluate their shoots. The inoculation experiment was carried out in greenhouse in Jaboticabal, SP. Seedlings of 'Pera' and 'Folha Murcha' sweet orange cultivated in 4 L plastic bags were evaluated grafted on 'Swingle' citrumelo, 'Indio', 'San Diego' and 'Riverside' citrandarins and six trifoliolate hybrids. The evaluations were performed at 3 and 6 months after inoculation (MAI). In the multiple comparison between all treatments, the titration of Las showed no significant difference. At 6 MAI the group formed by the scion of 'Pera' presented 19% more of Las genomes ($p < 0.05$) in relation to the rootstocks. All the evaluated materials allowed high multiplication of Las in the tissues. The experiment about shoots evaluation was carried out in four-year-old orchard of 'Valencia' sweet orange grafted on 'Swingle' citrumelo in Bebedouro, SP. The evaluations were performed by two methods, sampling 160 plants at 21 day intervals. In the first quantitative method, the shoots located within the projection of a frame ($0,25 \text{ m}^2$) on each side of the plant were counted and classified according to the phenological stage. In the second qualitative methodology, the predominant shoot stage ($> 50\%$) was recorded in eight quadrants of the canopy, four of each side of the plant. Taking into account the average number of shoots, the sample size of the minimum amount of plants was 21 and 26 plants for the sun and shade side respectively, and it would take 13 plants taking the two sides of the canopy to reach a relative variation of 25%. The temporal and spatial distribution of shoots was predominantly random. In general, the sun side and the upper quadrants of the plants were associated more with the younger shoots. The calculation by the area under the curve (AUC) and the evaluation of the two sides of the plant canopy suggest a smaller number of plants sampled to carry out the evaluation of shoots in the field.

Key words: *Citrus* spp., *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., inoculation, resistance, phenology, *Candidatus liberibacter asiaticus*.

REFERENCIAL TEÓRICO

INTRODUÇÃO

As laranjas são as principais frutas cítricas produzidas no mundo, chegando à produção de 71 milhões de toneladas em 2013, sendo que o Brasil é responsável pela produção de cerca de 19 milhões de toneladas anualmente, se tornando, deste modo, o maior produtor mundial, seguido pelos Estados Unidos (FAO, 2014; AGRIANUAL, 2016).

Em 2015, o cultivo de laranja compreendeu aproximadamente 668 mil hectares (ha) de área plantada em todo o Brasil, sendo que aproximadamente 416 mil ha se concentram no cinturão citrícola do Estado de São Paulo e no triângulo/sudoeste mineiro, tornando a citricultura dessa região a mais expressiva do país (IBGE, 2016; FUNDECITRUS, 2016).

A citricultura é uma das atividades mais relevantes do agronegócio brasileiro, sendo que o suco de laranja concentrado e congelado é seu principal produto para o mercado de exportação. O país detém mais da metade da produção de suco de laranja, sendo 98% destinados à exportação. Flórida, EUA, e São Paulo detêm cerca de 80% da produção mundial de suco, visto que apenas o Estado de São Paulo é responsável por 53% do total (NEVES et al., 2010). O Brasil tem se destacado como o maior produtor de suco de laranja em todo o mundo principalmente pela situação atual da Flórida em relação ao huanglongbing (HLB), que causou uma redução significativa na produtividade dos pomares (BOVÉ, 2012).

O HLB é a doença de maior importância econômica da citricultura mundial. Três espécies de bactérias do gênero '*Candidatus Liberibacter*' têm sido associadas à doença, *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las), *Candidatus Liberibacter africanus* (Laf) e *Candidatus Liberibacter americanus* (Lam) (BOVÉ, 2006). Medidas preventivas devem ser adotadas após o aparecimento da primeira planta sintomática, caso contrário, pomares inteiros podem se tornar economicamente inviáveis em até dez anos, sendo que em pomares jovens esse tempo pode ser de apenas cinco anos (GOTTWALD et al., 2007). Os sintomas da doença foram reconhecidos pela primeira vez em períodos relativamente recentes na Flórida e no

Estado de São Paulo, em 2005 e 2004, respectivamente (COLLETA-FILHO et al., 2004; HALBERT, 2005).

Desta forma, para o controle do HLB é de fundamental importância que sejam tomadas medidas preventivas para evitar a infecção das plantas. O controle indicado envolve o plantio de mudas saudáveis, a erradicação de plantas doentes e o controle do inseto vetor, *Diaphorina citri* Kuwayama. Assim, o manejo do HLB tem como fundamento a prevenção de novas infecções em plantas ainda saudáveis, baseando-se na redução do inóculo presente em plantas e insetos vetores (BELASQUE JUNIOR et al., 2010). O Brasil tem efetuado as medidas preventivas de maneira rigorosa e com resultados bem sucedidos em larga escala (BOVÉ, 2012).

Em relação ao controle do inseto vetor, é necessário cada vez mais estudar os seus hábitos para que um monitoramento mais efetivo seja realizado. A população do psílideo ocorre com maior frequência em épocas do ano em que a planta apresenta maior fluxo vegetativo, sendo as brotações mais novas as mais atrativas ao vetor (YAMAMOTO et al., 2001; HALBERT; MANJUNATH, 2004). Logo, é necessária a verificação desses fluxos ao longo do ano, com a finalidade de identificar os picos de brotações para que as inspeções sejam realizadas de maneira eficaz e, além disso, de épocas do ano em que não haja emissões significativas de brotações que justifiquem as aplicações de inseticidas (HALL; ALBRIGO, 2007).

Embora *Las* seja capaz de se multiplicar em todas as plantas de citros, diferentes hospedeiros respondem de maneiras distintas à inoculação da bactéria, de modo que diferentes isolados de *Las* podem causar diferentes níveis de sintomas e severidade da doença em cultivares de citros (TSAI et al., 2008; FOLIMONOVA et al., 2009).

Assim, pesquisas realizadas em casa-de-vegetação têm a finalidade de determinar condições favoráveis à transmissão do patógeno de plantas doentes do campo para plantas jovens, bem como avaliar o desempenho de diversas espécies de citros e parentais à doença, determinando a eficiência de propagação do patógeno por meio da enxertia (LOPES; FRARE, 2008).

Deste modo, estudos com diferentes genótipos, copas e porta-enxertos, se tornam cada vez mais necessários a fim de selecionar novos materiais que possam vir a contribuir ao manejo de pragas e doenças, notadamente o HLB. Assim, esta pesquisa teve como finalidade avaliar a titulação de bactéria em combinações copa

e porta-enxerto após inoculação artificial com *Candidatus Liberibacter asiaticus* e ainda estabelecer critérios de amostragem de plantas cítricas para avaliação de suas brotações.

Revisão de Literatura

Importância socioeconômica da citricultura no Brasil

As plantas cítricas como as do gênero *Citrus*, *Fortunella* e *Poncirus* são pertencentes à família Rutaceae, subfamília Aurantioideae, tendo sua origem no sudeste do continente asiático (SWINGLE; REECE, 1967; SCORA, 1975). No Brasil, as sementes que originaram as primeiras plantas cítricas foram trazidas pelos portugueses, no período da colonização a partir do ano de 1530, sendo relatadas as primeiras aparições no Estado de São Paulo e sua posterior expansão pelo litoral brasileiro (HASSE, 1987).

O Estado de São Paulo, até julho de 2015, alcançou uma produção total de 284 milhões de caixas de 40,8 kg de laranja na safra 14/15, seguido de Minas Gerais (24.449 milhões), Bahia (24.148 milhões), Paraná (24.019 milhões) e Sergipe (14.473 milhões) como maiores Estados produtores. Em relação à área colhida, em São Paulo esta foi cerca de 425 mil ha, sendo que é expressivo o cultivo de laranjeira no país representado pelas demais unidades da Federação, tais como Bahia (60.950 ha), Sergipe (51.800 ha), Minas Gerais (46.280 ha), Paraná (28.000 ha), Rio Grande do Sul (25.371 ha) e Pará (11.817 ha) (AGRIANUAL, 2016).

Ainda no que diz respeito ao mercado de fruta fresca de citros, além da laranja doce, para tangerinas e seus híbridos, que têm a China como maior produtor, e limas ácidas e limões, com produção mundial liderada pela Índia, o Brasil ainda é um dos maiores produtores dessas frutas cítricas, ocupando respectivamente quarto e quinto lugar em escala mundial. O Brasil é o maior produtor de suco concentrado e congelado de laranja, o segundo para o suco concentrado de tangerina, atrás apenas dos Estados Unidos, e o quarto para o suco concentrado de limão, sendo a produção mundial liderada pela Argentina (FAO, 2014).

A citricultura é uma das maiores atividades do agronegócio brasileiro, com uma cadeia disposta em divisões representadas por viveiristas, produtores rurais, prestadores de serviço, fornecedores de insumos e máquinas, comercialização de fruta fresca, indústrias de óleos essenciais, limoneno e casca em *pellets* para ração

animal, indústrias de processamento de suco concentrado e congelado (“Frozen Concentrated Orange Juice” - FCOJ, sigla em inglês) e integral pasteurizado (“Not From Concentrate” - NFC), entre outros segmentos. A citricultura tem gerado, entre empregos diretos e indiretos, um contingente de 230 mil posições, e uma massa salarial anual de R\$ 676 milhões, enquanto que o preço médio de exportação do NFC e do FCOJ foi de, respectivamente, R\$ 575 ton⁻¹ e R\$ 1.965 ton⁻¹ (NEVES et al., 2010).

Histórico, importância e manejo do huanglongbing

O huanglongbing (HLB), também conhecido popularmente como *greening*, foi relatada pela primeira vez na China em 1919 e era conhecido como *yellow shoot disease*, sendo atualmente encontrado em muitas regiões produtoras de citros em todo o mundo, incluindo Ásia, África e Américas (REINKING, 1919; BOVÉ, 2006).

Posteriormente, foi relatada na África em 1928 uma doença similar ao HLB e que recebeu o nome de *yellow shoot*, mais tarde sendo diagnosticada e descrita como *greening* em 1937 (VAN DE MERWE; ANDERSON, 1937). Nas Filipinas, a doença é conhecida como *mottle leaf*, na Índia como *dieback*, na Indonésia como *vein phloem degeneration* e em Taiwan como *likubin* (BOVÉ, 2006). Ainda não existem relatos do HLB na Austrália e na bacia do Mediterrâneo, onde, no entanto, a doença está se tornando cada vez mais objeto de grande preocupação (BOVÉ, 2014).

O HLB afeta as três maiores regiões produtoras de citros em todo o mundo: a China, ao menos desde os anos de 1930; o Brasil, desde 2004; e, desde 2005, os Estados Unidos. É provavelmente a doença mais séria e destrutiva do citros em todo o mundo (BOVÉ, 2006). Desde o seu primeiro relato no Brasil, em março de 2004, na região de Araraquara, Estado de São Paulo (COLLETA-FILHO et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2005b), a doença já foi encontrada nas principais regiões citrícolas do Estado e também nos estados de Minas Gerais e Paraná, que são os maiores produtores de laranja em conjunto com os Estados de São Paulo e Bahia (AGRIANUAL, 2016).

No campo, a identificação da doença é realizada por meio da observação dos sintomas, que por muitas vezes é difícil de ser atingida. Os sintomas da doença aparecem inicialmente em um ramo ou galho, que se destaca pela coloração

amarelada assimétrica das folhas, caracterizando um mosqueado irregular entre os lados da folha separado pela nervura central, que normalmente se encontra espessa e saliente. Com o avanço da doença, há uma intensa desfolha nos ramos afetados, seca dos ponteiros e os sintomas podem aparecer em toda a copa. Os frutos dos ramos afetados são pequenos, irregulares, assimétricos, com coloração de casca irregular, possuem sementes abortadas e caem de forma prematura. A assimetria dos frutos pode ser determinada com um corte perpendicular ao eixo dos frutos (LARANJEIRA et al., 2005; BOVÉ, 2006).

Os frutos de laranja colhidos de ramos sintomáticos, quando comparados com frutos de ramos assintomáticos, apresentam diferenças marcantes na redução do tamanho e da massa, bem como menor teor de sólidos solúveis totais (°Brix) avaliados por fruto e por caixa e, ainda, baixo rendimento de suco com aumento na acidez (BASSANEZI et al., 2009).

Em murtas (*Murraya paniculata* L.), que são plantas próximas de *Citrus* muito utilizadas em paisagismo urbano e tidas por acrescer a disseminação da bactéria, muitas vezes há sintomas discretos quando comparados com os de citros (MANJUNATH et al., 2008).

Em plantas infectadas, a bactéria coloniza de maneira sistêmica a partir do sítio de infecção para diferentes partes da planta, podendo ser encontrada nas folhas, raízes, flores, frutos e ainda no tegumento das sementes. A distribuição da bactéria dentro da planta é irregular, apresentando variadas concentrações nos diferentes tecidos vegetais exceto no endosperma das sementes (TATINENI et al., 2008). Apesar da distribuição irregular da bactéria na planta, tem sido estudado que, a partir da inoculação, a bactéria se move diretamente para o sistema radicular onde se multiplica, movimentando-se posteriormente para as folhas a partir das novas brotações que funcionam como drenos, seguindo o fluxo do floema (JOHNSON et al., 2014).

Estudos anatômicos mostram que as bactérias associadas ao HLB estão presentes no floema como células individuais e, por suas dimensões reduzidas, movem-se livremente pelos elementos crivados de maneira que não formam agregados capazes de bloquear o floema. No entanto, em plantas infectadas, o bloqueio do floema é atribuído principalmente à deposição de calose nos poros das placas crivadas e nos plasmodesmos que conectam os elementos crivados às

células companheiras, provavelmente pela superexpressão de genes que induzem a formação do amido (TATINENI et al., 2008; KIM et al., 2009).

O bloqueio do floema é associado à inibição do transporte de fotoassimilados, causada pelo acúmulo de amido em células fotossintéticas, no parênquima vascular e em elementos do floema de folhas e pecíolos, enquanto que nas raízes o acúmulo de amido não é observado. Esse acúmulo resulta na desorganização e colapso das células do floema. Essas alterações contribuem para o desenvolvimento dos sintomas da doença levando ao declínio e até mesmo à morte das plantas afetadas (ETXEBERRIA et al., 2009).

A maior incidência de plantas com sintomas visíveis é observada entre o final do verão e o início da primavera, com máxima detecção ocorrendo entre o outono e o inverno. A expressão mais intensa dos sintomas nesta época do ano indica que a causa deve estar nas menores temperaturas prevalentes que, ao contrário das temperaturas mais altas da primavera e verão, não reduzem as taxas de multiplicação da bactéria nos tecidos das plantas (LOPES et al., 2009a; BASSANEZI et al., 2010).

Também existe o efeito de borda, ou seja, uma maior concentração de plantas sintomáticas na periferia das propriedades e talhões, característica marcante do HLB que ocorre em virtude da maior incidência do psíldeo que migra de outras áreas para as plantas que se localizam nas bordas dos pomares, o que acarreta na infecção primária dessas plantas, que servirão de fonte de inóculo para o vetor que se deslocará a curtas distâncias, resultando na infecção secundária dentro do pomar (GOTTWALD et al., 2008; BELASQUE JUNIOR et al., 2009).

As plantas jovens infectadas com a doença apresentam acentuada limitação ao desenvolvimento e produção, enquanto que as adultas apresentam ao longo do tempo um grave definhamento vegetativo, com consequente perda de produção, porém mais lentamente que nas plantas jovens (BOVÉ, 2006).

O manejo para controle do HLB exige a utilização de três principais medidas: i) tratamento químico nas plantas de maneira constante durante todo o ano para diminuir a população do inseto vetor, ii) identificação e remoção imediata de plantas sintomáticas para reduzir as fontes de inóculo e iii) substituição das plantas erradicadas por plantas jovens e sadias provenientes de viveiros telados e livres de contato com o psíldeo (BOVÉ, 2012).

Além disso, é importante ressaltar que o manejo para o controle do HLB deve ser efetuado em escala regional, ou seja, que todas as propriedades que são vizinhas em uma mesma região realizem todas as medidas para o controle da doença, para que haja eliminação das fontes externas de inóculo e o controle do psilídeo nessas fontes (BASSANEZI et al., 2010).

São recomendadas inspeções periódicas, com intervalos de no máximo quatro meses a depender da incidência da doença na área, para detecção e eliminação de todas as plantas identificadas com sintomas. Para as inspeções, devem-se sempre empregar inspetores continuamente treinados e capacitados para a identificação de plantas doentes com sintomas. Também se deve permitir que os mesmos inspecionem as plantas com o máximo de concentração e motivados para a atividade (BELASQUE JUNIOR et al., 2009; BELASQUE JUNIOR et al., 2010).

Mesmo em pomares nos quais ainda não foi constatada a presença de plantas com HLB, é recomendada a prática de inspeções constantes, visando adotar o controle no início da epidemia, além da possibilidade de já haver plantas assintomáticas no pomar. Neste caso, as inspeções podem ser concentradas nas plantas que fazem divisa com outros pomares ou outras áreas, onde há maiores concentrações de plantas com HLB, pois são suscetíveis à infecção primária. Assim que detectada as primeiras plantas sintomáticas, a inspeção deve ser realizada em toda a propriedade, planta a planta, uma vez que a distribuição das plantas doentes no pomar varia de levemente agregada à aleatória, o que inviabiliza uma inspeção amostral para fins de controle da doença (GOTTWALD et al., 2007; BASSANEZI et al., 2010).

As bactérias associadas ao HLB e seu vetor

O agente causal associado ao HLB, *Candidatus Liberibacter* spp., é uma bactéria Gram-negativa, pertencente à subdivisão *alpha* da classe das Proteobacteria, sendo uma bactéria restrita ao floema da planta (GARNIER et al, 1984; JAGOUÉIX et al., 1994). Embora todas as evidências levem a crer que estas bactérias sejam as causadoras da doença, ainda não houve uma comprovação por meio do uso dos postulados de Koch, por serem microrganismos de incompleto domínio em meio de cultura artificial, sendo provavelmente as primeiras bactérias

constituídas por parede celular que são restritas ao floema observadas em plantas (BOVÉ, 2006).

Assim, a classificação taxonômica foi obtida por meio de estudos em microscopia eletrônica e a identificação por comparação a partir do banco de dados da sequência 16S DNA ribossomal, sendo proposto o nome trivial “*liberibacter*” (GARNIER et al, 1984; JAGOUEIX et al., 1994) para esse grupo de bactérias que foram denominadas provisoriamente de *Candidatus* (MURRAY; SCHLEIFER, 1994) até que mais pesquisas comprovem sua classificação taxonômica.

As três espécies de bactérias relacionadas ao HLB são: *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las), presente nos continentes asiático, americano e recentemente relatada também no continente africano e na península árabe (BOVÉ, 2006; BOVÉ, 2015; SHIMWELA et al., 2016); *Candidatus Liberibacter africanus* (Laf), existente na África e na península árabe (BOVÉ, 2006; BOVÉ, 2015); e *Candidatus Liberibacter americanus* (Lam), verificada apenas no Brasil (TEIXEIRA et al., 2005a). Entre as bactérias associadas ao HLB, a Las é a mais disseminada entre as três, predominando como espécie relacionada à epidemia do HLB nos países da América do Sul, Central e do Norte (BASSANEZI et al., 2010).

Assim que o HLB foi detectado no Brasil, a espécie Lam era a mais prevalente nos pomares de citros, porém, a partir de 2008, a espécie Las passou a ser mais predominante (LOPES et al., 2009a). Isso se deve ao fato da temperatura ser um fator que contribui de maneira significativa à multiplicação da bactéria. A proliferação da espécie Las não é afetada em temperaturas elevadas, na faixa entre 32–35°C, sendo deste modo tolerante ao calor, o que não ocorre com a espécie Lam, já que nessa faixa de temperatura a multiplicação das bactérias é reduzida e não há sintomas da doença (BOVÉ, 2006; LOPES et al., 2009a).

Além disso, o aumento da incidência de Las pode ser devido à maior concentração dessa bactéria em plantas infectadas, elevando assim as chances de aquisição e transmissão do patógeno pelo inseto vetor. Os efeitos de temperatura e concentração da bactéria não são devidos à planta hospedeira, mas sim à biologia do próprio patógeno, demonstrando que possuem diferenças biológicas entre si e que a espécie Las apresenta vantagem na competição sobre Lam e Laf (BOVÉ, 2006; LOPES et al., 2009b).

Candidatus Liberibacter spp. pode ser transmitida para citros por meio do inseto (psílideo) *Diaphorina citri* Kuwayama (Liviidae), que está presente na Ásia, América e África, e transmite as bactérias Las e Lam (BOVÉ, 2006; SHIMWELA et al., 2016). A espécie *Trioza erytrea* (Del Guercio) (Psilidea), que é responsável pela transmissão da bactéria Laf, encontra-se na África, no sudoeste europeu (Portugal e Espanha), bem como nas ilhas da Madeira e Canárias (BOVÉ, 2006; EPPO, 2016).

A transmissão por psílideo é um processo natural que ocorre em condições de campo, mas experimentalmente a utilização desta prática é complexa pela baixa eficiência da transmissão do patógeno e necessidade de uso de uma alta quantidade de insetos. Desta forma, a transmissão do patógeno pode ser feita experimentalmente pela enxertia de borbulhas oriundas de plantas infectadas ou ainda de forma indireta, com o uso de hospedeiros secundários, no caso da cuscuta (*Cuscuta* spp.) (LOPES; FRARE, 2008).

No Brasil, *D. citri* foi relatado pela primeira vez em 1942 (COSTA LIMA, 1942). Por muito tempo, sua presença nos pomares não causou preocupação, o que veio a acontecer após o relato da ocorrência de HLB nos pomares paulistas (COLLETA-FILHO et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2005b). Esse inseto é originário do sul da Ásia (HALBERT; MANJUNATH, 2004) apresentando distribuição geográfica mais ampla do que a das bactérias do HLB, uma vez que ocorre em países onde a doença ainda não foi relatada (EPPO, 2016).

Os insetos medem de 2 a 3 mm de comprimento quando atingem a idade adulta, possuem cabeça ligeiramente mais estreita que o tórax, com antenas com dois segmentos basais de coloração castanha clara e pontas pretas e olhos castanho escuro. Seu corpo possui coloração marrom, coberto com secreção serosa sob a forma de pó esbranquiçado, com abdômen dorsalmente preto, e branco, esverdeado ou alaranjado no ventre. Geralmente são encontrados na face abaxial das folhas, saltam a curtas distâncias e, quando em repouso, seu corpo forma um ângulo de 30° a 45° em relação à superfície em que se encontram (GALLO et al., 2002; HALL, 2008).

Seu ciclo de vida é composto de três estágios de desenvolvimento: ovo, ninfa passando por cinco instares, e adulto (AUBERT, 1987). Tem vida média de dois a três meses em condições adequadas de temperatura (18-25 °C), umidade (70-85%) e planta hospedeira como fonte de alimento. Os ovos são depositados

preferencialmente na superfície dos brotos em estágio inicial de desenvolvimento. Cada fêmea chega a colocar de 500 a 800 ovos durante toda a sua vida (TSAI e LIU, 2000; NAVA et al., 2007; GÓMEZ TORRES, 2009).

As ninfas se desenvolvem em brotos de estádios vegetativos iniciais e se alimentam preferivelmente em folhas novas. Excretam grande quantidade de substância açucarada, conhecida como “honeydew”, que favorece o desenvolvimento de bolor negro ou fumagina que recobrem as folhas prejudicando sua respiração, transpiração e fotossíntese, prejudicando também visualmente a qualidade dos frutos (TSAI; LIU, 2000). A flutuação populacional do psíldeo está diretamente relacionada à presença de brotações e condições ambientais favoráveis ao seu desenvolvimento (GALLO et al., 2002; HALL et al., 2008).

