

CIRCULAR TÉCNICA

96

Brasília, DF
Novembro, 2021

Huanglongbing dos citros: sintomas, bactérias associa- das, vetores e diagnóstico

Nelson Arno Wulff
Barbara Eckstein
Elaine Cristina Martins
Marcelo Lopes-da-Silva
Marcio Martinello Sanches



1. Huanglongbing¹

O Huanglongbing (HLB) também conhecido como “greening dos citros” tornou-se a maior preocupação dos citricultores em todo mundo, pois representa a maior ameaça à citricultura devido a sua rápida disseminação, severos danos a produção, diminuição da qualidade dos frutos e do suco e a dificuldade de seu controle (Graça; Korsten, 2004). O HLB está presente no sudoeste asiático, na China há mais de cem anos, com sintomas relatados pela primeira vez por Reinking em 1919 e descrito com o nome de Huanglongbing ou “doença do ramo amarelo” por Lin em 1956. Na África, sintomas similares foram descritos por Van De Merwe; Anderson em 1937, com o nome de greening (Bové, 2006; Zheng et al., 2018).

No Brasil, o HLB foi relatado em 2004 no Estado de São Paulo e hoje encontra-se também em Minas Gerais, Mato Grosso do Sul e Paraná (Coletta-Filho et al., 2004; Bassanezi et al., 2020). O HLB está associado a presença de bactérias restritas aos vasos do floema e tem psilídeos como insetos vetores. O HLB afeta todas as variedades de citros, como laranjeiras, tangerineiras, limeiras e limoeiros, não havendo variedades comerciais resistentes a doença. Na família Rutaceae, a família dos citros, há variados graus de suscetibilidade ao HLB, inclusive com espécies resistentes e imunes (Ramadugu et al., 2016; Alves et al.,

¹ **Nelson Arno Wulff**, Biólogo, Doutor em Agronomia, Departamento de Pesquisa & Desenvolvimento, Fundo de Defesa da Citricultura – Fundecitrus, Araraquara, SP, Brasil e Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – UNESP, Araraquara, SP, Brasil, **Barbara Eckstein**.Engenheiro Agrônomo, Doutora em Fitopatologia, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, **Elaine Cristina Martins** .Farmacêutica, Doutoranda em Biotecnologia, Departamento de Pesquisa & Desenvolvimento, Fundo de Defesa da Citricultura – Fundecitrus, Araraquara, SP, Brasil e Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – UNESP, Araraquara, SP, Brasil, **Marcelo Lopes-da-Silva**.Engenheiro Agrônomo, Doutor em Entomologia, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF. **Marcio Martinello Sanches**, Biólogo, Doutor em Agronomia (Proteção de Plantas), Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

2021). Para o manejo do HLB é recomendado o uso de mudas sadias (certificadas) na implantação do pomar, o monitoramento e controle do inseto vetor, a inspeção e erradicação de plantas sintomáticas (Bové, 2006; Fundecitrus, 2019).

Sintomas em citros, indistinguíveis daqueles do HLB e, devidos a diferentes agentes causais, têm sido relatados no Brasil e em outros países em pomares de laranjas, tangerinas e de limas. Esses sintomas, possuem diferente etiologia, vetores, distribuição geográfica, impactos econômicos e não são regulamentados pelo Ministério da Agricultura e Pecuária (Portaria n° 317 MAPA). Relataremos a seguir a sintomatologia associada ao HLB dos citros, a etiologia e seus vetores, bem como sua distribuição e diagnóstico, descrevendo em maiores detalhes sua ocorrência no Brasil e aspectos relevantes de ocorrência global.

2. Sintomas

A constatação da ocorrência de HLB pode ser feita de forma indireta, através da sintomatologia encontrada na planta. O sintoma característico é o mosqueado, caracterizado pela coloração parcialmente verde e amarela do limbo foliar, sem uma delimitação clara entre as cores e em casos mais intensos levando a clorose assimétrica (Figura 1). Folhas amareladas, com o limbo clorótico exibindo deficiência mineral, particularmente de zinco, manganês e ferro é comum em plantas com HLB. Em alguns casos, pode ocorrer espessamento e clareamento das nervuras foliares que ficam com aspecto corticoso assim como amarelamento do limbo ao longo da nervura (Figura 1).

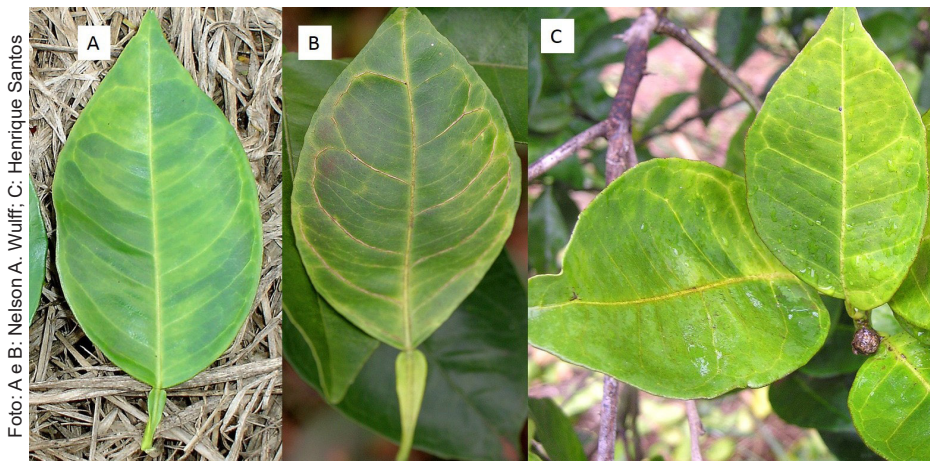


Figura 1. Sintoma típico do HLB em laranja-doce, folhas com mosqueado, nervura espessa e nervuras amarelas.

Nas plantas infectadas com HLB, os ponteiros ficam com as folhas cloróticas, destoando do restante da planta, podendo haver queda pronunciada de folhas e de frutos, progredindo para a morte de ponteiros (Figura 2).



Foto: Henrique Santos/Fundecitrus

Figura 2. Sintoma típico do HLB em laranjeira-doce, ramos amarelados e folhas caídas.

Entretanto, folhas com mosqueado não são exclusividade de plantas com HLB. Citros com *stubborn* (causado por *Spiroplasma citri*) podem ter sintomas semelhantes (Shi et al., 2014). Vale ressaltar, porém, que não há relatos da ocorrência de citros com *stubborn* no Brasil, sendo que esse patógeno é regulamentado como Praga Quarentenária Ausente (PQA) (Instrução Normativa N. 39, de 1 de outubro de 2018, do MAPA). Com relação aos frutos, nas plantas com HLB, eles podem ser deformados, sem sementes e apresentarem maturação invertida (Figura 3), ou seja, o amadurecimento se inicia na extremidade peduncular, causando queda prematura, enquanto no fruto sadio, a maturação inicia-se na extremidade estiletar.

Foto: A. Henrique Santos/Fundecitrus. B. Nelson A. Wulff.

