

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

**Estudos sobre aquisição e concentração de "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" e "*Candidatus Liberibacter americanus*" em *Diaphorina citri*
Kuwayama**

Fernanda Engels do Nascimento

**Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Entomologia**

**Piracicaba
2010**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Fernanda Engels do Nascimento
Bióloga

Estudos sobre aquisição e concentração de "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" e "*Candidatus Liberibacter americanus*" em *Diaphorina citri* Kuwayama

Orientador:
Prof. Dr. **JOÃO ROBERTO SPOTTI LOPES**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Entomologia

**Piracicaba
2010**

FICHA CATALOGRÁFICA
Verso da Folha de Rosto

**Elaborada pelo Tratamento da Informação
(Biblioteca Central)**

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. João Roberto Spotti Lopes pela orientação, grande confiança e amizade durante tantos anos de atividades em conjunto, iniciadas em 2002 durante minha graduação e que persistiu pelo curso de Mestrado.

Ao Dr. Helvécio Della Coletta Filho, pesquisador do Centro APTA Citros Sylvio Moreira – IAC Cordeirópolis, pela orientação, confiança, incentivo no desenvolvimento do trabalho e parceria nas inúmeras análises moleculares.

Aos professores do Departamento de Entomologia e Zoologia Agrícola da ESALQ/USP pelos ensinamentos transmitidos.

A Kely, Luciane e Silvia do Laboratório de Biotecnologia do Centro APTA Citros Sylvio Moreira - IAC, pela ajuda e aprendizado.

Ao futuro Engenheiro Agrônomo, Arthur Tomaseto, pela amizade, companheirismo e grande ajuda na montagem dos experimentos e na manutenção da criação de psilídeos.

Aos colegas do Laboratório de Insetos Vetores de Fitopatógenos: Arthur, Clederson, Cristiane, Daniele, Flávio, Gerane, Isolda, Joyce, Juliana, Lucas, Marcelo, Matê, Nicole, Patrick, Rafael, Rodrigo e Simone.

Aos meus queridos colegas do PPG em Entomologia, pelos dias de estudo, descontração e companheirismo durante estes dois anos, em especial para Bruno De Conti, Érika Britto, Greice Erler, Guilherme Trivellato, John Saldarriaga, Lorena Nunes, Márcio Silva, Marcos Lima, Oderlei Bernardi, Rafael Pitta e Tiago Lima.

A Ricardo Alves de Olinda, pelas análises estatísticas e auxílio na interpretação dos dados.

A bibliotecária Silvia Maria Zinsly, da Biblioteca da ESALQ, por toda a editoração, e pela paciência e carinho com que me ajudou neste trabalho.

Aos meus pais Antonio Carlos do Nascimento e Susana T. Engels do Nascimento, pelo amor, apoio, carinho e grande incentivo, fundamentais em minha vida.

A minha irmã, Roberta, companheira de moradia e graduação, por me mostrar o caminho da vida acadêmica.

Ao meu querido e amado esposo, por todo o amor, apoio e compreensão muito necessários para a finalização desta etapa.

As minhas queridas e adoradas amigas da república Choppensá, a Mestre em Ciência Animal e Pastagens Jackeline Thaís da Silva, a Doutoranda em Fisiologia e Bioquímica de Plantas Magda Andréia Tessmer, Doutoranda em Entomologia Cristiane Müller, a Mestranda em Entomologia Juliana Balbinotte, a Mestranda em Recursos Florestais Maria Isabel Bertacchi. Obrigada por absolutamente tudo que vivemos juntas, todo o convívio e amizade desses anos.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização e conclusão deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos!

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	9
1 INTRODUÇÃO.....	11
2 DESENVOLVIMENTO.....	15
2.1 Revisão Bibliográfica.....	15
2.1.1 Huanglongbing.....	15
2.1.2 Sintomas.....	16
2.1.3 Os três fitopatógenos causadores do HLB – “ <i>Candidatus Liberibacter</i> ”.....	18
2.1.3.1 Reação de Polimerase em Cadeia - PCR.....	19
2.1.3.2 Reação de Polimerase em Cadeia em Tempo Real/Quantitativo (Q-PCR)..	21
2.1.4 <i>Diaphorina citri</i> Kuwayama.....	24
2.1.5 Transmissão de “Ca. Liberibacter”.....	26
2.2 Material e Métodos.....	28
2.2.1 Insetos e Plantas.....	28
2.2.2 Eficiência de aquisição das bactérias “Ca. L. asiaticus” e “Ca. L. americanus” em relação ao estágio de desenvolvimento do psílídeo <i>D. citri</i>	29
2.2.3 Avaliação do crescimento da população bacteriana de “Ca. L. asiaticus” no inseto vetor.....	30
2.2.4 Avaliação do crescimento da população bacteriana de ambas as bactérias, “Ca. L. asiaticus” e “Ca. L. americanus”, no inseto vetor.....	31
2.2.5 Comparação da multiplicação de “Ca. L. asiaticus” e “Ca. L. americanus” no vetor.....	31
2.2.6 Extração de DNA e Reação de Polimerase em Cadeia (PCR).....	32
2.2.7 Análises Estatísticas.....	36
2.3 Resultados e Discussão.....	37
2.3.1 Teste de Q-PCR.....	37
2.3.1.1 Quantificação do DNA bacteriano amplificado por Q-PCR.....	38

2.3.2	Aquisição de “ <i>Ca. Liberibacter asiaticus</i> ” e “ <i>Ca. L. americanus</i> ” por <i>D. citri</i> em diferentes estágios de desenvolvimento do inseto.....	38
2.3.3	Avaliação do crescimento populacional de “ <i>Ca. L. asiaticus</i> ” no inseto vetor.....	43
2.3.4	Avaliação do crescimento populacional de, “ <i>Ca. Liberibacter asiaticus</i> ” e “ <i>Ca. L. americanus</i> ” em <i>D. citri</i>	46
2.3.5	Teste de aquisição seqüencial e multiplicação de “ <i>Ca. L. asiaticus</i> ” e “ <i>Ca. L. americanus</i> ” no vetor.....	50
3	CONCLUSÕES	57
	REFERÊNCIAS.....	59
	ANEXOS.....	69

RESUMO

Estudos sobre aquisição e concentração de "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" e "*Candidatus Liberibacter americanus*" em *Diaphorina citri* Kuwayama

Considerada uma das mais severas doenças em citros, o Huanglongbing (HLB) foi descoberto no Brasil em 2004, e desde então tem causado sérios danos à citricultura do país. Anteriormente conhecida apenas na Ásia e África, atualmente está também presente em vários países do continente Americano. O HLB, no Brasil, é causado pelas bactérias "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" (LAS) e "*Ca. L. americanus*" (LAM), sendo a última encontrada apenas neste país. São bactérias gram-negativas, limitadas ao floema, pertencentes ao subgrupo alpha das α -proteobacterias. A transmissão desta doença pode ocorrer por enxertia de materiais vegetais infectados, pela planta parasita *Cuscuta spp.* ou pelo psíldeo-asiático-dos-citros, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). Para que o patógeno seja transmitido, há uma interação única que ocorre entre a bactéria e seu inseto vetor, cujo conhecimento auxiliaria no controle e prevenção da doença. Entretanto, vários aspectos da biologia da transmissão de *Ca. Liberibacter spp.* ainda são desconhecidos. Este trabalho teve por objetivo elucidar alguns aspectos relacionados à aquisição e interação de LAS e LAM com o inseto vetor, *D. citri*. Um primeiro estudo foi montado para avaliação de qual(s) estágio(s) apresentaria(m) maior eficiência de aquisição. Em seguida, avaliou-se o crescimento e concentração de ambas as bactérias no organismo do inseto em períodos sucessivos após a aquisição. Por fim, investigou-se a possibilidade de aquisição de ambas as bactérias concomitantemente pelo vetor, em períodos de acesso à aquisição iguais e seqüenciais em plantas-fonte de cada umas delas. Observou-se uma maior taxa de aquisição do patógenos por ninfas de 4^o e 5^o instares, contrastando com uma menor eficiência de aquisição por adultos. Por meio de análises de regressão, verificou-se um crescimento da população bacteriana com o passar do tempo, em insetos que se alimentaram em plantas infectivas ainda nas formas jovens (ninfas), sendo que o mesmo não foi observado para adultos. As bactérias foram detectadas no inseto por sonda específicas de PCR quantitativo apenas 7 dias após o início do período de acesso à aquisição (PAA) e foram detectadas até 40 dias após o PAA. O fato de as bactérias serem detectadas até 6 semanas após sua aquisição e em concentrações crescentes no vetor, caracterizam o tipo de transmissão como persistente propagativa. Este conhecimento é importante para melhor compreensão da epidemiologia e aprimorar o manejo do HLB.

Palavras-chave: Huanglongbing; Greening dos Citros; Psíldeo Asiático do Citros; Bactérias Fitopatogênicas; PCR Quantitativo; Biologia da Transmissão

ABSTRACT

Studies on acquisition and concentration of "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" and "*Candidatus Liberibacter americanus*" in *Diaphorina citri* Kuwayama

Known as one of the most severe citrus diseases, Huanglongbing (HLB) was first described in Brazil in 2004. Ever since, it has caused serious damages to Brazilian citriculture. Previously known only in Asia and Africa, HLB is now present in several countries in the Americas. In Brazil, HLB is associated with two bacterial species, "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" (LAS) and "*Ca. L. americanus*" (LAM); the latter one was found only in this country. These are gram-negative, phloem-limited bacteria, belonging to the *alpha* subdivision of the Proteobacteria group. Transmission of these bacteria may occur by grafting with infected plant material, by parasitic plants (*Cuscuta* spp.), or by the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). The vector transmission process probably involves complex psyllid-pathogen interactions, which should be understood in order to improve management strategies to control HLB. The goal of this research was to study some aspects related to acquisition of LAS and LAM by the insect vector, *D. citri*. A first study was carried out to determine bacterial acquisition efficiency in relation to vector developmental stages. A second study was set up to investigate if bacterial concentration increases over time in the vector after acquisition by *D. citri* nymphs and adults. Finally, the possibility of acquisition of both LAS and LAM by a single insect was investigated by submitting *D. citri* nymphs and adults to sequential and similar acquisition access periods on citrus plants singly-infected with each one of these bacterial species. *D. citri* nymphs acquired "*Ca. L. asiaticus*" and "*Ca. L. americanus*" more efficiently than adults. No single insect acquired both bacterial species. Concentration of "*Ca. L. asiaticus*" reached higher levels in *D. citri* when acquired by 4th and 5th instar nymphs. Regression analyses showed an increase in the concentration of "*Ca. L. asiaticus*" in *D. citri* over time after acquisition for insects that acquired the pathogen yet as nymphs, which was not observed when bacterial acquisition occurred only in the adult stage. Both bacterial species were detected in *D. citri* by quantitative PCR from 7 to 40 days after onset of the acquisition access period. The observation of increasing concentrations of "*Ca. L. asiaticus*" in *D. citri* for several weeks after acquisition indicates that the bacterium is persistent and propagative in the vector. This information allows a better understanding of the transmission process with implications on HLB epidemiology and management.

Keywords: Huanglongbing; Citrus Greening; Phytopathogenic Bacteria, Insect Vector, Asian Citrus Psyllid; Transmission Biology; Quantitative PCR

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de laranja, com 18.340.240 toneladas produzidas em 2009, equivalentes a 449,5 milhões de caixas de 40,8 kg, e 18.982.647 toneladas de laranja esperadas para a safra de 2010, com uma variação positiva (3,5%). Sua produção é comercializada tanto na forma *in natura* como em suco concentrado, nos mercados interno e externo, sendo o maior exportador de suco concentrado do mundo (IBGE, 2010), participando com cerca de 80% do volume comercializado.

Contudo, a ocorrência de pragas é fato gerador de despesas e aumento de custos nas produções. O psílídeo asiático dos citros, *Diaphorina citri* Kuwayama, é uma dessas pragas. Entretanto, exceto nos casos de alta infestação do inseto, seu dano direto não afeta severamente a laranjeira e sua produção, sendo considerada até o ano de 2004 como uma praga secundária da cultura (GALLO et al., 2002). No entanto, este inseto passou a ser visto como o principal inseto-praga em citros devido a sua atuação como vetor dos fitopatógenos associados ao Huanglongbing (HLB).

Huanglongbing (HLB), anteriormente conhecida como Greening dos Citros, é uma das doenças mais severas que ocorre em plantas cítricas em diferentes regiões no mundo como África, Ásia e América. Apresentando-se nas formas asiática, africana e americana, é causada por bactérias gram-negativas, limitadas ao floema, do gênero “*Candidatus Liberibacter*” e podem ser transmitidas por dois diferentes insetos vetores, o psílídeo asiático dos citros *Diaphorina citri* Kuyawama, e o psílídeo africano dos citros *Trioza erytreae* (Del Guercio) (Hemiptera: Psylloidea). Outras formas de transmissão também ocorrem como borbulha, enxertia ou por meio da planta parasita *Cuscuta* spp. Plantas infectadas apresentam sintomas de mosqueado típico nas folhas, ramos amarelados, folhas com manchas que aparentam deficiência de zinco e frutos diminutos e deformados. Acredita-se que esta seja uma das mais graves doenças causadas por um fitopatógeno transmitido por um inseto em citros, justamente pelo pouco conhecimento sobre sua dinâmica, epidemiologia e até características moleculares da bactéria (HALBERT; MANJUNATH, 2004). Apesar de ser uma doença conhecida há

muitos anos no continente asiático, foi diagnosticada recentemente no Brasil e nos EUA, locais em que toda a sua epidemiologia muda.

Três espécies da bactéria são conhecidas como agentes causais do HLB, “*Candidatus Liberibacter americanus*”, “*Ca. L. asiaticus*” e “*Ca. L. africanus*” (BOVÉ, 2006). No Brasil já foi identificada a presença das formas asiática e americana (COLETTA-FILHO et al. 2004; TEIXEIRA et al., 2005a). Recentemente uma nova espécie de “*Candidatus Liberibacter*” foi identificada na Nova Zelândia, sendo extraída de plantas de tomate, pimentão e batatas. Esta nova espécie também é transmitida por um psilídio, *Bactericera cockerelli*, (LIEFTING et al., 2008), porém ainda não houve nenhum relato desta nova bactéria em *Citrus* ou sendo transmitida por um dos insetos vetores de HLB.

No Brasil, desde que os fitopatógenos foram identificados, havia uma maior quantidade de “*Ca. L. americanus*”, em torno de 90%, do que “*Ca. L. asiaticus*” em plantas sintomáticas no campo (TEIXEIRA et al., 2005b). Com o passar destes anos, foi verificada a inversão destes valores, sendo constatada uma relação de quase 80% das plantas infectadas avaliadas com a bactéria asiática (COLLETA-FILHO, comunicação pessoal). Tal fato pode ter ocorrido devido a diferenças na taxa de multiplicação das duas bactérias na planta cítrica e/ou no inseto vetor. Desta forma, estudos relacionados à abundância das diferentes espécies de “*Ca. Liberibacter*” na planta se fazem necessários para um maior avanço no controle desta doença.

É interessante ressaltar que as espécies de bactérias transmitidas por cada um dos insetos possuem as mesmas características adaptativas ao ambiente que seus insetos vetores, sugerindo fortemente uma adaptação conjunta de patógenos e seus respectivos insetos vetores. No entanto, foi comprovado, mesmo que em âmbito laboratorial, que ambas as espécies de psilídeos são capazes de adquirir e transmitir tanto “*Ca. L. asiaticus*” como “*Ca. L. africanus*” (MASSONIÈ; GARNIER; BOVÉ, 1976; LALLEMAND et al., 1986). Tais fitopatógenos também apresentam características de interação com seu inseto vetor de caráter persistente e propagativo indicando, mais uma vez, sua grande importância econômica e científica, uma vez que, esta característica da transmissão da doença atribui maior facilidade de dispersão do patógeno e maior dificuldade de controle da doença (AUBERT, 1987).