As bactérias associadas ao HLB, uma vez adquiridas pelo inseto, possuem a capacidade de se replicar no seu sistema circulatório e, conseqüentemente, ser disseminada durante toda a vida do mesmo. Insetos adultos podem adquirir a bactéria alimentando-se em plantas sintomáticas de 30 minutos a uma hora (XU et al., 1988; HUNG et al., 2004). Já o período de latência ou multiplicação da bactéria no tecido do inseto até atingir as glândulas salivares e este se tornar infectivo pode variar de 8 a 21 dias (ROGERS et al., 2012).

Na fase de ninfa, o patógeno pode ser adquirido a partir do segundo ínstar quando se desenvolvem em ramos de plantas infectadas, no entanto, somente ninfas de quarto e quinto ínstars são capazes de transmissão para plantas sadias (XU et al., 1988; PELZ-STELINSKI et al., 2010).

A transmissão das fêmeas para a progênie (transovariana) ocorre em níveis de 2 a 6% (PELZ-STELINSKI et al., 2010), e machos infectivos transmitem a bactéria para as fêmeas durante o acasalamento em níveis de 4% (MANN et al., 2011).

A aquisição das bactérias por ninfas é mais eficiente do que pelos insetos adultos, principalmente no 4º e 5º instares. Além disso, as ninfas também são mais eficazes na transmissão da bactéria, podendo efetuar a inoculação semanas após a aquisição (PELZ-STELINSKI et al., 2010).

Porta-enxertos em citricultura

A prática da enxertia já era realizada desde cerca de 1000 a. C. pelos chineses. Em citros, a enxertia é uma atividade praticada desde o século V, porém o principal indutor da transição da citricultura de pés francos para a de plantas enxertadas foi o surgimento da gomose de *Phytophthora* spp. na Ilha dos Açores em 1842 com seu controle mediante porta-enxertos resistentes (CHAPOT, 1975; POMPEU JUNIOR, 2005).

No Brasil, o uso de plantas enxertadas teve início com o avanço comercial da citricultura no início do século XX, sendo a laranjeira 'Caipira' [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] o único porta-enxerto utilizado até então, que logo foi substituída pela laranjeira 'Azeda' (*C. aurantium* L.) por possuir baixa resistência à seca e à gomose de *Phytophthora* spp.. No entanto, em função do surgimento da tristeza dos citros (*Citrus tristeza virus*, CTV), esta foi substituída devido à sua suscetibilidade a essa doença, dessa vez pelo limoeiro 'Cravo' (*C. limonia* Osbeck) (CHAPOT, 1975; POMPEU JUNIOR, 2005).

O porta-enxerto induz alterações à copa em diversas características, tais como crescimento, precocidade, produção, maturação e massa dos frutos, aspectos físico-químicos dos frutos e do suco, teor de açúcares e de ácidos e sua conservação pós-colheita, além de tolerância à salinidade, à seca, ao frio, a doenças e pragas, entre outros atributos. Desse modo, o uso dos porta-enxertos permitiu a superação tanto de fatores abióticos como bióticos, obtendo assim ganhos de produtividade (POMPEU JUNIOR, 2005).

A utilização generalizada de um mesmo porta-enxerto para todas as cultivares copas provavelmente não atenderá às características peculiares de cada uma delas, impedindo que a planta manifeste todo o seu potencial produtivo, mesmo recebendo os tratamentos culturais adequados (POMPEU JUNIOR et al., 2002). Assim, tanto a citricultura brasileira como mundial estão em busca de novos porta-enxertos, notadamente híbridos, com a finalidade de inserir novos materiais aos programas de melhoramento (SCHINOR et al., 2013; SCHINOR et al., 2015; RAMOS, et al., 2015; RODRIGUES et al., 2015; BOWMAN et al., 2016b).

Constituindo uma nova geração de porta-enxertos híbridos, os citrandarins apresentam características de interesse, tais como menor suscetibilidade ao declínio, imunidade à tristeza e a nematoides dos citros, grande resistência à

gomose de *Phytophthora* spp. e, em alguns casos, efeito ananicante. São resultantes do cruzamento entre tangerineiras como a 'Sunki' [*Citrus sunki* (Hayata) hort. Ex Tan.], 'Cleópatra' (*C. reshni* hort. ex Tanaka) e *C. reticulata* Blanco com trifoliata [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.]. Além disso, surgem como alternativa para serem utilizados como porta-enxerto para a laranjeira 'Pera' (*C. sinensis*), visto que o citrumelo 'Swingle' [*C. paradisi* Macfad. x *P. trifoliata*] apresenta incompatibilidade com essa variedade copa (BLUMER; POMPEU JUNIOR, 2005; SCHINOR et al., 2013; POMPEU JUNIOR; BLUMER, 2014).

Os citrandarins são avaliados em diversos países. No Brasil, para o uso no Estado de São Paulo, foram selecionados os citrandarins 'Changsha' x 'English' Small e 'Sunki' x 'Benecke' (POMPEU JUNIOR et al., 2002). Alguns experimentos têm sido realizados, em que o uso de citrandarins tem conferido maior produtividade de frutos e sólidos solúveis por planta, precocidade na produção e, além disso, plantas enxertadas nesses porta-enxertos não apresentaram sintomas de tristeza e declínio (BLUMER; POMPEU JUNIOR, 2005; POMPEU JUNIOR; BLUMER, 2009; POMPEU JUNIOR; BLUMER, 2014).

Outros porta-enxertos híbridos têm sido avaliados e apresentaram resultados promissores, com potencial para uso comercial no futuro. Estudos realizados em São Paulo mostraram que os híbridos TSKC x (LCR x TR) - 059 e LCR x TR - 001 induzem às plantas alta produtividade e alta tolerância à seca, além de precocidade de produção e redução do volume da copa. O híbrido TSKC x CTSW - 041 associou alta eficiência produtiva e efeito ananicante quando comparado com porta-enxertos tradicionais tais como o limoeiro 'Cravo' (RAMOS et al., 2015).

Principais variedades comerciais de porta-enxertos no Brasil

A partir da década de 1960, o limoeiro 'Cravo' (*C. limonia* Osbeck) passou a ser praticamente o único porta-enxerto utilizado na citricultura paulista, tornando-se o preferido pelos citricultores e viveiristas, pois, além de proporcionar tolerância ao CTV, ainda apresentava características notáveis, tais como facilidade de formação das mudas, compatibilidade com todas as copas, produção precoce, alta produtividade de frutos de boa qualidade e grande resistência à seca (POMPEU JUNIOR, 2001).

Suscetível à exocorte dos citros, doença causada pelo viróide da exocorte (CEVd), o limoeiro 'Cravo' continuou a ser utilizado graças à adoção dos clones nucelares ou clones novos. Uma vez que a exocorte não é transmitida por vetores, apenas por borbulhas infectadas, o emprego de clones nucelares a partir de sementes poliembriônicas permitiu a formação de uma nova planta sadia idêntica à planta mãe, o que posteriormente possibilitou manter o uso deste porta-enxerto no pomares (MOREIRA, 1954; 1955).

Há diversas seleções do limoeiro 'Cravo' semelhantes quanto às características de crescimento, vigor e produção das plantas, mas que diferem no formato dos frutos, coloração e aderência da casca, acidez e aroma do suco. Uma seleção do limoeiro 'Cravo' obtida por mutação natural de gema foi selecionada pela Embrapa Mandioca e Fruticultura e denominada de limoeiro 'Cravo Santa Cruz': apresenta média de 16,8 sementes por fruto, 60,9% de sementes poliembriônicas e 1,9 embriões por semente (SOARES FILHO et al., 1999; POMPEU JUNIOR, 2005).

O declínio dos citros começou a afetar plantas enxertadas sobre o limoeiro 'Cravo' a partir da década de 1970 e provocou uma pequena diversificação dos porta-enxertos, destacando-se a tangerineira 'Cleópatra' seguida da tangerineira 'Sunki' e, a partir do início da década de 1990, pelo citrumelo 'Swingle'. Entretanto, o limoeiro 'Cravo' ainda predominava nos novos plantios, até sofrer uma baixa a partir do ano de 1999, com o surgimento da MSC, afetando laranjeiras e tangerineiras enxertadas nesse porta-enxerto (RODRIGUEZ, 1979; GIMENES-FERNANDES; BASSANEZI, 2001).

Em 1907, o citrumelo 'Swingle' foi produzido nos Estados Unidos pelo pesquisador Walter Swingle, e vem sendo avaliado no Brasil pelo IAC desde sua introdução em 1948. Passou a ser mais utilizado a partir da década de 1980, motivado pela tolerância ao declínio e resistência à gomose. Desde 1988, ele surge nas estatísticas participando de boa parte dos plantios de citros no Estado de São Paulo como um dos mais utilizados, sobretudo por apresentar tolerância à MSC. É um material que possui plântulas capazes de gerar mudas uniformes e vigorosas, variando de 85 a 95% de poliembrionia. Suas principais limitações são a menor resistência à seca que os limoeiros 'Cravo' e 'Volkameriano', baixa adaptação a solos alcalinos e a incompatibilidade com a laranjeira 'Pera', tangor 'Murcott' [C.

reticulata Blanco x *C. sinensis* (L.) Osbeck] e limoeiros [*C. limon* (L.) Burm. f.] cv. Siciliano e Eureka (HUTCHISON, 1974; POMPEU JUNIOR, 2005).

Com origem na China, a tangerineira ‘Sunki’ passou a ter emprego no Brasil em 1985, estimulado pela sua resistência ao declínio dos citros e por induzir produções de frutos geralmente superiores às proporcionadas pela tangerineira ‘Cleópatra’. A constatação de que as plantas enxertadas nesse porta-enxerto não são afetadas pela MSC fez com que sua presença nos viveiros aumentasse significativamente na última década, sendo entretanto intolerante ao exocorte e suscetível a gomose de *Phytophthora* spp., a seca e ao frio (POMPEU JUNIOR, 2005; POMPEU JUNIOR et al., 2008).

A tangerineira ‘Sunki Tropical’ é uma seleção da tangerineira ‘Sunki’ que foi produzida pelo programa de melhoramento genético de citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Apresenta bom comportamento agrônômico, principalmente em função de seu elevado número médio de sementes por fruto e maior uniformidade de *seedlings*, decorrente da poliembrião próxima a 100% (SOARES FILHO et al., 2002).

Tendo em vista que todas as variedades de porta-enxertos de citros são afetadas pelo HLB (BOVÉ; AYRES, 2007), há a perspectiva da aplicação de tecnologias de manejo de porta-enxertos com o objetivo de minimizar os impactos causados pela doença. A utilização de porta-enxertos que apresentem porte ananicante surge como uma alternativa ao manejo do HLB, visto que estes porta-enxertos induzem o tamanho reduzido da copa das plantas, o que irá refletir nas práticas culturais de colheita, aplicação de defensivos, além da redução do vigor de brotações e, ainda, no melhor monitoramento dos sintomas do HLB em plantas no campo (STUCHI; GIRARDI, 2010).

O trifoliata [*P. trifoliata* (L.) Raf.] é considerado um porta-enxerto com potencial ananicante que pode se expressar com maior ou menor intensidade, dependendo das condições edafoclimáticas, da variedade copa, presença de viroses e uso da irrigação. As principais limitações do uso do trifoliata e diversos dos seus híbridos são a suscetibilidade ao declínio dos citros e a incompatibilidade com a laranjeira ‘Pera’ e o tangor ‘Murcott’. O trifoliata ‘Flying Dragon’ (*P. trifoliata* var *monstrosa*), uma mutação natural do trifoliata originada no Japão, é considerado um porta-enxerto realmente ananicante, porque possibilita a formação de plantas de

altura inferior a 2,5 m. O trifoliata 'Flying Dragon' confere maior produtividade de frutos por volume de copa, apesar da menor produção por planta, além de facilitar a colheita dos frutos (POMPEU JUNIOR, 2005; STUCHI et al., 2012).

Assim, a indução de baixo vigor à variedade copa associada à menor frequência de emissão de brotações causada pelo uso de porta-enxertos ananizantes, pode se tornar um fator adicional no manejo do HLB, uma vez que diminuirá mesmo que indiretamente a oferta de alimento ao psílídeo vetor da doença, que ataca preferivelmente os brotos mais novos. Além disso, a utilização de porta-enxertos ananizantes ainda promove a adoção de plantios adensados, o que pode ser mais uma alternativa ao manejo do HLB principalmente pelo fato de compensar a redução da população de plantas do pomar devido à erradicação de plantas doentes (STUCHI et al., 2012).

Reação de porta-enxertos ao HLB

Ainda que todas as plantas de citros sejam suscetíveis à proliferação de Las, os diferentes hospedeiros respondem de maneiras distintas à inoculação da bactéria. Plantas de pé-franco de trifoliata e de seus híbridos têm apresentado resultados diferenciados em resposta à inoculação de Las, tal como o citrange 'Carrizo' [*C. sinensis* (L.) Osbeck x *P. trifoliata*], que apresentou baixo título bacteriano em seus tecidos e ausência ou pouca expressão de sintomas foliares, sendo desta forma classificado como mais tolerante ao HLB em comparação com porta-enxertos tradicionais como citrumelo 'Swingle' e tangerineira 'Cleópatra' (FOLIMONOVA et al., 2009).

Baixa concentração de Las nos tecidos foliares e ausência de sintomas foram evidenciadas mais uma vez no citrange 'Carrizo', que apresentou crescimento com aspecto assintomático em plantas inoculadas. Ainda, outros híbridos de trifoliata testados, tais como US-897 (*C. reticulata* 'Cleopatra' x *P. trifoliata* 'Flying Dragon') e US-942 (*C. reticulata* 'Sunki' x *P. trifoliata* 'Flying Dragon'), também mostraram ausência ou pequena expressão dos sintomas, além da reduzida concentração da bactéria nos tecidos foliares (ALBRECHT; BOWMAN, 2012).

Albrecht et al. (2012) obtiveram resultados semelhantes ao avaliarem a disseminação natural do HLB por *D. citri* em condições de campo. Todos os quinze porta-enxertos analisados no decorrer de nove anos, enxertados com laranja

'Valência' e/ou 'Early Gold', foram afetados pela doença. Entretanto, os híbridos US-897 e US-812 (*C. reticulata* 'Sunki' × *P. trifoliata* 'Benecke') obtiveram as maiores médias do teor total de sólidos solúveis totais, sendo que o primeiro ainda foi o que apresentou menor expressão de sintomas nas folhas.

A influência de porta-enxertos também tem sido monitorada em pomares infectados por Las, nos quais híbridos de trifoliata se mostraram promissores quanto à produtividade e qualidade dos frutos frente a porta-enxertos tradicionais. Cinco porta-enxertos híbridos de trifoliata enxertados com laranja 'Hamlin' (*C. sinensis*) foram avaliados durante seis safras, exprimindo maior produtividade de maneira significativa comparada ao citrumelo 'Swingle' e ao trifoliata 'Flying Dragon', do mesmo modo que o peso do fruto; no entanto, não diferiram quanto ao teor de sólidos solúveis totais (BOWMAN; McCOLLUM, 2015). A avaliação se repetiu com alguns dos mesmos materiais enxertados com laranja 'Valência', que novamente superaram de modo relevante a produtividade de porta-enxertos comerciais, tais como a tangerineira 'Cleópatra' e o citrange 'Carrizo', bem como na menor titulação de Las nos tecidos foliares afetados (BOWMAN et al., 2016a).

Outras espécies próximas ao gênero *Citrus* spp., que também pertencem à família Rutáceas, têm sido avaliadas quanto ao HLB em testes de resistência e tolerância. Os gêneros *Eremocitrus* e *Microcitrus*, sexualmente e fisiologicamente compatíveis com citros, foram classificados como resistente e tolerante, respectivamente, com baixo título bacteriano mesmo seis anos depois de inoculados com Las, da mesma maneira a sapota branca (*Casimiroa edulis* La Llave & Lex) e a *curry leaf* (*Berberis koenigii* L.). Em *pink wampee* (*Clausena excavata* Burm. f.) e *orange berry* [*Glycosmis pentaphylla* (Retz.) DC], Las nunca foi detectada em seis anos de testes, recebendo a classificação de imunes à bactéria (RADAMAGU et al., 2016).

Além da expressão dos sintomas foliares, a perda de fitomassa do sistema radicular ocasionada pela colonização de Las também pode explicar a razão da anomalia na planta, resultado em queda prematura de frutos e folhas, mesmo em pomares irrigados. Avaliações conduzidas na Flórida, EUA, apontaram perdas significativas de ~37% em plantas sintomáticas de laranja 'Hamlin' e 'Valência' de três e quatro anos de idade, respectivamente, enxertadas em citrumelo 'Swingle' em comparação com plantas visualmente sadias (GRAHAM et al., 2013). Pesquisas

indicam que o sistema radicular é colonizado e sofre perda da fitomassa antes mesmo dos sintomas foliares se expressarem. Plantas sintomáticas com oito anos de idade de laranjeira ‘Valência’ enxertadas em citrumelo ‘Swingle’ apresentaram 26% a menos de fitomassa seca do sistema radicular em relação a plantas assintomáticas (JOHNSON et al., 2014).

É importante ressaltar também a influência das combinações copa e porta-enxerto, que podem se comportar de maneira específica em relação ao HLB. Variedades copa quando enxertadas em porta-enxertos classificados como tolerantes podem apresentar produção e aparência dos frutos normais em relação a plantas assintomáticas. Em pesquisa realizada na Flórida, foi avaliada uma seleção de toranja [*Citrus grandis* (L.) Osbeck], ‘red’ grapefruit, testada em oito diferentes porta-enxertos em uma região infectada por HLB. Essa variedade copa não apresentou sintomas típicos do HLB quando enxertada em um porta-enxerto híbrido somático específico, sendo que manifestou sintomas quando avaliada nos demais porta-enxertos, indicando que os mesmos podem ter diferentes comportamentos em relação à variedade copa neles enxertada (CASTLE et al., 2015).

Contudo, diferentes isolados de Las podem causar diferentes sintomas e severidade da doença em cultivares de citros, conforme os estudos de Tsai et al. (2008), ao avaliar a inoculação de diferentes hospedeiros de citros com Las. Essa resultou em diferenças significativas entre os vários isolados na sua capacidade para induzir a doença em cultivares como limoeiro ‘Eureka’ e toranjeira, que vão desde a ausência de bactérias e de sintomas até altas concentrações de bactérias e desenvolvimento de sintomas graves.

A taxa de evolução e severidade dos sintomas é influenciada pela variedade e idade da planta, concentração bacteriana e condições climáticas, principalmente a temperatura (BOVÉ, 2006). Portanto, muitas vezes se torna difícil a identificação dos sintomas do HLB, que também podem ser confundidos com ataque de pragas e doenças, danos mecânicos e principalmente deficiência mineral, fazendo-se necessário a elaboração de uma escala de severidade com sintomas característicos para a melhor diagnose da doença (MENDONÇA, 2015).

Visto que a expressão dos sintomas do HLB varia com o hospedeiro e muitas vezes podem ser confundidas com sintomas de deficiências nutricionais, a diagnose molecular tem sido a ferramenta mais eficiente para a detecção da bactéria na

planta (LI et al., 2006). Métodos de PCR (reação em cadeia da polimerase) convencional com *primers* específicos que amplificam a sequência 16S rDNA, que é única para cada bactéria, tem sido utilizados para a identificação de Las, Laf e Lam (JAGOUEIX et al., 1996; TEIXEIRA et al., 2005a).

Atualmente, o PCR quantitativo (qPCR) ganhou mais aceitação nos laboratórios de diagnose molecular por ser um método mais sensível, veloz, de maior reprodutibilidade e com menor risco de contaminação (MACKAY et al., 2002). É um método baseado na emissão de fluorescência, quando ocorre acúmulo suficiente do DNA alvo é acusado o *Cycle Threshold* (Ct), que é o ciclo em que a fluorescência ocorre quando a maior quantidade do DNA alvo é detectada (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004). Esse valor de Ct é transformado para número de genomas de Las por grama de tecido extraído, convertido em logaritmo, que é estimada com base em uma curva padrão construída a partir da diluição seriada do DNA alvo colocado em um plasmídeo (LOPES et al., 2013).

Variedades de copa

Os grupos cítricos mais utilizados como variedades de copa em plantios comerciais são as laranjas, tangerinas, limões, limas ácidas e pomelos, sendo que este último não apresenta tanta expressividade quando comparado aos anteriores no Brasil. A laranjeira doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] é o grupo que possui maior destaque entre todos os mencionados, sendo a variedade de copa mais predominante nos países produtores (PIO et al., 2005).

A laranjeira 'Pera' é a principal variedade de citros do Brasil, por possuir frutos em meia-estação de excelente qualidade que atendem os mercados interno e externo de fruta fresca e à industrialização. Já participou de cerca de 50% de plantas em pomares e viveiros. Mesmo tendo esse índice reduzido, ainda representa 34% da área plantada no cinturão citrícola paulista e triângulo/sudoeste mineiro (FIGUEIREDO, 1991; POMPEU JUNIOR, 2001; PIO et al., 2005; FUNDECITRUS, 2016).

A laranjeira 'Valência' é uma variedade que possui boa preferência entre os produtores, principalmente pela boa produtividade e pelo tamanho adequado dos frutos. Possui maturação tardia e produz frutos que se prestam aos três tipos de comercialização disponíveis: exportação de fruta fresca, mercado interno e suco

processado, e é compatível com todas as variedades comerciais de porta-enxertos usadas no Brasil. É a segunda variedade mais plantada em toda área do cinturão citrícola paulista e triângulo/sudoeste, representando 29% da área total (FIGUEIREDO, 1991; POMPEU JUNIOR, 2001; FUNDECITRUS, 2016).

Originária do Rio de Janeiro como mutação de gema de 'Valência' ou de 'Natal', a variedade 'Folha Murcha' possui a característica marcante de apresentar as folhas enroladas ou retorcidas, o que lhe dá o nome, pois parece estar sentindo a falta de água. Apresenta maturação muito tardia e é possivelmente mais resistente à seca, sendo ainda uma das mais tolerantes à bactéria do cancro cítrico, mas apresenta suscetibilidade à CVC. Ocupa pouco mais de 4% da área total plantada do cinturão citrícola paulista e triângulo/sudoeste mineiro (DONADIO et al., 1995; LARANJEIRA; POMPEU JUNIOR, 2002; PIO et al., 2005).

Entre outras variedades copa de importância econômica no Brasil, podemos citar a laranjeira 'Hamlin', que com área plantada de 12%, ocupa a terceira posição como a variedade de laranja mais plantada do cinturão citrícola paulista e triângulo/sudoeste mineiro. É uma variedade de maturação precoce e as plantas são muito produtivas. Seus frutos se destinam, principalmente, ao mercado externo e à industrialização (FIGUEIREDO, 1991; PIO et al., 2005; FUNDECITRUS, 2016).

A laranjeira 'Natal' sempre foi muito utilizada nos pomares citrícolas brasileiros por possuir frutos que apresentam excelente qualidade para consumo como fruta fresca e também para industrialização. Ocupa o quarto lugar como variedade de laranja mais plantada do cinturão citrícola paulista e triângulo/sudoeste mineiro, atingindo 11% da área total, produzindo frutos de maturação tardia (FIGUEIREDO, 1991; PIO et al., 2005; FUNDECITRUS, 2016).