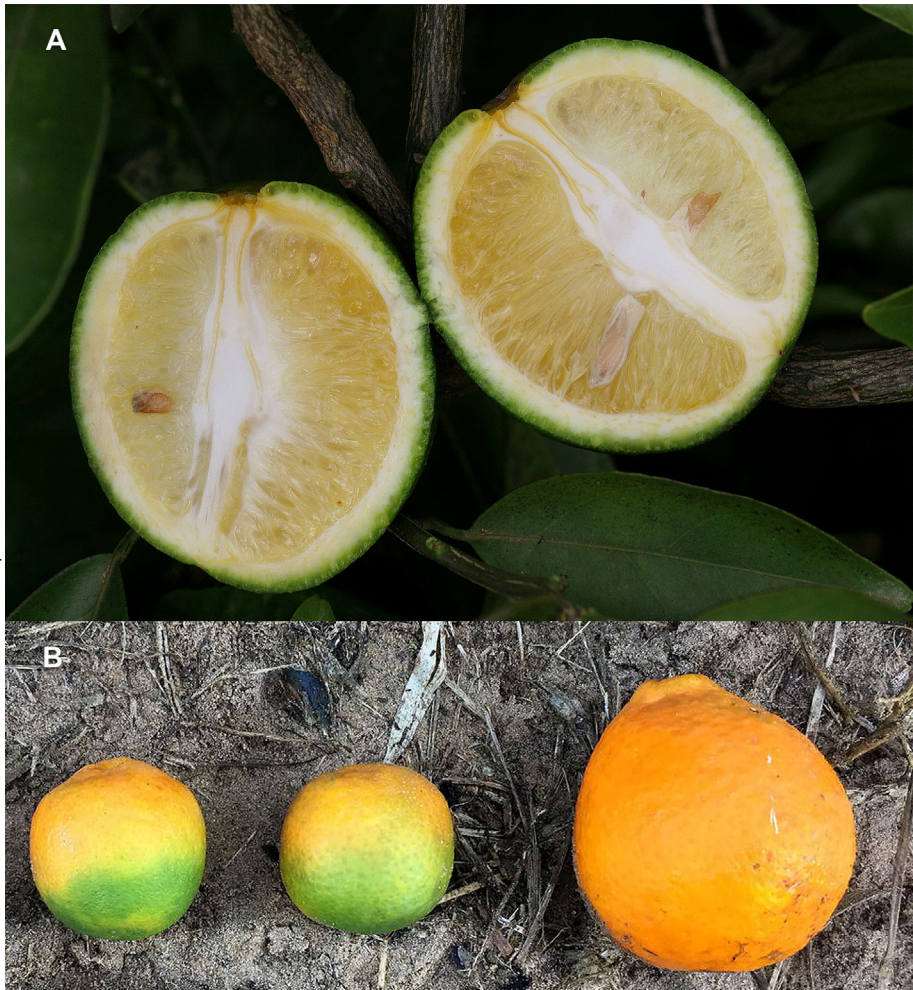


Figura 3. Fruto assimétrico de laranja-doce com HLB, com columela escurecida e semente abortada (A) e fruto de tangerina, menores e com inversão de cor (esquerda e centro, em comparação ao sadio, à direita; B).

Os sintomas causados pelas infecções das liberibactérias e dos fitoplasmas associados ao HLB são idênticos: as plantas infectadas têm folhas com mosqueado ou limbo amarelado e os

frutos ficam deformados. Há maior volume de informações sobre a sintomatologia em plantas infectadas com liberibactérias do que com fitoplasmas, porém não há forma de separar os sintomas ocasionados pelos dois tipos de bactérias (Figura 4).

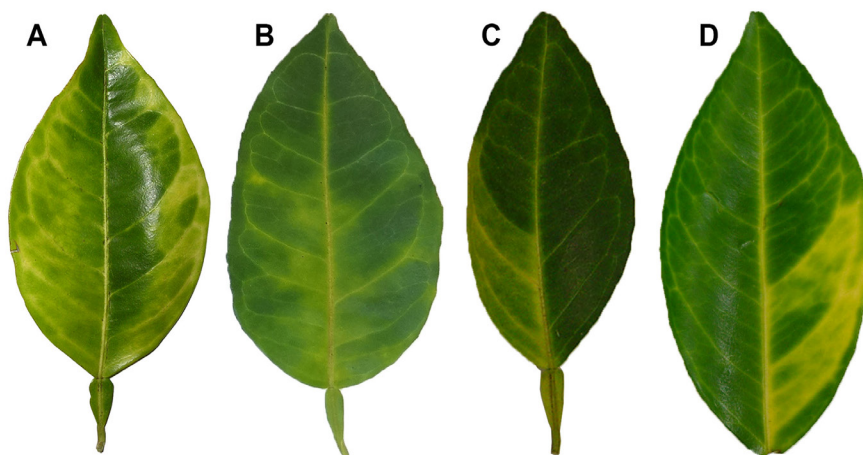


Foto: A. Nelson A. Wulff, B. C e D. Jean M. Martins/Fundecitrus

Figura 4. Sintoma de mosqueado em folhas de laranjeira causado por ‘*Candidatus Liberibacter americanus*’ (A), ‘*Ca. L. asiaticus*’ (B), fitoplasma do grupo 16SrIII (C) e 16SrIX (D).

Em função da similaridade de sintomas, ambos os grupos de bactérias são descritos como associadas aos sintomas de HLB. Em termos de legislação, a Portaria 317 do MAPA, de 21 de maio de 2021, estabelece as medidas de prevenção e controle da praga HLB, que tem como agente etiológico as bactérias do gênero ‘*Candidatus Liberibacter spp.*’ e não há menção à ocorrência de fitoplasmas associados aos sintomas de HLB. De qualquer maneira, como os sintomas e a natureza infecciosa da doença são comuns entre si, a melhor medida é realizar o manejo da doença com base na sintomatologia, de forma análoga ao que se faz com ‘*Ca. Liberibacter spp.*’

Enquanto a sintomatologia em laranjeiras-doces é bem caracterizada, face à extensão da cultura principalmente nos estados brasileiros onde a doença está presente, nos demais cítricos o diagnóstico por sintomas merece considerações particulares. Folhas com mosqueado e frutos assimétricos também são encontrados em tangerinas, limas e limões. Plantas jovens podem apresentar brotações novas amareladas em ramos com HLB ou decorrentes de deficiência mineral, mais comum no início do inverno, decorrente da queda de temperatura. A clorose generalizada não é específica de HLB, podendo se manifestar em decorrência de gomose provocada por *Phytophthora* spp.

Nas diversas tangerineiras a sintomatologia do mosqueado pode gerar dúvida, em função da severidade dos sintomas, principalmente pela similaridade às deficiências nutricionais (Figura 5). Na tangerineira Ponkan a severidade dos sintomas é grande e as plantas ficam improdutivas, rapidamente.

Foto: Davidson F. Rodrigues/Fundecitrus.

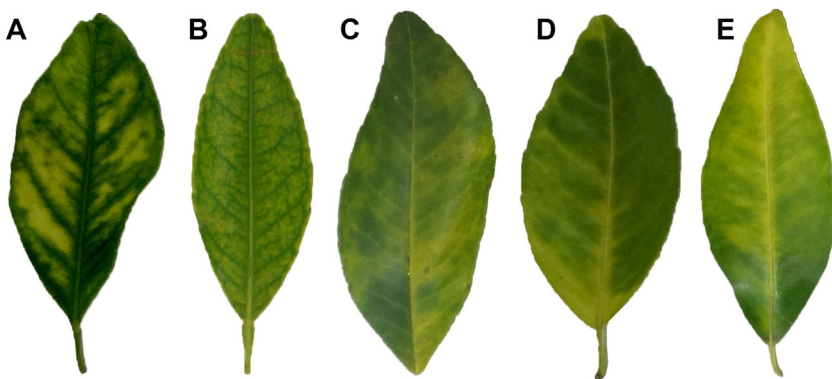


Figura 5. Sintoma de mosqueado em folhas de tangerineiras com HLB: mexerica montenegrina (A), tangerina (B), Ponkan (C), murcote (D) e tangerina Clemenules (E).

No caso dos limões-verdadeiros a sintomatologia de HLB merece consideração especial (Pancionni, 2015). Mesmo que o hospedeiro seja suscetível e sofra os efeitos da infecção, a severidade é menor em laranjeiras e tangerineiras. A sintomatologia típica de mosqueado não parece ser específica, visto que ocorrem sintomas muito similares em folhas de limoeiros cujo diagnóstico molecular não encontra as bactérias associadas ao HLB, podendo ser facilmente confundidas com deficiências minerais (Figura 6).