Assim, estudos em relação ao inseto vetor também possuem grande impacto no conhecimento da epidemiologia da doença. Sua biologia e estudos de comportamento alimentar são de extrema importância para a averiguação das características das interações inseto x planta x patógeno, e nas implicações que estas interações causam nos processos de aquisição e inoculação das bactérias pelo inseto. Neste trabalho os esforços foram focados em responder questões relacionadas à interação envolvendo o inseto vetor e os fitopatógenos e suas implicações no processo de disseminação da doença. Portanto este trabalho teve por objetivos: a) determinar quais estágios de desenvolvimento do psilídeo *D. citri* apresentam maior eficiência de aquisição de “*Ca. Liberibacter*”; b) Avaliar a progressão da concentração de “*Ca. Liberibacter asiaticus*” no vetor *D. citri* ao longo do tempo; e c) Investigar a taxa de multiplicação de “*Ca. L. americanus*” e “*Ca. L. asiaticus*” em *D. citri*, após aquisição isolada (simples) ou sequencial (mista) desses patógenos no vetor.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 Huanglongbing

Huanglongbing (HLB), nome oficial da doença fitopatogênica anteriormente conhecida como Greening dos Citros, é uma enfermidade que ataca praticamente todas as variedades comerciais de plantas cítricas (DA GRAÇA, 1991). Ela é causada por três espécies de bactérias gram-negativas: “*Candidatus Liberibacter asiaticus*”, “*Ca. L. africanus*” e “*Ca. L. americanus*”. As plantas infectadas apresentam sintomas em folhas e, mais severamente, em frutos. As bactérias são transmitidas pelos insetos *Diaphorina citri* Kuwayama (Ásia e Américas) e *Trioza erytreae* (Del Guercio) (África) (Hemiptera: Psylloidea) (MARTINEZ; WALLACE, 1967; CAPOOR; RAO; VISWANATH, 1967; McCLEAN; OBERHOLZER, 1965b), por enxertia (LIN, 1956) ou pela planta parasita *Cuscuta* spp (GARNIER; BOVÉ, 1983).

Acredita-se que a doença está presente nos pomares cítricos da Ásia e África há centenas de anos, uma vez que a produção de laranja nestas áreas data de milênios atrás. Alguns autores propuseram teorias de que a doença teria começado na África do Sul, levada para China (por meio de mudas infectadas) e de lá se alastrado por toda a Ásia (GOTTWALD; DA GRAÇA; BASSANEZI, 2007), contudo ainda há muito que ser compreendido.

De acordo com a literatura, uma severa enfermidade causando danos a plantas cítricas na Índia foi pela primeira vez descrita no século XVIII, chamada de “dieback” (CAPOOR, 1963). Após esse período, muitas doenças causando males em plantas cítricas foram descritas com outros nomes e apresentando sintomas semelhantes em outras regiões da Índia e em outros países como China, Taiwan, Filipinas, Indonésia e até em países da África. (CAPOOR, 1963; GOTTWALD; DA GRAÇA; BASSANEZI, 2007; BOVÉ, 2006). Por muito tempo acreditou-se que a doença era causada por deficiências nutricionais ou até mesmo falta de água, ao invés de um agente fitopatogênico até ser demonstrada a transmissão por enxertia na China (LIN, 1956. No entanto, sabe-se que este trabalho ficou praticamente desconhecido fora do mundo

acadêmico chinês por alguns anos até ser publicado uma nota, referindo-se ao artigo, na Itália (BOVÉ, 2006).

Assim, anos depois, na África do Sul, McClean e Oberholzer (1965a) também demonstraram a transmissão por enxertia da forma africana, e que a doença era transmitida naturalmente pelo psílídeo africano dos citros *Tryoza erytreae* (Del Guercio) (McCLEAN; OBERHOLZER, 1965b). Neste mesmo trabalho os autores apresentaram a hipótese de que o fitopatógeno responsável pelo HLB seria um vírus.

2.1.2 Sintomas

O HLB ocasiona sintomas em folhas e frutos, podendo apenas um ramo de uma árvore afetada apresentar os sinais da doença, entretanto, acredita-se que a distribuição da bactéria seja sistêmica, ainda que desigual (BOVÉ, 2006). As folhas maduras apresentam amarelecimento ao longo das nervuras e manchas cloróticas irregulares, progredindo para o amarelecimento por toda a folha. Como sintoma secundário, ramos da árvore infectada apresentam folhas diminutas e com clorose similar a deficiência de zinco, ferro e manganês (LOPES; FRARE, 2008). Além disso, podem ocorrer floradas fora de época e intensa desfolha dos ramos afetados, progredindo para uma generalização dos sintomas por toda a planta inclusive com seca e morte de ponteiros (HALBERT; MANJUNATH, 2004).

Os frutos apresentam sintomas mais severos, também com o tamanho reduzido, assimétrico e de sabor amargo (inviabilizando o consumo *in natura* e industrial), provavelmente devido à alta acidez e baixa quantidade de açúcar (McCLEAN; SCHWARZ, 1970). É comum a ocorrência de sementes abortadas em frutos severamente afetados (CAPOOR, 1974). Pode incidir a queda prematura dos frutos, e aqueles que permanecem na laranjeira apresentam a coloração verde (DA GRAÇA, 1991), caracterizando o nome mais comum da doença, “Greening”.

Apesar dos sintomas serem semelhantes, acredita-se que algumas formas do HLB possam ser mais severas que outras, como a forma asiática é mais severa do que a forma africana, possuindo um comportamento sistêmico mais agressivo na planta e causando morte precoce da árvore (GOTTWALD; DA GRAÇA; BASSANEZI, 2007). No

caso de “*Ca. L. americanus*” no Brasil, verificou-se diferentes graus de resistência entre as variedades e espécies de *Citrus*, apesar de serem todas afetadas (LOPES; FRARE, 2008). Da mesma forma, HLB na África e Índia foi descrita ser mais severa para as variedades de laranjas-doce e tangerinas, enquanto que limões, limas, grapefruit e pomelos apresentaram maior tolerância a doença (NARIANI; RAYCHAUDHURI; VISWANATH, 1973). No entanto, algumas formas de “*Ca. L. asiaticus*” em Taiwan e, recentemente na Flórida., , afetam todas as variedades comerciais (GOTTWALD; DA GRAÇA; BASSANEZI, 2007), bem como a “*Ca. L. americanus*” aqui no Brasil (LOPES; FRARE; MARTINS, 2006). Acredita-se que as diferentes estirpes das bactérias possam, com o tempo, adaptar-se às espécies e variedades de plantas cítricas hospedeiras, o que explicaria a mudança das variedades de pomelo e grapefruit de resistentes, anteriormente na Ásia, para suscetíveis na Flórida (GOTTWALD; DA GRAÇA; BASSANEZI, 2007).

Segundo Bowman et al.(2009), a bactéria “*Ca. Liberibacter asiaticus*” altera a expressão gênica da planta cítrica em diferentes níveis levando ao desenvolvimento dos sintomas em diferentes órgãos da planta, principalmente naqueles que consomem mais seiva elaborada do que produzem. Todavia, e curiosamente, a bactéria não afeta o processo de fotossíntese da planta, apesar de tantos outros fatores ficarem desregulados, por essa razão acredita-se que os frutos e brotações sejam os mais afetados pela doença.

Além das condições fisiológicas da planta, alteradas pela presença do patógeno, acredita-se que as condições abióticas influenciem na doença, expressão de sintomas e conseqüentemente sua transmissão. Segundo Gottwald et al. (2007), a forma africana da doença é sensível ao calor, apresentando o pico de expressão de sintomas no inverno. Seu inseto vetor, *T. erytraeae*, também apresenta hábitos de melhor desenvolvimento nas regiões de maior altitude e menor temperatura, como ocorre com a presença da doença no continente africano. Por outro lado, a forma asiática da bactéria se apresenta tolerante ao calor, causando expressão de sintomas mais severos e visíveis a temperaturas iguais ou superiores a 30°C, assim como o inseto vetor, *D. citri*, que apresenta desenvolvimento favorável nestas condições. Essas características adaptativas ao ambiente semelhantes para patógeno e seus insetos

vetores, sugerem fortemente uma adaptação conjunta de patógenos e seus respectivos insetos vetores. No entanto, foi comprovado, mesmo que em âmbito laboratorial, que ambas as espécies de psílídeos são capazes de adquirir e transmitir tanto “*Ca. L. asiaticus*” como “*Ca. L. africanus*” (MASSONIE; GARNIER; BOVÉ, 1976; LALLEMAND et al., 1986).

Paralelamente, Lopes et al.(2009) relataram as mesmas condições adaptativas ao ambiente de “*Ca. L. asiaticus*”, sendo tolerante ao calor. Em contrapartida, estes mesmo autores relataram que “*Ca. L. americanus*” apresenta sensibilidade ao calor, como ocorre com a espécie africana da bactéria, mesmo que o vetor *D. citri* apresente sobrevivência elevada em condições de temperatura um pouco mais elevadas (NAVA et al., 2007).

2.1.3 Os três fitopatógenos causadores do HLB - “*Candidatus Liberibacter*”

A partir do momento em que HLB foi relatado ser transmitido por enxertia e por insetos vetores (LIN, 1956; McCLEAN; OBERHOLZER, 1965a,b), houve a necessidade de compreender mais sobre o assunto. Com tais descobertas de transmissão do agente causal, acreditava-se que este era um vírus, único patógeno conhecido na época que poderia ser transmitido por tais meios (BOVÉ, 2006).

Em contrapartida, a descoberta por Microscopia Eletrônica (ME), de que organismos aparentemente semelhantes à micoplasmas (MLO – Mycoplasma-like Organisms) estavam associados com doenças conhecidas genericamente como “amarelos” inspirou estudos por ME com plantas infectadas com HLB. Verificou-se, portanto, que era possível visualizar tais organismos nos tubos de floema de plantas com os sintomas de HLB, mas não no floema de plantas saudáveis (LÂFLECHE; BOVÉ, 1970). Pouco tempo depois, foram observado corpúsculos semelhantes aos encontrados em plantas sintomáticas no corpo de ambos os insetos vetores, *T. erytrae* (MOLL; MARTIN, 1973) e *D. citri* (CHEN et al., 1973).

Com estudos mais avançados e imagens mais precisas, pôde-se notar que estes microrganismos apresentavam uma camada celular externa mais espessa do que naturalmente se encontrava nos MLOs, sugerindo que estes organismos eram, na

realidade, bactérias. Até aquele momento, não houvera sucesso no isolamento das bactérias, mas aliando a ME com tratamentos enzimáticos, apresentou-se a natureza gram-negativa das mesmas (GARNIER; DANIEL; BOVÉ, 1984). Outra evidência de que os fitopatógenos seriam bactérias é a temporária remissão dos sintomas da doença quando as plantas são tratadas com antibióticos (CAPOOR; THIRUMALACHAR, 1973; BUITENTAG; von BROEMBSSEN, 1993).

Por meio de métodos moleculares, os patógenos foram reconhecidos como novos "*Candidatus*" ao gênero *Liberibacter*, pertencente à subdivisão alpha das protobactérias (JAGOUÉIX; BOVÉ; GARNIER, 1994). De acordo com as normas de nomenclatura de organismos ainda não classificados, o termo *Candidatus*, em itálico e com a primeira letra maiúscula, precede o nome em latim da espécie, que deve ser grafada de acordo com as normas de termos binomiais, mas não em itálico; o termo completo deve sempre ser citado entre aspas: "*Candidatus Liberibacter americanus*" (EUZÉBY, 2010)

Recentemente, Sechler et al. (2009) obtiveram sucesso no isolamento das bactérias "*Ca. L. asiaticus*", "*Ca. L. americanus*" e "*Ca. L. africanus*", associadas ao HLB. Utilizando um meio de cultura complexo (o meio PW, também utilizado para o isolamento de *Xylella fastidiosa*) com acréscimo de aminoácidos e extrato de plantas cítricas. No entanto, a comunidade científica tem encontrado dificuldades de reproduzir o feito.

Além do isolamento e testes enzimáticos muitos estudos moleculares foram realizados, como é o caso de primers (oligonucleotídeos iniciadores) específicos para cada forma de "*Candidatus Liberibacter*", para detecção dos patógenos tanto em plantas como nos insetos vetores (BOVÉ et al., 1993; JAGOUÉIX; BOVÉ; GARNIER, 1996; TEIXEIRA et al., 2005b).

2.1.3.1 Reação de Polimerase em Cadeia - PCR

O teste de "Polimerase Chain Reaction" – PCR (Reação de Polimerase em Cadeia) provocou uma verdadeira revolução na biologia devido à sua facilidade, rapidez, versatilidade e sensibilidade. Este teste possibilita a amplificação exponencial

da sequência de um DNA por meio de ciclos repetitivos de síntese de DNA. Cada ciclo de PCR consiste de três etapas: desnaturação térmica (92 a 95°C) da fita dupla do DNA; anelamento sob temperatura reduzida (35 a 60°C), que varia dependendo do tamanho e sequência do primer utilizado, permitindo hibridização DNA-DNA de cada iniciador com suas sequências complementares que flanqueiam a região alvo; e extensão das novas fitas de DNA, produzidas através da elevação da temperatura (72°C) e com a presença da enzima DNA polimerase e de nucleotídeos (Adenina, Timina, Guanina, Citosina) (MILLER; JOAQUIM, 1993). O produto desta reação é um fragmento de DNA com tamanho conhecido, em pares de base, em grande quantidade, uma vez que a amplificação do DNA alvo ocorre de forma exponencial.

A visualização dos produtos amplificados é feita sob luz ultravioleta, em um transluminador, após eletroforese do DNA em gel de agarose adicionado de brometo de etídio para corar o DNA. O gel de agarose separa os fragmentos de acordo com seu tamanho e forma “bandas” que são comparadas com marcadores moleculares, aplicados no gel juntamente com suas amostras, os quais possuem diversos tamanhos de fragmento de DNA localizados em “alturas” conhecidas do gel. A comparação entre o marcador molecular e seu produto de PCR é fundamental para verificar se o fragmento amplificado é o alvo pretendido.

A especificidade do teste deriva do desenvolvimento de sondas de oligonucleotídeos, os “primers”, que reconhecem sequências específicas do DNA do patógeno. Diferentes primers podem ser desenvolvidos para o mesmo patógeno para diferenciar estirpes (como no caso de *Xylella fastidiosa*) ou diferentes espécies de patógenos de um mesmo gênero que causam a mesma enfermidade em plantas, como o caso do Huanglongbing (LI; HARTUNG; LEVY, 2006). Jagoueix, Bové e Garnier (1996) desenvolveram um conjunto de iniciadores para as bactérias causadoras do HLB conhecidas na época, “*Ca. L. asiaticus*” e “*Ca. L. africanus*” baseado na região 16S rDNA do genoma bacteriano. O produto desta amplificação gera um fragmento de 1.160 pb, para ambas as bactérias. Apesar de o tamanho ser o mesmo, a sequência deste DNA não é, e para diferenciar a forma africana da forma asiática o produto da amplificação deve ser submetido a um processo de digestão com a enzima de restrição *Xba*I. O fragmento do DNA africano é dividido em três fragmentos menores de 520, 506

e 130 pares de base, enquanto a forma asiática é dividida em apenas dois fragmentos contendo 640 e 520 pares de base cada.

Recentemente, com a nova descoberta da doença no Brasil, também foi encontrada uma nova espécie que não havia sido relatada até então, a qual recebeu o nome de “*Ca. L. americanus*”, além da presença confirmada da bactéria já conhecida “*Ca. L. asiaticus*” (COLLETA-FILHO et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2005a). Dessa forma, para detecção da nova espécie encontrada foi desenvolvido um novo par de iniciadores, específicos para a forma americana da doença, os quais também foram baseados na região 16S rDNA da bactéria (TEIXEIRA et al., 2005b).