A 'Westin' é uma variedade altamente produtiva com frutos com poucas sementes. Apresenta maturação de meia-estação, cujos frutos se prestam muito bem para os mercados interno e externo de fruta fresca e para industrialização. O plantio dessa variedade sofreu uma redução com o aumento do interesse por outras copas, entre elas a 'Pera'. Ainda apresenta o inconveniente de seus frutos permanecerem pouco tempo na planta, após a completa maturação (PIO et al., 2005). Por fim, a laranjeira 'Rubi', que também possui frutos cuja maturação ocorre no período chamado meia-estação, destina-se ao mercado interno de fruta fresca e

à industrialização, e caracterizados pela coloração mais intensa da polpa (PIO et al., 2005).

Todas as variedades de copa de laranjeira doce são afetadas pelo HLB, tendo a qualidade dos frutos comprometida pela incidência da doença. Os frutos sintomáticos para o HLB apresentam menor tamanho, massa e diâmetro em relação a frutos assintomáticos. Também possuem redução significativa no rendimento de suco e quantidade de sólidos solúveis totais, com aumento no teor de acidez total (BASSANEZI et al., 2009).

Dinâmica das brotações em citros

Os porta-enxertos podem interferir em várias características da copa, incluindo aquelas relacionadas com maior resistência ou tolerância a patógenos. Podem também afetar a disseminação dos patógenos ao interferir nas brotações, fazendo com que fiquem mais ou menos atrativas aos insetos vetores, sendo que a detecção e quantificação do vetor têm sido feitas por meio de monitoramento, mediante o uso de cartões adesivos (armadilhas) ou inspeção visual de brotações. Esse monitoramento pode ser realizado simultaneamente com o monitoramento de outras pragas. Maiores populações de *D. citri* geralmente ocorrem nos períodos em que as plantas apresentam brotações novas (YAMAMOTO et al., 2001; PAIVA, 2009).

Dessa maneira, se torna cada vez mais necessária na citricultura a frequente inspeção de insetos que se alimentam de brotações novas, pelo aumento da ocorrência de doenças disseminadas por vetores, sejam pulgões, cigarrinhas ou até mesmo a larva minadora do citros (*Phyllocnistis citrella* Stainton), que tem favorecido a infecção de brotos e tecidos jovens pela bactéria do cancro cítrico e, conseqüentemente, intensificado os sintomas da doença (GRAHAM et al., 2004).

Do mesmo modo, o psíldeo vetor do HLB também tem nas brotações novas os pontos preferidos para alimentação e multiplicação. Assim, a verificação de picos de brotações novas é imprescindível para se iniciar o controle desses vetores que, conseqüentemente, acarretará numa melhor eficiência de inspeção e controle da doença (HALBERT; MANJUNATH, 2004; HALL; ALBRIGO, 2007).

A maior concentração populacional de *D. citri* ocorre no final da primavera e no início do verão, sendo que a distribuição espacial do inseto é do tipo agregada, com

picos justamente nessas estações do ano, acompanhando o período de maior emissão de novos brotos. A diminuição populacional do inseto decresce nos meses de outono e inverno, quando a planta está em repouso vegetativo e o fluxo de brotações é reduzido (YAMAMOTO et al., 2001; HALL; ALBRIGO, 2007; COSTA et al., 2010).

Logo, o monitoramento para identificar os períodos com maior emissão de brotações é um mecanismo que auxilia o manejo das culturas, definindo melhores épocas de aplicação de defensivos contra pragas e vetores de doenças. A amostragem pode ser realizada tomando como parâmetro o número médio de brotos de cada planta que representam uma população, ou ainda os brotos que predominam na planta, nas diferentes épocas do ano (HALL; ALBRIGO, 2007; GARIERI, 2016).

Em vista disso, a elaboração de métodos de amostragem de brotações torna-se uma ferramenta importante para que produtores possam inspecionar o pomar e identificar o momento mais apropriado para aplicação de inseticidas, dando preferência justamente às épocas com maior emissão de fluxos vegetativos. Isso também dependerá da estação do ano, uma vez que o clima influencia proeminentemente na emissão desses fluxos, e provavelmente o número de plantas amostradas variará de acordo com a época do ano (HALL; ALBRIGO, 2007).

No entanto, a amostragem de brotações é uma atividade muito penosa, fazendo-se necessária a determinação do número mínimo de plantas a serem amostradas para facilitar a avaliação por parte do produtor, que poderá inclusive ser variável de acordo com o genótipo estudado. Assim, com o objetivo de estimar a quantidade relativa de brotos em uma planta cítrica e, por conseguinte, estabelecer o número mínimo de plantas amostradas, Hall e Albrigo (2007) avaliaram semanalmente as brotações vegetativas emitidas em plantas de pomelo (*Citrus paradise* Macf.) enxertadas em tangerineira 'Sun Chu Sha' (*Citrus reticulata* Blanco) e tangor 'Temple' [*C. reticulata* Blanco x *C. sinensis* (L.) Osbeck] enxertadas em tangerineira 'Cleópatra', amostrando 45 árvores de cada combinação, escolhidas aleatoriamente no talhão durante um ano. Os autores recomendaram, para uma área de um hectare, 25 plantas para a tomada de duas amostras de brotos por árvore e 40 plantas para a tomada de uma amostra de brotação (HALL; ALBRIGO, 2007).

O crescimento vegetativo dos citros é muito sensível aos fatores do ambiente (e.g. temperatura, umidade, luz, concentração de gás carbônico, nutrição etc), com acentuada influência da temperatura e umidade, bem como fatores endógenos (e.g. hormônios, carboidratos e aminoácidos). Os citros têm, geneticamente, certo potencial de crescimento que se expressa, dependendo das condições do ambiente, sob a forma de vários e bem definidos fluxos, durante o ano. Normalmente, ocorrem em dois surtos anuais bem definidos nas regiões de clima frio, variando de três a cinco nas regiões mais quentes de clima tropical e subtropical. Fotoperíodos médios mais longos, típicos das regiões tropicais, reduzem o período entre as brotações (DAVIES; ALBRIGO, 1994).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIANUAL: Anuário da agricultura brasileira. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio, 2016. 456p.

ALBRECHT, U.; BOWMAN, K.D. Tolerance of trifoliate citrus rootstock hybrids to *Candidatus Liberibacter asiaticus*. **Scientia Horticulturae**, v. 147, p. 71-80, 2012.

ALBRECHT, U.; MCCOLLUM, G.; BOWMAN, K.D. Influence of rootstock variety on huanglongbing disease development in field-grown sweet orange (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck) trees. **Scientia Horticulturae**, v. 138, p. 210-220, 2012.

AUBERT, B. *Trioza erytrae* Del Guercio and *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae), the two vectors of citrus greening disease: biological aspects and possible control strategies. **Fruits**, Paris, v.42, p.149-62, 1987.

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**, v. 125, p. 565-572, 2009.

BASSANEZI, R.B.; LOPES, S.A.; BELASQUE JÚNIOR, 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. **Revista Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v.31, p.11-23, 2010.

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

BELASQUE JÚNIOR, J.; BASSANEZI, R.B.; YAMAMOTO, P.T.; AYRES, A.J.; TACHILBANA, A.; VIOLANTE, A.R.; TANK, A. JR.; DI GIORGI, F.; TERSI, E.E.A.; MENEZES, G.M.; DRAGONE, J.; JANK, R.H.JR., BOVÉ, J.M. Lessons from huanglongbing management in São Paulo State, Brazil. **Journal of Plant Pathology**, v.92, p. 285-302, 2010.

BLUMER, S.; POMPEU JUNIOR, J. Avaliação de citrandarins e outros híbridos de trifoliata como porta-enxertos para citros em São Paulo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.27, p.264-267, 2005.

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

BOVÉ, J.M.; AYRES, A. J. Etiology of three recent diseases of citrus in Sao Paulo State: sudden death, variegated chlorosis and huanglongbing. **IUBMB Life**, v. 59, p. 346–354, 2007.

BOVÉ, J.M. et al. Huanglongbing and the future of citrus in São Paulo State, Brazil. **Journal of Plant Pathology**, v. 94, p. 465-467, 2012.

BOVÉ, J.M. Huanglongbing or yellow shoot, a disease of Gondwanan origin: Will it destroy citrus worldwide? **Phytoparasitica**, v. 42, p. 579-583, 2014.

BOVÉ, J.M. Half a century on huanglongbing: learning about the disease, trying to control it. **Journal of Citrus Pathology**, v. 2, 2015.

BOWMAN, K.D.; MCCOLLUM, G. Five new citrus rootstocks with improved tolerance to huanglongbing. **HortScience**, v. 50, p. 1731-1734, 2015.

BOWMAN, K.D.; MCCOLLUM, G.; ALBRECHT, U. Performance of 'Valencia' Orange (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck) on 17 rootstocks in a trial severely affected by huanglongbing. **Scientia Horticulturae**, v. 201, p. 355-361, 2016a.

BOWMAN, K. D.; FAULKNER, L.; KESINGER, M. New Citrus Rootstocks Released by USDA 2001–2010: Field Performance and Nursery Characteristics. **HortScience**, v. 51, p. 1208-1214, 2016b.

CASTLE, W.S.; GROSSER, J.; BOWMAN, K.D.; STOVER, E. An HLB-tolerant citrus rootstock: What exactly does that mean? **Citrus Industry**, 16–19, 2015.

CHAPOT, H. **The Citrus plant**. Basle: Ciba-Geigy Agrochemicals Ltd, p.6-13, 1975.

COLETTA-FILHO, H.D.; TARGON, M.L.P.N.; TAKITA, M.A.; DE NEGRI, J.D.; POMPEU, J.R.; CARVALHO, S.A.; MACHADO, M.A. First report of the causal agent of huanglongbing (*Candidatus Liberibacter asiaticus*) in Brazil. **Plant Disease**, v. 88, p. 1382, 2004.

COSTA LIMA, A.M. **Insetos do Brasil: homopteros**. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Agronomia, 327p, 1942.

COSTA, M.; BARBOSA, J.; YAMAMOTO, P.; LEAL, R. Spatial distribution of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) in citrus orchards. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 67, p. 546–554, 2010.

DAVIES, F.S.; ALBRIGO, L.G. **Citrus**. Wallingford: Cab International, 254p, 1994.

DONADIO, L.C.; FIGUEIREDO, J.O.; PIO, R.M. **Variedades cítricas brasileiras**. Jaboticabal: Funep, 228p, 1995.

ETXEBERRIA, E.; GONZALEZ, P.; ACHOR, D.; ALBRIGO, G. Anatomical distribution of abnormally high levels of starch in HLB-affected 'Valencia' orange trees. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 74, p. 76-83, 2009.

EPPO. <https://gd.eppo.int/taxon/DIAACI/distribution>/<https://gd.eppo.int/taxon/TRIZER/distribution> Acesso em: 08 de outubro de 2016.

FAO. <http://faostat.org.br> Acesso em: 15 de fevereiro de 2016.

FIGUEIREDO, J.O. Variedades copas. **Citricultura brasileira**. Campinas: Fundação Cargill, p.228-57, 1991.

FOLIMONOVA, S. Y.; ROBERTSON, C. J.; GARNSEY, C. S.; GOWDA, S.; DAWSON, W.O. Examination of the responses of different genotypes of citrus to huanglongbing (citrus greening) under different conditions. **Phytopathology**, v. 99, p. 1346-1354, 2009.

FUNDECITRUS. **Inventário de árvores do cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro – Retrato dos pomares em março/2016 - n.1 – 2016**. Fundo de Defesa da Citricultura. Disponível em: <<https://www.fundecitrus.com.br/pes/inventario>>. Acesso em: 29 de setembro de 2016.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BATISTA, 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. **Manual de Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 920p, 2002.

GARIERI, D. S. **Influência de porta-enxertos na intensidade, frequência e distribuição de brotações em laranjeira Natal**. 40 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Controle de Doenças e Pragas dos Citros) – Fundecitrus. Araraquara, 2016.

GARNIER, M.; DANIEL, N.; BOVÉ, J.M. The greening organism is a Gram negative bacterium. **Proceedings of 9th Conference of International Organization of Citrus Virologists**, Riverside, p. 115-124, 1984.

GIMENES-FERNANDES, N.; BASSANEZI, R.B. Doença de causa desconhecida afeta pomares cítricos no norte de São Paulo e sul do Triângulo Mineiro. **Summa Phytopathologica**, v.27, p.93, 2001.

GOTTWALD, T.R.; DA GRAÇA, J.V.; BASSANEZI, R.B. Citrus huanglongbing: the pathogen and its impact. **Plant Health Progress**, v.6, p. 1-18, 2007.

GOTTWALD, T. R.; IREY, M.; GAST, T. The plantation edge effect of HLB: a geostatistical analysis. **Proceedings of the International Research Conference on Huanglongbing**, Orlando, p. 305-308, 2008.

GOTTWALD, T.R. Current epidemiological understanding of citrus huanglongbing. **Annual Review Phytopathology** v.48, p. 119–139, 2010.

GÓMEZ TORRES, M.L. **Estudos biológicos de *Tamarixia radiata* (Waterston, 1922) (Hymenoptera: Eulophidae) para o controle de *Diaphorina citri* Kuwayama, 1907 (Hemiptera: Psyllidae)**. Tese de doutorado – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 138p. 2009.

GRAHAM, J.H.; GOTTWALD, T.R.; CUBERO, J.; ACHOR, D.S. *Xanthomonas axonopodis* pv. citri: Factors affecting successful eradication of citrus canker. **Plant Pathology**, v. 5, p. 1–15, 2004.

GRAHAM, J.H.; JOHNSON, E.G.; GOTTWALD, T.R.; IREY, M.R. Presymptomatic fibrous root decline in citrus trees caused by huanglongbing and potential interaction with *Phytophthora* spp. **Plant Disease**, v. 97, p. 1195–1199, 2013.

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

HALBERT, S.E. The discovery of huanglongbing in Florida. **Proceedings of 2nd International Citrus Canker and Huanglongbing Research Workshop**. Orlando, p. 50, 2005.

HALL, D.G.; ALBRIGO, L.G. Estimating the Relative Abundance of Flush Shoots in Citrus with Implications on Monitoring Insects Associated with Flush. **HortScience**, v. 42, p. 364-368, 2007.

HALL, D. G. Biology, history and world status of *Diaphorina citri*. In:**Proceedings of the International Workshop on Huanglongbing and Asian Citrus Psyllid**. Orlando, p. 1-11. 2008.

HASSE, G. **A laranja no Brasil 1500-1987**. São Paulo: Edição de Duprat; lobe Propaganda, 296p, 1987.

HUNG, T. H.; HUNG, S. C.; CHEN, C. N.; HSU, M. H.; SU, H. J. Detection by PCR of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the bacterium causing citrus huanglongbing in vector psyllids: application to the study of vector–pathogen relationships. **Plant Pathology**. 53: 96–102; 2004.

HUTCHISON, D.J. Swingle citrumelo-a promising rootstock hybrid. In:**Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Lake Alfred, p. 89-91, 1974.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Disponível em <http://www.sidra.ibge.gov.br/> Acesso em 29 de setembro de 2016.

JAGOUEIX, S.; BOVÉ, J.M.; GARNIER, M. The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the alpha subdivision of the Proteobacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 44, p. 379-386, 1994.

JAGOUEIX, S.; BOVÉ, J.M.; GARNIER, M. PCR detection of the two *Candidatus* Liberibacter species associated with greening disease of citrus. **Molecular and cellular probes**, v. 10, p. 43– 50, 1996.

JOHNSON, E.G.; WU, J.; BRIGHT, D.B.; GRAHAM, J.H. Association of *Candidatus* Liberibacter asiaticus root infection, but not phloem plugging with root loss on huanglongbing-affected trees prior to appearance of foliar symptoms. **Plant Pathology**, v. 63, p. 290-298, 2014.

KIM, J.S.; SAGARAM, U.S.; BURNS, J.K.; LI, J.L.; WANG, N. Response of sweet orange (*Citrus sinensis*) to *Candidatus* Liberibacter asiaticus infection: microscopy and microarray analyses. **Phytopathology**, v. 99, p. 50-57, 2009.

LARANJEIRA, F.F.; POMPEU JUNIOR, J. Comportamento de quinze cultivares de laranja-doce afetadas pela clorose variegada dos citros. **Laranja**, v.23, p.401-411, 2002.

LARANJEIRA, F.F.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; COLLETA FILHO, H.D.; Fungos, procariotos e doenças abióticas. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico de Campinas; Fundag. Cap. 18, p. 509-566, 2005.

LOPES, S. A., FRARE, G. F. Graft transmission and cultivar reaction of citrus to *Candidatus* Liberibacter americanus. **Plant Disease**, v. 92, p. 21-24, 2008.

LOPES, S.A.; FRARE, G.F.; BERTOLINI, E.; CAMBRA, M.; FERNANDES, N. G.; AYRES, A.J.; MARIN, D.R.; BOVÉ, J.M. Liberibacters associated with citrus huanglongbing in Brazil: *Candidatus* Liberibacter asiaticus is heat tolerant, *Ca. L. americanus* is heat sensitive. **Plant Disease**, v. 93, 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 *Ca. Liberibacter asiaticus* in citrus plants. **Phytopathology** v. 99, p. 301-306, 2009b.

LOPES, S. A.; LUIZ, F. Q. B. Q.; MARTINS, E. C.; FASSINI, C. G.; BARBOSA, J. C.; BEATTIE, G. A. C. *Candidatus* Liberibacter asiaticus titers in citrus and acquisition rates by *Diaphorina citri* are decreased by higher temperature. **Plant Disease**, v.97, p. 1563-1570, 2013.

MACKAY, I.M.; ARDEN, K.E.; NITSCHKE, A. Real-time PCR in virology. **Nucleic acids research**, v. 30, p. 1292-1305, 2002.

MANN, R. S.; ROUSEFF, R. L.; SMOOT, J. M.; CASTLE, W. S.; STELINSKI, L. L. Sulfur volatiles from *Allium* spp. affect Asian citrus psyllid, *Diaphorina Citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), response to citrus volatiles. **Bulletin of Entomological Research**, v. 101, p. 89–97, 2011.

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**, v. 98, p. 387-396, 2008.

MENDONÇA, W. J. Q. F. **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**. 2015. 45 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Controle de Doenças e Pragas dos Citros) – Fundo de Defesa da Citricultura, Araraquara, 2015.

MOREIRA, S. Exocortis, outra moléstia de vírus nos laranjais paulistas. **O Agrônomo**, v.6, p.10-12, 1954.

MOREIRA, S. A moléstia “exocortes” e o cavalo de limoeiro-cravo. **Revista de Agricultura**, v.30, p.99-112, 1955.

NAVA, D.E.; TORRES, M.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**, v. 131, p. 709–715, 2007.

NEVES, M.F.; TROMBIN, V.G.; MILAN, P.; LOPES, F.F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. **O retrato da citricultura brasileira**. São Paulo: Atlas, 137p, 2010.

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.33, p. 10-13, 2004.

PAIVA, P. E. B. **Distribuição espacial e temporal, inimigos naturais e tabela de vida ecológica de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) em citros em São Paulo**. Tese de doutorado – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 65p. 2009.

PELZ-STELINSKI, K.S.; BRLANSKY, R.H.; EBERT, T.A; ROGERS, M.E. Transmission parameters for *Candidatus liberibacter asiaticus* by asian citrus psyllid (Hemiptera: Psyllidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 103, p. 1531–1541, 2010.

PIO, R.M.; FIGUEIREDO, J.O.; STUCHI, E.S.; CARDOSO, S. A. B. Variedades copas. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Eds.). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônomo de Campinas; Fundag. Cap. 3, p.37-60, 2005.

POMPEU JUNIOR, J. Rootstocks and scions in the citriculture of the São Paulo State. INT. CONG. CITRUS NURSERYMEN, 6. Ribeirão Preto. **Proceedings of International Congress of Citrus Nurserymen**, Ribeirão Preto, v. 6, p.75-82, 2001.

POMPEU JUNIOR, J.; LARANJEIRA, F. F.; BLUMER, S. Laranjeiras 'Valência' enxertadas em híbridos de trifoliata. **Scientia Agricola**, v. 59, p. 93-97, 2002.

POMPEU JUNIOR, J. Porta - enxertos. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JÚNIOR, P. **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico de Campinas; Fundag. Cap. 4, p. 61-104, 2005.

POMPEU JUNIOR, J; BLUMER, S; POMPEU, G. B. Tangerineiras como porta-enxertos para laranjeira 'Pera'. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, p. 1218-1223, 2008.

POMPEU JUNIOR, J; BLUMER, S. Híbridos de trifoliata como porta-enxertos para a laranjeira 'Valência'. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 44, p. 701-705, 2009.

POMPEU JUNIOR, J; BLUMER, S. Híbridos de trifoliata como porta-enxertos para laranjeira 'Pera'. **Pesquisa Agropecuária Tropical (Agricultural Research in the Tropics)**, v. 1, p. 9-14 , 2014.

RAMADUGU, C.; KEREMANE, M. L.; HALBERT, S. E.; DUAN, Y.; ROOSE, M.; STOVER, E.; LEE, R. F. Long term field evaluation reveals HLB resistance in Citrus relatives. **Plant Disease**, v. 100, p. 1858-1869, 2016.

RAMOS, Y.C.; STUCHI, E.S.; GIRARDI, E.A.; LEÃO, H.C.; GESTEIRA, A.S.; PASSOS, O.S.; SOARES FILHO, W.S. Dwarfing rootstocks for 'Valencia' sweet orange. **Acta Horticulturae**, v. 1065, p. 351-354. 2015.

REINKING, O. A. Diseases of economic plants in southern China. **Philippine Agriculturist**, v.8, p.109-135, 1919.

RODRIGUES, M.J.S.; LEDO, C.A.S.; GIRARDI, E.A.; ALMEIDA, L.A. H.; SOARES FILHO, W. S. Caracterização de frutos e propagação de porta-enxertos híbridos de citros em ambiente protegido. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 37, p. 457-470, 2015.

RODRIGUEZ, O. **Declínio de plantas cítricas em São Paulo**. CATI, 1979.

ROGERS, M. E.; STANSLY, P. A.; STELINSKI, L. L. Florida Citrus Pest Management Guide: Asian Citrus Psyllid and Citrus Leafminer. **IFAS Extension Publication**. Gainesville, 2012.

SCHINOR, E. H.; CRISTOFANI-YALY, M.; BASTIANEL, M.; MACHADO, M. A. 'Sunki' Mandarin vs *Poncirus trifoliata* Hybrids as Rootstocks for 'Pera' Sweet Orange. **Journal of Agricultural Science**, v. 5, p. 190, 2013.

SCHINOR, E. H.; DO NASCIMENTO, A. L.; DE BARROS, V. L. N. P.; BASTIANEL, M.; DE AZEVEDO, F. A.; CRISTOFANI-YALY, M. Fruit traits and vegetative growth of citrandarins rootstocks in the nursery. **Citrus Research & Technology**, v. 36, p. 27-35, 2015.

SCORA, R.W. **On the history and origin of Citrus**. Bull. Torrey Bot. Club, v.102. p.369- 375, 1975.

SHIMWELA, M. M.; NAROU EI-KHANDAN, H. A.; HALBERT, S. E.; KEREMANE, M. L.; MINSAVAGE, G. V.; TIMILSINA, S.; VAN BRUGGEN, A. H. First occurrence of *Diaphorina citri* in East Africa, characterization of the *Candidatus Liberibacter* species causing huanglongbing (HLB) in Tanzania, and potential further spread of *D. citri* and HLB in Africa and Europe. **European Journal of Plant Pathology**, v. 146, p. 1-20, 2016.

SOARES FILHO, W.S.; MORAIS, L.S.; CUNHA SOBRINHO, A.P.; DIAMANTINO, M.S.A.S.; PASSOS, O.S. Santa Cruz, uma nova seleção de limão Cravo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.21, p.222-225,1999.