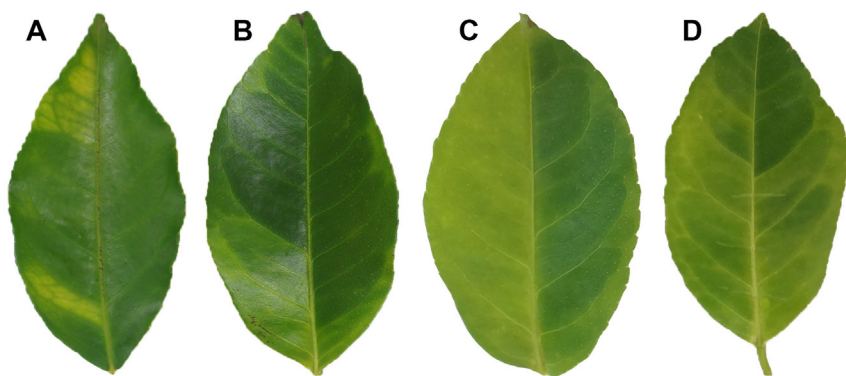


Foto: Daniela A. B. Coletti/ Fundecitrus.

Figura 6. Sintoma de mosqueado em folhas de limoeiro verdadeiro. A. 'Eureka' sem HLB; B. 'Eureka' com HLB; C. 'Siciliano' sem HLB; D. 'Siciliano' com HLB.

No limoeiro (limeira) Cravo e na Cidra o sintoma de mosqueado é bem típico. Na limeira ácida Tahiti (limão Tahiti) é frequentemente mencionado que os sintomas são menos severos (Figura 7).

Foto: Daniela A. B. Coletti/ Fundecitrus.

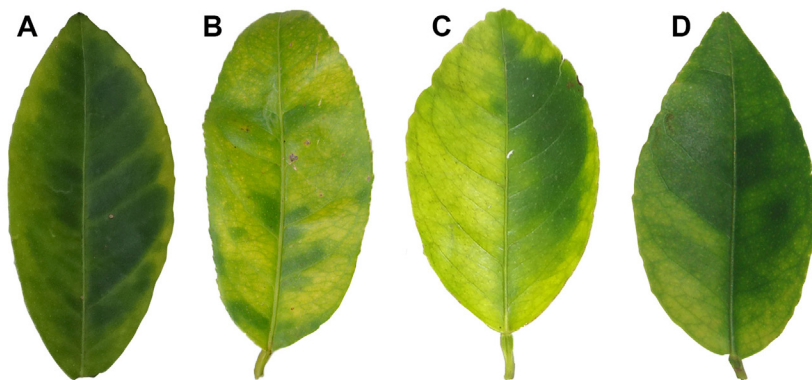


Figura 7. Sintoma de mosqueado em folhas de limoeiro cravo (A), em Cidra (B) e em limeira ácida Tahiti (C e D)

É importante mencionar que na lima ‘Tahiti’ os sintomas são similares aos observados nas laranjeiras e parte das dúvidas advém de sintomas de um problema denominado *wood pocket*, uma variação genética encontrada em clones de ‘Tahiti’ que geram manchas amareladas no limbo foliar (Figura 8) e formações longitudinais nos frutos.

Lesões no caule ou no pecíolo podem causar interferência na circulação da seiva e induzir sintomas similares ao mosqueado. O amarelecimento das folhas por gomose pode ser confundido com HLB. Nesses casos, uma inspeção detalhada na planta pode evitar a falsa interpretação, ao propiciar a observação de lesões no caule e ramos ou sintomas da gomose em outros órgãos. Encharcamento de mudas em viveiro pode ocasionar o amarelecimento de folhas, enquanto a variegação tem coloração bem distinta das manchas verde e amarelo presente em folhas com mosqueado (Figura 8).

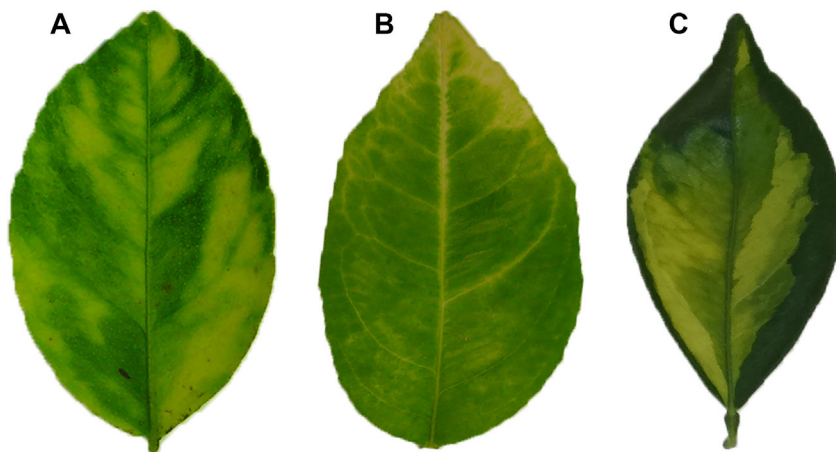


Foto: Daniela A. B. Coletti/ Fundecitrus.

Figura 8. Sintomas foliares que podem ser confundidos com HLB. *Wood pocket* em limeira ácida Tahiti (A); Amarelecimento foliar causado por encharcamento em muda de laranjeira-doce (B) e Variação em folha de laranjeira-doce (C).

3. Agentes etiológicos

3.1. HLB - *Candidatus Liberibacter* spp.

Os agentes etiológicos associados ao HLB são bactérias gram-negativas, de colonização restrita ao floema das plantas, denominadas '*Candidatus Liberibacter* spp.', pertencentes à subdivisão α -Proteobacteria. Além das plantas, estas bactérias conseguem sobreviver e se multiplicar em artrópodes vetores (Jagoueix, 1994). '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' é a bactéria mais cosmopolita associada ao HLB, encontrada na Ásia, Américas e de limitada amplitude na África. '*Ca. L. africanus*' é restrita à África, enquanto '*Ca. L. americanus*' foi encontrada somente no Brasil. O status quarentenário dessas bactérias para o Brasil está descrito na Tabela 1. Pelo fato dessas bactérias não serem

cultivadas axenicamente, isto é, em meio de cultivo in vitro na forma pura e, de serem caracterizadas principalmente através de métodos moleculares, denota a necessidade de se utilizar o epíteto '*Candidatus*' em itálico e com aspas na frente do gênero *Liberibacter* (Jagoueix et al., 1994; Teixeira et al., 2010). A relação causal do HLB com '*Candidatus Liberibacter* spp.' é associativa, exatamente pela impossibilidade do cultivo dessas bactérias e do cumprimento dos postulados de Koch.

Entretanto, há muitas evidências de que sejam realmente essas bactérias as causadoras do HLB e por uma questão de conceito, são descritas como associadas ao HLB. A impossibilidade do cultivo in vitro não impediu que técnicas de diagnóstico com base em marcadores moleculares fossem desenvolvidas e que o genoma dessas bactérias fosse completamente sequenciado. Porém, pouco se sabe sobre os mecanismos que induzem a sintomatologia na planta hospedeira. A ocorrência de '*Ca. L. asiaticus*' e de '*Ca. L. americanus*' no Brasil sofreu uma inversão na frequência de ambas as bactérias. Enquanto no início, a epidemia associada a '*Ca. L. americanus*' era predominante, a partir de 2007 '*Ca. L. asiaticus*' passou a ser mais frequente e a partir de 2013 teve dominância absoluta, com índices próximos a 99,9% de prevalência.

Tabela 1. Status quarentenário para o Brasil das bactérias ‘*Ca. Liberibacter*’ associadas a HLB dos citros.