Alguns métodos mais sensíveis de PCR já estão disponíveis para a detecção de patógenos em plantas e nos insetos vetores, como é o caso do “Nested-PCR”. Neste caso, primeiramente ocorre a amplificação do fragmento de DNA com um par de primers (externos) e, posteriormente o produto deste PCR serve como molde, podendo ser diluído a fim de evitar inespecificidade, para uma segunda amplificação com um novo conjunto de primers internos à sequência amplificada no primeiro PCR (PAIÃO; LEITE JÚNIOR, 2001). Colleta-Filho (comunicação pessoal) desenvolveu um protocolo de Nested PCR para detecção do patógeno “*Ca. L. asiaticus*” em insetos vetores baseado nos genes *Omp*, corroborado por outro método de PCR também muito sensível, o PCR quantitativo em Tempo Real (Q-PCR).

2.1.3.2 Reação de Polimerase em Cadeia em Tempo Real/Quantitativo (Q-PCR)

Acredita-se que métodos mais robustos, rápidos e sensíveis de detecção de patógenos sejam importantes para um controle efetivo (e posterior eliminação) de plantas infectivas no campo e produção de mudas livres de “*Candidatus Liberibacter*” para uma possível melhora do controle da doença nos pomares de laranja (LI; HARTUNG; LEVY, 2006). Estes mesmo autores desenvolveram um protocolo de Q-PCR multiplex, fluorgênico (TaqMan MasterMix) com sondas específicas para detecção das três espécies de “*Ca. Liberibacter*”, indicando a alta sensibilidade, reprodutibilidade e robustez do teste.

A grande vantagem deste teste em relação ao PCR convencional é sua alta sensibilidade, possibilitando a detecção do patógeno no inseto vetor e, principalmente, a possibilidade de quantificação do patógeno no inseto e na planta.

O equipamento de PCR em Tempo Real difere do termociclador convencional em diversos pontos. Este equipamento, conectado a um computador, é capaz de monitorar a reação de amplificação do início ao fim, provendo informações a cada ciclo realizado, o que explica o nome “tempo real”, pois o resultado é imediato. O computador, munido de um software produzido pela empresa do equipamento (existem diferentes tipos no mercado), produz gráficos, gera valores para as suas amostras e analisa a qualidade da reação (HIGUCHI et al., 1993; GIBSON; HEID; WILLIAMS, 1996). O usuário pode programar a máquina e seus ciclos para diversos fins, como avaliar a expressão gênica de um fragmento de RNA de planta, ou o cDNA de um vírus, podendo inclusive realizar uma reação de Transcriptase Reversa (traduzir RNA para DNA) e, na mesma reação, realizar o PCR quantitativo. O fato de o resultado ser gerado na tela do computador exclui a necessidade do uso de géis de agarose ou poliacrilamida para visualização do resultado da reação, o que agiliza o diagnóstico (PFAFFL, 2004).

O Q-PCR utiliza uma sonda (probe) para sua reação, específica para sua sequência alvo, no caso do protocolo com TaqMan®. Esta sonda funciona como um primer adicionado de um agente fluorescente que, quando anelado ao DNA alvo libera energia em forma de luz fluorescente de um determinado comprimento de onda. O equipamento é capaz de captar este comprimento de onda e monitora aquela amostra a cada ciclo realizado. Para detectar diferentes DNAs-alvo de uma mesma amostra, podem-se utilizar uma sonda para cada DNA-alvo marcada com fluorescência de diferentes comprimentos de onda, na mesma reação e na mesma amostra tem-se o resultado para ambos os alvos, caracterizando um PCR Multiplex (PFAFFL, 2004; LI; HARTUNG; LEVY, 2006).

Esta técnica de PCR pode ser utilizada tanto para um simples diagnóstico como para quantificação do DNA de interesse. A Reação é dividida em 4 fases, a primeira fase é a expectativa de amplificação exponencial de todas as amostras, não apresenta linhas definidas no gráfico, que aparecem abaixo do limiar (“threshold”); a segunda é a

fase exponencial, onde a amplificação começa e a curva é formada, é detectada acima do “threshold”; a terceira fase apresenta um aumento da amplificação linear e aumento da fluorescência; e a quarta, e última, é a fase do “plateau”, definida como uma atenuação do acúmulo exponencial do produto, onde a curva estabiliza. A quantidade de DNA-alvo amplificado é diretamente proporcional à quantidade de DNA alvo inicial da amostra, apenas na fase exponencial, assim como é nesta fase que a quantificação do produto é realizada (TICHOPAD et al., 2003). Cada amostra gera um número de Ct (threshold values), que significa o número do ciclo em que aquela amostra começou a gerar fluorescência ao cruzar com a linha do limiar de qualidade da reação (threshold). O valor de Ct é inversamente proporcional a quantificação do DNA, ou seja, quanto menor o valor de Ct, maior é a quantidade do DNA-alvo na amostra (TICHOPAD et al., 2003).

Há duas formas de quantificação: a absoluta e a relativa. A quantificação absoluta relaciona o Ct obtido da amplificação da amostra com uma curva de calibração pré estabelecida especificamente para aquele DNA-alvo. Para isso é necessário que se tenha o DNA-alvo, geralmente extraído de colônias puras da bactéria (quando for o caso), em grande quantidade para fazer diluições em série e gerar esta curva padrão. A alta reprodutibilidade desta curva gera quantificações sensíveis e precisas, apesar de trabalhosa (SOUAZE et al., 1996; BUSTIN, 2000). No caso do HLB, como o isolamento das bactérias causadoras da doença ainda está sendo aprimorado, é realizada a clonagem dos genes de interesse por métodos tradicionais. Em sequência, amplifica-se o DNA clonado, realiza-se uma diluição em série e uma nova amplificação é realizada para fazer a curva de quantificação. No entanto este processo é delicado e nem sempre apresenta resultados satisfatórios (COLETTA-FILHO, comunicação pessoal).

A quantificação relativa utiliza um controle interno na própria amostra, como um *housekeeping gene*, como controle para expressão gênica, ou um DNA endógeno como 18S do inseto/planta (eucariotos) em relação ao 16S do patógeno (procarioto) no caso do HLB. Assim, é feita a quantificação do DNA-alvo (16S) em relação à quantidade do DNA endógeno (18S), comparando o Ct de ambos os alvos. No entanto, para a utilização deste método é necessário que haja uma padronização do DNA endógeno (PFAFFL, 2004), como uma quantificação do DNA total extraído do inseto, feita por

NanoDrop®, por exemplo. Em ambos os métodos, a eficiência da reação é imprescindível para a acurácia dos resultados.

2.1.4 *Diaphorina citri* Kuwayama

Desde 1942 a espécie *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) está presente no Brasil (COSTA-LIMA, 1942), que até a descoberta do HLB ocupava o posto de praga secundária na cultura de laranja. *D. citri* é um inseto de tamanho diminuto e chega a medir até 3 mm de comprimento na fase adulta (GALLO et al., 2002). Possui o corpo mosqueado de marrom, com cabeça e asas amarronzadas e secreção serosa que pode se apresentar sob a forma de pó (AUBERT, 1987; BERGMANN et al., 1994). Comumente preferem a face abaxial das folhas para se alimentar (BONANI, 2009; TURATI, 2008). Quando parados, apresentam disposição de 45° em relação ao substrato em que se encontram, indicando alimentação (BONANI, 2009).

Segundo Nava et al. (2007), os adultos atingem maturidade sexual por volta de 10 dias após emergência, sendo que as fêmeas podem colocar até 800 ovos com maior concentração nos 8 primeiros dias após o início do período de oviposição. Os ovos possuem coloração amarela e formato alongado. A duração média da geração (ovo-adulto) foi de 44,42 dias e a duração média do estágio ninfal de 14,93 dias. Dados para criação do biótipo brasileiro do inseto em laboratório, com a planta hospedeira de sua maior aceitação, *Murraya paniculata* (L.) Jack (Murta-de-cheiro), e condições de 25°C, 70% UR e 14h de fotofase (NAVA et al., 2007). A cópula varia de 18 a 50 minutos e após o período de pré-oviposição as fêmeas colocam seus ovos em gemas foliares novas, brotações e axila das folhas (HUANG et al., 1999). As ninfas são de cor amarelo palha, pequenas, achatadas dorso-ventralmente e apresentam cinco instares, permanecem grande parte do tempo agregadas e se alimentam nas partes mais jovens da planta, como folhas novas, parte terminal do pecíolo, entre a gema axilar e em brotações (TSAI; LIU, 2000).

Possivelmente, a espécie teve origem na Ásia e se alastrou por este continente (BOVÉ, 2006) assim como nas Américas (HALBERT; NUNEZ, 2004). Os danos diretos causados pelo inseto devem-se à injeção de saliva tóxica causando crescimento ou

deformações anormais na parte da planta atacada, geralmente brotações, uma vez que as ninfas causam maior dano (HODKINSON, 1974). Segundo Aubert (1987) a alimentação das ninfas da seiva elaborada resulta em deformações nas folhas, assim como o honeydew deixado nas superfícies da planta ocasiona o surgimento de fumagina em folhas e frutos.

Altas infestações de *D. citri* podem ocasionar seca das brotações, região de maior concentração e alimentação das ninfas, abscisão de folhas e até do ramo infestado (HOY; NGUYEN, 2001). Ainda, danos foliares irreversíveis foram observados após alimentação de uma única ninfa por menos de um dia (MICHAUD, 2004).

No entanto, tais danos são considerados secundários. *D. citri* teve sua importância elevada à principal praga dos citros no Brasil por ser inseto vetor dos patógenos causadores do HLB, a partir de 2004, com o descobrimento da doença nos pomares do país (COLETTA-FILHO et al. 2004; YAMAMOTO et al., 2006). Com isso, a preocupação com seu controle aumentou, junto com a necessidade de melhor compreensão de sua biologia e ecologia.

Segundo Catling (1970) a flutuação populacional do psílideo asiático está relacionada com a disponibilidade, abundância e qualidade de ramos novos e brotações nos pomares, com forte influência dos fatores climáticos sobre as populações (PAIVA, 2009). As chuvas e altas umidades relativas são mais agressivas ao inseto do que as altas temperaturas, sendo que chuvas, acima de 150 mm mensais, estão relacionadas com baixas populações de *D. citri*, devido aos ovos e ninfas jovens serem lavados da superfície das plantas (AUBERT, 1987).

No Brasil, há uma significativa variação da dinâmica populacional de *D. citri* nos pomares cítricos da região norte do Estado de São Paulo, sendo que a densidade mais alta ocorre ao final da primavera e início do verão, tempo de seca. Ao passo que durante outono e inverno observou-se a redução da população (YAMAMOTO; PAIVA; GRAVENA, 2001). As maiores infestações de ninfas foram encontradas em São Carlos e de adultos em Bauru, Botucatu, Lins e São Carlos e, independente da região afetada, sabe-se que *D. citri* apresenta um padrão de distribuição espacial do tipo agregada (PAIVA, 2009).

2.1.5 Transmissão de “*Ca. Liberibacter*”

Os insetos vetores são apontados como meio primário e natural de transmissão de doenças causadas por fitopatógenos, a qual compõe um processo biológico que necessita de compreensão em cada um de seus aspectos. Tais aspectos podem ser compreendidos como características de importância epidemiológica, como períodos de tempo necessários para aquisição e inoculação, latência, persistência e eficiência da transmissão (PARRA et al., 2010).

O primeiro relato de transmissão do HLB por inseto foi para a forma africana da doença, transmitida pelo psílideo africano dos citros, *Trioza erythrae* (McCLEAN; OBREHOLZER, 1965b) sendo que, pouco tempo depois outro psílideo, *D. citri*, foi identificado como vetor da forma asiática da doença (SALIBE; CORTEZ, 1966).

O psílideo asiático dos citros, *D. citri*, é o inseto vetor de “*Ca. L. asiaticus*” e de “*Ca. L. americanus*” no Brasil. (COLETTA-FILHO et al., 2004; YAMAMOTO et al., 2006). Os aspectos referentes às suas características de transmissão dos patógenos ainda não se encontram elucidados, sendo necessários mais estudos para a total compreensão dessa interação.

São conhecidos diferentes tipos de transmissão de fitopatógenos por insetos vetores. Nault (1997) descreveu quatro tipos de transmissão que ocorrem com fitovírus transmitidos por Hemiptera. Tais características podem ser extrapoladas, com certa cautela, para que também possamos melhor compreender as interações entre as bactérias fitopatogênicas e seus insetos vetores. Os tipos de transmissão podem ser não persistente, semipersistente, persistente circulativa e persistentes propagativa. Tais definições são baseadas no tempo de aquisição e inoculação do patógeno pelo inseto, se há ou não a presença do período de latência (tempo entre aquisição e inoculação do patógeno) e se o patógeno se multiplica dentro do inseto vetor.

Pouco se sabe sobre as características de transmissão da doença e os dados apresentados na literatura são contrastantes. Tanto adultos como ninfas (4^o e 5^o instares) podem adquirir e transmitir “*Ca. L. asiaticus*” (XU et al., 1988), no entanto, as ninfas o fazem com maior eficiência (VICHIN NETO et al., 2008). Para Capoor, Rao e Viswanath (1974), o tempo de aquisição pode variar de 15 a 30 minutos e o período de

latência é de 21 dias no entanto, para Xu et al.(1988) o tempo de aquisição apresentado foi de 5 a 7 horas e o período de latência de apenas 24 horas. Em um trabalho mais recente, pesquisadores conseguiram mostrar que a bactéria permanece no inseto até 12 semanas após um Período de Acesso à Aquisição (PAA) de duas semanas, em 75% dos 20 insetos testados (HUNG et al., 2004), demonstrando que a bactéria é persistente. Além disso, foram obtidos dados por Q-PCR de que a bactéria se multiplica dentro do inseto, ao longo do tempo (VICHIN-NETO et al., 2008; INOUE et al., 2009). Estas últimas informações corroboram suspeitas anteriores de que a transmissão de “*Ca. L. asiaticus*” por *D. citri* ocorre de forma persistente propagativa (PARRA et al., 2010).

Dados relacionados à transmissão das bactérias pelo vetor também não são claros. A taxa de transmissão pode variar de 1 a 100%, segundo Xu et al. (1988). Entretanto, Inoue et al. (2009) conseguiram uma taxa de transmissão de 67%, mas apenas para ninfas que se alimentaram por 24h em plantas infectadas, e transmitiram a bactérias quando adultos. Tais diferenças podem ocorrer por eventuais diferenças entre biótipos dos insetos estudados, assim como entre estirpes das bactérias (forma asiática em Taiwan deve ser distinta da forma asiática no Brasil). Além disso, o estágio de desenvolvimento também pode influenciar como demonstrado que as ninfas adquirem e transmitem o patógeno com maior facilidade (INOUE et al., 2009).

Transmissão vertical do patógeno “*Ca. L. asiaticus*” para a progênie através dos ovos (transmissão transovariana) não foi constatada para *D. citri* (HUNG et al., 2004), mas há um relato de que ocorra para a o inseto vetor da forma africana da doença, *T. erythrae* (VAN DEN BERG; VAN VUUREN; DEACON, 1991-92).

Entretanto, não apenas os insetos podem transmitir o HLB. Os patógenos também podem ser transmitidos por enxertia para ambas as formas presentes no Brasil (COLETTA-FILHO et al., 2009; LOPES et al., 2009). Assim como foi apresentado que a forma africana também pode ser transmitida por meio de enxertia (BOVÉ, 2006). No Brasil, verificou-se que o sucesso neste tipo de transmissão depende da parte da planta infectada que é retirada para fazer a enxertia. Coletta-Filho et al. (2009) apresentaram dados de que a transmissão ocorre facilmente para “*Ca. L. asiaticus*” se a enxertia for

realizada com gemas infectadas de ramos assintomáticos, o que demonstra a importância da produção de mudas saudáveis.

2.2 Material e Métodos

Os estudos foram realizados nas dependências do Laboratório de Insetos Vetores de Fitopatógenos do Departamento de Entomologia e Acarologia (LEA) da ESALQ/USP.

As análises de PCR quantitativo foram realizadas nas dependências do Laboratório de Biotecnologia do Centro de Citricultura Sylvio Moreira / IAC, em Cordeirópolis, SP.