SOARES FILHO, W.S.; DIAMANTINO, M.S.A. S.; MOITINHO, E.D.B.; CUNHA SOBRINHO, A.P.D.; PASSOS, O. S. Tropical, uma nova seleção de tangerina Sunki. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, p.127-132, 2002.

STUCHI, E.S.; GIRARDI, E.A. **Utilização de práticas culturais na citricultura frente ao Huanglongbing**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, (Documentos da Embrapa, 191), 77p, 2010.

STUCHI, E.S.; GIRARDI, E.A.; SEMPIONATO, O.R.; REIFF, E.T.; SILVA, S.R.; PAROLIN, L.G. **Trifoliata ‘Flying Dragon’: Porta-enxerto para plantios adensados e irrigados de laranjeiras doces e alta produtividade e sustentabilidade**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, (Documentos da Embrapa, 152), 7p, 2012.

SWINGLE, W.T.; REECE, P.C. **The botany of citrus and its wild relatives**. In: REUTHER, W.; WEBBER, H.J.; BATCHELOR, L.D. (Ed.). *The citrus industry*. Riverside: University of California, v.1, p.190-430, 1967.

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**, v. 98, p. 592-599, 2008.

TEIXEIRA, D.C.; SAILLARD, C.; EVEILLARD, S.; DANET, J.L.; DA COSTA, P.I.; AYRES, A.J.; BOVÉ, J.M. *Candidatus Liberibacter americanus*, associated with citrus huanglongbing (greening disease) in São Paulo State, Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 1857-1862, 2005a.

TEIXEIRA, D.C.; DANET, J.L.; EVEILLARD, S.; MARTINS, E.C.; JESUS JUNIOR, W.C.; YAMAMOTO, P.T.; 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**, v. 19, p. 173-179, 2005b.

TSAI, J. H.; LIU, Y. H. Biology of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) on four host plants. **Journal of Economic Entomology**, v.93, p. 1721–1725, 2000.

TSAI, C.H.; HUNG, T.H.; AND SU, J.H. Strain identification and distribution of citrus huanglongbing bacteria in Taiwan. **Botanical studies**, v. 49, p. 49- 56, 2008.

VAN DER MERWE, A.J.; ANDERSEN, F.G. Chromium and manganese toxicity. Is it important in Transvaal citrus greening? **Farming South Africa**, v. 12, p. 439-440, 1937.

YAMAMOTO, P.T.; PAIVA, P.E.B.; GRAVENA, S. Flutuação populacional de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) em pomares de citros na Região Norte do Estado de São Paulo. **Neotropical Entomology**, v.30, p. 165-170, 2001.

XU, C. F.; XIA, Y. H.; LI, K. B. & KE, C. Further study of the transmission of citrus huanglongbing by a psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama. **Proceedings of the 10th Conference of the International Organization of Citrus Virologists**, Valencia, p.243–248, 1988.

ARTIGO 1

RESPOSTAS DE COMBINAÇÕES COPA E PORTA-ENXERTO DE CITROS À
INOCULAÇÃO ARTIFICIAL COM *CANDIDATUS LIBERIBACTER ASIATICUS*

Respostas de combinações copa e porta-enxerto de citros à inoculação artificial com *Candidatus Liberibacter asiaticus*

Resumo: A reação de porta-enxertos de citros ao huanglongbing (HLB) vem sendo o foco de diversas pesquisas, apontando a influência na multiplicação e colonização da bactéria responsável pela transmissão da doença em copas suscetíveis e no sistema radicular. Neste trabalho, avaliaram-se respostas de combinações copa e porta-enxerto à inoculação artificial com *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las) em condições controladas. O experimento foi conduzido em casa de vegetação com laterais de vidro e tela anti-afídeos em Jaboticabal, SP. Um total de dez porta-enxertos foram avaliados, incluindo citrumelo 'Swingle', os citrandarins 'Indio', 'San Diego' e 'Riverside', e os híbridos TSKC x CTCM - 008, TSKC x CTSW - 041, TSKC x (LCR x TR) - 059 e 073 e TSKC x TRFD - 003 e 006. Os porta-enxertos foram produzidos em sacolas plásticas de 4 L com substrato de casca de pinus. Parte dos porta-enxertos formaram mudas com as variedades copa de laranjeiras 'Pera' e 'Folha Murcha'. Para a infecção de Las, as plantas com 20 meses de idade ou 11 meses após a enxertia foram inoculadas de 5 a 10 cm acima do colo nos porta-enxertos de pé franco e de 5 a 10 cm acima da linha da enxertia nas mudas enxertadas, com duas borbulhas infectadas, cada uma com 2 a 3 cm de comprimento, as quais foram enxertadas em lados opostos do tronco. As plantas não-inoculadas (controle) receberam borbulhas saudáveis. Cada planta foi parcialmente desfolhada, deixando apenas três pares de folhas em cada uma delas, e se permitiu o crescimento de apenas três brotos novos na copa em cada planta de modo a se padronizar a parte aérea das plantas avaliadas e favorecer a expressão do vigor vegetativo inerente a cada combinação copa e porta-enxerto. Duas folhas de cada um dos três brotos que cresceram em cada planta foram coletadas e utilizadas para a análise de qPCR aos 3 e 6 meses após a inoculação (MAI). Aos 3 MAI, quase todas as combinações já possuíam todas as plantas positivas para Las. Na comparação múltipla entre todos os tratamentos, a titulação de Las não apresentou diferença significativa. Aos 6 MAI, apenas a comparação entre o grupo formado pelas combinações com a copa 'Pera' e o grupo dos porta-enxertos apresentaram diferenças significativas, onde as combinações exibiram 19% a mais de genomas de Las em relação aos porta-enxertos. Todos os materiais se mostraram suscetíveis à multiplicação de Las.

Palavras-chave: *Citrus* spp., *Poncirus trifoliata*, enxertia, titulação bacteriana, mosqueado de folhas, sistema radicular, huanglongbing.

Responses of citrus scion and rootstock combinations to artificial inoculation with *Candidatus Liberibacter asiaticus*

Abstract: The reaction of citrus rootstocks to huanglongbing (HLB) has been the focus of several researches, pointing out the influence in the multiplication and colonization of the bacteria responsible for the transmission of the disease in susceptible scions and in the root system. In this study, scion and rootstock combinations were evaluated by artificial inoculation with *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las) under controlled conditions. The experiment was carried out in a greenhouse with glass sides and anti-aphid screen in Jaboticabal, SP. A total of ten rootstocks were evaluated, including 'Swingle' citrumelo, 'Indio', 'San Diego' and 'Riverside' citrandarins, and the hybrids TSKC x CTCM-008, TSKC x CTSW-041, TSKC x (LCR x TR) - 059 and 073 and TSKC x TRFD - 003 and 006. The rootstocks were produced in plastic bags of 4 L with pinus bark substrate. Part of the rootstocks formed seedlings with the scion varieties 'Pera' and 'Folha Murcha' sweet orange. For Las infection, plants 20 months of age or 11 months after grafting were inoculated 5 to 10 cm above the neck in the rootstocks and 5 to 10 cm above the grafting line in the grafted seedlings, with two infected buddings, each 2 to 3 cm long, which were grafted on opposite sides of the canopy. The uninoculated plants (control) received healthy buddings. Each plant was partially defoliated, leaving only three pairs of leaves in each of them, and only three new shoots were allowed to grow in each plant in order to standardize the aerial part of the evaluated plants and favor the expression of vegetative vigor inherent to each canopy and rootstock combination. Two leaves of each of the three shoots grown in each plant were collected and used for qPCR analysis at 3 and 6 months after inoculation (MAI). At 3 MAI, almost all combinations already had all the plants positive for Las. In the multiple comparison between all the treatments, the titration of Las did not present significant difference. At 6 MAI, only the comparison between the group formed by combinations with the scion of 'Pera' and the rootstock group presented significant differences, where the combinations exhibited 19% more of Las genomes in relation to rootstocks. All materials were susceptible to Las multiplication.

Keywords: *Citrus* spp., *Poncirus trifoliata*, grafting, bacterial titration, blotchy mottle, root system, huanglongbing.

INTRODUÇÃO

O huanglongbing (HLB) é a doença de maior importância econômica na citricultura mundial. As bactérias associadas ao HLB, incluindo a mais predominante, *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las), residem no floema da planta se distribuindo de maneira sistêmica e irregular (JAGOUÉIX et al., 1994; BOVÉ, 2006). A bactéria asiática é transmitida naturalmente pelo psíldeo *Diaphorina citri* Kuwayama (Liviidae), podendo também ser disseminada experimentalmente via enxertia de borbulhas infectadas (HALBERT; MANJUNATH, 2004; LOPES; FRARE, 2008).

Algumas espécies de rutáceas próximas ao gênero *Citrus* spp. têm sido avaliadas quanto ao HLB em testes de resistência e tolerância ao HLB com o objetivo de encontrar genótipos que possam ser utilizados em programas de melhoramento, tais como plantas dos gêneros *Eremocitrus* e *Microcitrus*, sexualmente e fisiologicamente compatíveis com citros. Essas plantas foram classificadas como resistente e tolerante, respectivamente, por conta do baixo título bacteriano encontrado nos tecidos foliares mesmo seis anos depois de inoculados com Las naturalmente em condições de campo. Apresentaram o mesmo comportamento a sapota branca (*Casimiroa edulis* La Llave & Lex) e a *curry leaf* (*Bergera koenigii* L.), enquanto em *pink wampee* (*Clausena excavata* Burm. f.) e *orange berry* [*Glycosmis pentaphylla* (Retz.) DC], Las nunca foi detectada, recebendo a classificação de imunes à bactéria (RADAMAGU et al., 2016).

O trifoliata [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] e seus híbridos têm manifestado respostas diferenciadas à inoculação de Las, sendo classificados como mais tolerantes à bactéria, tal como o citrange 'Carrizo' [*C. sinensis* (L.) Osbeck x *P. trifoliata*], que, quando comparado ao citrumelo 'Swingle' [*C. paradisi* Macfad. x *P. trifoliata*] e à tangerineira 'Cleópatra' (*C. reshni* hort. ex Tanaka), apresentou baixa concentração bacteriana em seus tecidos e ausência ou pouca expressão de sintomas foliares. Entretanto, Las foi detectada nas mudas de trifoliata, pela análise da PCR quantitativa (qPCR), mesmo na ausência de sintomas nas folhas (FOLIMONOVA et al., 2009). Estudos conduzidos em casa-de-vegetação indicam condições adequadas para multiplicação e

avaliação do patógeno, visto que em poucos meses as plantas manifestam respostas à inoculação (LOPES; FRARE, 2008).

O comportamento de porta-enxertos frente ao HLB também tem sido avaliado em condições de campo, quanto à produtividade e qualidade dos frutos. Híbridos de trifoliata enxertados com laranjeira 'Hamlin' (*C. sinensis*), produziram frutos em maior número e mais pesados quando comparados aos porta-enxertos tradicionais citrumelo 'Swingle' e trifoliata 'Flying Dragon' (*P. trifoliata* var *monstrosa*), porém, não diferiram quanto ao teor de sólidos solúveis totais, em plantas positivas e sintomáticas para HLB (*C. sinensis*) (BOWMAN; McCOLLUM, 2015).

A colonização de Las no hospedeiro também provoca perda de fitomassa do sistema radicular, que pode aumentar o estresse sofrido pela planta, elevando a queda prematura de frutos e folhas. Plantas jovens sintomáticas de laranjeira 'Hamlin' e 'Valência', quando enxertadas em citrumelo 'Swingle', chegaram a atingir perdas significativas de ~37% da massa de raízes em comparação com plantas saudáveis. O sistema radicular quando colonizado sofre perda da fitomassa antes mesmo dos sintomas foliares se expressarem e essa resposta depende do porta-enxerto avaliado (GRAHAM et al., 2013; JOHNSON et al., 2014).

Combinações específicas de copa e porta-enxerto podem apresentar resposta diferenciada em relação ao HLB, como evidenciado na Flórida, EUA, quando uma seleção de toranja [*C. grandis* (L.) Osbeck], *Red grapefruit*, foi testada sobre oito diferentes porta-enxertos. Durante sete anos de avaliação em condições de campo, essa variedade copa não apresentou sintomas típicos do HLB quando enxertada em um híbrido somático, indicando uma reação diferenciada em relação aos demais porta-enxertos que resultaram em sintomas da doença (CASTLE et al., 2015).

Deste modo, visando identificar genótipos de citros potencialmente mais tolerantes ou mesmo resistentes ao HLB, com ênfase em porta-enxertos híbridos de trifoliata, no presente trabalho avaliaram-se respostas de combinações copa e porta-enxerto à inoculação artificial com *Candidatus Liberibacter asiaticus* em condições controladas.

MATERIAL E MÉTODOS

Local e material vegetal

O experimento foi iniciado pela inoculação artificial, em fevereiro de 2016, em casa de vegetação com laterais de vidro e tela anti-afídeos, com temperatura e umidade relativa do ar que oscilaram durante todo o período de condução do experimento entre 17.8 a 31.2 °C e 41 a 89% UR (31.2 °C e 47.3% UR no período da inoculação), localizada em Jaboticabal, São Paulo, Brasil (21°15'17" S, 48°19'20" W, 607 m). As plantas utilizadas foram dispostas sobre o piso de alvenaria e espaçadas de 15 cm entre si.

Um total de dez porta-enxertos foi avaliado, incluindo citrumelo 'Swingle' [*Citrus paradisi* Macfad. x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.], os citrandarins 'Indio' e 'Riverside' (*C. sunki* x *P. trifoliata* 'English' -256 e -264) e 'San Diego' (*C. sunki* x *P. trifoliata* 'Swingle' -314) e, e os híbridos TSKC x CTCM - 008, TSKC x CTSW - 041, TSKC x (LCR x TR) - 059 e 073 e TSKC x TRFD - 003 e 006 {CTSW - [*C. paradisi* Macfad. x *P. trifoliata* (L.) Raf.] cv. Swingle; CTCM - [*C. sinensis* (L.) Osbeck x *P. trifoliata* (L.) Raf.] cv. Coleman; LCR - (*C. limonia* Osbeck); TR – [*P. trifoliata* (L.) Raf.]; TSKC - [*C. sunki* (Hayata) hort. Ex Tan.]; TRFD - *P. trifoliata* var *monstrosa*}.

Os porta-enxertos nucelares foram produzidos em sacolas plásticas de 4 L com substrato de casca de pinus. Parte dos porta-enxertos foi enxertada por borbúlia a 15 cm do colo formando mudas com as variedades copa de laranjeiras 'Pera' e 'Folha Murcha' [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] (Tabela 1). A inoculação foi realizada quando os porta-enxertos e as mudas tinham cerca de 20 meses de idade e 11 meses da enxertia. Todas as plantas estavam livres de HLB no momento da inoculação, tendo as mudas sido produzidas em condições de viveiro protegido.

Tabela 1. Relação de porta-enxertos e mudas inoculadas com Las, classificadas em pé-francos e mudas enxertadas.

Copa	Porta-enxerto
'Pera'	citrumelo 'Swingle'; citrandarins 'Indio' e 'San Diego'; TSKC x CTCM - 008; TSKC x CTSW - 041; TSKC x (LCR x TR) - 059; TSKC x TRFD - 003, 006
'Folha Murcha'	Citrandarins 'Riverside' e 'San Diego'; TSKC x (LCR x TR) - 059, 073
Pé-franco	citrumelo 'Swingle'; 'Indio'; TSKC x (LCR x TR) -073

{CTSW - [*C. paradisi* Macfad. x *P. trifoliata* (L.) Raf.] cv. Swingle; CTCM - [*C. sinensis* (L.) Osbeck x *P. trifoliata* (L.) Raf.] cv. Coleman; LCR - (*C. limonia* Osbeck); TR – [*P. trifoliata* (L.) Raf.]; TSKC - [*C. sunki* (Hayata) hort. Ex Tan.]; TRFD - *P. trifoliata* var *monstrosa*}.

As plantas foram inoculadas de 5 a 10 cm acima do colo nos porta-enxertos de pé franco e de 5 a 10 cm acima da linha da enxertia nas mudas, com duas borbulhas infectadas, cada uma com 2 a 3 cm de comprimento, as quais foram enxertadas em lados opostos do tronco. As borbulhas foram oriundas de plantas sintomáticas de HLB de laranjeira 'Valência' enxertadas em limoeiro 'Cravo' com seis anos de idade, em pomar no município de Rincão – SP, inoculadas naturalmente. Todos os ramos que forneceram borbulhas para a inoculação foram analisados e confirmados via qPCR de DNA foliar para presença ou não de Las. O Ct (Cycle threshold) médio das folhas dos ramos usadas com inóculo de $18,2 \pm 0,20$ que representa $6,94 \pm 0,06$ [logaritmo base 10 do número de cópias do gene ribossomal 16S (16S rDNA) de Las por grama de nervura foliar].

As plantas não-inoculadas (controle) receberam borbulhas saudáveis, obtidas de plantas de laranjeira 'Valência' localizadas em casa-de-vegetação em Araraquara – SP. As borbulhas foram inseridas dentro da região do corte em 'T' invertido e firmemente fixadas com fitas plásticas transparentes de 2 cm de largura. As fitas plásticas foram mantidas no caule por um período de até 20 dias. No momento da retirada das fitas plásticas, todas as plantas foram podadas em uma altura padrão de 50 cm a partir do colo do porta-enxerto.

Cada planta foi parcialmente desfolhada, deixando apenas três pares de folhas em cada uma delas, e se permitiu o crescimento de apenas três brotos novos na copa em cada planta, de modo a se padronizar a parte aérea das plantas avaliadas e favorecer a expressão do vigor vegetativo inerente a cada

combinação copa e porta-enxerto. Os enxertos fonte de inóculo não foram forçados a brotar. Portanto, a avaliação foi realizada nos tecidos dos brotos presentes na variedade copa ou no pé franco inoculados. Os inóculos foram retirados das plantas aos seis meses após a inoculação (MAI), com o auxílio de um canivete.

As plantas foram irrigadas automaticamente todos os dias, com duas irrigações de 30 min de duração por um sistema de microaspersão, com oito microaspersores do tipo bailarina de saída dupla, com vazão de $1,65 \text{ L h}^{-1}$, e fertilizadas com o adubo de liberação lenta Osmocote® 22-04-08 (10 g planta^{-1}), aplicado a cada quatro meses em cobertura a partir da inoculação. Pulverizações com Abamex ($2 \text{ mL } 10\text{L}^{-1}$) e óleo mineral Assist® ($8 \text{ mL } 10\text{L}^{-1}$) foram realizadas periodicamente para controle de ácaros e larva minadora dos citros.

Duas folhas de cada um dos três brotos que cresceram em cada planta foram coletadas e utilizadas para a análise de qPCR aos 3 e 6 MAI. Um total de onze plantas de cada tratamento (mudas enxertadas e porta-enxertos de pé franco) foram utilizadas, sendo que até oito receberam material vegetal infectado com Las e três com material sadio (LOPES; FRARE, 2008). A classificação dos sintomas nas mesmas folhas amostradas para a verificação via qPCR foi realizada aos 3 e 6 MAI, de acordo com a escala fotográfica de severidade elaborada por Mendonça (2015).

Extração de DNA

O ácido desoxirribonucleico (DNA) total das folhas foi extraído usando o tampão brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), segundo o protocolo de Murray e Thompson (1980). Foi pesado 0,5 g de material vegetal (folha e raiz), picado sobre papel toalha com lâmina, colocado em sacos de BAG plástico e conduzido para a extração como descrito por Teixeira et al. (2005). O DNA precipitado foi dissolvido em 50 μL de água DNAase-free e sua concentração foi determinada em espectrofotômetro ND-100 (NanoDrop Technologies).

PCR quantitativo (qPCR)

Para a detecção da bactéria, foram utilizados os oligonucleotídeos (primers) e sonda desenvolvidos por Li et al. (2006). Para os ensaios de qPCR, o DNA foi previamente diluído em água Milli-Q autoclavada para uma concentração final de 100 ng μL^{-1} . Para a amplificação via qPCR foi utilizado termociclador (StepOne Plus, Applied Biosystems).

Para cada reação de qPCR foi utilizado 1 μL de DNA, 6 μL de Master Mix [1 X, kit TaqMan® da Applied Biosystems], 0,5 μM dos *primers* HLBas: 5' TCGAGCGCGTATGCAATAGC 3' (*forward*) e HLBr: 5' GCGTTATCCCGTAGAAAAAGGTAG 3' (*reverse*) e 0,2 μM da sonda HLBp: FAN AGACGGGTGAGTAACGCG MGB-NFQ, em um volume final de reação igual a 12 μL . Para amplificação do DNA, o programa utilizado consistiu em desnaturação inicial a 95 °C por 10 min e 40 ciclos de 95 °C por 15 s de desnaturação e 58 °C por 45 s de anelamento e extensão.

A análise dos dados foi feita no software do mesmo aparelho StepOne Plus. O ponto que detecta o ciclo na qual a reação atinge o limiar da fase exponencial é denominado de 'Cycle threshold' (Ct), ponto que permite estimar a quantidade de fluorescência de cada amostra.

Quantificação de Las e análise dos resultados

Para quantificação dos títulos bacterianos, os valores de Ct obtidos por qPCR foram convertidos no logaritmo do número de genomas de Las por grama de tecido, empregando-se uma curva de titulação já definida. Como o gene alvo usado no qPCR ocorre em cópia única no genoma de Las, pode se afirmar que o log do número de genomas se equivale ao log do número de células de Las. Foram considerados positivos valores obtidos de Ct por qPCR quando ≤ 34.0 , determinado com base na curva de quantificação para determinar a concentração da bactéria. Para os valores de Ct obtidos como '*undetermined*', foi atribuído valor de log igual a zero (LOPES et al., 2013).

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, com oito repetições para plantas inoculadas e três para plantas não inoculadas. Os tratamentos foram comparados aos 3 e 6 MAI dentro de cada uma das duas variedades copa e para pés francos, que foram comparados entre si por

contrastes ortogonais, e também no conjunto dos tratamentos. Os dados transformados referentes aos valores de log foram submetidos à análise de variância e, quando significativo pelo teste F, as médias dos contrastes foram comparadas pelo teste t de Student (ou LSD - Least Significant Difference) com a correção de FDR (false discovery rate) proposta por Benjamini e Hochberg (1995) e, as médias dentro de cada grupo foram comparadas pelo teste de Tukey, a ($p \leq 0,05$). A frequência de plantas infectadas foi computada em cada avaliação.

RESULTADOS

Os primeiros sintomas visuais de HLB foram observados nas plantas inoculadas entre o quarto e quinto mês após a inoculação, sendo que apenas algumas repetições de alguns tratamentos foram identificadas com os sinais iniciais da doença, tais como laranjeira 'Pera' enxertada em TSKC x TRFD - 003 e - 006, em TSKC x (LCR x TR) - 059 e em TSKC x CTCM - 008. Os sintomas nas folhas até esse momento ainda não eram caracterizados pelo mosqueado típico do HLB, entretanto, algumas folhas já apresentavam a nervura central mais espessa e nervuras secundárias cloróticas em relação às folhas das plantas controle.

O número de plantas sintomáticas e a intensidade da clorose foliar aumentaram com o passar do tempo, aos 6 MAI, e os sintomas se mostraram similares aos de folhas com deficiência de micronutrientes, tais como zinco e ferro, principalmente nas folhas mais novas nas combinações anteriormente citadas e ainda na combinação de laranjeira 'Pera' em TSKC x CTSW - 041 e 'Indio' (Figura 1).