Agente etiológico	Status Quarentenário	Estados de Ocorrência	Legislação	
‘ <i>Candidatus</i> <i>Liberibacter africanus</i> ’	Praga Quarentenária (PQA)	Quarentenária Ausente	Não se aplica	Instrução Normativa nº 39, de 1 de outubro de 2018
‘ <i>Candidatus</i> <i>Liberibacter asiaticus</i> ’	Praga Quarentenária (PQP)	Quarentenária Presente	São Paulo, Paraná, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul	Instrução Normativa nº38, de 1 de outubro de 2018 e IN nº 26 de 10 de setembro de 2019
‘ <i>Candidatus</i> <i>Liberibacter americanus</i> ’	Praga Quarentenária (PQP)	Quarentenária Presente	São Paulo, Paraná, Minas Gerais	Instrução Normativa nº 38, de 1 de outubro de 2018

3.2. Doenças associadas à fitoplasmas

No campo não há distinção entre plantas cítricas infectadas com ‘*Ca. L. asiaticus*’, ‘*Ca. L. americanus*’ ou fitoplasmas (Figura 1), exceto no caso de sintomas de vassoura de bruxa da lima, causada por fitoplasma (Teixeira et al., 2010; Bassanezi et al., 2020; Zreik et al., 1995).

Em 2007, Teixeira e colaboradores identificaram um fitoplasma do grupo 16SrIX em plantas sintomáticas para HLB no estado de São Paulo, posteriormente detectado nos estados de Minas Gerais, Bahia e Distrito Federal (Teixeira et al., 2008b; Wulff et al., 2015; Sanches et al., 2016) e no México (Wulff et al., 2015). Os fitoplasmas são bactérias sem parede celular, pertencentes à classe Mollicutes que habitam e se multiplicam em vasos do floema das plantas e em insetos vetores (sugadores de seiva do floema). Assim como as liberibactérias,

a grande maioria dos fitoplasmas não são cultiváveis em meio de cultura, o que dificulta os estudos das doenças associadas a estes patógenos (Bertacini, 2007). Globalmente há uma gama de fitoplasmas associados aos sintomas de HLB, sendo usualmente encontrados em infecção simples ou mista com Liberibactérias: na China foram relatados os grupos 16SrI-B e 16SrII-A, no México os grupos 16SrI-B, 16SrI-S e 16SrIX, na Índia o grupo 16Sr VI e no Irã do grupo 16SrII-C (revisado em Wulff et al., 2019). Fitoplasmas dos grupos 16SrIII e VII foram identificados em plantas com sintomas de HLB no Estado de São Paulo e Minas Gerais (Barbosa et al., 2021a, 2021b; Wulff et al. 2019). A ocorrência de fitoplasmas e de '*Candidatus Liberibacter spp.*' na mesma planta é rara, primeiramente pelo fato da ocorrência de fitoplasmas ser baixa, visto que levantamentos de plantas sintomáticas em pomares mostram que os fitoplasmas do grupo 16SrIII e 16SrIX são encontrados a taxas de 0,2 a 0,3%, enquanto '*Ca. L. asiaticus*' é encontrado em torno de 99,7 a 99,9% das plantas sintomáticas (Wulff et al., 2019). Embora haja uma gama de fitoplasmas atualmente descritos em citros, com sintomas associados a HLB, o primeiro fitoplasma descrito em citros causa sintomas de vassoura de bruxa, conhecida como *witches'-broom disease of lime* em uma lima semelhante à lima galego, um fitoplasma do grupo 16SrII (Zreik et al., 1995). Este fitoplasma foi detectado em MG em plantas cítricas assintomáticas, portanto, não há descrição da doença no Brasil (Silva et al., 2014).

4. Distribuição geográfica

No Brasil, o HLB foi oficialmente relatado nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Paraná e Mato Grosso do Sul (Tabela 1). Ocorre, igualmente, nos países vizinhos Argentina, Paraguai, Colômbia e Venezuela (Figura 9). Nestes casos, a indicação é da presença do HLB no país, não necessariamente de que todas as regiões tenham a doença.



Figura 9. Estados do Brasil onde o HLB foi oficialmente constatado e países da América do Sul com relatos de ocorrência de HLB ³. A indicação de presença em todo o território dos países sul-americanos (exceto Brasil) é meramente ilustrativa e não corresponde a ocorrência do HLB em todas as regiões do país.

Os fitoplasmas do grupo IX estão presentes em pomares de citros da Bahia, Distrito Federal, Minas Gerais e São Paulo, enquanto o fitoplasma do grupo III foi encontrado em pomares de citros dos estados de São Paulo e Minas Gerais.

Em termos mundiais o número de países com relato confirmado da presença de huanglongbing sofre incremento gradual e dados atualizados podem ser encontrados em CABI - *Invasive Species Compendium*⁴ buscando-se a palavra-chave huanglongbing, sendo que em abril de 2021 sua presença estava relatada em 65 países.

5. Vetores e outros hospedeiros

As liberibactérias que causam o HLB em citros no Brasil são transmitidas pelo psíldeo asiático dos citros, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae), transmissor de ‘*Ca. L. asiaticus*’ e de ‘*Ca. L. americanus*’. Presente no Brasil desde a década de 40 (Parra et al., 2010) na maior parte das regiões brasileiras, este psíldeo ganhou importância com a descoberta do HLB em 2004 (Coleta-Filho et al., 2004). Nesta circular técnica, registra-se a primeira ocorrência de *D. citri* no Distrito Federal em pomar de citros do Núcleo Rural Alexandre Gusmão, Brazlândia (coordenadas 15°43’1,8” S 48°09’38,8” W) em coletas realizadas no mês de novembro de 2016. De acordo com levantamento bibliográfico, até o momento não se encontram registros de *D. citri* no Brasil nas seguintes unidades da federação: Acre, Amapá, Paraíba, Piauí, Rio Grande do Norte e Rondônia (Barreto et al., 2020; Burckhardt; Queiroz, 2012, Chirardia et al., 2006; Queiroz et al., 2017; Silva et al., 2017).

O psíldeo *Trioza erytrae* é o transmissor de ‘*Ca. L. afri-*

canus' na África e oriente médio. Na península Ibéria o psílideo *T. erythraeae* está presente, sem ocorrência de *Liberibacter* associado ao HLB (Pérez-Otero et al., 2015). *D. citri* está disseminado de forma cosmopolita na Ásia e Américas sendo relatado na parte oriental da África continental.

D. citri se alimenta preferencialmente em brotações e ramos novos de plantas, exclusivamente na família das rutáceas como os citros e a murta, embora haja outras espécies referidas como hospedeiras nessa família (Parra et al., 2010). As fêmeas de *D. citri* colocam ovos, até 800 por indivíduo, de cor alaranjada, aderidos às folhas de brotações novas. O tempo de incubação dos ovos é em média de quatro dias. As ninfas passam por cinco ínstaes (quatro mudas), e são geralmente de cor alaranjada-claro (Hall, 2008). As ninfas, a partir da primeira muda já possuem brotos alares (rudimentos das asas em desenvolvimento), excretam substâncias açucaradas e uma substância cerosa que formam filamentos para a sua proteção conhecido como *honeydew*. Quando atingem a fase adulta, possuem em torno de 2 a 3 mm de comprimento, com o corpo de coloração castanho-amarelada, com as pernas de cor castanho-esverdeada. As asas são transparentes com pontos esbranquiçados e uma banda larga de cor bege no centro (Figura 10). São encontrados na porção terminal das plantas com a posição da cabeça inclinada, formando um ângulo de 45° (Hall, 2008). O ciclo ovo/adulto é variável, durando 15 dias no verão a até 40 dias no inverno (Parra et al., 2010).

O caso da murta (falsa-murta, murta de cheiro; *Murraya paniculata*), uma planta ornamental no qual o inseto vetor do HLB se prolifera abundantemente é importante, visto que pode ser um agente disseminador da doença a longas distâncias no transporte de mudas, principalmente pelo seu uso em arborização urbana e jardinagem como cerca viva (Lopes et al., 2010; Parra et al., 2010; Cifuentes-Arenas et al., 2019).