2.2.1 Insetos e plantas

Todos os insetos utilizados nos experimentos foram provenientes da criação de *Diaphorina citri* mantida no Laboratório de Insetos Vetores. A colônia de *D. citri* foi mantida sobre plantas de murta, *Murraya paniculata* (L.) Jack (Rutaceae), planta que se apresenta como hospedeiro adequado para a criação deste inseto (NAVA et al., 2007). A criação foi acondicionada em caixas com revestimento de tela antiafídica e porta de acrílico transparente (35 x 35 x 53 cm) contendo mudas de murta com brotações novas, mantidas em sala climatizada (25±2°C; 70±10% UR e fotofase de 14h).

As plantas-fonte foram fornecidas pelo Instituto Agronômico de Campinas (IAC) de Cordeirópolis – Centro APTA Citros Sylvio Moreira. As mesmas foram produzidas por meio de enxertia de gemas infectadas em plantas saudáveis. Todas foram testadas previamente por PCR para a confirmação da presença do HLB além de apresentarem os sintomas típicos da doença.

Para as plantas teste foram usadas seedlings saudáveis de laranja-doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] cv. 'Caipira', produzidas em tubetes de 100 ml em substrato Plantmax®. Cada um dos grupos das plantas utilizadas (plantas-teste saudáveis, plantas-teste utilizadas e plantas-fonte) foi mantido em diferentes casas de vegetação revestidas com tela antiafídica. Plantas-fonte infectadas com a bactéria "Ca. L.

americanus” foram mantidas em uma casa de vegetação com as condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento da bactéria, por causa de sua natural intolerância a altas temperaturas (LOPES et al., 2009).

2.2.2 Eficiência de aquisição das bactérias “*Ca. L. asiaticus*” e “*Ca. L. americanus*” em relação ao estágio de desenvolvimento do psíldeo *D. citri*

Uma metodologia foi desenvolvida para avaliar a eficiência de aquisição de ninfas – os cinco diferentes instares – e adultos de *D. citri* em plantas infectadas com “*Ca. L. asiaticus*” (LAS) e “*Ca. L. americanus*” (LAM). Quarenta ninfas de cada um dos cinco estágios foram transferidas de plantas de murta da criação para plantas sintomáticas de laranja com o auxílio de um pincel umedecido. Todas as ninfas foram colocadas em um mesmo ramo com folhas recém expandidas, cada ínstar em uma folha separada, com aplicação de uma solução composta por 1 parte de vaselina líquida e 1 parte de vaselina sólida no pecíolo para evitar que os insetos de diferentes idades se misturassem. Os adultos (40 insetos) foram colocados em outro ramo próximo com folhas recém expandidas, em uma gaiola feita de copo plástico (300ml) e tule. Os insetos de diferentes idades foram mantidos na planta fonte por um Período de Acesso à Aquisição (PAA) de 48 horas. Após este período os insetos foram transferidos, com o auxílio de um sugador de transferência ou pincel umedecido, para seedlings sadios de citros. Nestas novas plantas os insetos foram mantidos por 15 dias e depois transferidos novamente para novos seedlings sadios por um Período de Acesso a Inoculação (PAI) de 7 dias. Em seguida, os insetos foram mortos por congelamento e armazenados em microtubos de 1,5ml em álcool absoluto, em freezer a -20°C até a realização das análises moleculares. Como controle negativo, um grupo de quarenta insetos foi transferido diretamente da criação para seedlings sadios e mantidos até o momento de colocá-los em álcool para análises moleculares.

Este experimento foi montado de acordo com o delineamento experimental de Blocos ao Acaso. Foram montados quatro blocos para cada tipo de bactéria (LAM e LAS).

2.2.3 Avaliação do crescimento da população bacteriana de “*Ca. L. asiaticus*” no inseto vetor

O teste consistiu em verificar o crescimento populacional da bactéria LAS, em dois tratamentos (ninfas e adultos) de *D. citri* ao longo do tempo. O experimento foi conduzido em câmara de crescimento com fotofase de 14 h e temperatura constante de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Cento e vinte ninfas de primeiro instar e cento e vinte adultos recém-emergidos com 3-5 dias de idade foram transferidos para uma planta fonte infectada com LAS, com auxílio de um pincel úmido ou sugador de transferência, e mantidos em PAA por 48h (dias 1 e 2). A planta fonte foi testada por PCR para a confirmação da presença da bactéria. Trinta insetos de cada tratamento foram transferidos individualmente para trinta plantas-teste (seedlings de laranja caipira de 10 a 15 centímetros) com brotação. Cada inseto recebeu um número e sua respectiva planta recebeu o mesmo número e o dia em que ficou em contato com o inseto. A cada 48 horas os insetos foram transferidos para novas plantas teste, sempre saudáveis e com brotações novas, confinados em gaiolas confeccionadas com tubos tipo falcon de 50 mL, até completar um período de 35 dias após o PAA. A cada troca as plantas retiradas foram pulverizadas, etiquetadas e mantidas em casa de vegetação revestida com tela antiáfida. Paralelamente, o restante dos insetos (grupo reserva) que foram colocados em aquisição na planta fonte, foram transferidos para uma gaiola do tipo baleiro, com quatro plantas-teste e mantidos por todo o experimento, sendo retirados 10 adultos e 5 ninfas de cada grupo reserva a cada 7 dias. O mesmo foi feito com insetos saudáveis, retirados da criação e transferidos diretamente para plantas-teste, como controle negativo. Todos os insetos mortos ou retirados semanalmente foram mantidos em álcool absoluto a -20°C , devidamente etiquetados, até a realização dos testes moleculares.

2.2.4 Avaliação do crescimento da população bacteriana de ambas as bactérias, “*Ca. L. asiaticus*” e “*Ca. L. americanus*”, no inseto vetor

Este experimento foi conduzido de forma semelhante ao anterior, porém com a aquisição de ambas as bactérias, separadamente, e com coletas em intervalos menores de tempo. O teste consistiu em verificar o crescimento populacional das bactérias LAS e LAM, em dois tratamentos (ninfas e adultos) de *D. citri* ao longo do tempo. O experimento foi conduzido em câmara de crescimento com fotofase de 14 h e temperatura constante de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Cento e setenta ninfas de terceiro instar e cento e quarenta adultos recém-emergidos com 3-5 dias de idade foram transferidos para uma planta fonte infectada com LAM ou LAS, com auxílio de um pincel úmido ou sugador de transferência, e mantidos em PAA por 24h (dia 1). As plantas-fonte foram testadas por PCR para a confirmação da presença das bactérias em cada uma delas, respectivamente. Após o PAA, os insetos foram transferidos para uma gaiola do tipo baleiro, com quatro plantas-teste e mantidos na câmara de crescimento, em condições controladas. A cada cinco dias foram coletados 10 adultos e 10 ninfas de cada tratamento, com início no dia 1 pós PAA e fim no dia 30 pós PAA, totalizando 6 coletas. A cada coleta, as mudas cítricas do baleiro foram trocadas por plantas-teste saudáveis. As plantas retiradas foram pulverizadas e colocadas em casa de vegetação, devidamente etiquetadas. O mesmo foi feito com insetos saudáveis, retirados da criação e transferidos diretamente para plantas-teste, como controle negativo. Todos os insetos mortos ou retirados semanalmente foram mantidos em álcool absoluto a -20°C , devidamente etiquetados, até a realização dos testes moleculares.

2.2.5 Comparação da multiplicação de “*Ca. L. asiaticus*” e “*Ca. L. americanus*” no vetor.

Este experimento teve como objetivo comparar a taxa de multiplicação de LAS e LAM em *D. citri* em determinado estágio de desenvolvimento (ninfas ou adultos) após aquisição isolada (simples) ou sequencial (mista) de LAS e LAM, bem se ocorria a aquisição conjunta das bactérias. Sendo assim, quatro formas diferentes de aquisição

dos patógenos foram avaliadas, variando-se as plantas-fonte de cada espécie bacteriana, a seqüência de aquisição nas mesmas e o estágio de desenvolvimento do inseto (ninfas x adultos): Tratamento 1) período de acesso à aquisição (PAA) de 96 h por 120 insetos apenas em planta-fonte de LAS; 2) PAA de 96h por 120 insetos apenas em planta-fonte de LAS; 3) PAA de 96 h por 120 insetos em planta-fonte de LAM, seguido de um novo PAA de 96 h em planta-fonte de LAS; e 4) PAA de 96 h por 120 insetos em planta-fonte de LAS, seguido de um novo PAA de 96 h em planta-fonte de LAM. Foram realizados dois tratamentos: (N) Ninfas de 2 e 3 instares e (A) adultos. Após o término dos PAAs, os insetos foram transferidos para seedlings saudáveis de laranja doce em baleiros (4 plantas por baleiro), onde foram mantidos até o momento de cada coleta. A cada oito dias 10 adultos e 10 ninfas foram coletados, mortos por congelamento e armazenados em álcool até a realização das análises moleculares para presença e quantificação de ambas as bactérias em cada inseto. Como controle negativo, um grupo de psilídeos do mesmo lote foi transferido diretamente para seedlings de laranja 'Caipira', sem passar por plantas-fontes. O delineamento experimental aplicado foi o Inteiramente Casualizado e este experimento foi repetido por três vezes.

Avaliação da multiplicação bacteriana: Em períodos sucessivos (8, 16, 24, 32 e 40 dias) após o início do primeiro PAA em planta-fonte, grupos de 10 indivíduos de cada tratamento mantidos nos 'baleiros' foram avaliados quanto à multiplicação por ambas as bactérias, de acordo com o tratamento, por qPCR. Os insetos que não se alimentaram em plantas-fonte foram utilizados como controle negativo para os testes de qPCR. No caso dos insetos submetidos à aquisição sequencial em plantas-fonte de LAS e LAM, os dados de qPCR foram utilizados para verificar se o inseto adquiriu ambas as bactérias, e se a colonização no corpo do psilídeo por uma espécie de "Ca. Liberibacter" influenciou na multiplicação da outra.

2.2.6 Extração de DNA e Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)

Todos os insetos de todos os experimentos foram submetidos às análises moleculares. Cada inseto foi testado individualmente e teve seu DNA extraído de

acordo com o protocolo de Deng et al. (2006) modificado por Coletta-Filho (Comunicação pessoal), como descrito a seguir.

Extração de DNA Total de Insetos. O excesso de álcool foi retirado do corpo dos insetos com o auxílio de um papel filtro e o inseto foi colocado em um microtubo de 1,5ml com 50µl de tampão STE (10mM Tris HCl; 1mM EDTA; 25mM NaCl) em uma raque no gelo. Os insetos foram macerados com o auxílio de um pistilo plástico previamente autoclavado e em seguida acrescentado 10µl de Proteinase K (200µg/ml), homogeneizados e mantidos a 56°C por 30 minutos. Após o banho-maria, os tubos foram centrifugados brevemente e o sobrenadante ($\approx 40\mu\text{l}$) retirado, cuidadosamente, com o auxílio de uma micropipeta portando ponteira com filtro e transferido para um microtubo novo e autoclavado. Após esta etapa de extração do DNA seguiu-se com uma etapa extra de purificação do DNA com o auxílio do Kit Wizard (DNA Purification Kit Wizard Genomic, Promega®, CA cat# A1125). Foram adicionados 100 µl de Nucleic Lysis Solution às amostras, agitado vigorosamente e mantidas a 80°C por 5 minutos. As amostras foram mantidas a temperatura ambiente, acrescentado 30µl de Protein Precipitation Solution, agitado vigorosamente e mantidas à temperatura de aproximadamente 0°C por 5 minutos. Os microtubos foram centrifugados por 3 minutos a 13000xg em centrífuga refrigerada a 10°C. Retirou-se $\approx 140\mu\text{l}$ do sobrenadante, transferindo-o para um novo tubo. Acrescentou-se 100µl de Álcool Isopropílico, seguida por uma inversão os tubos, e mantidos em freezer (-20°C) por 2 horas. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 14000xg por 5 minutos a 10°C. O sobrenadante foi retirado, cuidadosamente, com o auxílio de uma micropipeta ($\approx 230\mu\text{l}$), descartado, e acrescentado 150µl de álcool 70% ao pellet no microtubo. Centrifugou-se a 14000xg, 10°C por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado novamente. Os microtubos foram colocados abertos para secar em estufa por ≈ 15 minutos a 50°C. Após este período foi acrescentado 50µl de TE + RNase e as amostras foram colocadas novamente na estufa por 30 minutos a 37°C para ação da RNase. Foram utilizados 4µl do DNA para qPCR.

Extração de DNA total de Plantas. O DNA das plantas-fonte e demais plantas testadas foi extraído com o método descrito por Murray e Thompson (1980) com modificações. Foram coletadas folhas, das plantas-fonte, nos ramos utilizados para

aquisição da bactéria. Os pecíolos das folhas foram retirados, picados em pedaços miúdos com o auxílio de uma lâmina e colocados em 800µl de Tampão 1 (10ml de Tris HCl pH 7,5 1M; 2ml EDTA 0,5M; 14ml NaCl 5M; 33ml H₂O MiliQ) sendo macerados em almofarizes de cerâmica com o auxílio de pistilos do mesmo material. Todo o conteúdo macerado foi transferido para microtubos de 2,0ml, adicionando-se 500µl do Tampão 2 (8ml PVP 5%; 8ml PVP 10%; 32µl Mercaptoetanol 140mM) na capela, e os tubos foram agitados delicadamente para misturar seu conteúdo. As amostras foram colocadas em banho-maria a 65°C por 30 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 1300xg por 5 minutos e 700µl do sobrenadante foi transferido para tubos novos e autoclavados de 1,5ml, com igual volume de CIA (Clorofórmio/Álcool Iso-Amilíco 24:1), misturados por inversão por 2 minutos. Depois disso, as amostras foram centrifugadas a 14000xg por 5 minutos, retirados 500µl do sobrenadante e transferidos para novos tubos com 0,6vol. de Álcool Isopropílico gelado, misturado por inversão e deixados em freezer (-20°C) por 30 minutos. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 14000xg por 20 minutos a 10°C, descartado seu sobrenadante e acrescentado 500µl de álcool etílico 70%. Uma nova centrifugação foi realizada com as mesmas condições por 5 minutos e o sobrenadante descartado. Os tubos foram colocados abertos em uma estufa a 55°C para secar o pellet formado por, aproximadamente, 15 minutos. Com os tubos secos, acrescentou-se 50µl de H₂O MiliQ autoclavada para ressuspender o pellet. As amostras foram mantidas em geladeira (4°C) até a realização do PCR e depois armazenadas em freezer (-20°C). Foram utilizados 5µl de DNA para reação de PCR.

Reação de Polimerase em Cadeia – PCR. Para a amplificação do DNA extraído das plantas cítricas infectadas com LAS, utilizou-se o par de oligonucleotídeos (primers) Oi1 (Oi1: 5' GCG CGT ATG CAA TAC GAG CGG CA 3') e Oi2c (5' GCC TCG CGA CTT CGC AAC CCA T 3'), específicos para esta bactéria (JAGOUÉIX; BOVÉ; GARNIER, 1996). Os primers foram incluídos na seguinte mistura de reagentes: tampão para PCR 1x (Invitrogen™ - Life Technologies), 200 µM de cada dNTP (10mM – Invitrogen); 1U de *Taq* DNA-Polimerase (Invitrogen); 0,4 µM de cada primer (Oi1 e Oi2c/ Prodímol Biotecnologia) e 5 µl de DNA da amostra, o volume final de reação de 25 µl foi completado com Água MiliQ. Após a mistura estar pronta, adicionou-se a cada amostra 30 µl de óleo mineral para evitar evaporação. A amplificação foi realizada em um

termociclador PTC-100 (MJ Research Inc. Watertown, MA 02172, EUA), programado para as seguintes condições: 35 ciclos de 92°C por 45 segundos, 60°C por 1min 30s e estabilizando a 4°C por tempo indeterminado.