As combinações de laranjeira 'Folha Murcha' em citrandarins 'Riverside' e 'San Diego' e nos híbridos germanos TSKC x (LCR x TR) - 073 e 059, bem como de 'Pera' em citrumelo 'Swingle' e em citrandarin 'San Diego' e todos os pés francos, mesmo positivos para Las via qPCR, apresentaram aspecto assintomático de maneira geral, apenas com alguns sinais de deficiência, que podem ter sido provocados pela infecção. Sintomas característicos de ataque de ácaros também foram observados nessas plantas.



Figura 1. Folhas de A) 'Pera' em TSKC × TRFD – 003; B) 'Pera' em TSKC × TRFD – 006; C) 'Pera' em TSKC x CTCM – 008; D) 'Pera' em TSKC × (LCR × TR) – 059; E) 'Pera' em TSKC × CTSW – 041; F) 'Pera' em citrandarin 'San Diego'; G) 'Pera' em citrandarin 'Índio'; H) 'Pera' em citrumelo 'Swingle'; I) 'Folha Murcha' em TSKC × (LCR × TR) – 059; J) 'Folha Murcha' em TSKC x (LCR x TR) – 073; K) 'Folha Murcha' em citrandarin 'Riverside'; L) 'Folha Murcha' em citrandarin 'San Diego'; M) citrandarin 'Índio'; N) citrumelo 'Swingle'; O) TSKC x (LCR x TR) – 073; aos 6 meses após a inoculação por Las via enxertia.

Aos 3 MAI, quase todas as combinações já possuíam todas as plantas positivas, verificadas via qPCR para Las (Tabela 2). A porcentagem de plantas positivas aumentou aos 6 MAI, quando alguns tratamentos que ainda não possuíam todas as plantas detectadas na primeira avaliação testaram positivas

na segunda. Porém, para algumas combinações, ainda aos 6 MAI não se detectou Las, o que pode ser explicado pela distribuição irregular da bactéria nas borbulhas que serviram como fontes de inóculo (TATINENI et al., 2008). Houve 100% de pegamento da enxertia, assim, isso não foi limitante para a inoculação.

Não houve efeito significativo na avaliação dos contrastes ortogonais aos 3 MAI, mas houve aos 6 MAI apenas na comparação entre o grupo das mudas formada pela copa de laranjeira 'Pera' com o grupo formado apenas por plantas pé-franco, mostrando que há inferência entre eles, ou seja, a copa pode promover efeito sobre os porta-enxertos no aumento da multiplicação do patógeno (Tabela 3). O grupo formado pela copa de laranjeira 'Pera' teve 19% a mais de genomas da Las em relação ao grupo formado por plantas pé-franco.

Por causa da ortogonalidade dos contrastes, não foi realizada comparação entre 'Folha Murcha' e porta-enxertos. Essa comparação pode ser subentendida através da premissa: se temos a comparação de 'Folha Murcha' com 'Pera' e 'Pera' com os porta-enxertos, conseqüentemente temos a comparação de 'Folha Murcha' com os porta-enxertos. Assim, sugere-se que, o grupo formado pela variedade copa 'Folha Murcha', possivelmente apresentaria diferenças significativas em comparação ao grupo dos porta-enxertos, visto que pelo teste de F, esse grupo não se diferenciou estatisticamente do grupo da copa 'Pera'. Do mesmo modo, os tecidos foliares da laranja 'Folha Murcha' proporcionaram maior multiplicação de Las.

Na comparação múltipla entre todos os tratamentos avaliados (Tabela 2), bem como a comparação realizada dentro de cada grupo, a quantidade de genoma de Las por grama de tecido extraído não apresentou diferença significativa nas avaliações aos 3 e 6 MAI.

Tabela 2. Porcentagem de plantas qPCR positivas para *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las) e título de Las expresso em valores de Log em tecido foliar de genótipos de citros (porta-enxertos e mudas enxertadas) aos 3 e 6 MAI com borbulhas infectadas em condições controladas.

Combinação de genótipos	3 MAI			6 MAI		
	HLB-Positivas / Total	%	Log	HLB-Positivas / Total	%	Log
'Folha Murcha' em TSKC x (LCR x TR) - 073	6 (8)	75	3,39 ± 0,80 a	8 (8)	100	4,85 ± 0,23 a
'Folha Murcha' em 'Riverside'	5 (5)	100	3,33 ± 0,24 a	5 (5)	100	5,03 ± 0,15 a
'Folha Murcha' em 'San Diego'	8 (8)	100	5,64 ± 0,15 a	8 (8)	100	5,49 ± 0,19 a
'Folha Murcha' em TSKC x (LCR x TR) - 059	7 (8)	87,5	4,67 ± 0,68 a	7 (8)	87,5	5,21 ± 0,57 a
'Pera' em TSKC x TRFD - 003	7 (7)	100	5,24 ± 0,27 a	7 (7)	100	5,55 ± 0,16 a
'Pera' em TSKC x CTSW - 041	8 (8)	100	5,63 ± 0,11 a	8 (8)	100	5,60 ± 0,10 a
'Pera' em 'Indio'	4 (7)	57,1	3,39 ± 0,81 a	5 (7)	71,4	3,86 ± 0,75 a
'Pera' em TSKC x TRFD - 006	6 (8)	75	4,44 ± 0,74 a	6 (8)	75	4,79 ± 0,82 a
'Pera' em TSKC x (LCR x TR) - 059	6 (8)	75	4,10 ± 0,63 a	6 (8)	75	4,29 ± 0,69 a
'Pera' em citrumelo 'Swingle'	8 (8)	100	4,95 ± 0,23 a	8 (8)	100	5,30 ± 0,17 a
'Pera' em 'San Diego'	7(8)	87,5	4,76 ± 0,69 a	7(8)	87,5	5,24 ± 0,57 a
'Pera' em TSKC x CTCM - 008	6 (8)	75	4,22 ± 0,79 a	7(8)	87,5	4,59 ± 056 a
Citrumelo 'Swingle'	8 (8)	100	5,05 ± 0,12 a	8 (8)	100	4,63 ± 0,16 a
Citrandarin 'Indio'	5 (5)	100	4,42 ± 0,21 a	5 (5)	100	4,14 ± 0,26 a
TSKC x (LCR x TR) - 073	5 (5)	100	4,60 ± 0,21 a	4 (5)	80	3,57 ± 0,99 a

Os valores de Ct obtidos por qPCR foram considerados positivos quando $\leq 34,0$, determinado com base na curva de quantificação para determinar a concentração da bactéria por grama de tecido avaliado. Para os valores de Ct obtidos como '*undetermined*', foi atribuído valor de log igual a zero. O Log representa o logaritmo base 10 do número de cópias do gene 16S (16S rDNA) de Las por grama de nervura foliar. As siglas dos genótipos são apresentadas em Material e Métodos. Médias seguidas por letras iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste t de Student com a correção de FDR a 5% de probabilidade.

Tabela 3. Resumo da análise de variância e comparação dos contrastes ortogonais dos títulos de *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las) expresso em valores de Log em tecido foliar de genótipos de citros (porta-enxertos e mudas enxertadas) aos 3 e 6 MAI com borbulhas infectadas em condições controladas.

Combinações de genótipos	3 MAI	6 MAI
Grupo enxertado com laranja 'Folha Murcha'	Log	Log
TSKC x (LCR x TR) - 073	3,39 ± 0,80 a	4,85 ± 0,23 a
'Riverside'	3,33 ± 0,24 a	5,03 ± 0,15 a
'San Diego'	5,64 ± 0,15 a	5,49 ± 0,19 a
'TSKC x (LCR x TR) - 059	4,67 ± 0,68 a	5,21 ± 0,57 a
Grupo enxertado com laranja 'Pera'		
TSKC x TRFD - 003	5,24 ± 0,27 a	5,55 ± 0,16 a
TSKC x CTSW-041	5,63 ± 0,11 a	5,60 ± 0,10 a
'Indio'	3,39 ± 0,81 a	3,86 ± 0,75 a
TSKC x TRFD - 006	4,44 ± 0,74 a	4,79 ± 0,82 a
TSKC x (LCR x TR) - 059	4,10 ± 0,63 a	4,29 ± 0,69 a
citrumelo 'Swingle'	4,95 ± 0,23 a	5,30 ± 0,17 a
'San Diego'	4,76 ± 0,69 a	5,24 ± 0,57 a
TSKC x CTCM - 008	4,22 ± 0,79 a	4,59 ± 0,56 a
Pés francos		
citrumelo 'Swingle'	5,05 ± 0,12 a	4,63 ± 0,16 a
'Indio 256'	4,42 ± 0,21 a	4,14 ± 0,26 a
'TSKC x (LCR x TR) - 073	4,60 ± 0,21 a	3,57 ± 0,99 a
Comparação por contrastes ortogonais	Pr (>F) (3 MAI)	Pr (>F) (6 MAI)
'Folha Murcha' vs 'Pera'	0,7693	0,4212
'Pera' vs 'Pés-franco'	0,7601	0,0341*
Entre 'Folha Murcha'	0,0948	0,2485
Entre 'Pera'	0,2068	0,2103
Entre Pés-franco	0,2750	0,8161

Os valores de Ct obtidos por qPCR foram considerados positivos quando $\leq 34,0$, determinado com base na curva de quantificação para determinar a concentração da bactéria por grama de tecido avaliado. Para os valores de Ct obtidos como '*undetermined*', foi atribuído valor de log igual a zero. O Log representa o logaritmo base 10 do número de cópias do gene 16S (16S rDNA) de Las por grama de nervura foliar. As siglas dos genótipos são apresentadas em Material e Métodos. Médias seguidas por letras iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste t de Student com a correção de FDR a 5% de probabilidade.

DISCUSSÃO

Muitas pesquisas têm sido realizadas procurando avaliar o desempenho de porta-enxertos frente ao HLB, na busca de materiais que possam promover condições de menor multiplicação de Las nos tecidos da variedade copa e mesmo menor severidade da doença. Avaliações de porta-enxertos inoculados com Las por enxertia em casa-de-vegetação têm sido conduzidas para comparar a resposta de diferentes variedades ao HLB, com o objetivo de avaliar melhor as respostas desses materiais, uma vez que proporcionam condições mais favoráveis à transmissão e ao desenvolvimento do patógeno (LOPES; FRARE, 2008; LOPES et al., 2009b; FOLIMONOVA et al., 2009; ALBRETCH; BOWMAN, 2012).

Durante seis meses, mais de 400 amostras foram avaliadas quanto à titulação de Las nos tecidos foliares. A Tabela 2 indica que logo na primeira avaliação, aos 3 MAI, a maioria das plantas testaram positivas via qPCR, apresentando elevada quantidade da bactéria nos tecidos, evidenciando a susceptibilidade ao HLB das variedade copa de citros bem como dos porta-enxertos híbridos avaliados. O número de plantas positivas aumentou com o passar do tempo, onde aos 6 MAI praticamente todas as plantas já se encontravam doentes. As condições ambientais durante o estudo foram favoráveis à inoculação e à colonização por Las conforme Lopes et al., 2009a.

Em pesquisa envolvendo porta-enxertos híbridos de trifoliata inoculados por borbulhia, Albretch e Bowman (2012) verificaram menor porcentagem de plantas positivas para Las do que na presente pesquisa. O porta-enxerto US-897 (*C. reticulata* 'Cleopatra' × *P. trifoliata* 'Flying Dragon') apresentou 4 e 32% de plantas positivas para Las aos 3 e 6 MAI, respectivamente, sendo que o porta-enxerto US-802 (*C. grandis* (L.) Osb. 'Siamese' × *P. trifoliata* 'Gotha Road') não apresentou plantas positivas pela diagnose molecular nas mesmas avaliações. Do mesmo modo, Folimonova et al. (2009) indicaram como tolerante o citrange 'Carrizo', que exibiu baixa concentração de Las nos tecidos foliares amostrados e pouco ou nenhuma expressão de mosqueado nas folhas, enquanto que o trifoliata apresentou variação na titulação de Las ao decorrer das avaliações.

No entanto, vale a pena ressaltar que isolados de Las coletados de diferentes fontes de inóculo promovem distintos níveis de severidade às variedades de citros e seus parentais (TSAI et al., 2008), o que pode resultar em variação de severidade de sintomas e mesmo da colonização e multiplicação do patógeno nos tecidos de um hospedeiro. Assim, pode-se explicar as reações diferenciadas dos porta-enxertos citados anteriormente, mesmo que todos sejam híbridos de trifoliata. Ainda, outros híbridos de trifoliata, tais como os citranges, têm sido avaliados em relação ao HLB e têm apresentado variação no que diz respeito à tolerância ao HLB, evidenciando que há segregação entre híbridos que podem apresentar mais ou menos genomas de Las nos tecidos, podendo ser uma característica de tolerância derivada do parental trifoliata (STOVER et al., 2010).

Ainda, Radamagu et al. (2016) indicaram que a titulação de Las em trifoliata pode variar ao longo do tempo, reduzindo o Ct de 40 no primeiro ano à 28 nos últimos dois anos, em seis anos de avaliação em condições de campo, evidenciando que nesses materiais o tempo necessário para a multiplicação Las foi maior do que em outros citros, sendo até classificados como tolerantes pela detecção tardia da bactéria nos tecidos das plantas.

Apenas na segunda avaliação, aos 6 MAI, a comparação entre a titulação média de Las no grupo formado pelas combinações com a copa 'Pera' e o grupo dos porta-enxertos de pé franco diferiu entre si, com as combinações enxertadas apresentando maiores médias de genomas de Las, o que sugere que a copa de 'Pera' resultou em maior multiplicação da bactéria nos tecidos das plantas quando comparada com as plantas de pé-franco. Isso sugere que não houve influência do porta-enxerto, mas a reação dos tecidos da laranja doce que são mais suscetíveis à multiplicação de Las do que os tecidos dos porta-enxertos que foram avaliados, que possuem o trifoliata como parental. E ainda, o grupo formado pela variedade copa 'Folha Murcha', possivelmente apresentaria diferenças significativas em comparação ao grupo dos porta-enxertos com maior titulação de Las, uma vez que não apresentou diferenças significativas em relação ao grupo da copa 'Pera' pela comparação dos contrastes.

Stover et al. (2014) avaliaram a titulação e severidade do HLB em 54 variedades copa de laranja doce, pomelo, tangerina e trifoliata enxertadas em tangerineira 'Sun Chu Sha' (*Citrus reticulata* Blanco) e híbridos de trifoliata

(citrumelo 'Swingle', citrange 'Carrizo', US – 812, US – 942 e US – 952) em condições de campo, e também verificaram que não houve diferenças estatísticas em relação à titulação de Las nos tecidos de todas as combinações estudadas, mas, quanto à severidade, as copas do grupo dos trifoliatas apresentaram menor expressão de sintomas, independente do porta-enxerto.

Analisando diferentes combinações de copa e porta-enxerto, Boava et al. (2015) avaliaram a incidência de Las em condições de campo em duas áreas. A área A era formada por plantas de laranjeira 'Pera' enxertada em 56 diferentes citrandarins e a área B, localizada a dez metros de distância, era composto por diversos citrandarins enxertados em limoeiro 'Cravo'. A incidência de HLB nos talhões foi de 92% e 14%, respectivamente, atestando que houve uma influência nas combinações em relação à disseminação da bactéria. A menor ocorrência de plantas positivas para Las na área B pode ser atribuída à menor atratividade do psílídeo pelas copas de citrandarins ou pela maior tolerância a Las desses híbridos, que possuem o trifoliata como parental, em relação à laranjeira doce 'Pera'. A titulação de Las na laranjeira 'Pera' foi maior do que nos citrandarins para os tecidos foliares, sugerindo que além da menor atratividade do psílídeo, os híbridos de trifoliata também podem limitar a multiplicação de Las, assim como ocorreu no presente trabalho quando houve diferença entre o grupo de mudas com a copa de 'Pera' e o grupo das plantas pé-franco.

CONCLUSÕES

1. Todos os materiais se mostraram suscetíveis à multiplicação de Las.
2. Os tecidos foliares das laranjeiras doces 'Pera' e 'Folha Murcha' proporcionaram maior condição à multiplicação de Las quando comparados com a titulação da parte aérea das plantas de pé-franco dos híbridos de trifoliata oriundas de sementes.
3. Não houve evidências de que diferentes combinações de variedade copa e porta-enxerto interferiram de modo expressivo na multiplicação de Las, ao menos em laranjeira doce.

REFERÊNCIAS

ALBRECHT, U.; BOWMAN, K.D. Tolerance of trifoliolate citrus rootstock hybrids to *Candidatus Liberibacter asiaticus*. **Scientia horticultrae**, v. 147, p. 71-80, 2012.

BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. **Journal of the royal statistical society**, v. 57, p. 289-300, 1995.

BOAVA, L. P.; SAGAWA, C. H. D.; CRISTOFANI-YALY, M.; MACHADO, M. A. Incidence of *Candidatus Liberibacter asiaticus* - infected plants among citrandarins as rootstock and scion under field conditions. **Phytopathology**, v. 105, p. 518-524, 2015.

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

BOWMAN, K.D.; MCCOLLUM, G.; ALBRECHT, U. Performance of 'Valencia' Orange (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck) on 17 rootstocks in a trial severely affected by huanglongbing. **Scientia Horticulturae**. v. 201, p. 355-361, 2016.

CASTLE, W.S.; GROSSER, J.; BOWMAN, K.D.; STOVER, E. An HLB-tolerant citrus rootstock: What exactly does that mean? **Citrus Industry**, 16–19, 2015.

FOLIMONOVA, S. Y.; ROBERTSON, C. J.; GARNSEY, C. S.; GOWDA, S.; DAWSON, W.O. Examination of the responses of different genotypes of citrus to Huanglongbing (citrus greening) under different conditions. **Phytopathology**, v. 99, p. 1346-1354, 2009.

GRAHAM, J.H.; JOHNSON, E.G.; GOTTWALD, T.R.; IREY, M.R. Presymptomatic fibrous root decline in citrus trees caused by huanglongbing and potential interaction with *Phytophthora* spp. **Plant Disease**, v. 97, p. 1195-1199, 2013.

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.

JAGOUEIX, S.; BOVÉ, J.M.; GARNIER, M. The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the alpha subdivision of the Proteobacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 44, p. 379-386, 1994.

JOHNSON, E.G.; WU, J.; BRIGHT, D.B.; GRAHAM, J.H. Association of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' root infection, but not phloem plugging with root loss on huanglongbing-affected trees prior to appearance of foliar symptoms. **Plant Pathology**, v. 63, p. 290-298, 2014.

LI, W.B.; HARTUNG, J. S.; LEVY, L. Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus huanglongbing. **Journal of Microbiological Methods**, v.66, p. 104-115, 2006.

LOPES, S. A., FRARE, G. F. Graft transmission and cultivar reaction of citrus to *Candidatus Liberibacter americanus*. **Plant Disease**, v. 92, p. 21–24, 2008.

LOPES, S.A.; FRARE, G.F.; BERTOLINI, E.; CAMBRA, M.; FERNANDES, N. G.; AYRES, A.J.; MARIN, D.R.; BOVÉ, J.M. Liberibacters associated with citrus huanglongbing in Brazil: *Candidatus Liberibacter asiaticus* is heat tolerant, *Ca. L. americanus* is heat sensitive. **Plant Disease**, v. 93, 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 *Ca. Liberibacter asiaticus* in citrus plants. **Phytopathology** v. 99, p. 301-306, 2009b.

LOPES, S. A.; LUIZ, F. Q. B. Q.; MARTINS, E. C.; FASSINI, C. G.; BARBOSA, J. C.; BEATTIE, G. A. C. *Candidatus Liberibacter asiaticus* titers in citrus and

acquisition rates by *Diaphorina citri* are decreased by higher temperature. **Plant Disease**, v.97, p. 1563-1570, 2013.

MANN, R. S.; ROUSEFF, R. L.; SMOOT, J. M.; CASTLE, W. S.; STELINSKI, L. L. Sulfur volatiles from *Allium* spp. affect Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), response to citrus volatiles. **Bulletin of entomological research**, v. 101, p. 89-97, 2011.

MANN, R. S.; ALI, J. G.; HERMANN, S. L.; TIWARI, S.; PELZ-STELINSKI, K. S.; ALBORN, H. T.; STELINSKI, L. L. Induced release of a plant-defense volatile 'deceptively' attracts insect vectors to plants infected with a bacterial pathogen. **PLOS Pathogens**, v. 8, p. e1002610, 2012.

MENDONÇA, W. J. Q. F. **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**. 2015. 45 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Controle de Doenças e Pragas dos Citros) – Fundo de Defesa da Citricultura, Araraquara, 2015.

MURRAY, M. G.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic acids research**, v. 8, p. 4321-4326, 1980.

RAMOS, Y.C.; STUCHI, E.S.; GIRARDI, E.A.; LEÃO, H.C.; GESTEIRA, A.S.; PASSOS, O.S.; SOARES FILHO, W.S. Dwarfing rootstocks for 'Valencia' sweet orange. **Acta Horticulturae**, v.1065, p. 351-354. 2015.

STOVER, E.; BOWMAN, K.; MCCOLLUM, G.; NIEDZ, R., SHATTERS JR, R.; HALL, D. Breeding citrus for HLB resistance at the USDA/ARS US Horticultural Research Laboratory, Ft. Pierce, Florida. In: **Workshop Proceedings**, Ft. Pierce, 2010.

STOVER, E.; MCCOLLUM, T.; RAMOS, J.; SHATTERS, R. Growth, health and *Liberibacter asiaticus* titer in diverse citrus scions on mandarin vs. trifoliate hybrid

rootstocks in a field planting with severe huanglongbing. In: **Proceedings of Florida State Horticultural Society**, v. 127, p. 53-59, 2015.

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**, v. 98, p. 592-599, 2008.

TEIXEIRA, D.C.; DANET, J.L.; EVEILLARD, S.; MARTINS, E.C.; JESUS JUNIOR, W.C.; YAMAMOTO, P.T.; 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**, v. 19, p. 173-179, 2005.

ARTIGO 2

CRITÉRIOS DE AMOSTRAGEM PARA CARACTERIZAÇÃO DA DINÂMICA DE BROTAÇÕES EM PLANTAS DE CITROS

Critérios de amostragem para caracterização da dinâmica de brotações em plantas de citros

Resumo: A identificação do pico de brotações novas em plantas de citros pode auxiliar no manejo de insetos vetores e doenças por eles disseminadas. Este trabalho foi conduzido com o objetivo de estabelecer critérios de amostragem de plantas cítricas em campo para avaliação de suas brotações. O experimento foi realizado em campo em Bebedouro, São Paulo. Foram utilizadas 160 plantas de laranjeira 'Valência' enxertada em citrumelo 'Swingle' em espaçamento de 6,0 m x 2,0 m, sendo 40 plantas em cada uma das quatro linhas de plantio selecionadas dentro do talhão. As avaliações dos brotos foram realizadas por meio de dois métodos em intervalos de 21 dias. Para o método quantitativo, foram contados e classificados pela fase fenológica todos os brotos localizados dentro da projeção de uma moldura (0,25 m²) dos dois lados da linha de plantio. Estimou-se o número mínimo de plantas a ser amostradas usando os dados do cálculo da área abaixo da curva (AAC) e o número médio de brotos em um período de seis meses (correspondente a onze avaliações). Para a metodologia qualitativa, a copa da planta foi segmentada em oito quadrantes, sendo quatro de cada lado da planta, e foi anotado o estágio do broto predominante (> 50% do total de brotações naquele quadrante), sendo realizada uma análise multivariada de correspondência múltipla, associando a predominância dos diferentes tipos brotações nos dois lados da planta e nos oito quadrantes às diferentes épocas do ano e ao número médio de brotos anotados no quadrante. A análise da distribuição temporal e espacial dos brotos foi avaliada utilizando a lei da potência de Taylor. Levando em consideração o número médio de brotos, o tamanho amostral da quantidade mínima de plantas foi de 21 e 26 plantas para o lado de sol e de sombra, respectivamente, sendo que seriam necessárias 13 plantas tomando os dois lados da copa para atingir uma variância relativa (VR) de 25%, enquanto que pelo cálculo da AAC, seria necessário amostrar 11 ou 12 plantas no lado do sol ou no lado da sombra, respectivamente, ou 7 plantas fazendo a média dos dois lados, para atingir uma VR de 10%. A distribuição temporal dos brotos foi classificada como aleatória no lado do sol, ligeiramente agregado no lado da sombra e aleatório para a média dos dois lados, considerando todas as avaliações. Para a distribuição espacial, a classificação foi predominantemente aleatória para os lados do sol e sombra e também para a média dos dois lados, considerando cada avaliação individualmente. A análise de correspondências múltiplas apontou que, de modo geral, o lado do sol e os quadrantes superiores das plantas se associaram mais com os brotos amostrados no quadrante. O cálculo pela AAC e a avaliação dos dois lados da copa da planta sugerem um menor número de plantas amostradas para realizar a avaliação de brotações no campo, na ordem de 4 a 8% do total de plantas da população a ser amostrada.