Foto: Henrique Santos/Fundecitrus



Figura 10. Psilídeo asiático dos citros (*Diaphorina citri*) adulto e ninfas. Observe a posição em ângulo de 45° de adulto alimentando-se na planta. Nas ninfas é possível observar a excreção produzida, conhecida como *honeydew* (material esbranquiçado na ninfa localizada na forquilha).

Os vetores dos fitoplasmas são insetos conhecidos como cigarrinhas. Pertencem à ordem Hemiptera e às famílias Cicadellidae, Cixiidae, Flatidae, Debidae e, raramente, Tingidae e Pentatomidae, além de Psyllidae (Wilson; Weintraub, 2007). No caso da família Cicadellidae, a subfamília Deltocephalinae possui um número expressivo de vetores de fitoplasmas, englobando 75% das espécies conhecidas como vetores de tais bactérias (Wilson; Weintraub, 2007). Nessa família, as espécies são altamente polífagas, comumente encontradas em plantas invasoras de pomares e também em cultivos adjacentes a estes. Até o momento apenas membros do gênero *Scaphytopius* foram apontados como potenciais vetores do fitoplasma 16SrIX em citros, sendo a espécie *S. marginelineatus* confirmada como portador desse fitoplasma (Marques, 2012; Lopes da Silva et al., 2020). No entanto, outras espécies de *Scaphytopius* são potencialmente vetoras. As cigarrinhas do gênero *Scaphytopius*

spp. são facilmente reconhecidas pela cabeça triangular com a face prolongada, sendo levemente curvada para cima (Zanol, 2000) (Figura 11). Para os fitoplasmas do grupo 16SrIII a cigarrinha *Agalia albidula* foi considerada um potencial vetor para citros, pela detecção do fitoplasma em indivíduos desta espécie, em pomares (Barbosa et al., 2021b).



Foto: Marcelo Lopes-Silva

Figura 11. Espécimen de *Scaphytopius* sp. coletado em pomar de citros. Observe a cabeça triangular com a face prolongada.

Fitoplasmas do grupo 16SrIX também foram encontrados em plantas de Crotalária (*Crotalaria juncea*) usada como adubação verde (Wulff et al., 2015) e no picão-preto (*Bidens pilosa*), guanxuma (*Sida* sp.) e *Euphorbia* sp., plantas daninhas em pomares de citros (Lopes da Silva et al., 2020). Fitoplasmas do grupo III também foram encontrados em plantas de *B. pilosa* e *Leonurus*

sibiricus em pomares de citros (Barbosa et al., 2021b).

6. Diagnose

O diagnóstico do HLB pode ser feito com foco nos indicadores sintomatológicos do hospedeiro ou na identificação do agente causal, utilizando-se os testes moleculares e sorológicos ou as observações microscópicas. A diagnose da doença no campo, com base nos sintomas, requer treinamento adequado e depende da experiência do observador e do estágio de desenvolvimento dos sintomas.

Como ferramenta laboratorial, a microscopia eletrônica é uma técnica muito importante na detecção dos patógenos, porém é considerada laboriosa e não apropriada como metodologia de rotina diagnóstica. Outra opção é a sorologia, mas além de requerer a disponibilidade de antissoro, sua sensibilidade não é comparável àquela das técnicas moleculares. Apesar dessa dificuldade, com a produção de proteínas heterólogas, foi possível desenvolver um ensaio sorológico adequado para o estudo da distribuição de '*Ca. L. asiaticus*' em plantas (Ding et al., 2016).

O método mais utilizado para a detecção das bactérias responsáveis pelo HLB é a reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR), uma técnica consolidada e que se baseia na amplificação de fragmentos de DNA. Vários métodos têm sido desenvolvidos e atualmente a PCR quantitativa em tempo real (qPCR) tem sido considerado o método mais rápido, sensível e específico para detecção do HLB, usando oligonucleotídeos específicos para cada patógeno e, eventualmente, de sondas hidrolisantes. Raiz, caule, frutos e folhas podem ser utilizados para extração do DNA visando a realização das reações de PCR ou qPCR, porém devido a facilidade de identificação de sintomas e manuseio, as folhas são as amostras ideais para testagem.

A coleta de amostras deve ser feita dando preferência às folhas sintomáticas, sobretudo as que tenham mosqueado e devem ser enviadas ao laboratório devidamente identificadas. Para a detecção do HLB não é recomendada a coleta de amostras composta de folhas de diversas plantas. A amostra deve ser individualizada para cada planta para permitir o manejo adequado conforme o resultado da análise. Na Tabela 2 encontram-se sequências de oligonucleotídeos e sondas usados nas reações de PCR e de qPCR para detecção das bactérias associadas ao HLB que os autores utilizam frequentemente para a detecção, identificação e diagnose de bactérias associadas ao HLB no Fundecitrus. A detecção de ‘*Ca. L. asiaticus*’ e ‘*Ca. L. americanus*’ pode ser feito com os pares de oligonucleotídeos A2/J5 e GB1/GB3 em conjunto, em reação PCR convencional duplex (Teixeira et al., 2008b), enquanto o protocolo de Jagoueix et al. (1994) permite a detecção de ‘*Ca. L. asiaticus*’ e de ‘*Ca. L. africanus*’. Os fitoplasmas são tradicionalmente identificados com a PCR utilizando os oligonucleotídeos P1 e P7 seguido de outra PCR (*Nested* PCR) com os oligonucleotídeos R16mF2/R16mR1. Alternativamente o protocolo universal com sonda hidrolisante pode ser empregado (Christensen et al., 2004) ou a qPCR específica para o fitoplasma do grupo 16SrIX pode ser empregado (Wulff et al., 2015). No caso de qPCR para as liberibactérias, há uma gama de opções para a detecção e a quantificação. A detecção de *Liberibacter* em psilídeos (Teixeira et al., 2008a; Wulff et al., 2020) ou de fitoplasmas em cigarrinhas (Barbosa et al., 2021a, 2021b; Marques et al., 2012; Lopes da Silva et al., 2020) através de PCR é uma forma de identificar potenciais vetores e realizar estudos de infectividade nestes insetos.

A detecção de liberibactérias e de fitoplasmas pode ser realizada através de PCR ou de qPCR e no caso de HLB é recomendado o uso de amostras sintomáticas. No caso de amostras assintomáticas, devido a irregularidade na distribuição das

bactérias na planta, a ausência de sintomas não permite uma adequada amostragem, sendo este o fator limitante, mais do que o título da bactéria nessas amostras ou a sensibilidade da PCR. A quantificação de liberibactérias foi obtida com o uso da PCR digital (dPCR) que proporciona incremento na detecção em amostras com baixo título bacteriano (Selvaraj et al., 2018). O uso de imagens para a detecção de HLB desponta como uma abordagem, ainda restrita a laboratórios (Pereira et al., 2010; Pontes et al., 2020) e sistemas automatizados, que permitiriam o escalonamento no seu uso, como por, exemplo, com o auxílio de *drones* ainda não é uma realidade (Garcia-Ruiz et al., 2013).

Tabela 2 – Lista de primers e sondas para a detecção de ‘*Ca. L. asiaticus*’, ‘*Ca. L. americanus*’ e fitoplasmas através de PCR.