Para a amplificação do DNA extraído das plantas cítricas infectadas com LAM, utilizou-se o par de primers GB1 (5' AAG TCG AGC GAG TAC GCA AGT ACT 3') e GB3c (5' CCA ACT TAA TGA TGG CAA ATA TAG 3'), específicos para esta bactéria (TEIXEIRA et al., 2005). Os primers foram incluídos na seguinte mistura de reagentes: tampão para PCR 1x (Invitrogen™ - Life Technologies), 200 µM de cada dNTP (10mM – Invitrogen); 1U de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen); 0,4 µM de cada primer (GB1 e GB3c / Prodímol Biotecnologia) e 5 µl de DNA da amostra, o volume final de reação de 25 µl foi completado com Água MiliQ. Após a mistura estar pronta, adicionou-se a cada amostra 30 µl de óleo mineral para evitar evaporação. A amplificação foi realizada em um termociclador PTC-100 (MJ Research Inc. Watertown, MA 02172, EUA), programado para as seguintes condições: 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 60°C por 45s e 72°C por 1 minuto e estabilizando a 4°C por tempo indeterminado.

Reação de Polimerase em Cadeia de Quantificação – qPCR. Para detecção de LAS em DNA extraído de insetos e plantas-fonte, utilizou-se o par de primers As84F (5'-TCACCGGCAGTCCCTATAAAAAGT-3') e As180R (5'-GGGTAAAGTCCCGCAAA CGA-3'); a sonda Asi-NED-111T (5'-ACATCTAGGTAAAAACC-3') baseados na sequência do 16S rDNA desta bactéria (GeneBank AY919311) (CARLOS et al., 2006). Para a solução de reação foram utilizados 0,8 µM de cada primers; 0,2 µM da sonda de LAS; 1 X TaqMan Fast Universal MasterMix (Applied Biosystems–cat# 4352042); 1 µl de Eukaryotic 18S rRNA kit (Applied Biosystems), como controle interno e normalização do total de DNA em cada reação; 4 µl do DNA-alvo (inseto ou planta) e completado com água MiliQ autoclava ao volume final de 20µl. A amplificação foi realizada no aparelho ABI PRISM 7500 Fast Sequence Detection System (Applied Biosystems) utilizando o software de detecção de amplificação (versão 1,4) sob as seguintes condições: 2 minutos a 50°C e 10 minutos a 95°C seguido de 40 ciclos de amplificação (15 s a 95°C e 1 min a 60°C). Cada reação foi realizada em placas de 96 poços, sendo cada amostra feita em duplicata. Três tipos de controles foram adicionados a cada uma: um controle positivo de planta infectada sintomática, com LAS, um controle positivo (previamente

realizado Q-PCR) de inseto e água MiliQ autoclavada. Os valores de Ct foram calculados pelo número de ciclos necessários para que a fluorescência das sondas fossem detectadas, e ao cruzarem com a linha limite (threshold) da análise do software. Cada corrida teve duração média de 40 minutos e os dados foram salvos e armazenados em um drive de memória para análises posteriores.

Para detecção de LAM em DNA extraído de insetos e plantas-fonte, utilizou-se o par de primers Ame-67F (5'-CACCTTCCTCCGGCTTATCA-3') e Ame-144R (5'-GCGCAACCCCTGCCTAT-3'); a sonda Ame-FAM6-MGB (5'-CCTATAAAGTTCCCAACTTA-3'), baseados na sequência do 16S rDNA desta bactéria. Para a solução de reação foram utilizados 0,8 µM de cada primers; 0,2 µM da sonda de LAM; 1 X TaqMan Fast Universal MasterMix (Applied Biosystems—cat# 4352042); 1 µl de Eukaryotic 18S rRNA kit (Applied Biosystems), como controle interno e normalização do total de DNA em cada reação; 4 µl do DNA-alvo (inseto ou planta) e completado com água MiliQ autoclavada ao volume final de 20µl. A amplificação foi realizada usando as mesmas condições descritas anteriormente

2.2.7 Análises estatísticas

Foram verificados os pressupostos da ANOVA por meio da família de transformações Box-Cox (1964) e o teste de Hartley (1950) foi aplicado para verificar a homogeneidade de variâncias. O delineamento utilizado foi o casualizado em blocos para o experimento de eficiência de aquisição de “*Ca. L. asiaticus*” e “*Ca. L. americanus*” por *D. citri* em diferentes estágios de aquisição (ver item 2.2.2).

Uma vez verificados os pressupostos da ANOVA, aplicou-se o teste F ($p < 0,05$) para verificar possíveis diferenças entre tratamentos. Aplicou-se o teste de Tukey ($p < 0,05$) para as variáveis que apresentaram essa diferença. Para o fator tempo, foi feita análise de regressão por se tratar um fator quantitativo.

Os dados foram analisados utilizando-se o programa computacional SAS/STAT 2003.

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Teste de Q-PCR

Para todos os experimentos deste trabalho, foi utilizado um protocolo de amplificação em tempo real e quantificação de DNA das bactérias “*Ca. Liberibacter americanus*” (LAM) e “*Ca. L. asiaticus*” (LAS) em insetos e plantas com um controle endógeno, o 18S rRNA Eucariótico. Este controle endógeno seria utilizado para realizar a quantificação das amostras de DNA de forma relativa (ver item 2.1.3.2), ou seja, quanto DNA de bactéria havia na amostra em relação ao DNA endógeno (inseto). No entanto, a extração do DNA dos insetos foi realizada individualmente, para que o resultado de cada avaliação fosse com um maior número de repetições, auxiliando nas análises e atingindo, possivelmente, um resultado mais preciso. Dessa forma verificou-se que a quantidade de DNA de um único inseto foi insuficiente para esta análise, uma vez que a amplificação do 18 S foi muito variável, apresentando um alto desvio padrão, ou não amplificando, mesmo quando as amostras foram repetidas.

Tal complicação decorreu do fato de que o método de extração utilizado neste trabalho (DENG et al., 2006) favoreceu, como objetivo daquele método, a extração do DNA de bactérias gram-negativas (neste caso, “*Ca. L. asiaticus*” e “*Ca. L. americanus*”), principal alvo deste estudo. A presença do DNA endógeno dos insetos foi observada com frequência relativamente baixa, nos levando a fazer uma verificação da qualidade do protocolo de extração.

Um protocolo de extração de DNA de insetos por Sais foi testado para confrontar com o protocolo de Deng, usado para extração de DNA no presente estudo. Vinte e quatro insetos que ficaram por 3 semanas em PAA em plantas-fonte de LAS foram macerados, individualmente, em tampão de extração (coincidente para ambos os métodos) e, com o auxílio de uma micropipeta, separou-se igual volume em diferentes tubos para cada uma das amostras tornando-as duplicadas, uma para cada protocolo. Seguiu-se com cada extração de DNA e posterior análise por Q-PCR. Os resultados mostraram que o método utilizado no presente trabalho de fato não favorece a extração do DNA endógeno do inseto, sendo que o 18 S foi amplificado em um maior número de

amostras para o método de Sais e não em suas duplicatas para o método de Deng (dados não apresentados). Apesar disso, verificou-se que ambos os métodos propiciaram a detecção de LAS por Q-PCR em um mesmo número de amostras de psilídeos, indicando que os resultados aqui apresentados são confiáveis e nenhuma amostra teve seu resultado, de amplificação bacteriana, comprometido pelo método de extração utilizado.

2.3.1.1 Quantificação do DNA bacteriano amplificado por Q-PCR

Comumente, a quantificação do número de cópias de DNA de interesse em uma amostra por Q-PCR é feita utilizando-se uma curva padrão de concentração gênica do DNA alvo. Embora disponível para LAS (COLETTA-FILHO et al. 2009), uma curva deste tipo ainda não foi construída para LAM, o que impediu o uso deste método de quantificação na presente pesquisa. Inicialmente procurou-se avaliar a concentração bacteriana por meio de um índice relativo, o dCt, calculado pela diferença entre os Cts obtidos para a DNA da bactéria (16S) e o DNA do endógeno do inseto (18S). Entretanto, devido à baixa quantidade de DNA de insetos extraído pelo método de Deng, optou-se por usar apenas os valores de Ct (*threshold cycle*) como estimativa da concentração bacteriana no inseto. Estes valores de Ct podem ser comparados aos obtidos por testes semelhantes disponíveis na literatura (COLETTA-FILHO et al. 2009; LOPES et al., 2009). É importante ressaltar que, como não há comparação com uma curva padrão de concentração realizada em conjunto com este trabalho, os resultados aqui apresentados na forma de Ct não constituem uma medida absoluta da quantidade de DNA bacteriano nos insetos, mas servem de parâmetro para comparar a concentração das bactérias nas amostras analisadas.

2.3.2 Aquisição de “*Ca. Liberibacter asiaticus*” e “*Ca. L. americanus*” por *D. citri* em diferentes estágios de desenvolvimento do inseto

Para este experimento foram realizados quatro blocos, sendo que apenas três apresentaram resultados positivos para infecção do psilídeo por LAS. Todos foram

montados sob as mesmas condições, porém em diferentes plantas-fonte. Estas plantas foram testadas por Q-PCR e apresentaram alto título bacteriano nos ramos utilizados (Tabela 1).

Tabela 1 – Valores de Ct (*Threshold cycle*) obtidos por Q-PCR das plantas-fonte de *Ca. Liberibacter asiaticus* (LAS) e *Ca. L. americanus* (LAM) utilizadas nos experimentos. O valor de Ct é inversamente proporcional à concentração bacteriana na planta

Bactéria	Planta Fonte	Ct médio (16S)**	Ct Planta (18 S)**
LAS	05 III	21,63	15,63
	12 III	22,99	21,1
	PF X24	24,41	24,49
	PF X 15	20,65	17,1
LAM	LAM 7	24,87	16,88
	LAM 06 III *	27,76	17,22
	LAM 06 *	25,61	13,42

* Mesma planta-fonte utilizada em diferentes experimentos e analisadas nas datas de avaliação de cada experimento

** Valores de Ct médio para o DNA da bactéria (16S rDNA) e DNA endógeno, da planta, (18 S Eucarioto rDNA)

Houve mortalidade de alguns insetos, sendo que o tratamento de aquisição durante o 2º instar foi o que mais teve baixas em relação aos demais tratamentos, com 50% (valor para os três blocos de LAS) dos insetos mortos antes de completar o experimento e que, portanto, não puderam ser testados por Q-PCR.

No caso do experimento realizado com LAM, a mortalidade foi maior, sendo que de quatro blocos montados, apenas um foi aproveitado e com baixa quantidade de insetos. De uma forma geral, os primeiros dois instares de *D. citri* apresentaram-se mais sensíveis à manipulação que os demais estágios do inseto. No entanto, no caso dos insetos submetidos a um período de aceso à aquisição (PAA) sobre plantas-fonte de LAM, a mortalidade sempre foi mais alta, indicando que algum fator ainda desconhecido pode estar afetando a viabilidade dos insetos em plantas infectadas com este patógeno. Sabe-se que os sintomas de LAM apresentam-se mais severos que os de LAS em plantas cítricas (LOPES et al., 2009), assim como a bactéria LAS causa desordens de diversos tipos no metabolismo vegetal (BOWMAN et al., 2009; ALBRECHT; BOWMAN,

2008), podendo estes fatores influenciar também no comportamento do inseto, que se alimenta desta planta infectada.

Adultos de *D. citri* que adquiriram LAS nos estágios de ninfas de 4^o e 5^o ínstars, 21 dias após o início do PAA, apresentaram maior concentração bacteriana (menor valor de Ct), em relação àqueles que adquiram esta bactéria em outros estágios de desenvolvimento (Tabela 2 e Figura 1). Observou-se a maior taxa de infectividade no 4^o ínstar, com 84% de insetos infectados.

No caso de LAM não houve diferença significativa entre os tratamentos, porém é possível observar uma tendência de maior concentração bacteriana quando a aquisição ocorreu no 4^o e 5^o ínstars, como observado para LAS (Tabela 2). A proporção de insetos infectivos foi maior para os tratamentos de aquisição no 3^o e 4^o e 5^o ínstars, apesar de poucos insetos terem sido testados. Tanto para LAS como para LAM, observou-se menor taxa de infectividade quando houve aquisição na fase adulta. Em ambos os experimentos, todos os insetos provenientes do mesmo lote de criação e não submetidos ao PAA em planta-fonte (Controle negativo) mostraram-se isentos de LAS e LAM, demonstrando que a aquisição bacteriana ocorreu somente nos estágios de desenvolvimento avaliados (Figura 2).

Tabela 2 – Amplificação do DNA de “*Ca. Liberibacter asiaticus*” (LAS) e “*Ca. L. americanus*” (LAM) em *Diaphorina citri* e proporção de indivíduos infectivos em relação ao estágio de desenvolvimento do inseto em que ocorreu a exposição às plantas-fonte dessas bactérias

	Estágio de Desenvolvimento	Ct médio ± EPM ¹	Nº de insetos positivos/ Nº de insetos testados ²	Taxa de infectividade (%)
LAS	Ninfas 1º instar	31,99 ± 0,7 a ³	13/19	68,4
	Ninfas 2º instar	32,53 ± 0,71 a	9/15	60
	Ninfas 3º instar	31,21 ± 0,84 a	14/21	66,6
	Ninfas 4º instar	30,50 ± 0,75 b	21/25	84
	Ninfas 5º instar	30,82 ± 0,57 b	17/26	65,3
	Adultos	33,1 ± 1,10 a	9/21	42,85
	Controle Negativo	indeterminado	0/24	0
LAM	Ninfas 1º instar
	Ninfas 2º instar	30,53 ± 1,77 a ³	5/14	35,7
	Ninfas 3º instar	29,42 ± 0,26 a	2/2	100
	Ninfas 4º instar	27,35 ± 0,26 a	4/4	100
	Ninfas 5º instar	28,14 ± 1,73 a	3/4	75
	Adultos	29,34 ± 1,99 a	3/10	30
	Controle Negativo	indeterminado	0/10	0

¹ Valores de Ct (Cycle Threshold para amplificação por Q-PCR) médios de insetos infectivos após aquisição em cada estágio de desenvolvimento ± erro padrão da média (EPM). Valores de Ct foram obtidos com a utilização de primers e sonda com 16S rDNA como alvo, e representam uma estimativa da concentração bacteriana no inseto. Quanto menor o valor de Ct, maior a concentração da bactéria no inseto

² Proporção de insetos infectivos em relação ao número total de insetos testados em todos os blocos.

³ Letras ao lado dos valores correspondem à análise estatística de comparação de médias (ANOVA) Letras diferentes diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a $p < 0,05$.