Palavras-chave: *Citrus* spp., *Diaphorina citri*, fenologia, vegetação, monitoramento.

Sampling criteria for characterization of shoot dynamics in citrus plants

Abstract: The identification of the peak of new shoots in citrus plants may help in the control of insect vectors and diseases disseminated by them. This study was conducted with the objective of establishing criteria for sampling citrus plants in the field to evaluate their shoots. The experiment was carried out in the field in Bebedouro, São Paulo. A total of 160 'Valencia' sweet orange were grafted on a 'Swingle' citrumelo in a spacing of 6.0 m x 2.0 m, with 40 plants in each one of the four planting lines selected within the field. Shoot evaluations were performed using two methods at 21 day intervals. For the quantitative method, all the shoots located within the projection of a frame (0.25 m²) on both sides of the planting line were counted and classified by the phenological phase. The minimum number of plants to be sampled was estimated using the area under the curve (AUC) calculation and the average number of shoots data in a six-month period (corresponding to eleven evaluations). For the qualitative methodology, the canopy of the plant was segmented into eight quadrants, four on each side of the plant, and the predominant shoot stage (> 50% of the total shoots in that quadrant) was noted, being done a multivariate analysis of multiple correspondence, associating the predominance of the different shoots types on both sides of the plant and in the eight quadrants at different times of the year and the average number of shoots recorded in the quadrant. The temporal and spatial distribution analysis of shoots was evaluated using the Taylor's power law. Taking into account the average number of shoots, the sample size of the minimum amount of plants was 21 and 26 plants for the sun and shade side respectively, and it would take 13 plants taking the two sides of the canopy to reach a relative variance (RV) of 25%, whereas by calculating the AUC, it would be necessary to sample 11 or 12 plants on the side of the sun or shadow side, respectively, or 7 plants averaging on both sides, to reach a RV of 10 %. The temporal distribution of shoots was classified as random on the side of the sun, slightly aggregated on the shadow side and random for the average on both sides, considering all evaluations. For the spatial distribution, the classification was predominantly random to the sides of the sun and shade and also to the average of the two sides, considering each assessment individually. Multiple correspondence analysis showed that, in general, the sun side and the upper quadrants of the plants were associated more with the shoots sampled in the quadrant. Calculation by AUC and the evaluation of both sides of the canopy suggests a smaller number of plants sampled to carry out the evaluation of shoots in the field, in the order of 4 to 8% of the total plants of the population to be sampled.

Keywords: *Citrus* spp., *Diaphorina citri*, phenology, flush growth, scouting.

INTRODUÇÃO

A necessidade de controlar insetos vetores que atacam folhas e brotações tem se acentuado bastante nas plantas do gênero *Citrus*, devido à disseminação de patógenos transmitidos por esses vetores. Entre esses, destacam-se o vírus da tristeza dos citros (*Citrus tristeza virus*, CTV), transmitido por diferentes espécies de afídeos, a morte súbita dos citros (MSC), com a hipótese de o agente causal ser um variante do CTV ou outro vírus transmitido por um vetor aéreo, a bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* que causa o cancro cítrico e que se beneficia dos danos causados em brotações pela larva minadora dos citros (*Phyllocnistis citrella* Stainton), a bactéria *Xylella fastidiosa* que provoca a clorose variegada dos citros (CVC), transmitida por diversas cigarrinhas, e, principalmente, as bactérias *Candidatus Liberibacter* spp. associadas à mais impactante doença em citros na atualidade, o huanglongbing (HLB), transmitidas nas Américas pelo psílideo *Diaphorina citri* Kuwayama (BASSANEZI et al., 2003; HALBERT; MANJUNATH, 2004; HALL, 2005; MULLER et al., 2005; BOVÉ; AYRES, 2007).

Vários métodos têm sido utilizados para o monitoramento de *D. citri* nos pomares, como a utilização de cartões adesivos amarelos (BELOTI et al., 2013; HALL, 2009), inspeções visuais (SÉTAMOU et al., 2008; TECK et al., 2011) e sucção de insetos nas plantas (YAMAMOTO et al., 2001).

Em todos esses casos, é necessário direcionar o monitoramento sobre as brotações novas, uma vez que são mais atrativas ao psílideo, tanto para alimentação quanto para oviposição e desenvolvimento das ninfas, onde ocorrem quase que exclusivamente (PLUKE et al., 2008). Os insetos adultos podem saltar para plantas vizinhas em busca de brotações mais novas, geralmente na mesma linha, sendo que a migração para plantas em linhas de plantio diferentes ocorre ocasionalmente (GOTTWALD, 2010; HALL; HENTZ, 2011).

O monitoramento de brotações também pode auxiliar de forma indireta no controle, pois produtores de citros podem monitorar os picos de brotação mais intensos e, dessa forma, direcionar a aplicação de inseticidas nos pomares para o controle mais efetivo dos vetores, podendo concentrar o período de aplicações

para épocas do ano com maior emissão de brotos nas plantas ou nas áreas em que se observa maior brotação (HALL; ALBRIGO, 2007).

Esse monitoramento se faz necessário levando em consideração que a maior presença de *D. citri* nos pomares acompanha os períodos em que as plantas apresentam maior fluxo de brotações (YAMAMOTO et al., 2001; PAIVA, 2009), ocorrendo no final da primavera e no início do verão nas condições do Estado de São Paulo, Brasil. A diminuição populacional do inseto ocorre nos meses de outono e inverno, quando a planta se encontra em repouso vegetativo e o fluxo de brotações é reduzido (YAMAMOTO et al., 2001; HALL; ALBRIGO, 2007).

É uma avaliação muito operosa, sendo necessária a estimativa do número mínimo de plantas a ser amostradas para facilitar a avaliação por parte do produtor. A amostragem dependerá da época do ano, pois o clima influencia na emissão dos brotos, bem como do porta-enxerto utilizado, que induzirá vigor vegetativo diferenciado à copa. Assim, visando estabelecer um método que estimasse a quantidade relativa de brotos de uma planta cítrica e, a partir disso, determinar o número mínimo de plantas amostradas para avaliação de brotações, Hall e Albrigo (2007) avaliaram semanalmente as brotações vegetativas emitidas em plantas de pomelo (*Citrus paradisi* Macf.) enxertadas em tangerineira 'Sun Chu Sha' (*C. reticulata* Blanco) e de tangor 'Temple' [*C. reticulata* Blanco x *C. sinensis* (L.) Osbeck] enxertadas em tangerineira 'Cleópatra' (*C. reshni* Hort. Ex Tan.), amostrando 45 árvores de cada combinação, escolhidas aleatoriamente no talhão durante um ano e usando uma moldura de 0,0225 m². Os autores sugeriram, com variação relativa de amostragem de no máximo 25%, um número mínimo de 25 plantas quando forem tomadas duas amostras de brotos por árvore e 40 plantas para a tomada de uma amostra de brotação, em uma área de um hectare.

Plantas de citros possuem o crescimento vegetativo bastante sensível aos fatores do ambiente, tais como temperatura, umidade e radiação, bem como fatores endógenos, como hormônios e carga de produção. Em regiões de clima temperado, geralmente ocorrem dois surtos de brotações anuais bem definidos, variando de três a cinco nas regiões mais quentes de clima tropical e subtropical.

Fotoperíodos mais longos, típicos das regiões tropicais, reduzem o período entre as brotações (DAVIES; ALBRIGO, 1994).

Deste modo, é fundamental o acompanhamento do fluxo de brotações durante todas as épocas do ano, visando determinar os picos dessas brotações com a finalidade de melhorar o controle do psilídeo. No entanto, a avaliação de brotação é muito laboriosa, se fazendo necessário estimar critérios mínimos de amostragem que minimizem o tempo do inspetor no campo, tornando o trabalho mais eficaz. Além da aplicação em monitoramento de pomares comerciais, essa metodologia pode auxiliar pesquisas relacionadas à seleção de genótipos de citros que facilitem o controle de *D. citri*, em função do seu hábito de brotação, bem como em estudos com outras práticas de manejo, como podas, irrigação e tratamentos profiláticos.

Assim, este trabalho foi conduzido com o objetivo de estabelecer critérios de amostragem de plantas cítricas em campo para avaliação de suas brotações e quantificação do número mínimo de plantas a serem amostradas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Área experimental

O experimento foi conduzido entre março e setembro de 2016 em Bebedouro-SP, Brasil (20°53'16" S, 48°28'11" W, 601 m). Segundo a classificação de Köppen, o clima local é do tipo Cwa subtropical com inverno curto, moderado e seco, e verão quente e chuvoso, caracterizando duas estações distintas (Figura 1). O solo na área experimental é um Latossolo Vermelho-Escuro A moderado, textura média, álico (Haplustox) (Andrioli et al., 1994), correspondendo a um Latossolo Vermelho distrófico (Embrapa, 2006), apresentando as propriedades químicas descritas na Tabela 1, nas profundidades de 0 - 20 e 20 - 40 cm.

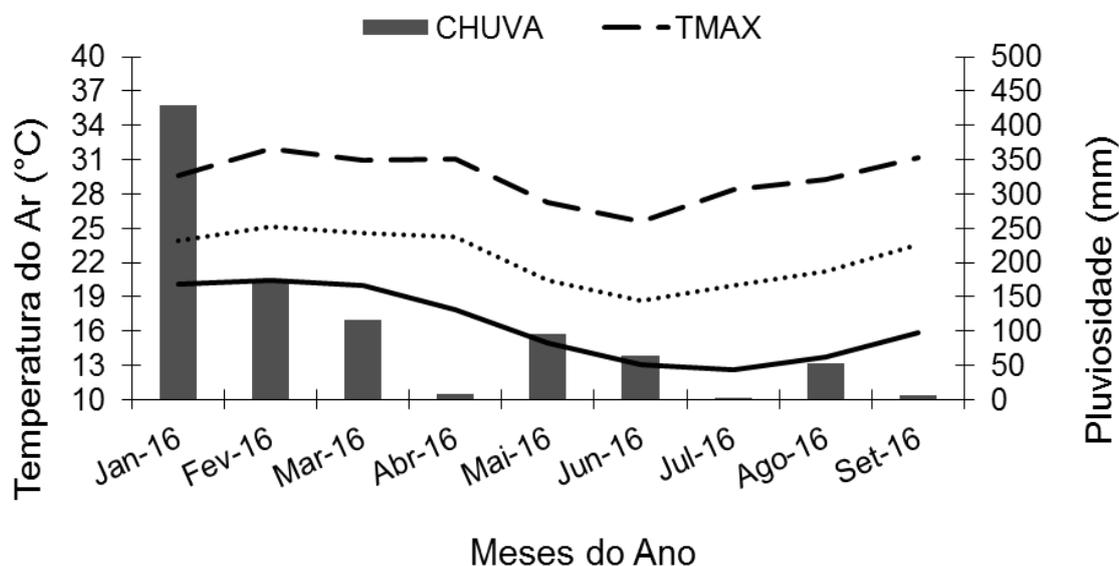


Figura 1. Variáveis meteorológicas computadas no período de janeiro a setembro de 2016 na área experimental em Bebedouro – SP, Brasil.

Tabela 1. Análise química do solo da área experimental, na profundidade de 0 - 20 e 20 - 40 cm, respectivamente, em Bebedouro-SP, Brasil.

pH	Al ³⁺	H+Al	Ca ²⁺	Mg ²⁺	K ⁺	P	Fe	Cu	Zn	Mn	B	S	M.O	SB	T	V
CaCl ₂	-----	mmolc dm ⁻³	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
								mg dm ⁻³					g dm ⁻³	--mmolc dm ⁻³ --		%
5,1	0	28	24	9,0	2,2	25	30	5,8	5,0	7,2	0,42	26	15	35,2	63,2	56
5,2	0	19	19	9,0	1,2	9	17	2,6	1,4	3,0	0,21	24	13	29,2	48,2	61

O pomar utilizado apresentava 900 plantas totais e foi plantado em junho de 2012 em espaçamento de 6,0 m x 2,0 m (833 plantas ha⁻¹) com orientação leste-oeste. O pomar é constituído por plantas de laranjeira 'Valência' [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] enxertada em citrumelo 'Swingle' [*C. paradisi* Macfad. x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] em regime de sequeiro. O pomar nunca foi podado e adotaram-se os tratamentos culturais usualmente recomendados para cultivo de laranja em São Paulo. O controle do psilídeo foi realizado pela pulverização autopropelida de inseticidas de contato rotacionados, a cada 10 dias, numa vazão correspondente a 2 L planta⁻¹.

Para as avaliações, foram amostradas 160 plantas, sendo 40 plantas em cada uma das quatro linhas de plantio selecionadas dentro do talhão, deixando-se duas linhas de borda de cada lado e duas plantas de borda no início de cada linha. No início do experimento, as plantas apresentavam altura de $2,33 \pm 0,03$ m e diâmetros de copa transversal e paralelo à linha de plantio de $2,10 \pm 0,04$ m e $1,93 \pm 0,05$ m, respectivamente. Utilizaram-se apenas plantas com aspecto geral sadio e assintomáticas para HLB na amostragem. Todas as plantas foram individualmente identificadas e etiquetadas e, a partir da primeira amostragem, foram utilizadas até o final do experimento. Quando sintomas de HLB foram identificados ao longo da avaliação, as plantas sintomáticas foram erradicadas e substituídas por uma nova planta sadia na mesma linha.

Avaliação da fenologia das plantas

As avaliações dos brotos foram realizadas por meio de dois métodos em intervalos de 21 dias. Para ambos, os brotos foram classificados em cada estágio fenológico (V2 a V7) conforme a chave descritiva de STOLLER (2016) adaptada de AGUSTÌ et al. (1997).

Para a primeira metodologia, de base quantitativa, foram contados e classificados todos os brotos localizados dentro da projeção de uma moldura ($0,25 \text{ m}^2$) feito com tubos de PVC de $\frac{1}{2}$ ", colocado à altura do peito ($\approx 1,5$ m acima do solo) dos dois lados da linha de plantio. Além do número médio de brotos (V2 a V7) em cada avaliação e no período completo, calculou-se ainda a área abaixo da curva (AAC), considerando-se brotos V2 a V6, no período total de avaliação, para cada árvore amostrada individualmente.

A utilização de molduras já havia sido elaborada por Serfontein e Catling (1968) para a determinação da área do dossel na copa de plantas de citros e também, por Catling (1969) para determinação da área do dossel e avaliação de brotações em plantas de citros para o estudo da dinâmica do psilídeo *Trioza erytrea* (Del Guercio) (Psilidea).

Para a segunda metodologia, de base qualitativa, a copa da planta foi segmentada em oito quadrantes, sendo quatro de cada lado da planta, dois na metade superior e dois na metade inferior de cada lado. Em cada quadrante, foi

anotado o estágio do broto que predominava (> 50% do total de brotos naquele quadrante).

Desse modo, objetivou-se comparar o monitoramento das brotações pelos critérios qualitativo e quantitativo, bem como definir a necessidade de amostragem nos dois lados da linha de plantio, ou seja, da planta amostrada, e em função do quadrante.

Análises dos dados

Os dados de AAC da dinâmica de brotação e do número médio de brotos foram analisados para normalidade e homocedasticidade pelos testes Shapiro-Wilk e F , respectivamente, e, quando necessário, transformados por meio de Box-Cox (OSBORNE, 2010). Para comparar a dinâmica de brotação entre os dois lados da copa, um teste t para amostras pareadas foi conduzido.

Distribuição temporal e espacial da brotação e tamanho mínimo amostral

Para a análise de distribuição temporal e espacial das brotações, foi determinada a relação entre a variância e a média ($s^2 = ax^b = \beta_0 x^{\beta_1}$) e os coeficientes determinados por meio de uma regressão linear simples sobre a transformação logarítmica da média e da variância (SOUTHWOOD; HENDERSON, 2000; TAYLOR, 1961), com a sendo o ponto de interceptação e b a inclinação da reta. Uma distribuição aleatória é indicada por $b = 1$; uma distribuição uniforme por $b < 1$ e distribuição agregada quando $b > 1$. Foi aplicado o teste t para determinar se β_0 e $\beta_1 \neq 0$. β_0 e $\beta_1 \neq 1$ foi determinado analisando sua pertence ao intervalo de confiança de 95% (significativo caso $1 \notin \pm 95\%$ IC). Em alguns dos casos, os coeficientes foram significativamente diferentes de 0 e 1, porém, o valor estava nesse intervalo de confiança (produto de um $\pm 95\%$ IC relativamente estreito) ou, pelo contrário, não foram significativamente diferentes a esses valores (produto de um $\pm 95\%$ IC relativamente amplo); neste caso, a decisão sobre se tratava-se de uma distribuição uniforme ou aleatória foi determinada por simples proximidade aritmética dos valores dos coeficientes com os valores estabelecidos das distribuições.

Tamanho mínimo amostral

A estimativa do número mínimo de amostras que pode ser considerado como representativo foi realizada usando os dados de AAC e de média de brotos amostrados na moldura. No caso da AAC, a estimativa foi uma só para o final do período de avaliação, enquanto para a média de brotos subdividiu-se em períodos de 3-4 avaliações.

Foi considerada a totalidade de brotos contabilizados nos estádios V2 a V6 (brotações com tecido imaturo), com cada planta representando uma repetição. Para a primeira metodologia de amostragem, foi calculado o total de brotos (variável dependente) em cada lado da copa e a soma das contagens nos dois lados, em função do tempo (variável independente). Esses dados foram usados para calcular a AAC, utilizando como medida de avaliação a intensidade de brotos, assim como ocorre com epidemias (CAMPBELL; MADDEN, 1990).

Para a segunda metodologia, foi realizada uma análise multivariada de correspondência múltipla, associando a predominância dos diferentes tipos brotações nos dois lados da planta nos oito quadrantes nas diferentes épocas do ano.

Evolução da associação da brotação predominante com o setor da copa avaliado

Para simplificar a análise, os brotos que inicialmente foram classificados em estádios de desenvolvimento entre V2 e V7 foram agrupados em grupos que indicam uma fase de desenvolvimento específica. Nesse agrupamento, os brotos V2 e V3 são indicativos de brotos em plena fase de desenvolvimento, os brotos V4 a V6 são indicativos da fase de maturação, e os brotos V7 indicam dormência por serem brotos completamente maduros com as gemas inativas (STOLLER (2016) adaptada de AGUSTÌ et al. (1997).

A associação entre a fase de desenvolvimento do broto predominante e o setor e lado da copa foi analisada por meio de uma análise de correspondência múltipla (MCA), uma técnica da estatística multivariada que visa estudar a interdependência entre atributos não métricos (três ou mais variáveis categóricas) e cujo resultado principal é um mapa perceptual que permite observar a proximidade entre os níveis das variáveis (HAIR et al., 2009).

RESULTADOS

Análise de Área Abaixo da Curva (AAC)

Inicialmente, os dados de AAC foram homocedásticos ($F = 0,88$; $P = 0,47$), mas não se ajustaram à distribuição normal ($W = 0,97$; $P = 0,02$), entretanto após transformação de Box-Cox os dados foram normalizados ($W = 0,98$; $P = 0,42$) e continuaram homocedásticos ($F = 0,84$; $P = 0,29$). Após isto, um teste t para amostras pareadas foi conduzido para comparar a brotação entre os dois lados da copa. Houve diferenças significativas na brotação entre o lado do sol, ou seja, voltado para o oeste ($\bar{X} = 536,6$; $\sigma = 174,22$), e o lado da sombra, ou seja, voltado para o leste ($\bar{X} = 445,05$; $\sigma = 185,17$) ($t = 4,39$; $P < 0,01$). Esses resultados sugerem que o lado mais exposto ao sol brota mais (+ 20,57%) do que o lado menos exposto. Considerando os dois lados, a média foi 490,83 e desvio padrão de 141,05.

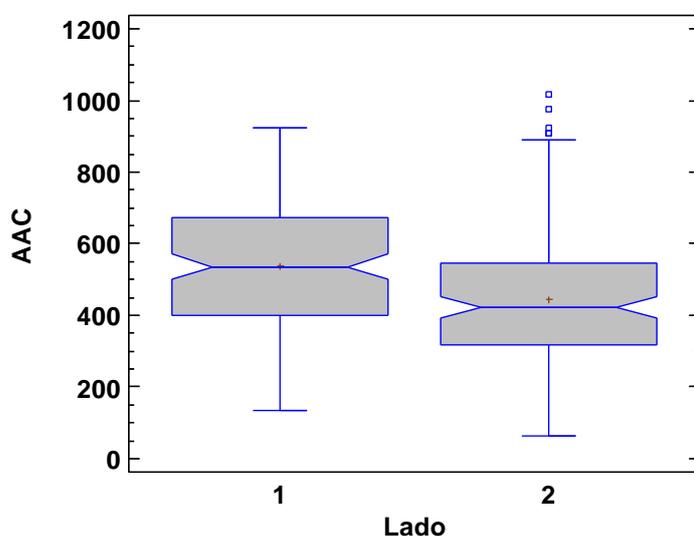


Figura 2. Comparação da área abaixo da curva da dinâmica de brotação (AAC) entre os dois lados da copa de laranja 'Valência' enxertada em citrumelo 'Swingle' estimada entre as datas 02/03/2016 e 28/09/2016. (1) lado do sol ou face oeste; (2) lado da sombra ou face leste.

Distribuição temporal e espacial dos brotos e tamanho mínimo amostral

A regressão linear sobre a média e a variância (transformadas logaritmicamente) indicou que, no geral, a variância incrementou-se em função da média (Figura 3), ao longo das avaliações (lado do sol: $F = 65,71$, $GL = 10$, $P < 0,0001$, $R^2 = 0,87$; lado de sombra: $F = 344,71$, $GL = 10$, $P < 0,0001$, $R^2 = 0,97$; Média dos dois lados: $F = 178,70$, $GL = 10$, $P < 0,0001$, $R^2 = 0,95$). De acordo com os valores dos parâmetros da lei de potência de Taylor (Tabela 2), observa-se que a distribuição temporal da brotação foi aleatória no lado do sol, $a = 0,78$ (erro padrão 0,11, a significativamente diferente de 0, sem diferenças significativas de 1), $b = 0,93$ (erro padrão 0,11, b significativamente diferente de 0, sem diferenças significativas de 1); ligeiramente agregada no lado da sombra, $a = 0,75$ (erro padrão 0,06, a significativamente diferente de 0, significativamente diferente de 1), $b = 1,17$ (erro padrão 0,06, b significativamente diferente de 0, significativamente diferente de 1); e, considerando a média dos dois lados se comporta de maneira aleatória, $a = 0,18$ (erro padrão 0,08, a significativamente diferente de 0, significativamente diferente de 1), $b = 1,12$ (erro padrão 0,08, b significativamente diferente de 0, sem diferenças significativas de 1).