^a As sondas hidrolisantes (por exemplo do tipo TaqMan®) utilizam um fluoróforo na extremidade 5’ e um quencher na extremidade 3’ da sequência indicada

Alvo	Nome do primer	Sequência 5'-3' (sondas com fluoróforo e quencher) ^a	Tipo de PCR	Referência
Universal Fitoplasma	P1	AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT	PCR	Deng and Hiruki, 1991 Schneider et al., 1995
	P7	CGTCCTTCATCGGCTCTT		
Universal Fitoplasma	fU5	CGGCAATGGAGGAAACT	Nested PCR	Seemüller et al., 1994
	rU3	TTCAGCTACTCTTTGTAACA		
Universal Fitoplasma	R16mF2	CATGCAAGTCGAACGGA	Nested PCR	Gundersen and Lee, 1996
	R16mR1	CTTAACCCCAATCATCGAC		
Universal Fitoplasma	Forward	CGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGA	qPCR	Christensen et al., 2004
	Probe	TGACGGGACTCCGCACAAGCG		
	Reverse	TCTTCGAATTAACAACATGATCCA		
Fitoplasma grupo 16SrIX	FITf	AACGAAGGTTTACGTTTAAACAAGAC)	qPCR	Wulff et al., 2015
	FITp	CGATCTGCTCTCCCTTTTGCCCTAG		
	FITr	GAGGTGCGACTACTATTGTAATAG)		
‘ <i>Ca. L. americanus</i> ’	GB1	AAGTCGAGCGAGTACGCAAGTACT	PCR	Teixeira et al., 2005
	GB3	CCAACCTAATGATGGCAA ATATAG		
‘ <i>Ca. L. asiaticus</i> ’	RPLA2	TATAAAGGTTGACCTTTCGAGTTT	PCR	Hocquet et al., 1999
	RPLJ5	ACAAAAGCAGAAATAGCACGAACAA		
‘ <i>Ca. L. africanus</i> ’ e ‘ <i>Ca. L. asiaticus</i> ’	OA1	GCGCGTATTTTATACGAGCGGCA	PCR	Jagoueix et al., 1994
	OI1	GCGCGATGCAATACGAGCGGCA		
	OI2c	GCCTCGGACTTCGCAACCCAT		
‘ <i>Ca. L. asiaticus</i> ’ e ‘ <i>Ca. L. americanus</i> ’	HLBas	TCGAGCGCGTATGCAATACG	qPCR	Li et al., 2006
	HLBam	GAGCGAGTACGCAAGTACTAG		
	HLBr	GCGTTATCCCGTAGAAAAAGGTAG		
	HLBp	AGACGGGTGAGTAACGCG		
‘ <i>Ca. L. asiaticus</i> ’	f-rpLAs	CGCCC GTTCCGTTGT	qPCR	Teixeira et al., 2008a
	r-rpLAs	AGCCTCTTTAAGCCCTAAATCAG		
‘ <i>Ca. L. americanus</i> ’	f-rpJAm	GGACAAGGGGATATTGGATAATGATG	qPCR	Teixeira et al., 2008a
	r-rpJAm	ATTAAGAGTTCTA AGCAACCTGACAG		
‘ <i>Ca. L. asiaticus</i> ’	RNR-f	CATGCTCCATGAAGCTACCC	qPCR	Zheng et al., 2016
	RNR-p	CCTCGAAATCGCCTATGCAC		
	RNR-r	GGAGCATTTAACCCACGAA		

7. Impactos e importância

Após a infecção da planta por quaisquer desses patógenos não há medida que possa curá-la. Os impactos são considerados altos e ocorrem devido à queda de produção, queda da qualidade da fruta, perda de longevidade dos pomares, redução da área de cultivo e aumento dos custos de produção, onde a severidade dos sintomas é um bom indicador da perda de produção no pomar. A proporção da queda de frutos está diretamente relacionada ao avanço da doença, em alguns casos a redução na produção de frutos pode chegar a 100%. Além da queda precoce, os frutos sintomáticos são em geral menores e apresentam-se mais ácidos e com menores valores de Brix, reduzindo a qualidade do suco (Bassanezi et al., 2009, 2011, 2020). Em laranjeiras com cinco a 12 anos, os sintomas chegam a ocupar mais de 50% da copa e reduzir a produção em mais de 60% em apenas quatro anos após o aparecimento do primeiro ramo sintomático. A queda de frutos varia segundo o volume afetado da copa podendo chegar a 80% (Fundecitrus, 2019).

A rápida disseminação da doença entre os talhões do pomar e dos pomares vizinhos se deve à alta capacidade de dispersão em longas distâncias do inseto transmissor das bactérias. Em São Paulo - Brasil, e Flórida - EUA, às duas maiores regiões produtoras de laranja do mundo, o HLB afetou 21% e 90% das plantas, respectivamente (Girardi et al., 2017). O controle de psilídeos tem recomendação específica para a cultura dos citros (Fundecitrus, 2019).

Ainda não existem estudos para estimar os impactos dos fitoplasmas em citros. Entretanto, por sua baixa incidência e potencialmente pelos vetores serem cigarrinhas, o manejo recomendado é similar ao do HLB, afinal a doença é infecciosa.

A distribuição do HLB no Brasil revela áreas livres dos

patógenos, enquanto o psilídeo é descrito como presente em quase todas as áreas citrícolas. Esforço deve ser feito para evitar a entrada dos agentes etiológicos em áreas livres da doença, via disseminação por insetos ou por mudas infectadas (citros, murta, etc.), a partir das áreas afetadas de forma a preservar o potencial produtivo em regiões indenens, assim como manter a vantagem competitiva frente às áreas endêmicas.

Agradecimentos

A equipe de diagnóstico do Fundecitrus Daniela A. B. Coletti, Deividson F. Rodrigues e Jean M. Martins; Valmir A. Campos pela editoração de imagens. Julio C. Rodrigues pela editoração do mapa. A Embrapa e FAP-DF pelo auxílio financeiro.

8. Referências:

ALVES, M. N.; LOPES, S. A.; RAIOL-JR., L. L.; WULFF, N. A.; GIRARDI, E.; OLLITRAULT, P.; PEÑA, L. Resistance to '*Candidatus Liberibacter asiaticus*', the huanglongbing associated bacterium, in sexually and/or graft-compatible *Citrus* relatives. **Frontiers in Plant Science**, v.11, n. 617664, 2021.

BARBOSA, J. C. ; ECKSTEIN, B. ; INOUE-NAGATA, A. K. ; BERGAMIN FILHO, A. ; BEDENDO, I. Molecular delineation of a phytoplasma representative of the novel 16SrVII-G subgroup found in citrus trees with huanglongbing symptoms. **Journal of Plant Diseases and Protection**, 2021a. DOI: <https://doi.org/10.1007/s41348-021-00532-0>.

BARBOSA, J. C.; GASPAROTO, M.C.G.; ECKSTEIN, B. BERGAMIN FILHO, A.; BEDENDO, I. P. Potential reservoirs of a '*Candidatus Phytoplasma pruni*'-related strains (16SrIII-X) associated with HLB-like symptoms in citrus in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v.46, p.163-168, 2021b.

BARRETO, M. R.; QUEIROZ, D. L.; BURCKHARDT, D.; FOERSTER, L. A. Check-list of jumping plant-lice (Hemiptera, Sternorrhyncha, Psylloidea) from Mato Grosso, Brazil. **Ciência Florestal**, v. 30, v.3, p. 873-884, 2020.

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.; DE MIRANDA, M. P. ; WULFF, N. A.; VOLPE, H. X. L.; AYRES, A. J. Overview of citrus huanglongbing spread and management strategies in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 45, p. 251-264, 2020.

BASSANEZI, R. B.; MONTESINO, L. H.; GASPAROTO, M. C. G.; BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. Yield loss caused by huanglongbing in different sweet orange cultivars in São Paulo, Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, v.130, p. 577-586, 2011.

BERTACINI, A. Phytoplasmas: diversity, taxonomy and epidemiology. **Frontiers in Bioscience**, v. 12, p. 673-689, 2007.

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

BURCKHARDT, D., QUEIROZ, D. L. Checklist and comments on the jumping plant-lice (Hemiptera: Psylloidea) from Brazil. **Zootaxa**, v. 3571, n. 1, p.26-48, 2012.