... dado numérico não disponível (insetos morreram antes de completar o experimento)

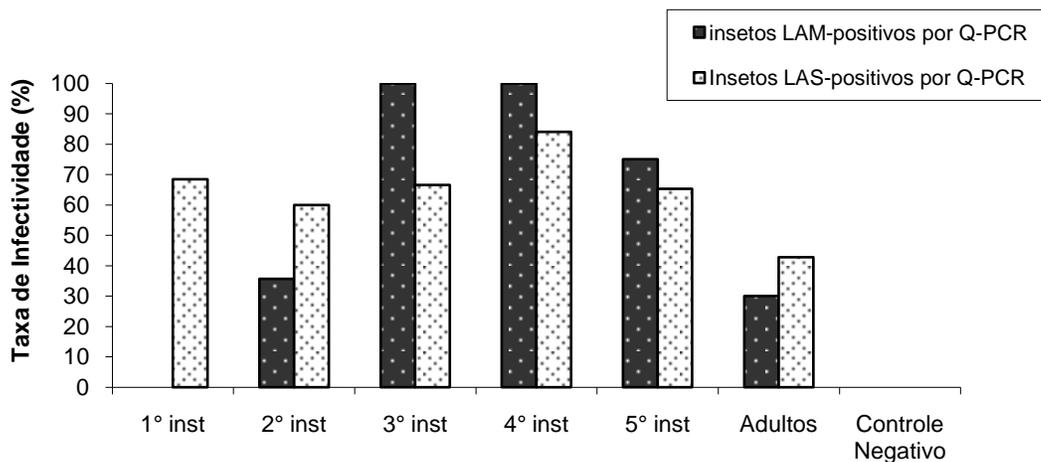


Figura 1 – Porcentagem de indivíduos de *Diaphorina citri* infectivos para ambas as bactérias, “*Ca. Liberibacter asiaticus*” (LAS) e “*Ca. L. americanus*” (LAM), 21 dias após período de acesso à aquisição (PAA) de 48 h em plantas-fonte por psilídeos em diferentes estágios de desenvolvimento. O controle negativo refere-se a insetos do mesmo lote de criação, porém sem exposição à planta-fonte. Os insetos foram testados por Reação de Polimerase em Cadeia- Quantitativo (Q-PCR)

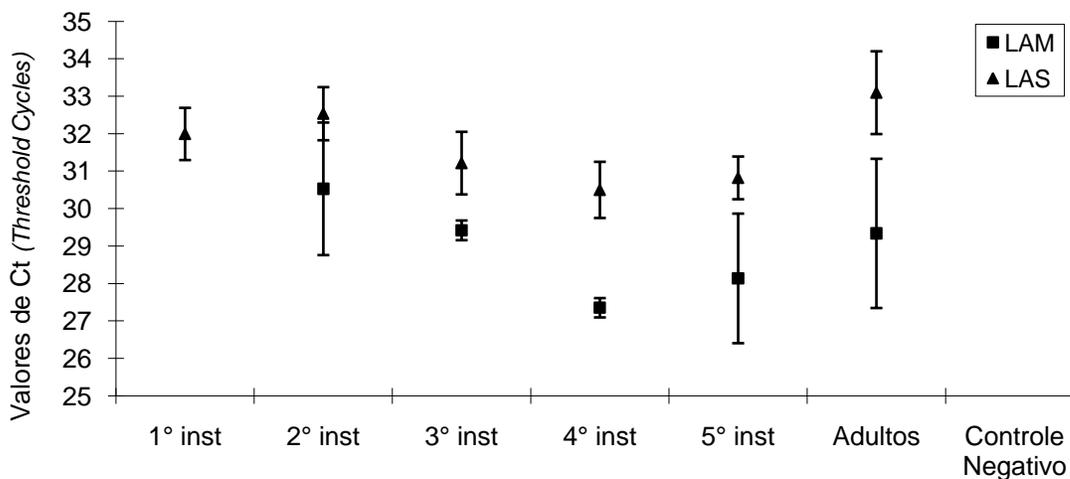


Figura 2 – Valores de Ct (Threshold cycles) para insetos infectivos com “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” (LAS) e “*Ca. L. americanus*” (LAM) após 21 dias do PAA de 48h. As barras representam o erro padrão da média. Valores de Ct são inversamente proporcionais à concentração bacteriana

Apesar de os insetos de todos os tratamentos/blocos terem sido submetidos a um período de acesso à inoculação (PAI) em plantas-teste saudáveis, tais plantas não puderam ser testadas em sua totalidade quanto à transmissão da bactéria pelos insetos, devido ao longo período (meses) necessário para a detecção do patógeno na planta após sua inoculação por vetores. No entanto, detectou-se a transmissão de LAM em um dos primeiros blocos montados, o qual não foi incluído nas análises descritas anteriormente, pelo pequeno número de insetos infectivos. Detectou-se apenas um inseto positivo por Q-PCR nos seis tratamentos de aquisição avaliados; foi um inseto de 2º instar submetido ao PAA de 24 h em uma planta-fonte de LAM no período de 19 a 21 de agosto de 2009. Seis meses após o PAA, foi possível observar sintomas característicos de HLB na muda. Com a apresentação destes sinais, estas e mais algumas plantas foram testadas por Q-PCR em Abril de 2010. A planta sintomática apresentou-se positiva, com valor de $Ct = 21,96 \pm 0,03$ (valor considerado de alta concentração) enquanto o inseto correspondente apresentou valor de $Ct = 35,89 \pm 0,26$, valor considerado baixo como concentração bacteriana, porém a transmissão ocorreu e a planta foi severamente atingida pela doença, (Figura 6/ Anexo E).

2.3.3 Avaliação do crescimento populacional de “*Ca. L. asiaticus*” no inseto vetor

Neste experimento, investigou-se a hipótese de que a concentração de “*Ca. L. asiaticus*” no psílideo vetor aumenta com o tempo após a aquisição do patógeno em plantas infectadas. Assim, indivíduos de *D. citri* foram avaliados quanto à concentração da bactéria pelo teste de Q-PCR a intervalos sucessivos de 7 dias após um PAA de 24 h em planta-fonte de “*Ca. L. asiaticus*”.

No caso de aquisição por ninfas, verificou-se aumento significativo de concentração bacteriana no inseto em relação ao tempo após início do PAA (Figura 3), o que condiz com os resultados de Inoue et al. (2009), que observaram que a concentração do patógeno no inseto aumentou em até 130 vezes 20 dias após início do PAA.

Detectou-se a bactéria LAS no primeiro intervalo de tempo, de 7 dias. Não foi observado aumento da proporção de insetos infectivos ao longo do tempo, sendo este número variável.

Para o tratamento de aquisição por adultos, a análise de regressão linear mostrou uma tendência de diminuição da concentração de LAS nos psíldeos (aumento de Ct) após 21 dias do início do PAA, fato também relatado por Inoue et al. (2009), que apresentam a hipótese de que o patógeno não é capaz de colonizar os adultos da mesma forma que ocorre com ninfas.

Tabela 3 – Taxa de infectividade e progressão da concentração de “*Ca. Liberibacter asiaticus*” em *Diaphorina citri* em relação ao tempo após um período de acesso à aquisição (PAA) de 24 h por ninfas e adultos em planta-fonte da bactéria

Dias após PAA	Proporção insetos infectivos		Concentração bacteriana em Ct ¹	
	Ninfas	Adultos	Ninfas	Adultos
7	0,60 (3/5)	0,50 (5/10)	32,29 ± 0,61	30,50 ± 1,14
14	1,00 (5/5)	0,30 (3/10)	30,64 ± 0,93	28,19 ± 0,15
21	0,75 (3/4)	0,50 (5/10)	27,59 ± 0,77	30,19 ± 1,23
28	...	0,40 (4/10)	...	34,48 ± 0,68
Ctl Neg. ²	0	0	indeterminado	indeterminado

¹ Valores aproximados de concentração bacteriana no inseto. Valores de Ct ± EPM (erro padrão da média)

² insetos do mesmo lote de aquisição sem contato com a planta-fonte.

... dado numérico não disponível (insetos morreram antes de completar o experimento).

Além do relato sobre a baixa multiplicação do patógeno dentro do organismo do de *D. citri*, há ainda o caso do Vírus do “Vira Cabeça” do Tomateiro (*Tomato spotted wilt virus* -TSWV), transmitido pelos tripses *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (MORITZ et al., 2004). Neste caso, o inseto somente adquire o patógeno em sua forma jovem e só transmite o vírus quando já se tornou adulto. Isso ocorre pois o vírus é inoculado na planta através da saliva do inseto, e só consegue atingir as glândulas salivares quando o inseto ainda está em sua forma jovem. No caso de “*Ca. Liberibacter*” em *D. citri*, a interação não chega a ser tão específica, uma vez que o adulto é capaz de adquirir a bactéria. Porém, a observação de uma menor eficiência de transmissão após a aquisição pelo adulto, bem como de um declínio na concentração bacteriana no inseto

após algumas semanas sugere que este patógeno esteja encontrando alguma barreira ao ser adquirido por um adulto, que não estaria ocorrendo no estágio de ninfa. Para que essa hipótese seja testada, resta ainda saber se o processo de inoculação realmente está relacionado com a salivação do inseto durante sua alimentação (BONANI, 2009) e, conseqüentemente, dependente da multiplicação do patógeno na glândula salivar do vetor. algo que ainda não está elucidado.

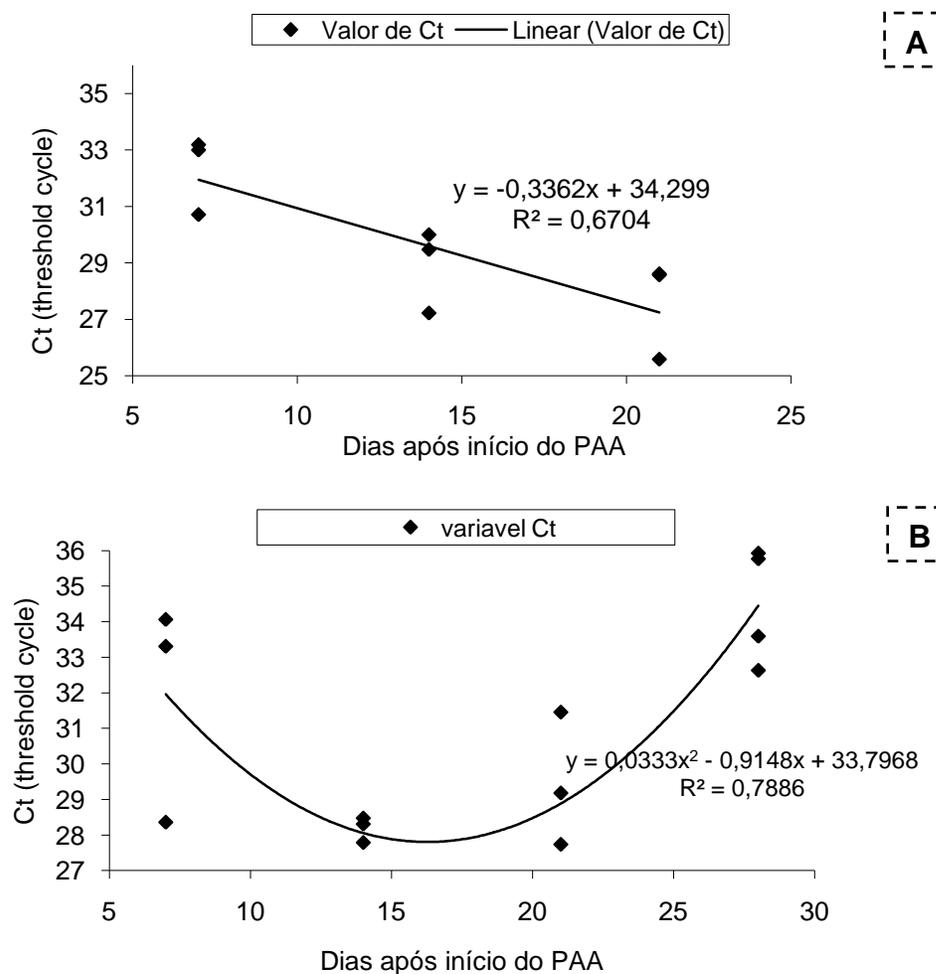


Figura 3 – Relação entre tempo após início do período de acesso a aquisição (PAA) e concentração bacteriana (Ct) em indivíduos de *Diaphorina citri* que adquiriram “Ca. L. asiaticus” nos estágios de ninfa (A) e adulto (B). Valores de Ct mais baixos indicam maior concentração bacteriana naquele inseto (Ct é inversamente proporcional à concentração bacteriana).

2.3.4 Avaliação do crescimento populacional de, “*Ca. Liberibacter asiaticus*” e “*Ca. L. americanus*” em *D. citri*

Este experimento também teve por objetivo investigar o crescimento bacteriano em *D. citri* após a aquisição em plantas infectadas, porém aqui incluiu-se a bactéria “*Ca. L. americanus*” e avaliou-se a infectividade a intervalos de tempo mais curtos: 1, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 dias após o início do PAA.

Os insetos submetidos à aquisição em planta-fonte de LAM apresentaram maior taxa de infectividade em relação ao grupo de insetos submetido a planta-fonte de LAS (Tabelas 4 e 5), detectando-se a bactéria (LAM) em insetos aos 15, 20, 25 e 30 dias após início do PAA (Figura 4). Não houve diferença significativa na concentração de LAM nos insetos entre os tratamentos (dias após início do PAA) pela análise de variância (ANOVA) seguida de comparação de médias por Tukey ao nível de 5% de significância (Tabela 4). Apenas ninfas adquiriram LAM neste experimento; nenhum dos 65 indivíduos submetidos ao PAA em planta-fonte de LAM no estágio adulto foram positivos para esta bactéria.

Tabela 4– Taxa de infectividade e progressão da concentração de “*Ca. Liberibacter americanus*” (LAM) em *Diaphorina citri* em relação ao tempo após o início do período de acesso à aquisição (PAA) de 24 h por ninfas em planta fonte da bactéria

Dias após PAA	% insetos infectivos (N° ins. infectivos/ N° ins. testados)	Concentração Bacteriana Ct médio ± EPM ¹
1	0 (0/10)	Indeterminado
5	0 (0/10)	indeterminado
10	0 (0/10)	indeterminado
15	33 (3/9)	33,91 ± 0,69 a ²
20	30 (3/10)	31,32 ± 3,27 a
25	50 (5/10)	31,11 ± 0,86 a
30	40 (4/10)	31,92 ± 1,38 a

¹ Estimativa da concentração bacteriana no inseto baseando-se em valores de Ct (threshold cycle) para detecção por Q-PCR). Valores de Ct médio ± erro padrão da média (EPM)

² Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

Uma baixa proporção de insetos adultos adquiriram a bactéria LAS nos intervalos de 10, 20 e 30 dias após PAA, não sendo possível a realização de análise estatística (Tabela 5).. No caso de aquisição de LAS por ninfas, as taxas de infectividade foram um pouco mais elevadas, porém não houve diferenças significativas na concentração bacteriana encontrada nos insetos ao longo do tempo após o PAA. Os intervalos de Ct encontrados foram de 34,78 a 31,92 para adultos e de 34,84 a 27,77 para ninfas (Tabela 5; Figura 5).

Apesar de a análise estatística não ter indicado diferença significativa na concentração de LAS em *D. citri* em períodos sucessivos após a aquisição por ninfas (Tabela 5), o valor médio de Ct após 30 dias do PAA ($27,77 \pm 2,93$) foi bem mais baixo do que aos 20 e 25 dias, sugerindo um incremento populacional da bactéria no inseto. O baixo número de insetos infectivos obtidos neste experimento ($n \leq 2$) provavelmente dificultou a separação estatística dessas médias de Ct para as ninfas.