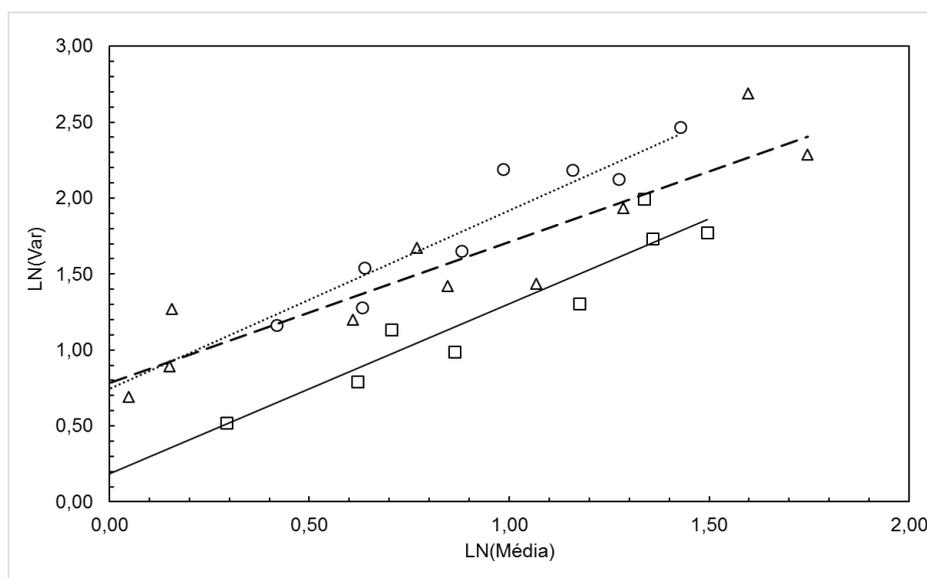


Figura 3. Relação entre a média e a variância (transformadas logaritmicamente) das contagens de brotos jovens (estádios V2 até V6) dentro de uma moldura de 0,25m² nos dois lados projetado no setor médio da copa (lado do sol, linha tracejada Δ ; lado da sombra, linha pontilhada \circ ; média dos dois lados, linha contínua \square), para cada uma das onze avaliações.

Tabela 2. Coeficientes (\pm erro padrão) da lei de potência de Taylor (TAYLOR, 1961) derivados da regressão linear simples da variância em função da média (transformadas logaritmicamente) e teste *t* de hipótese para cada um dos coeficientes considerando a totalidade de avaliações.

Parâmetro	Lado Sol			Lado Sombra			Média dos lados		
	Valor	H0: $\beta \neq 0$	H0: $\beta \neq 1$	Valor	H0: $\beta \neq 0$	H0: $\beta \neq 1$	Valor	H0: $\beta \neq 0$	H0: $\beta \neq 1$
β_0	0,78 (0,11)	***	ns	0,75 (0,06)	***	*	0,18 (0,08)	*	*
β_1	0,93 (0,11)	***	ns	1,17 (0,06)	***	*	1,12 (0,08)	***	ns

^a $\alpha = 0,05$ (*), 0,01 (**), 0,0001 (***); teste *t*.

^b significância do coeficiente determinada por análise do intervalo de confiança: * caso 1 \notin $\pm 95\%$ IC.

Para determinar a distribuição espacial dos brotos, foi primeiro determinado o tamanho mínimo amostral considerando as médias dos brotos. Foi evidente que o número plantas a ser amostradas para atingir determinado valor de variância relativa (VR) variou ao longo das datas de amostragens e entre os setores da copa que foram usados para contagens (Figura 4). O número de plantas a ser amostradas esteve inversamente relacionado à quantidade média de brotos contados, independente do setor da copa. No lado do sol, considerando uma VR de 5%, o número de plantas oscilou entre 120 e 1239 (média = 514), porém considerando um nível menos exigente, mas ainda aceito para tomada de decisões, 15% ou 25% (SOUTHWOOD; HENDERSON, 2000), o tamanho amostral esteve entre 13 – 138 (média = 57) e 5 – 50 (média = 21) plantas, respectivamente (Figura 4A).

Quando o lado da sombra foi analisado, o número de plantas para atingir uma variação relativa de 5%, 15%, ou 25% foi apenas ligeiramente superior, variando entre 262 – 1512 (média = 648), 72 – 168 (média = 72), e 10 – 60 (média = 26; Figura 4C), respectivamente, possivelmente por uma distribuição menos uniforme das brotações neste lado. Ao considerar plantas amostradas dos dois lados e estimando a média dos valores, a quantidade de plantas necessárias foi ainda menor, com 119 – 708 (média = 322), 13 – 79 (média = 36), e 5 – 28 (média = 13; Figura 4E) plantas para atingir variâncias relativas de 5%, 15%, e 25%, respectivamente.

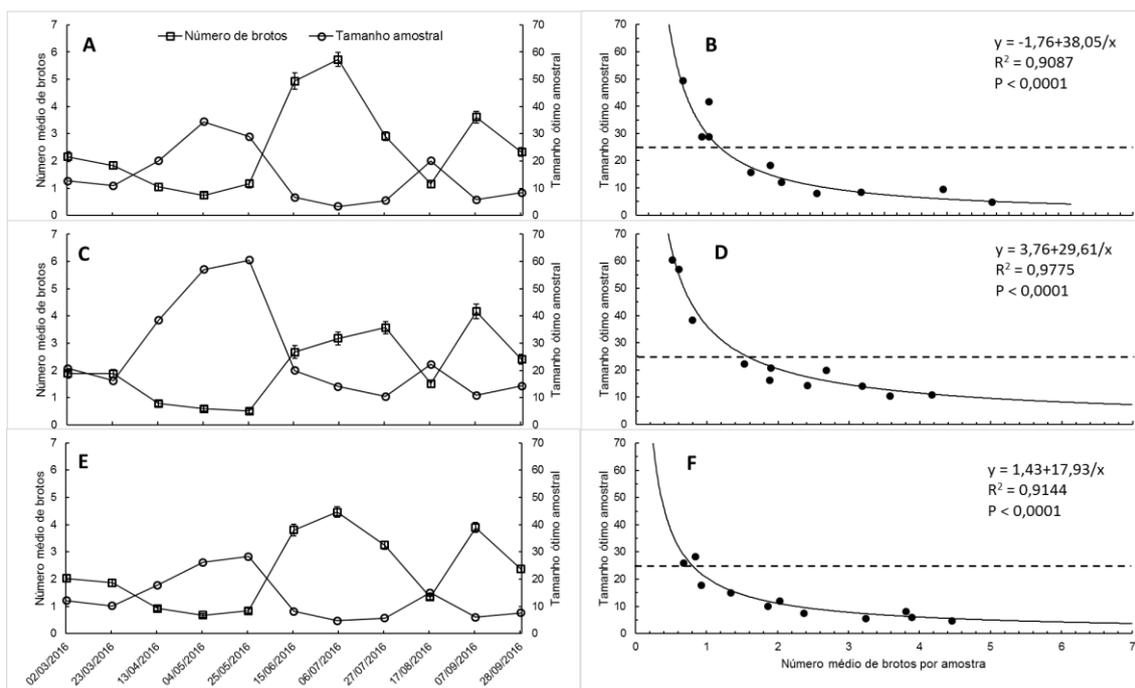


Figura 4. Número ótimo de amostras para atingir uma VR = 25% [$n = (s/E\bar{x})^2$, (SOUTHWOOD; HENDERSON, 2000)] e número médio de brotos (\pm erro padrão) em cada data de amostragem [lado do sol (A), lado da sombra (C) e média dos dois lados (E)], e número de plantas a amostrar para atingir 25% de variância relativa (linha tracejada = 25 plantas) considerando o número médio de brotos por amostra [lado do sol (B), lado da sombra (D) e média dos dois lados (F)].

A distribuição espacial da brotação para cada uma das datas de avaliação foi analisada agrupando os valores de média e variância de cinco grupos com oito plantas contínuas por cada linha, totalizando 20 dados na quadra, para cada data de avaliação. De forma parecida à distribuição temporal dos brotos, a regressão linear simples mostrou que a variância tende a incrementar com o valor da média (Tabela 3).

Os coeficientes da lei de potência de Taylor mostraram que, para o lado do sol a distribuição dos brotos foi aleatória na maioria das avaliações (1ª, 2ª, 3ª, 6ª, 7ª, 9ª, 10ª e 11ª), agregada nas avaliações 4ª e 5ª, e uniforme na avaliação 8ª. No lado da sombra a distribuição da brotação foi semelhante, observando-se aleatoriedade nas avaliações 1ª, 2ª, 3ª, 5ª, 7ª, 8ª, 9ª, e 11ª, uniformidade na 6ª avaliação, e agregação nas avaliações 4ª e 10ª. Já quando analisada a média dos dois lados a situação é mais regular, com uma distribuição aleatória na maioria das avaliações, com exceção da avaliação 5ª, que apresentou uma distribuição agregada.

Tabela 3. Coeficientes (\pm erro padrão) da lei de potência de Taylor (TAYLOR, 1961) derivados da regressão linear simples da variância em função da média (transformadas logaritmicamente) e teste t de hipótese para cada um dos coeficientes em uma das datas de avaliação.

Avaliação	Parâmetro	Lado Sol			Lado Sombra			Média dos lados		
		Valor	H0: $\beta \neq 0^a$	H0: $\beta \neq 1^b$	Valor	H0: $\beta \neq 0^a$	H0: $\beta \neq 1^b$	Valor	H0: $\beta \neq 0^a$	H0: $\beta \neq 1^b$
1	β_0	0,81 (0,16)	***	ns	0,58 (0,2)	**	*	0,43 (0,18)	*	*
	β_1	0,94 (0,19)	***	ns	1,39 (0,28)	***	ns	0,84 (0,24)	**	ns
2	β_0	0,80 (0,14)	***	ns	0,68 (0,02)	***	*	0,15 (0,27)	ns	*
	β_1	0,51 (0,2)	*	*	0,96 (0,03)	***	ns	0,68 (0,39)	ns	ns
3	β_0	0,60 (0,09)	***	*	0,62 (0,04)	***	*	-0,15 (0,1)	ns	*
	β_1	0,81 (0,19)	**	ns	0,77 (0,06)	***	*	0,68 (0,17)	***	ns
4	β_0	0,73 (0,12)	***	*	0,82 (0,04)	***	*	-0,04 (0,14)	ns	*
	β_1	1,30 (0,1)	***	*	1,25 (0,07)	***	*	1,22 (0,14)	***	ns
5	β_0	0,74 (0,1)	***	*	1,24 (0,06)	***	*	0,26 (0,14)	ns	*
	β_1	1,57 (0,14)	***	*	1,13 (0,09)	***	ns	1,41 (0,19)	***	*
6	β_0	0,69 (0,35)	ns	ns	2,42 (0,1)	***	*	0,25 (0,39)	ns	ns
	β_1	1,09 (0,23)	**	ns	-0,23 (0,1)	*	*	1,01 (0,3)	**	ns
7	β_0	0,77 (0,93)	ns	ns	1,17 (0,2)	***	ns	0,6 (0,96)	ns	ns
	β_1	0,81 (0,54)	ns	ns	0,82 (0,16)	***	ns	0,64 (0,65)	ns	ns
8	β_0	1,09 (0,58)	ns	ns	0,86 (0,09)	***	ns	-0,18 (0,56)	ns	*
	β_1	0,26 (0,55)	ns	ns	1,12 (0,09)	***	ns	1,05 (0,48)	*	ns
9	β_0	0,75 (0,06)	***	*	1,03 (0,11)	***	ns	0,12 (0,11)	ns	*
	β_1	0,67 (0,1)	***	*	1,12 (0,1)	***	ns	0,95 (0,2)	***	ns
10	β_0	0,19 (0,39)	ns	*	0,40 (0,09)	***	*	0,34 (0,63)	ns	ns
	β_1	1,24 (0,3)	**	ns	1,41 (0,07)	***	*	0,83 (0,47)	ns	ns
11	β_0	0,52 (0,27)	ns	ns	0,72 (0,09)	***	*	0,01 (0,36)	ns	*
	β_1	0,91 (0,31)	**	ns	1,04 (0,12)	***	ns	0,74 (0,41)	ns	ns

^a $\alpha = 0,05$ (*), $0,01$ (**), $0,0001$ (***); teste t.

^b significância do coeficiente determinada por análise do intervalo de confiança: * caso $1 \notin \pm 95\%$ IC.

Tamanho mínimo amostral

A estimação pela área abaixo da curva (AAC) na dinâmica de brotação planta a planta é uma forma de simplificar em um só valor a intensidade e a frequência de brotação. Neste caso, o tamanho ótimo amostral foi determinado estimando a Variação Relativa ($VR = [\sigma / (E * \bar{X})]^2$) (SOUTHWOOD; HENDERSON, 2000). Essa estimativa indicou que caso a amostragem seja feita somente em um dos lados da planta, o tamanho amostral é ligeiramente inferior quando realizada no lado do sol do que no lado da sombra (-11,8%). Porém, se a amostragem fosse feita com a média dos dois lados da copa para cada planta, a quantidade de plantas necessárias seria ainda menor (-38,4%) (Figura 5). Para atingir um $VR = 5\%$ seria necessário amostrar 42,2 plantas no lado do sol e 47,6 plantas no lado da sombra, ou 27,6 plantas fazendo a média dos dois lados. Enquanto para atingir uma $VR = 10\%$ é necessário amostrar 10,5 ou 11,9 plantas

no lado do sol ou no lado da sombra, respectivamente, ou 6,9 plantas fazendo a média dos dois lados.

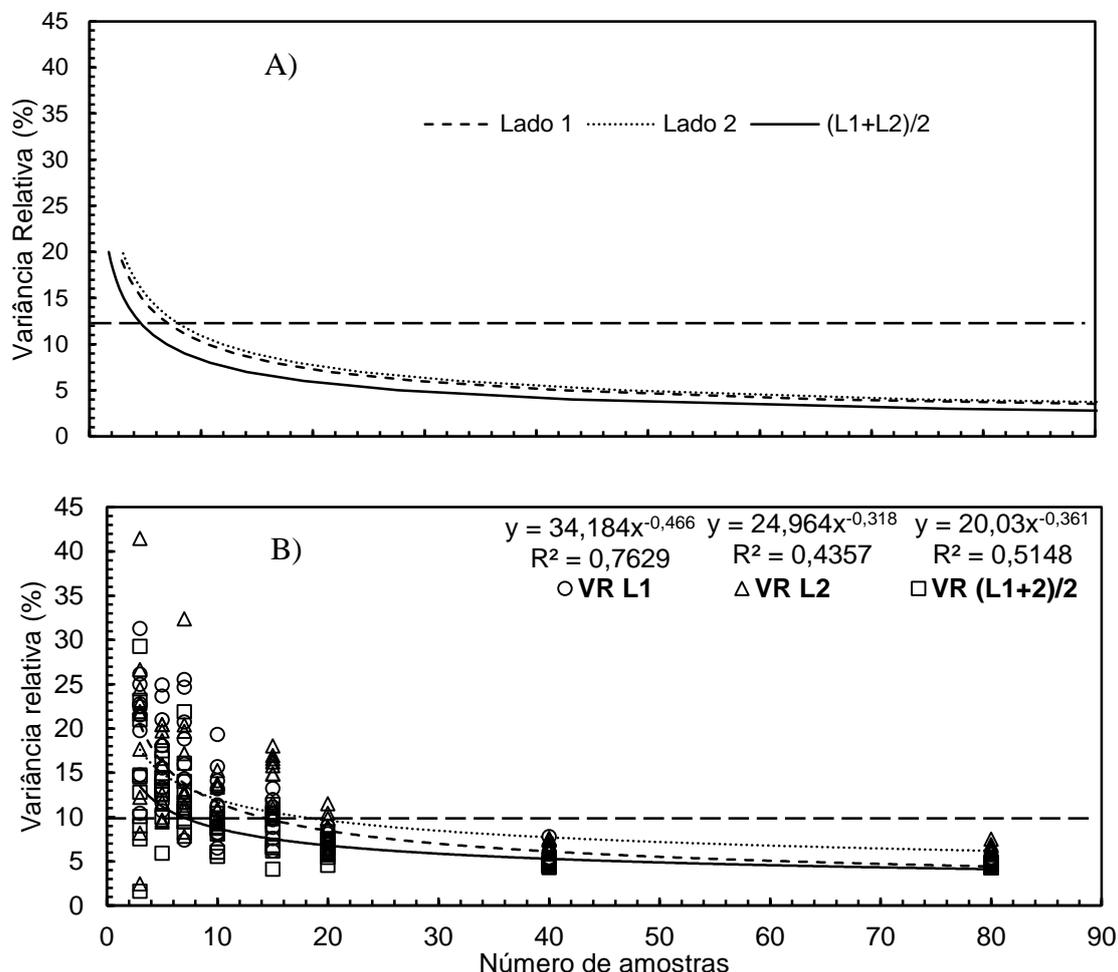
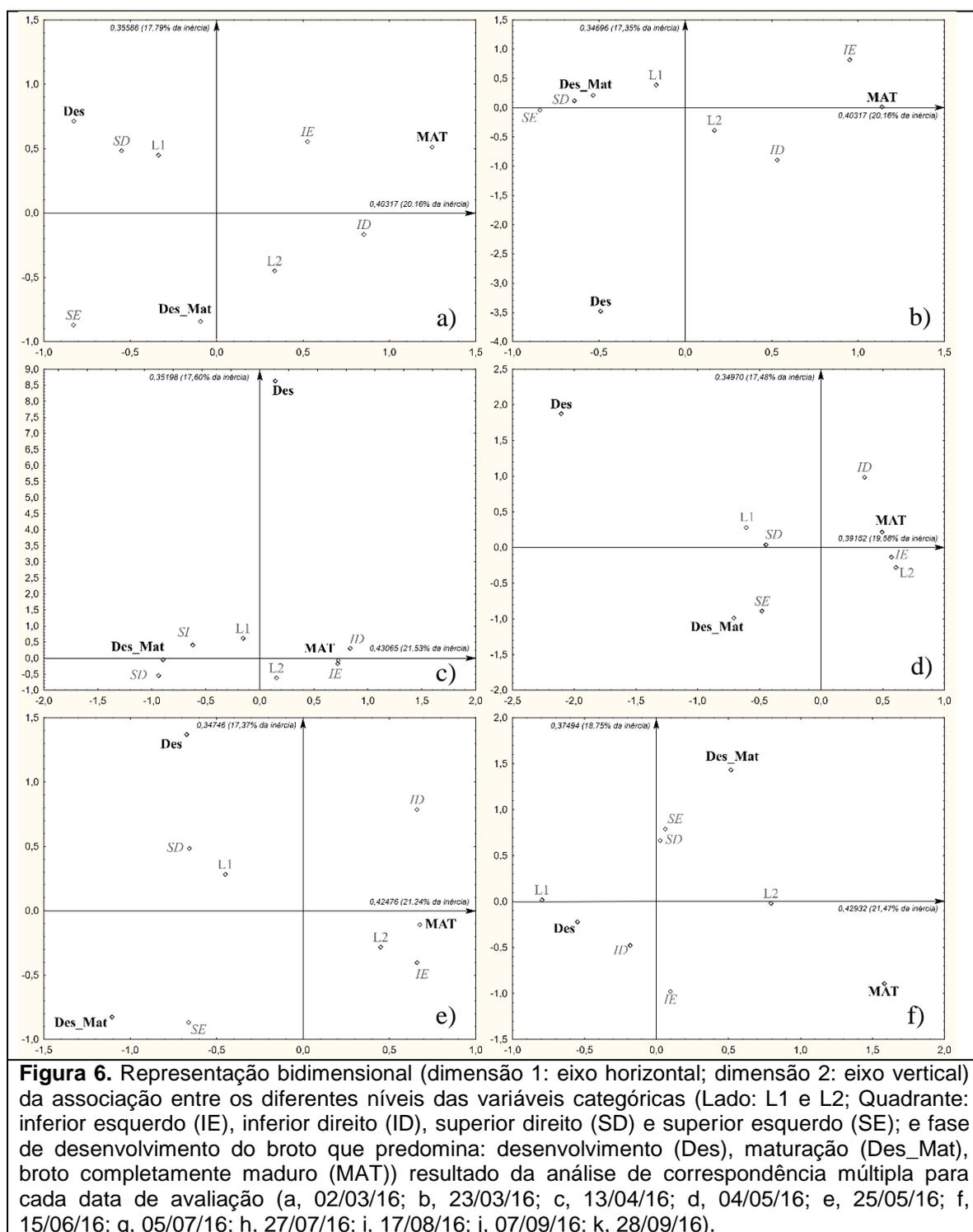


Figura 5. A: Estimativa do número de amostras necessárias para atingir uma determinada VR ($VR = [\sigma / (E * \bar{X})]^2$, (SOUTHWOOD; HENDERSON, 2000)). B: Variação relativa estimada de acordo com o número de amostras aleatoriamente selecionadas. Cada um dos 10 pontos corresponde a um conjunto de dados com $n = 3, 5, 7, 10, 15, 20, 40$ e 80 amostras. Lado 1 = lado do sol, lado 2 = lado da sombra.

A análise de correspondência múltipla mostrou correspondência significativa entre as categorias em cada uma das datas de avaliação ($X^2 > 7000$, $df = 64$, $P < 0,0001$). No geral, a MCA permitiu apreciar que a fase de desenvolvimento do broto predominante é diferente para os lados da copa assim como para cada um dos quadrantes em cada uma das datas. Geralmente, no lado do sol e nos quadrantes superiores estiveram mais frequentemente associados os brotos em desenvolvimento (indicadores de recente brotação ou de menos de 15 - 20 dias, V2 a V3) e brotos na transição do desenvolvimento a maturação (V4 a

V6), quando já não emitem folhas novas e acontece a expansão foliar. Pelo contrário, o lado da sombra e os quadrantes inferiores estiveram mais frequentemente associados aos brotos completamente maduros ou em maturação (V7) (Figura 6).