CHIRARDIA, L. A.; MILANEZ, J. M.; THEODORO, G. F.; BERTOLLO, E. C. Ocorrência de *Diaphorina citri* no Estado de Santa Catarina. **Agropecuária Catarinense**, v. 19, p. 94-96, 2006.

CHRISTENSEN, N. M.; NICOLAISEN, M.; HANSEN, M.; SCHULZ, A. Distribution of phytoplasmas in infected plants as revealed by real-time PCR and bioimaging. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v.17, p.1175–1184, 2004.

CIFUENTES-ARENAS, J. C.; BEATTIE, G. A. C.; PEÑA, L.; LOPES, S. A. *Murraya paniculata* and *Swinglea glutinosa* as short-term transient hosts of 'Candidatus Liberibacter asiaticus' and implications for the spread of Huanglongbing. **Phytopathology**, v.109, p.2064-2073, 2019.

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

DENG, S.; HIRUKI, C. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and non-culturable Mollicutes. **Journal of Microbiological Methods**, v.14, p.53-61, 1991.

DING, F.; DUAN, Y.; YUAN, Q.; SHOA, J.; HARTUNG, J. S. Serological detection of 'Candidatus Liberibacter asiaticus' in citrus, and identification by GelC-MS/MS of a chaperone protein re-ponding to cellular pathogens. **Scientific Reports**, v. 6, 29272, 2016.

FUNDECITRUS. Fundo de Defesa da Citricultura. "**Dez mandamentos**" contra o greening: me-didas para controlar a praga. 2019. Disponível em: <https://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/manuais>. Acesso em: 7 julho 2021.

GARCIA-RUIZ, G.; SANKARAN, S.; MAJA, J. M.; LEE, W. S.; RASMUSSEN, J.; EHSANI, R. Comparison of two aerial imaging platforms for identification of Huanglongbing-infected citrus trees. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 91, p. 106-115, 2013.

GIRARDI, E. A.; MILORI, D. M. B. P.; MARINHO-PRADO, J. S.; NAVA, D. E.; SANTOS, I. R. I.; STUCHI, E. S.; ASTUA, J. DE F.; GURGEL, F. DE L.; SA, L. A. N. DE; SANCHES, M. M.; ANDRADE, E. C. DE; BARBOSA, F. F. L. **Relatório Corporativo da I Reunião Técnica do Arranjo HLB dos Citros “Soluções inovadoras e integradas para a superação da doença huanglong-gbing (HLB, ex-greening) dos citros”**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2017. (Embrapa Mandioca e Fruticultura. Documentos, 218).

GRAÇA, J. V.; KORSTEN, L. Citrus Huanglongbing: Review, Present status and Future Strategies. In: NAQVI, S. A. M. H. (ed.) **Diseases of Fruits and Vegetables Diagnosis and Management**, v.1., Nagpur, Maharashtra: National Research Centre for Citrus (Indian Council of Agricultural Research), 2004. p 229-254.

GUNDERSEN, D. E.; LEE, I. M. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 35, p.144-151, 1996.

HALL, D. G. Biology, History and World Status of *Diaphorina citri*. In: TALLER INTERNACIONAL SOBRE HUANGLONGBING DE LOS CITRICOS, I. 2008. Hermosillo, Sonora: México. [Anais...] Hermosillo, Sonora: México, 2008. p. 1–11.

HOCQUELLET, A.; TOORAWA, P.; BOVÉ, J. M.; GARNIER, M. Detection and identification of the two “*Candidatus Liberibacter sp*” associated with citrus huanglongbing by PCR amplification of ribosomal protein genes of the beta operon. **Molecular and Cellular Probes**, v.13, p. 373-379, 1999.

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

LI, W.; 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.104-15, 2006.

LOPES DA SILVA, M.; MARTINS, O. M.; WULFF, N. A.; ICHIDA, C. M.; GUIMARÃES, A. S.; GUI-MARÃES, G. C.; SOUZA, S. L. B.; SANCHES, M. M. Survey of 16SrIX phytoplasmas associated with HLB-symptoms in weeds and leafhoppers at citrus orchards. **Tropical Plant Pathology**, v.45, p.680-683, 2020.

LOPES, S. A.; FRARE, G. F.; CAMARGO, L. E. A.; WULFF, N. A.; TEIXEIRA, D. C.; BASSANEZI, R. B.; BEATTIE, G. A. C.; AYRES, A. J. Liberibacters associated with orange jasmine in Brazil: incidence in urban areas and relatedness to citrus Liberibacters, **Plant Pathology**, v.59, p.1044-1053, 2010.

MARQUES, R. N.; TEIXEIRA, D. C.; YAMAMOTO, P. T.; LOPES, J. R. S. Weedy Hosts and Prevalence of Potential Leafhopper Vectors (Hemiptera: Cicadellidae) of a Phytoplasma (16SrIX group) Associated with Huanglongbing Symptoms in Citrus Groves, **Journal of Economic Entomology**, v.105, p.329-337, 2012.

PANCCIONI, T. M. **Caracterização dos sintomas de HLB e da infecção por *Candidatus Liberibacter asiaticus* em limão verdadeiro**. 39 f. Dissertação (mestrado em Fitossanidade) - Fun-do de Defesa da Citricultura, Araraquara, 2015.

PARRA, J. R. P.; LOPES, J. R. S.; GOMEZ-TORRES, M. L.; NAVA, D. E.; PAIVA, P. E. B. Bioecologia do vetor *Diaphorina citri* e transmissão de bactérias associadas ao Huanglongbing. **Citrus R&T**, v.31, p. 37-51, 2010.

PEREIRA, F. M. V.; MILORI, D. M. B. P.; PEREIRA-FILHO, E. R.; VENÂNCIO, A. L.; RUSSO, M. S. T.; CARDINALI, M. C. B.; MARTINS, P. K.; FREITAS-ASTÚA, J. Laser-induced fluorescence imaging method to monitor citrus greening disease. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 79, p. 90-93, 2010.

PÉREZ-OTERO, R.; MANSILLA, J. P.; DEL ESTAL, P. Detección de la psila africana de los cítricos, *Trioxa erytreae* (Del Guercio, 1918) (Hemiptera: Psylloidea: Triozidae), en la Península Ibérica. **Archivos Entomológicos**, v.13, p.119-122, 2015.

PONTES, J. G. M.; VENDRAMINI, P. H.; FERNANDES, L. S.; SOUZA, F. H.; PILAU, E. J.; EBER-LIN, M. N.; MAGNANI, R. F.; WULFF, N. A.; FILL, T. P. Mass spectrometry imaging as a potential technique for diagnostic of Huanglongbing disease using fast and simple sample preparation. **Scientific Reports**, v.10,13457, 2020.

QUEIROZ, R. B.; FANTON, C. J.; ZANÚNCIO JR., J. S.; MARTINS, D. S.; FORNAZIER, M. J. First report of invasive *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) and its associated parasitoid *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae) in the Espírito Santo State. **Revista Científica Intellecto**, v. 2, p. 10-15, 2017.

RAMADUGU, C.; KEREMANE, M. L.; HALBERT, S. E.; DUAN, Y. P.; ROOSE, M. L.; STOVER, E.; LEE, R. F. Long-Term field evaluation reveals huanglongbing resistance in Citrus Relatives. **Plant Disease**, v.9, p.1858-1869, 2016.

SANCHES, M. M.; WULFF, N. A.; FERREIRA, E.; FERNANDES, J.; ANGARTEN, M. B.; CARBONARI, J. J.; OLIVEIRA, R. P.; ISHIDA, A.; MARTINS, O. M. Survey for phytoplasmas and "Candidatus Liberibacter sp." from HLB-like symptomatic citrus plants in Brazil. **Citrus Research & Technology**, v.37, p. 88-93, 2016.

SCHNEIDER, B.; COUSIN, M. T.; KLINGKONG, S.; SEEMÜLLER, E. Taxonomic relatedness and phylogenetic positions of phytoplasmas associated with diseases of faba bean, sunhemp, sesame, soybean, and eggplant. **Z. Pflanzenkrankh (Pflanzenschutz)**, v.102, p. 225-232, 1995.