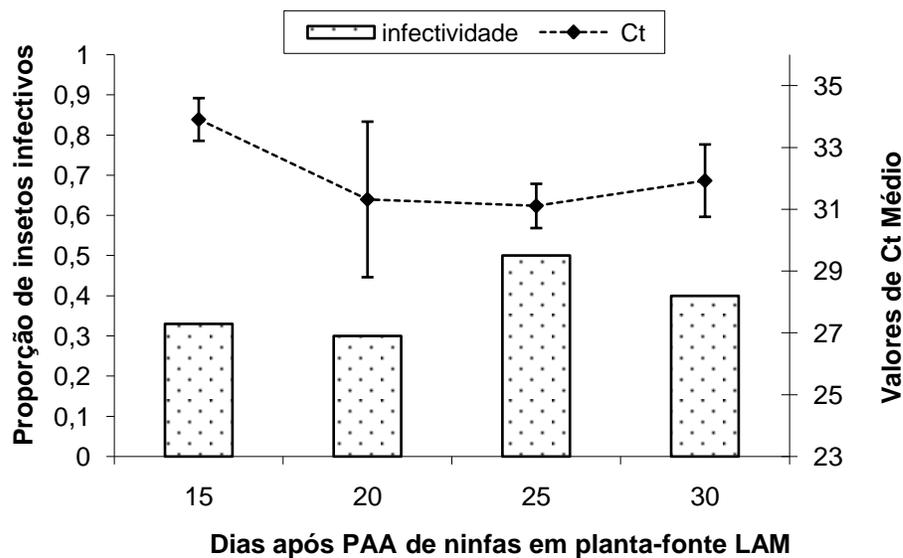


Figura 4 - Progressão da infectividade (barras) e concentração de “*Ca. Liberibacter americanus*” (LAM) (linhas) em indivíduos de *Diaphorina citri* com o tempo após um período de acesso à aquisição (PAA) de 24 h por ninfas em planta-fonte da bactéria (valor de Ct é inversamente proporcional à concentração bacteriana)

Tabela 5 – Taxa de infectividade e progressão da concentração de “*Ca. Liberibacter asiaticus*” (LAS) em *Diaphorina citri* em relação ao tempo após um período de acesso à aquisição (PAA) de 24 h por ninfas e adultos em planta fonte da bactéria

Dias após PAA	% insetos infectivos (N° ins. infectivos/ N° ins. testados)		Concentração Bacteriana Ct médio ± EPM ²	
	Ninfas	Adultos	Ninfas ³	Adultos ⁴
1	0 (0/10)	0 (0/10)	indeterminado	Indeterminado
5	0 (0/10)	0 (0/10)	Indeterminado	indeterminado
10	0 (0/10)	10 (1/10)	indeterminado	34,78
15	0 (0/10)	10 (1/10)	indeterminado	indeterminado
20	20 (2/10)	10 (1/10)	34,85 ± 0,7 a	29,73
25	33 (2/6)	0 (0/10)	33,4 ± 0,66 a	Indeterminado
30	20 (2/10)	10 (1/10)	27,77 ± 2,93 a	31,92

¹ Dias após o início do período de acesso à aquisição PAA, de 24h

² Estimativa da concentração bacteriana no inseto baseando-se em valores de Ct (threshold cycle para amplificação por Q-PCR). Valores de Ct médio ± erro padrão da média (EPM)

³ Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05)

⁴ Adultos não foram avaliados estatisticamente por número insuficiente de amostras

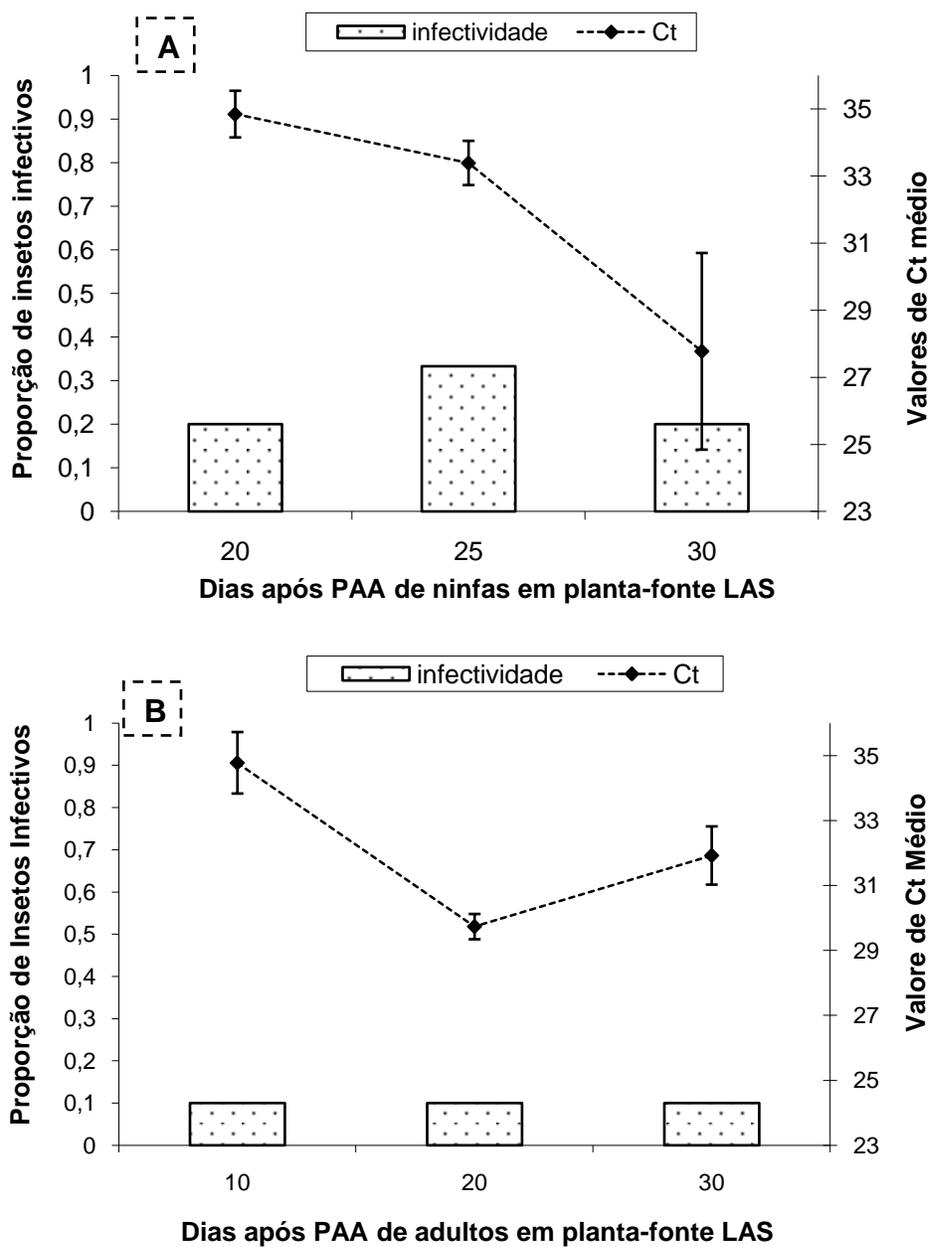


Figura 5 - Progressão da proporção de infectividade (barras) e concentração de “*Ca. Liberibacter asiaticus*” (LAS) (linhas) em indivíduos de *Diaphorina citri* com o tempo após um período de acesso à aquisição (PAA) de 24 h por ninfas (A) e adultos (B) em planta-fonte da bactéria (valor de Ct é inversamente proporcional a concentração bacteriana)

2.3.5 Teste de aquisição seqüencial e multiplicação de “*Ca. L. asiaticus*” e “*Ca. L. americanus*” no vetor.

Sem dúvida, o ponto alto deste trabalho foi a tentativa de elucidar a hipótese da infecção simultânea de LAM e LAS em *D. citri*, após aquisição seqüencial por ninfas ou adultos. Com os resultados obtidos verificou-se que os insetos não adquiriram ambas as bactérias, concomitantemente, mesmo tendo passado por PAAs longos (96h) tanto em plantas-fonte de LAM como em plantas-fonte de LAS (Tabela 6, 7, 8, 9).

Na aquisição por ninfas da primeira Repetição (RI) do experimento notou-se, curiosamente, um aumento contínuo na proporção de indivíduos LAM-positivos para o tratamento de aquisição seqüencial “LAS/LAM”, sendo de 10% aos 16 dias, 30% aos 24 e 32 dias e 40% aos 40 dias após PAA, sugerindo persistência da bactéria no inseto (com possível incremento na população bacteriana) como já relatado na literatura (HUNG et al., 2004) (Tabela 6). Como o tratamento correspondente, “LAM/LAS”, foi perdido por alta mortalidade dos insetos, não foi possível comparar os resultados entre os mesmos. Porém, esse resultado sugere que, caso as ninfas tenham tido contato com bactérias de LAS no primeiro PAA, estas não influenciaram a colonização de LAM no organismo do inseto. Outra hipótese seria das ninfas terem se alimentado em vasos de floema sem a bactéria LAS, quando em aquisição em plantas-fonte infectadas com essa bactéria, por conta de sua distribuição desigual na planta (GOTTWALD; DA GRAÇA; BASSANEZI, 2007). No entanto, com o longo período de aquisição (96 h) o inseto teria feito muitas tentativas de alimentação na planta-fonte. Por meio da técnica de Electrical Penetration Graph (EPG), Bonani (2009) constatou que *D. citri* realiza, em média, cerca de 20 provas em uma planta cítrica e, ao atingir o tecido do floema, a alimentação nos vasos crivados dura 206,11 minutos, em média, para um período de 8 h de avaliação. Estas informações sobre o comportamento alimentar de *D. citri* sugerem que a probabilidade de o inseto ficar as 96 h de aquisição apenas em vasos livres da bactéria é bastante baixa.

Tabela 6 – Dados individualizados de aquisição de “*Ca. Liberibacter americanus*” (LAM) e “*Ca. L. asiaticus*” (LAS) por ninfas de *Diaphorina citri* de forma isolada (somente em planta-fonte LAS) ou seqüencial (em planta-fonte de LAS seguida de LAM) (Repetição I)

Dias ¹	Plantas-fonte	Q-PCR ² LAM	LAM		Q-PCR ² LAS	LAS	
			N° Am ³	Ct médio ± EP		N° Am ³	Ct médio ± EP
8	LAS	NA	NA	NA	0/10	-	-
	LAS → LAM	0/10	-	-	0/10	-	-
16	LAS	NA	NA	NA	2/10	423	35,03 ± 0,1
	LAS → LAM	1/10	461	35,72 ± 0,03	0/10	424	35,23 ± 0,09
24	LAS	NA	NA	NA	1/10	477	33,08 ± 0,26
	LAS → LAM	3/10	516	30,48 ± 0,39	0/10	-	-
			517	32,70 ± 1,29			
			519	34,15 ± 0,95			
32	LAS	NA	NA	NA	2/10	540	35,32 ± 0,15
	LAS → LAM	3/10	576	27,96 ± 0,39	2/10	544	30,59 ± 0,14
			577	25,91 ± 0,09		578	35,07 ± 0,20
			583	26,06 ± 0,16		580	32,29 ± 0,49
40	LAS	NA	NA	NA	7/10	596	29,43 ± 0,09
	LAS → LAM	4/10	619	23,86 ± 0,10	0/10	598	29,28 ± 0,01
			621	32,86 ± 0,05		599	29,52 ± 0,02
			622	29,63 ± 0,14		600	30,74 ± 0,17
			624	26,56 ± 0,00		601	29,72 ± 0,31
						602	25,92 ± 0,07
					605	26,73 ± 0,14	

¹ Dias após o início do período de acesso à aquisição (PAA) de 96 h na 1ª. planta-fonte. Tratamentos com aquisição seqüencial passaram por um PAA de 96 h em cada planta-fonte, totalizando 192 h.

² Proporção entre o número de insetos positivos pelo Q-PCR (Ct < 36) e o número total de insetos avaliados, sendo os valores de Ct (*threshold cycle*) inversamente proporcionais à concentração bacteriana no inseto.

³ Número individual das amostras de psilídeos para mostrar que não houve inseto que adquiriu ambas as bactérias no tratamento de aquisição seqüencial (LAS → LAM).

Já nos tratamentos de aquisição por adultos da RI, observaram-se insetos LAM-positivos aos 16 e 24 dias após o PAA para o tratamento de aquisição apenas em planta-fonte de “LAM”, com baixo título bacteriano (próximo do limite Ct<36) (Tabela 7). No entanto, aos 32 dias, não houve insetos infectivos para este tratamento, mas sim para o tratamento de aquisição seqüencial “LAM/LAS”, 2 insetos entre 10 testados, que

apresentaram título bacteriano mais alto (Ct = 29,35 e 29,34), caracterizando uma infecção com a primeira bactéria com a qual o inseto teve contato (Tabela 7).

Tabela 7 – Dados individualizados da aquisição de “*Ca. Liberibacter americanus*” (LAM) e “*Ca. L. asiaticus*” (LAS), por adultos de *Diaphorina citri*, de forma isolada (somente em planta-fonte de LAS ou de LAM) ou seqüencial (planta-fonte de LAS seguida de LAM ou planta-fonte de LAM seguida de LAS) (Repetição I)

Dias ¹	Plantas-fonte	Q-PCR ² LAM	LAM		Q-PCR ² LAS	LAS	
			Nº Am ³	Ct médio ± EP		Nº Am ³	Ct médio ± EP
8	LAS	NA	NA	NA	0/10	-	-
	LAM	0/10	-	-	NA	NA	NA
	LAM → LAS	0/10	-	-	0/10	-	-
	LAS → LAM	0/10	-	-	0/10	-	-
16	LAS	NA	NA	NA	0/10	-	-
	LAM	1/10	429	35,57 ± 1,03	NA	NA	NA
	LAM → LAS	0/10	-	-	0/10	-	-
	LAS → LAM	0/10	-	-	0/10	-	-
24	LAS	NA	NA	NA	1/10	469	34,42 ± 0,07
	LAM	1/10	492	35,17 ± 0,17	NA	NA	NA
	LAM → LAS	0/10	-	-	0/10	-	-
	LAS → LAM	0/10	-	-	0/10	-	-
32	LAS	NA	NA	NA	0/10	-	-
	LAM	0/10	-	-	NA	NA	NA
	LAM → LAS	2/10	556	29,35 ± 0,05	0/10	-	-
			558	29,34 ± 0,08			
40	LAS → LAM	0/10	-	-	0/10	-	-
	LAS	NA	NA	NA	1/10	592	32,14 ± 0,10
	LAS → LAM	0/10	-	-	0/10	-	-

¹ Dias após o início do período de acesso à aquisição (PAA) de 96 h na 1ª. planta-fonte. Tratamentos com aquisição seqüencial passaram por um PAA de 96 h em cada planta-fonte, totalizando 192 h.

² Proporção entre o número de insetos positivos pelo Q-PCR (Ct < 36) e o número total de insetos avaliados, sendo os valores de Ct (*threshold cycle*) inversamente proporcionais à concentração bacteriana no inseto.

³ Número individual das amostras de psilídeos para mostrar que não houve inseto que adquiriu ambas as bactérias no tratamento de aquisição seqüencial (LAS → LAM).

⁴ NA: Não se aplica.

Tabela 8 - Dados individualizados de aquisição de “*Ca. Liberibacter americanus*” (LAM) e “*Ca. L. asiaticus*” (LAS) por ninfas de *Diaphorina citri* de forma isolada (somente em planta-fonte de LAS) ou seqüencial (em planta-fonte de LAS seguida de LAM) (Repetição II)

Dias ¹	Tratamentos	Q-PCR ² _{LAM}	LAM		Q-PCR ² _{LAM}	LAS	
			N° Am ³	Ct médio ± EP		N° Am ³	Ct médio ± EP
8	LAS	NA	NA	NA	0/5	-	-
	LAM	0/10	-	-	NA	NA	NA
	LAM → LAS	0/5	-	-	0/5	-	-
16	LAS	NA	NA	NA	1/5	804	33,81 ± 0,51
	LAM	0/7	-	-	NA	NA	NA
	LAM → LAS	0/5	-	-	3/5	834	34,79 ± 0,22
						836	33,58 ± 0,11
838						29,16 ± 0,07	
24	LAS	NA	NA	NA	1/5	862	33,28 ± 0,7
	LAM	0/7	-	-	NA	NA	NA
	LAM → LAS	0/6	-	-	4/6	892	31,61 ± 0,06
						894	34,58 ± 0,03
						895	35,18 ± 0,31
896						33,2 ± 0,004	
32	LAS	NA	NA	NA	3/5	918	30,92 ± 1,36
	LAM → LAS	0/5	-	-	0/5	920	31,21 ± 1,67
						921	34,41 ± 2,8
						NA	NA
						-	-
40	LAS	NA	NA	NA	4/10	979	31,99 ± 0,64
	LAM → LAS	1/10	1019	33,40 ± 0,03	8/10	980	34,67 ± 0,45
						981	34,09 ± 1,88
						985	28,26 ± 0,97
						NA	NA
						1016	31,55 ± 0,08
						1017	25,42 ± 0,16
						1018	31,30 ± 0,05
						1020	33,52 ± 0,02
						1021	30,84 ± 0,01
						1022	33,35 ± 0,06
1023	27,41 ± 1,13						
1025	29,37 ± 0,06						

¹ Dias após o início do período de acesso à aquisição (PAA) de 96 h na 1ª. planta-fonte. Tratamentos com aquisição seqüencial passaram por um PAA de 96 h em cada planta-fonte, totalizando 192 h.

² Proporção entre o número de insetos positivos pelo Q-PCR (Ct < 36) e o número total de insetos avaliados, sendo os valores de Ct (*threshold cycle*) inversamente proporcionais à concentração bacteriana no inseto.

³ Número individual das amostras de psilídeos para mostrar que não houve inseto que adquiriu ambas as bactérias no tratamento de aquisição seqüencial (LAS → LAM).

⁴ NA: Não se aplica.