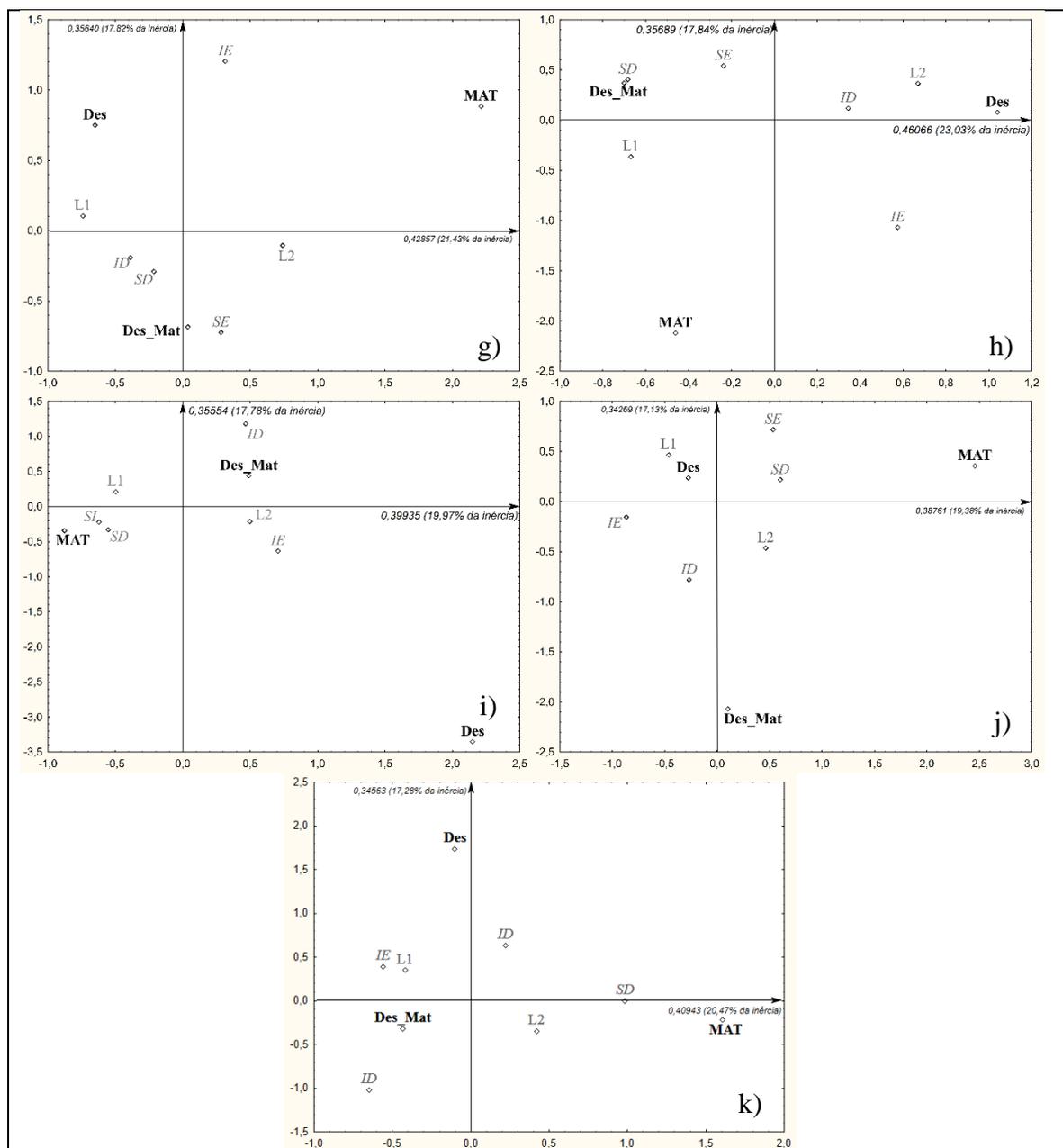


Figura 6. (continuação) Representação bidimensional (dimensão 1: eixo horizontal; dimensão 2: eixo vertical) da associação entre os diferentes níveis das variáveis categóricas (Lado: L1 e L2; Quadrante: inferior esquerdo (IE), inferior direito (ID), superior direito (SD) e superior esquerdo (SE); e fase de desenvolvimento do broto que predomina: desenvolvimento (Des), maturação (Des_Mat), broto completamente maduro (MAT)) resultado da análise de correspondência múltipla para cada data de avaliação (a, 02/03/16; b, 23/03/16; c, 13/04/16; d, 04/05/16; e, 25/05/16; f, 15/06/16; g, 05/07/16; h, 27/07/16; i, 17/08/16; j, 07/09/16; k, 28/09/16).

DISCUSSÃO

O primeiro critério de amostragem adotado levou em consideração o número médio de brotos de cada planta em cada data de avaliação, realizada a cada 21 dias, em um total de 160 plantas amostradas em um pomar de 900 plantas.

Considerando uma VR de 25%, que ainda é aceita para tomada de decisões, o tamanho amostral esteve entre 5 - 50 (média = 21) plantas para o lado do sol. Para o lado da sombra, o número de plantas ficaria entre 10 - 60 (média = 26) para a mesma variância. Levando em consideração as plantas amostradas dos dois lados da linha de plantio e estimando a média dos valores, a quantidade de amostragens necessárias seria ainda menor, com 5 - 28 (média = 13) plantas para atingir VR de 25%.

Foi observado um aumento na quantidade de plantas amostradas no lado da sombra, possivelmente por uma distribuição menos uniforme dos brotos, dado que o mesmo estava disposto no lado da linha de plantio com menor incidência de luz solar e, assim, emitindo menor fluxo vegetativo em relação ao lado do sol, mais exposto à radiação e apresentando brotações com distribuição mais uniforme (DAVIES; ALBRIGO, 1994). Da mesma maneira, Sétamou et al. (2008), em pesquisa realizada no Texas, EUA, encontraram maior quantidade de brotos no lado de maior incidência solar na linha de plantio, e ainda apontaram maior população de ninfas de *D. citri* por conta do maior fluxo vegetativo.

Do ponto de vista prático, a utilização da VR de 25% se torna mais apropriada para a determinação da quantidade plantas amostradas, uma vez que as avaliações de brotações são muito trabalhosas nos pomares e esta variância é aceita e atinge uma aferição precisa para estimar a média dos brotos. Deste modo, o número mínimo de plantas vai auxiliar o produtor a otimizar a amostragem e reconhecer o momento de picos de brotação para conduzir a aplicação de defensivos no momento mais adequado.

Conforme a Figura 4 (A, C, E) indica, quanto maior a quantidade de brotos nas plantas, menor será o número de plantas que devem ser amostradas, independente do lado da linha de plantio, uma vez que a uniformidade na quantidade de brotos facilita a visualização. A Figura 4 ainda mostra dois picos

distintos de brotações. O primeiro no mês de junho, quando coincidiu com uma época de chuvas e o segundo no início de setembro, acontecendo em um período após as chuvas, mostrando-se mais acentuado no lado do sol devido a maior incidência de luz e conseqüente quebra de dormência das gemas. As gemas brotam em qualquer época do ano, não havendo exigência com o frio, desde que a temperatura do solo esteja acima de 12 °C, independente da temperatura do ar (AGUSTÍ; ALMELA, 1991).

A amostragem das brotações pode variar de acordo com a época do ano. Períodos com chuvas e temperatura em ascensão são determinantes para o crescimento vegetativo dos citros (DAVIES; ALBRIGO, 1994; SPIEGEL-ROY; GOLDSCHMIDT, 1996). Isso está de acordo com o apontado pela Figura 4, que apresenta um pico de brotação no mês de setembro no começo da primavera, acompanhada do início de crescimento vegetativo e assim, com o incremento de brotos novos no pomar, menos plantas devem ser amostradas para as avaliações. Do modo contrário com o que ocorre no outono e inverno, que se caracteriza por temperaturas mais baixas e escasso de chuvas.

No segundo critério de amostragem aplicado, foi utilizada a estimação pelo cálculo da área abaixo da curva (AAC) na dinâmica de brotação planta a planta. Esse método indicou que seria necessário amostrar 11 ou 12 plantas no lado do sol ou no lado da sombra, respectivamente, ou 7 plantas fazendo a média dos dois lados, para atingir uma VR de 10%. Vale ressaltar que essa metodologia indicou um menor número de plantas comparado ao critério de amostragem pelo número médio de brotos.

A aplicação do critério de amostragem pela AAC é interessante especialmente em pesquisas, como na avaliação de genótipos que apresentem hábitos de brotação diferenciados, pois reduz o esforço para amostragem e ao mesmo tempo permite integrar diversas avaliações no tempo em uma única variável com significado biológico. Por outro lado, em aplicação para monitoramento de brotos visando auxiliar o controle do vetor, por exemplo, provavelmente o critério de amostragem com base na contagem da média de brotos em quadrantes da copa seja mais prático, pois permite tomada de decisões com base em uma única avaliação de forma mais imediata, embora implique em maior quantidade de plantas amostradas para atingir maior confiabilidade.

Pode-se ainda observar que, assim como no cálculo do número médio de brotos, a média dos brotos dos dois lados da planta proporciona uma menor quantidade de plantas que devem ser tomadas para realizar a avaliação de brotação, provavelmente devido ao fato de que com o aumento da quantidade média de brotos propicia uma maior uniformidade consequente da contagem dos brotos dos dois lados da planta. Dessa forma, também se trata de um procedimento mais conveniente aos produtores e inspetores.

Analisando o número médio de brotos, Hall e Albrigo (2007) avaliaram brotações vegetativas semanalmente em 45 plantas de pomelo enxertadas em tangerineira 'Sun Chu Sha' e de tangor 'Temple' enxertadas em tangerineira 'Cleópatra', escolhidas aleatoriamente no talhão durante um ano, utilizando uma moldura de 0,0225 m². Os autores indicaram um número mínimo de 25 plantas quando foram tomadas duas amostras de brotos por árvore e de 40 plantas para a tomada de uma amostra de brotação por planta, para uma área de um hectare e adotando uma VR de 25%.

Em relação ao acompanhamento das brotações para a aplicação de inseticidas, Hermoso de Mendonza et al. (2001) utilizaram uma moldura de 0,25 m² e acompanharam durante três anos fluxos vegetativos e densidade de *Aphis gossypii* em 24 plantas de tangerineira 'Clementina' (*C. clementina* Hort. ex Tan.) enxertadas em citrange 'Carrizo' [*C. sinensis* x *P. trifoliata*]. Marroquín et al. (2004) estimaram o número de pulgões a partir do número médio de brotos em laranjeira 'Baianinha' [*C. sinensis* cv. Washington Navel], tangerineiras 'Satsuma' (*C. unshiu* (Mak.) Marc.) e 'Clementina' enxertadas nos citranges 'Troyer' e 'Carrizo', utilizando uma moldura de 0,25 m² colocada em cada quadrante da copa de três plantas de cada combinação durante um período de primavera.

Na avaliação de psíldeos, Catling (1969) estimou a densidade de brotos em plantas de citros pela contagem de todos os brotos localizados em uma moldura de 0,4 m², e indicou os brotos mais novos como preferidos pelo inseto para oviposição e reprodução. Do mesmo modo, Tsai et al. (2002) apontou uma correlação positiva com o aumento da população de psíldeos e a emissão de brotações novas em plantas de murta (*Murraya paniculata* L.), bem como Hall e Albrigo (2007) em plantas de citros.

Com base nos resultados desse estudo, a amostragem utilizando molduras de 0,25 m² apresenta vantagem sobre aquela utilizada por Hall e Abrigo (2007), muito provavelmente em função de permitir amostrar maior quantidade de brotos por visada por planta e, conseqüentemente, reduzir a quantidade mínima necessária de plantas a ser amostradas. Por outro lado, esse número mínimo com base em média de brotos pode variar de 5 a 60, conforme lado da planta e época da avaliação, demonstrando a necessidade de se planejar uma amostragem adequada de acordo com o propósito do estudo.

Pelos coeficientes da lei da potência de Taylor, a distribuição temporal aleatória dos brotos no lado do sol demonstra que as plantas brotaram em quantidades diferentes e em maior quantidade do que o lado da sombra, que teve a distribuição agregada, apresentando emissão de brotações mais pontuais. Isso foi devido à maior exposição de um dos lados da linha de plantio à luz e, conseqüentemente, maior fluxo de brotos. O crescimento vegetativo dos citros é bastante sensível aos fatores ambientais bem como aos fatores endógenos, sendo expresso de forma bem definida na forma de lançamentos ou fluxos durante o ano. Apresentam uma ampla faixa de temperatura para o crescimento e desenvolvimento vegetativo, sendo que é paralisado apenas quando a temperatura atinge valores menores que 13 °C e maiores do que 32 °C (DAVIES; ALBRIGO, 1994; SPIEGEL-ROY; GOLDSCHMIDT, 1996).

De acordo com a Figura 1, podemos observar que o presente estudo foi conduzido em uma região que apresentou intervalos de temperatura média dentro da faixa ótima para o crescimento vegetativo, deste modo, a maior emissão de brotos de um lado da linha de plantio em relação ao outro também foi bastante influenciada pela maior incidência de luz em um dos lados, que estimula o alongamento dos ramos. Assim, a Figura 4 indica que os dois lados da linha de plantio exibiram comportamentos semelhantes, entretanto o lado do sol brotou mais quando comparamos os picos de brotação de cada um dos lados (DAVIES; ALBRIGO, 1994).

Na distribuição espacial da brotação, o comportamento foi semelhante, mostrando que para o lado do sol a distribuição dos brotos foi aleatória na maioria das avaliações, sendo classificada como agregada apenas nas avaliações 4^a e 5^a e uniforme na avaliação 8^a, quando as temperaturas foram menores (Figura 1) e

as plantas brotaram menos (Figura 4), atingindo quantidades parecidas no número de brotos, ou seja, em períodos de maior brotação, a distribuição é aleatória pois há brotação generalizada na copa. Em períodos de repouso ou transição, a brotação é esporádica, sendo restrita a poucos ramos da copa, por isso é agregada, e provavelmente ocorre em ramos em particular que sejam mais maduros, ou sem drenos como frutos.

No lado da sombra a distribuição da brotação foi similar, observando-se uniformidade na 6ª avaliação, agregação nas avaliações 4ª e 10ª e aleatoriedade nas demais. Já quando analisada a média dos dois lados, a situação é mais regular, com uma distribuição aleatória na maioria das avaliações, com exceção da avaliação 5ª, que apresentou uma distribuição agregada. Na distribuição espacial, a análise realizada por dia de avaliação no campo permite compreender se a distribuição varia de acordo com a época do ano e também, com a intensidade da brotação.

A análise de correspondências múltiplas apontou que, de modo geral, o lado do sol e os quadrantes superiores das plantas se associaram mais com os brotos mais jovens. Isso indica que, é provável que essa região do terço superior da copa da planta seja um alvo preferencial dos psílídeos, que são atraídos pelas brotações mais jovens (YAMAMOTO et al., 2001; HALBERT; MANJUNATH, 2004; PLUKE et al., 2008). Em relação ao manejo de monitoramento de insetos vetores, a região superior da copa da planta também seria a mais indicada para o posicionamento de armadilhas, visando uma maior amostragem de vetores para posterior avaliação, conforme relatado por Hall (2009), que utilizou cartões adesivos amarelos no monitoramento de *D.citri* em um pomar de dois anos e meio de idade formado por plantas de pomelo enxertado em tangerineira 'Sun Chu Sha', de aproximadamente 1,3 m de altura, sendo que os cartões foram posicionados a 1 – 1,2 m acima do solo.

CONCLUSÕES

1. O cálculo da área abaixo da curva fornece resultados com o menor número de plantas a serem amostradas, sendo que essa quantidade será ainda menor com a avaliação levando em consideração os dois lados da copa da planta.
2. A parte superior da copa da planta é a região com maior número de brotos, sendo indicada para o posicionamento de armadilhas para monitorar insetos vetores.

REFERÊNCIAS

- AGUSTÍ, M.; ALMELA, V. **Aplicación de fitorreguladores en citricultura**. Barcelona: Aedos Editorial, 261p, 1991.
- AGUSTÍ, M.; ZARAGOZA, Z.; BLEIHOLDER, H.; BUHR, L.; HACK, H.; KLOSE, R.; STAUB, R. Adaptation of the BBCH scale for the description of Citrus fruits phenological stages. **Fruits**, v.52, p.287-295, 1997.
- ANDRIOLI, I.; CENTURION, J. F.; MARQUES JÚNIOR, J. **Levantamento detalhado dos solos da Estação Experimental de Citricultura de Bebedouro: relatório**. Jaboticabal: FCAV-UNESP, 19p, 1994.
- BASSANEZI, R. B.; BERGAMIN FILHO, A.; AMORIN, L.; GIMENES-FERNANDES, N.; GOTTWALD, T. R.; BOVÉ, J. M. Spatial and temporal analyses of Citrus Sudden Death as a tool to generate hypotheses concerning its etiology. **Phytopathology**, v. 93, p.502-512, 2003.
- BELOTI, V.H.; RUGNO, G.R.; FELIPPE, M.R.; CARMO-UEHARA, A. do; GARBIM, L.F.; GODOY, W.A.C.; YAMAMOTO, P.T. Population dynamics of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) in orchards of 'Valencia' orange,

'Ponkan' Mandarin and 'Murcott' Tangor Trees. **Florida Entomologist**, v. 96, p. 173-179, 2013.

BOVÉ, J.M.; AYRES, A. J. Etiology of three recent diseases of citrus in São Paulo State: sudden death, variegated chlorosis and huanglongbing. **IUBMB Life**, v. 59, p.346–354, 2007.

Campbell, C.L. & Madden, L.V. **Introduction to Plant Disease Epidemiology**. Wiley, 97, 8-047. 1990.

CATLING, J. D. The bionomics of the South African citrus psylla, *Trioza erytreae* (del Guercio) (Homoptera: Psyllidae): 1. the influence of the flushing rhythm of citrus and factors which regulate flushing. **Journal of the Entomological Society of Southern Africa**, v.32, p. 191-208, 1969.

DAVIES, F.S.; ALBRIGO, L.G. **Citrus**. Wallingford: Cab International, 254p, 1994.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÀRIA – EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema de Classificação de solos**. Rio de Janeiro, 2006.

FIGUEIREDO, D.B.F.; JÚNIOR, J.A.S. Desvendando os Mistérios do Coeficiente de Correlação de Pearson (r). **Revista Política Hoje**, v. 18, p. 115-146, 2009.

GOTTWALD, T. R.; DA GRAÇA, J. V.; BASSANEZI, R. B. Citrus huanglongbing: the pathogen and its impact. **Plant Health Progress**, v.6, p. 1-18, 2007.

GOTTWALD, T.R. Current epidemiological understanding of citrus Huanglongbing. **Annual Review of Phytopathology**, v. 48, p.119–139, 2010.

HAIR, J. F. et al. **Multivariate Data Analysis**. 7th. ed. Prentice Hall, 2009.

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

HALL, D.G. Overview of the Asian citrus psyllid. **Proc. of the 2nd International Citrus Canker and Huanglongbing**. Research Workshop Florida Citrus Mutual, Orlando, 60p, 2005.

HALL, D.G.; ALBRIGO, L.G. Estimating the Relative Abundance of Flush Shoots in Citrus with Implications on Monitoring Insects Associated with Flush. **HortScience**, v. 42, p. 364-368, 2007.

HALL, D.G. An assessment of yellow sticky card traps as indicators of the abundance of adult *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in citrus. **Journal of Economic Entomology**, v. 102, p. 446–452, 2009.

HALL, D.G.; HENTZ, M.G. Seasonal flight activity by the Asian citrus psyllid in east central Florida. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 139, p. 75–85, 2011.

HERMOSO DE MENDONZA, A.; BELLIURE, B.; CARBONELL, E. A.; REAL, V. Economic thresholds for *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae) on Citrus clementina. **Journal of economic entomology**, v. 94, p. 439-444, 2001.

MARROQUÍN, C.; OLMOS, A.; GORRIS, M. T.; BERTOLINI, E.; MARTINEZ, M. C.; CARBONELL, E. A.; HERMOSO DE MENDONZA, A.; CAMBRA, M. Estimation of the number of aphids carrying Citrus tristeza virus that visit adult citrus trees. **Virus research**, v. 100, p. 101-108, 2004.

MÜLLER, G. W.; TARGON, M. L. P. N.; CARVALHO, S. A.; SOUZA, A. D.; RODRIGUES, J. C. V. Doenças de citros causadas por vírus e viróides. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J.

(Ed.). **Citros**. Campinas, Instituto Agronômico e Fundag, Cap. 19, p. 569-604, 2005.

OSBORNE, J. W. Improving your data transformations: Applying the Box-Cox transformation. **Practical Assessment, Research & Evaluation**, v. 15, p. 1-9, 2010.

PAIVA, P.E.B. **Distribuição espacial e temporal, inimigos naturais e tabela de vida ecológica de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) em citros em São Paulo**. Tese de doutorado – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 65p. 2009.

PLUKE, R. W. H; QURESHI, J. A.; STANSLY, P. A. Citrus flushing patterns, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) populations and parasitism by *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae) in Puerto Rico. **Florida Entomologist**, v. 91, p. 36-42, 2008.

SERFONTEIN, C. M. A. & H. D. CATLING. Determining the canopy area of citrus trees. **South African Citrus Journal**, v. 413, p. 14-15, 1968.

SÉTAMOU, M.; FLORES, D.; FRENCH, J.V.; HALL, D.G. Dispersion patterns and sampling plans for *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in citrus. **Journal of Economic Entomology**, v. 101, p. 1478–1487, 2008.

SOUTHWOOD, T. R. E.; HENDERSON, P. A. **Ecological Methods**—Blackwell Science. 2000.

SPIEGEL-ROY, P.; GOLDSCHMIDT, E.E. **Biology of citrus**. Cambridge: Cambridge University Press, 230p, 1996.

STOLLER. Citros. Disponível em: <http://www.stoller.com.br/culturas/citros> Acesso em: 10 de outubro de 2016.

TAYLOR, L.R. Aggregation, variance and the mean. **Nature**, v.189, p.732–735, 1961.

TECK, S.L.C.; FATIMAH, A.; BEATTIE, A.; HENG, R.K.J.; KING, W.S. Seasonal population dynamics of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama in Sarawak. **American Journal of Agricultural and Biological Sciences**, v. 6, p. 527–535, 2011.

TSAI, H. T., J. J. WANG, AND Y. H. LIU. Seasonal abundance of the Asian citrus psyllid *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) in southern Florida. **Florida Entomologist**, v.85, p446-451, 2002.

YAMAMOTO, P.T.; PAIVA, P.E.B.; GRAVENA, S. Flutuação populacional de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) em pomares de citros na Região Norte do Estado de São Paulo. **Neotropical Entomology**, v.30, p. 165-170, 2001.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os programas de melhoramento de citros buscam cada vez mais encontrar materiais promissores, seja para características hortícolas ou para mitigação de fatores bióticos e abióticos. Dentre os maiores desafios, está o auxílio ao manejo do Huanglongbing (HLB), doença de maior importância econômica da citricultura na atualidade. Esse estudo buscou avaliar a reação de diferentes combinações de copa e porta-enxerto de citros frente ao HLB, na tentativa de obter algum material que fornecesse condições à menor multiplicação de Las nos tecidos, uma vez que todos os citros são suscetíveis à Las. Entretanto, todos os materiais avaliados se mostraram sensíveis à multiplicação da bactéria.

Pesquisas futuras devem ser realizadas para investigar outras combinações de copa e porta-enxerto bem como a titulação de Las no sistema radicular, para melhor verificar a colonização da bactéria nesses tecidos e compreender melhor a distribuição da mesma na planta, para que mais a frente, esses materiais possam ser indicados a estudos em programas de melhoramento.

O inseto vetor do HLB, o psílideo *Diaphorina citri*, é a praga que transmite o HLB em condições naturais de campo. Esse inseto, assim como outros vetores, ataca principalmente as brotações e folhas mais novas das plantas, sendo necessário cada vez mais o monitoramento nessas brotações atrativas aos insetos. A presente pesquisa buscou avaliar brotações em plantas de citros em condições de campo, estabelecendo critérios de amostragem para determinar um número mínimo de plantas a serem amostradas, com o intuito de transformar essas avaliações em algo menos operoso ao homem do campo. Além disso, determinar a melhor época de amostragem no campo, quando menos plantas deverão ser avaliadas, contribuindo no manejo do controle do psílideo por meio de aplicações de inseticidas na época mais apropriada, ou seja, com maior fluxo de brotações atrativas ao inseto.

Posteriormente, essas recomendações deverão ser transmitidas a produtores e membros do meio acadêmico, para que a aplicação das práticas seja feita em pomares comerciais, com a finalidade de otimizar o tempo de avaliação nos talhões.