SEEMÜLLER, E.; SCHNEIDER, B.; MÄURER, R.; AHRENS, U.; DAIRE, X.; KISON, H.; LORENZ, K. H.; FIRRAO, G.; AVINENT, L.; SEARS, B. B. Phylogenetic classification of phytopathogenic mollicutes by sequence analyses of 16S ribosomal DNA. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 44, p. 440-446, 1994.

SELVARAJ, V.; MAHESHWARI, Y.; HAJERI, S.; CHEN, J.; MCCOLLUM, T. G.; YOKOMI, R. Development of a duplex droplet digital PCR assay for absolute quantitative detection of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*”. **PLoS ONE**, v. 13, n.5, e0197184, 2018.

SILVA, C. M.; RIBEIRO, J. M.; JOAQUIM, L. Primeiro registro de *Diaphorina citri* Kuwayama, 1908 (Hemiptera: Liviidade) no estado do Tocantins. In: SIMPÓSIOS EM PROTEÇÃO DE PLANTAS: ATUAIS DESAFIOS EM FITOSSANIDADE, 1, 2017, Urutaí, GO. **Anais...** Urutaí, GO: Insti-tuo Federal Goiano, 2017. p. 18.

SHI, J.; PAGLIACCIA, D.; MORGAN, R.; QIAO, Y.; PAN, S.; VIDALAKIS, G.; MA, W. Novel diagnosis for citrus stubborn disease by detection of a *Spiroplasma citri*-secreted protein. **Phytopathology**, v. 104, p. 188-195, 2014.

SILVA, F. N.; SOUZA, A. N.; AL-SADI, A. M.; SIQUEIRA, D. L.; ELLIOT, S. L.; CARVALHO, C. M. First Report of a 16SrII-C Phytoplasma Associated with Asymptomatic Acid Lime (*Citrus aurantifolia*) in Brazil. **Plant Disease**, v. 98, p. 1577-1577, 2014.

TEIXEIRA, D. C.; DANET, J. L.; EVEILLARD, S.; MARTINS, E. C.; JESUS JUNIOR, W. C.; YAMAMOTO, P. T.; LOPES, S. A.; BASSANEZI, R. B.; AYRES, A. J.; SAILLARD, C.; BOVÉ, J. M. Citrus huanglongbing in São Paulo state, Brazil: PCR detection of the “*Candidatus*” Liberibacter species associated with the disease. **Molecular and Cellular Probes**, v.19, p.173-179, 2005.

TEIXEIRA, D. C.; SAILLARD, C.; COUTURE, C.; MARTINS, E. C.; WULFF, N. A.; EVEIL-LARD-JAGOUÉIX, S. Distribution and quantification of *Candidatus* Liberibacter americanus, agent of huanglongbing disease of citrus in São Paulo State, Brasil, in leaves of an affected sweet orange tree as determined by PCR. **Molecular and Cellular Probes**, v.22, n. 3, p.139–150, 2008a.

TEIXEIRA, D. C.; WULFF, N. A.; MARTINS, E. C.; KITAJIMA, E. W.; BASSANEZI, R.; AYRES, A. J.; EVEILLARD, S.; SAILLARD, C.; BOVÉ, J. M. A phytoplasma closely related to the pigeon pea witches'- broom phytoplasma (16Sr IX) is associated with citrus huanglongbing symptoms in the state of Sao Paulo, Brazil. **Phytopathology**, v.98, p.977-984, 2008b.

TEIXEIRA, D. C.; WULFF, N. A.; LOPES, S. A.; YAMAMOTO, P. T.; MIRANDA, M. P.; BELASQUE JUNIOR, J.; BASSANEZI, R. B. Caracterização e etiologia das bactérias associadas ao huanglongbing. **Citrus Research & Technology**, v. 31, p.115-128, 2010.

WILSON, M. R.; WEINTRAUB, P. G. An Introduction to Auchenorrhyncha phytoplasma vectors, **Bulletin of insectology**, v. 60, p. 177-178, 2007.

WULFF, N. A.; FASSINI, C. G.; MARQUES, V. V.; MARTINS, E. C.; COLETTI, D. A. B.; TEIXEIRA, D. C.; SANCHES, M. M.; BOVÉ, J. M. Molecular characterization and detection of 16SrIII group phytoplasma associated with Huanglongbing symptoms. **Phytopathology**, v.109, p.366-374, 2019.

WULFF, N. A.; TEIXEIRA, D.C.; MARTINS, E. C.; TOLOY, R.; BIANCO, L. F.; COLLETTI, D. A. B.; KITAJIMA, E. W.; BOVÉ, J. M. Sunn hemp, a major source-plant of the phytoplasma associated with huanglongbing symptoms of sweet orange in São Paulo State, Brazil. **Journal of Citrus Pathology**, v.2, p.1-14, 2015.

WULFF, N. A.; DANIEL, B.; SASSI, S. R.; MOREIRA, A. S.; COLETTI, D. A. B.; BASSANEZI, R. B.; SALA, I.; RODRIGUES, J. C. Incidence of *Diaphorina citri* carrying *Candidatus Liberibacter asiaticus* in Brazil's citrus belt. **Insects**, v.11 n. 672, p.1-17, 2020.

ZANOL, K. M. R. Scaphytopius Ball (Homoptera: Cicadellidae, Deltacephalinae): descrições de onze espécies novas. **Acta Biológica Paranaense**, v. 29, n.1-4, p. 127-151, 2000.

ZHENG, Z.; CHEN, J.; DENG, X. Historical perspectives, management, and current research of citrus HLB in Guangdong Province of China, where the disease has been endemic for over a hundred years. **Phytopathology**, v.108, p.1224-1236, 2018.

ZHENG, Z.; XU, M.; BAO, M.; WU, F.; CHEN, J.; DENG, X. Unusual five copies and dual forms of *nrdB* in "*Candidatus Liberibacter asiaticus*": Biological implications and PCR detection application. **Scientific Reports**, v. 6, p.39020, 2016.

ZREIK, L.; CARLE, P.; BOVÉ, J. M.; GARNIER, M. Characterization of the mycoplasma-like organism associated with Witches'-Broom Disease of Lime and proposition of a *Candidatus* taxon for the organism, "*Candidatus Phytoplasma aurantifolia*". **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 5, p. 449-453, 1995.

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:
 Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
 Parque Estação Biológica
 PqEB, Av. W5 Norte (final)
 70970-717, Brasília, DF Fone: +55 (61) 3448-470
 Fax: +55 (61) 3340-3624
 www.embrapa.br www.embrapa.br/fale-conosco/sac Comitê Local de Publicações da Unidade Responsável



MINISTÉRIO DA
 AGRICULTURA, PECUÁRIA
 E ABASTECIMENTO



PÁTRIA AMADA
 BRASIL
 GOVERNO FEDERAL

Presidente

Wagner Alexandre Lucena

Secretária-Executiva

Daniela Aguiar de Souza

Membros

Ana Flávia do Nascimento Dias Côrtes;

Andrielle Camara Amaral Lopes; Bruno

Machado Teles Walter; Daniela Aguiar de

Souza; Debora Pires Paula; Edson Junqueira

Leite; Márcio Martinello Sanches; Marcos

Aparecido Gimenes; Solange Carvalho Barrios

Roveri Jose.

Supervisão editorial

Daniela Aguiar de Souza

Revisão de texto

Jakcelia Costa da Silva

Normalização bibliográfica

Ana Flávia do Nascimento Dias Côrtes

Tratamento das ilustrações

Adilson Werneck

Projeto gráfico da coleção

Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica

Marcus Vinicius Pereira e Souza

Foto da capa

Henrique Santos/Fundecitrus

1ª edição

1ª impressão (ano): tiragem