Tabela 9 - Dados individualizados da aquisição de “*Ca. Liberibacter americanus*” (LAM) e “*Ca. L. asiaticus*” (LAS), por adultos de *Diaphorina citri*, de forma isolada (somente em planta-fonte de LAS ou de LAM) ou seqüencial (planta-fonte de LAS seguida de LAM ou planta-fonte de LAM seguida de LAS) (Repetição II)

Dias ¹	Tratamentos	Q-PCR ²		LAM		LAS	
		LAM	Nº Am ³	Ct médio ± EP	LAS	Nº Am ³	Ct médio ± EP
8	LAS	NA	NA	NA	0/7	-	-
	LAM	0/10	-	-	NA	NA	NA
	LAM → LAS	0/10	-	-	0/10	-	-
	LAS → LAM	0/10	-	-	0/10	-	-
16	LAS	NA	NA	NA	0/10	-	-
	LAM	0/10	-	-	NA	NA	NA
	LAM → LAS	0/10	-	-	1/10	826	35,67 ± 0,1
	LAS → LAM	0/10	-	-	0/10	-	-
24	LAS	NA	NA	NA	2/10	849	33,12 ± 0,02
	LAM	0/10	-	-	NA	NA	NA
	LAM → LAS	0/10	-	-	2/10	882	34,56 ± 0,28
	LAS → LAM	0/10	-	-	0/10	890	35,06 ± 0,48
32	LAS	NA	NA	NA	0/11	-	-
	LAM	0/10	-	-	NA	NA	NA
	LAM → LAS	0/10	-	-	0/10	-	-
	LAS → LAM	0/10	-	-	0/10	-	-
40	LAS	NA	NA	NA	0/10	-	-
	LAM	0/10	-	-	NA	NA	NA
	LAM → LAS	1/10	1008	30,73 ± 0,09	1/10	1006	32,4 ± 0,44
	LAS → LAM	0/9	-	-	1/9	1028	31,67 ± 0,03

¹ Dias após o início do período de acesso à aquisição (PAA) de 96 h na 1ª. planta-fonte. Tratamentos com aquisição seqüencial passaram por um PAA de 96 h em cada planta-fonte, totalizando 192 h.

² Proporção entre o número de insetos positivos pelo Q-PCR (Ct < 36) e o número total de insetos avaliados, sendo os valores de Ct (*threshold cycle*) inversamente proporcionais à concentração bacteriana no inseto.

³ Número individual das amostras de psíldeos para mostrar que não houve inseto que adquiriu ambas as bactérias no tratamento de aquisição seqüencial (LAS → LAM).

⁴ NA: Não se aplica.

O número total de insetos LAS-positivos nos testes de aquisição por ninfas e adultos na foi pouco maior do que os LAM-positivos (16 e 15, respectivamente) nesta 1ª repetição do experimento (Tabelas 6 e 7). A grande maioria dos indivíduos LAS-positivos foram do tratamento de aquisição isolada “LAS” por ninfas, aos 16, 24, 32 e 40 dias após PAA (Tabela 6). Apenas dois indivíduos mostraram-se infectivos com LAM no tratamento “LAS/LAM”, aos 32 dias após o PAA por ninfas, indicando que houve colonização da primeira bactéria com a qual os insetos entraram em contato. A maior proporção de insetos LAS-positivos (70%) foi aos 40 dias após aquisição por ninfas, apresentando valores de Ct entre 25,92 e 30,74 (Tabela 6).

Na 2ª. repetição do experimento (RII) a proporção de insetos LAM-positivos foi extremamente baixa (Tabelas 8 e 9), provavelmente indicando algum problema com aquisição na planta-fonte LAM utilizada, apesar de a mesma ter sido diagnosticada como LAM-positiva por Q-PCR (Ct HLB 16S= 27,75 / Ct 18S = 17,22). Apenas um adulto e uma ninfa, ambos aos 40 dias do tratamento “LAM/LAS”, foram LAM-positivos por Q-PCR, sendo que o adulto apresentou uma concentração bacteriana ligeiramente mais alta (Ct= 30,73) do que a ninfa (Ct = 33,4) (Tabelas 8 e 9). Como comentado anteriormente (ver item 2.3.2), observou-se, durante toda a realização deste trabalho, alta mortalidade de insetos que se alimentaram em planta-fonte de LAM, algo que possivelmente ocorre devido à interação bactéria “*Ca. L. americanus*” X planta e, conseqüentemente planta X inseto. Entretanto, ainda há poucos estudos sobre essas interações (principalmente primeira) na literatura, sendo este um assunto que, definitivamente, precisa de estudos detalhados para ajudar a elucidar as interações entre o inseto vetor e sua planta hospedeira, e como esta interação influencia no processo de transmissão do fitopatógeno. Kim e colaboradores (2009) apresentaram informações relacionadas à interação de “*Ca. L. asiaticus*” com a planta cítrica, mas não com o inseto.

Em RII, a maioria dos indivíduos LAS-positivos por Q-PCR foram observados após aquisição por ninfas, , sendo a maior proporção encontrada para o tratamento de aquisição seqüencial “LAM/LAS” (Tabela 8), aos 16, 24 e 40 dias após PAA. Identificaram-se alguns insetos LAS-positivos para o tratamento “LAS” aos 16, 24 e 40 dias após o PAA por ninfas, porém em menor número. Na aquisição por ninfas,

observou-se a maior proporção de insetos LAS-positivos aos 40 dias após PAA, para o tratamento “LAM/LAS”, onde 8, de 10 insetos testados, apresentaram Ct variável entre 25,42 e 33,52.

De forma geral, observou-se que ninfas adquiriram as bactérias LAM ou LAS com maior eficiência que os adultos, concordando com outros trabalhos na literatura (INOUE et al., 2009; VICHIN-NETO et al., 2008). Não se observou, em nenhuma das duas repetições realizadas para este experimento, a aquisição seqüencial das bactérias LAM e LAS por um mesmo indivíduo, ou vice-versa, tanto para aquisição por ninfas como por adultos de *D. citri*. Houve casos da bactéria adquirida pelo inseto ser a segunda com a qual o inseto foi colocado em contato via planta-fonte.

3 CONCLUSÕES

- ✓ Ninfas de *Diaphorina citri* adquirem as bactérias “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” e “*Ca. L. americanus*” com maior eficiência que os adultos.
- ✓ A concentração de “*Ca. L. asiaticus*” atinge níveis mais elevados em *D. citri* quando a aquisição ocorre no quarto ou quinto ínstar da fase ninfal.
- ✓ A concentração bacteriana de “*Ca. L. asiaticus*” em *D. citri* aumenta com o tempo após o início do período de acesso à aquisição na fase ninfal.
- ✓ Quando a aquisição ocorre na fase adulta, há uma tendência de estabilidade ou redução da concentração de “*Ca. L. asiaticus*” no inseto após 2 a 3 semanas do início do período de acesso à aquisição.
- ✓ *D. citri* não adquire “*Ca. L. asiaticus*” e “*Ca. L. americanus*” concomitantemente.

REFERÊNCIAS

- AUBERT, B. *Trioza erytreae* (del Guercio) and *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psylloidea), the two vectors of citrus greening disease: Biological aspects and possible control strategies. **Fruits**, Paris, v. 42, n. 3, p. 149-162, 1987.
- BERGMANN, E.C.; FERNANDES, S.C.S.; FARIA, A.M. Surto de *Diaphorina citri* Kuwayama, 1908 (Hemiptera: Psyllidae), em pomares cítricos no estado de São Paulo. **Biológico**, São Paulo, v.56, n. 1 /2, p.22-25, 1994.
- BONANI, J.P. **Caracterização do aparelho bucal e comportamento alimentar de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) em *Citrus sinensis* (L.) Osbeck.** 2009. 83 p. Tese (Doutorado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.
- BOVÉ, J.M. Huanglongbing: a destructive, newly emerging, century-old disease of citrus. **Journal of Plant Pathology**, Piza, v. 88, n. 1, p. 7-37, 2006.
- BOVÉ, J.M.; GARBIER, M.; AHLAWAT, Y.S.; CHAKRABORTY, N.K.; VARMA, A. Detection of the Asian strains of the greening BLO by DNA-DNA hybridization in Indian orchard trees and Malaysian *Diaphorina citri* psyllids. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITROS VIROLOGISTS, 12th. 1993. Riverside. **Proceedings...** Riverside, 1993, p.258-263.
- BOX, G.E.P.; COX, D.R. An analysis of transformations (with discussion). **Journal of the Royal Statistical Society**, Paris, Séries B, v. 26, p. 211-252. 1964.
- BUITENDAG, C.H.; von BROEMBSSEN, L.A. Living with citrus greening in South Africa. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITROS VIROLOGISTS, 12th. 1993. Riverside. **Proceedings...** Riverside, 1993, p.269-273.
- BUSTIN, S.A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, Bradley Stoke, v. 25, p. 169-193, 2000.
- CAPOOR, S.P. Decline of citrus trees in India. **Bulletin of the National Institute of Science India**, Poona, v. 24, p. 48-64, 1963.

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

CAPOOR, S.P.; RAO, D.G.; VISWANATH, S.M. Greening Disease of citrus in the Deccan Trap Country and its relationship with the vector, *Diaphorina citri* Kuwayama. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITROS VIROLOGISTS, 6.,, 1974. Richmond. **Proceedings...** University of California, Richmond, 1974. p. 43-49.

CAPOOR, S.P.; THIRUMALACHAR, M. J. Cure of greening affect citrus plants by chemotherapeutic agents. **Plant Disease Reporter**, Washington, v. 57, n. 2, p. 160-163, Fev 1973.

CARLOS, E.F.; COLETTA-FILHO, H.D.; TARGON, M.L.N.; MACHADO, M.A. Quantitative real-time PCR based on TAQ-MAN probes for the molecular detection of *Candidatus Liberibacter asiaticus* and *Ca. L. americanus*. In: HUANGLONGBING - GREENING INTERNATIONAL WORKSHOP, 2006, Ribeirão Preto. **Proceedings...** Ribeirão Preto, July 16, 2006. p.81.

CATLING, H.D. Distribution of the psyllid vectors of citrus greening disease, with notes on the biology and bionomics of *Diaphorina citri*. **FAO Plant Protection Bulletin**, Roma v. 18, p. 8-15, 1970.

CHEN, M.H.; MIYAKAWA, T.; MATSUI, C. Citrus likubin pathogens in the salivary glands of *Diaphorina citri*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.63, p. 194-195, 1973.

COLETTA-FILHO, H.D.; CARLOS, E.F.; ALVES, K.C.S.; PEREIRA, M.A.R.; BOSCARIOL-CAMARGO, R.L.; SOUZA, A.A.; MACHADO, M.A. *In planta* multiplication and graft transmission of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' revealed by Real-Time PCR. **European Journal of Plant Pathology**, Netherlands, v. 126, n. 1, p. 53-60, 2009.

COLETTA-FILHO, H.D.; TARGON, M.L.P.N.; TAKITA, M.A.; DE NEGRI, J.D.; POMPEU Jr.; J. DO AMARAL, A.M.; MULLER, G.W.; MACHADO, M.A. First report of the causal agent of huanglongbing ("*Candidatus Liberibacter asiaticus*") in Brazil. **Plant Disease**, St. Paul, v. 88, p. 1382, 2004.

COSTA-LIMA, A.M. **Insetos do Brasil**; Rio de Janeiro: Escola Nacional de Agronomia, 1942. 101 p. (série didática, 3: Homoptera).

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

DENG, X.; LI, J.; XU, J.; FANG, S.; LI, H.; CHEN, J. A method for a quick detection of huanglongbing agent from asiatic citrus psyllid (*Diaphorina citri* Kuwayama). In: HUANGLONGBING - GREENING INTERNATIONAL WORKSHOP, 2006, Ribeirão Preto. **Proceedings...** Ribeirão Preto, July 16, 2006. p. 85.

EUZÉBY, J.P. **List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature**. 2010. Disponível em: < <http://www.bacterio.cict.fr/candidatus.html>>. Acesso em: 28 Jun. 2010.

GALLO, D.; NAKANO, O.; NETO, S.S.; CARVALHO, R.P.L.; BAPTISTA, G.C.; FILHO, E.B.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIM, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920p.

GARNIER, M. BOVÉ, J.M. Transmission of the organism associated with citrus greening disease from sweet orange to periwinkle by dodder. **Phytopathology**, St. Paul, v. 73, p.1358-1363, 1983.

GARNIER, M.; DANIEL, N.; BOVÉ, J.M. The greening organism is a gram negative bacterium. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 9., 1984, Riverside, **Proceedings...** Riverside, 1984. p. 115-124.

GIBSON, U.E.; HEID, C.A.; WILLIAMS, P.M. A novel method for real-time quantitative RT-PCR. **Genetical Research**, Cambridge, v. 6, p. 1095-2001, 1996.

GOTTWALD, T.R.; DA GRAÇA, J.V.; BASSANEZI, R.B. Citrus Huanglongbing: The Pathogen and Its Impact. **Plant Management Network**. Online: Plant Health Progress doi:10.1094/PHP-2007-0906-01-RV, 2007.

HARTLEY, H.O. The use of range in analysis of variance. **Biometrika**, London, v. 37, p. 271–280, 1950.

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, n. 3, p. 330-353, 2004.

HALBERT, S.E.; NUNEZ, C.A. Distribution of the asian citrus psyllid *Diaphorina citri* Kuwayama (Rhynchoa: Psyllidae) in the Caribbean basin. **Florida Entomologist**, Gainesville, v.87, n.3, p.401-402, 2004.

HIGUCHI, R.; FOCKLER, C.; DOLLINGER, G.; WATSON, R. Kinetic PCR analysis: Real-Time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology**, Weinheim, v.11, n. 9, p.1026-1030, 1993.

HODKINSON, I.D. The biology of the Psylloidea (Homoptera): a review. **Bulletin of Entomological Research**, Farnaham Royal, v. 64, p. 325-339, 1974.

HOY, M.A.; NGUYEN, R. Classical biological control of Asian citrus psylla. **Citrus Industry**, Ocala, v. 81, n. 12, p. 48-50, 2001.

HUANG, J.; LOU, X.; HUANG, B.; YAO, X. Studies on citrus psylla *Diaphorina citri* Kuwayama and its control. **Entomological Journal of East China**, Pequim, v. 8, p. 26-34, 1999.

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**, Oxford, v. 53, p. 96-102, 2004.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Confronto das Safras de 2009 e 2010 - Brasil - Junho 2010. **Levantamento sistemático de produção agrícola**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201006_5.shtm>. Acesso em: 20 jul.2010.

INOUE, H.; OHNISHI, J.; ITO, T.; TOMIMURA, K.; MIYATA, S.; IWANAMI, T.; ASHIHARA, W. Enhanced proliferation and efficient transmission of *Candidatus Liberibacter asiaticus* by adult *Diaphorina citri* after acquisition feeding in nymphal stage. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 155, p. 29-36, 2009.

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**, Reading, v. 44, p.379-386, 1994.

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

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**, Saint Paul, v. 99, p. 50-57, 2009.

LALLEMAND, J.; FOS, A.; BOVÉ, J.M. Transmission de la bactérie associée à la forme africaine de la maladie du greening par la psylle asiatique *Diaphorina citri* Kuwayama. **Fruits**, Paris, v.41, p. 341-343, 1986.

LAFLECHE, D.; BOVÉ, J.M. Structures de type mycoplasme dans les feuilles d'orangers atteints de la maladie du greening. **Académie des sciences**. Paris, vol. 200, p.1915-1917, 1970.

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**, Liverpool, v. 66, p.104-115, 2006.

LIN, K.H. Observations on yellow shoot of citrus. Etiological studies of yellow shoot of citrus. **Acta Phytophylacica Sinica**, Pequim, v.2, n. 1, p. 1-42, 1956.

LIEFTING L.W.; WARD, L.I.; SHILLER, J.B.; CLOVER, G.R.G. A New 'Candidatus Liberibacter' Species in *Solanum betaceum* (Tamarillo) and *Physalis peruviana* (Cape Gooseberry) in New Zealand. **Plant Disease**, St. Paul, v. 92, n. 11, p. 1588, 2008.

LOPES, S.A.; FRARE, G.F. Graft Transmission and Cultivar Reaction of Citrus to 'Candidatus Liberibacter americanus'. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 92, p. 21-24, 2008.

LOPES, S.A. FRARE, G.F.; MARTINS, E.C. Hosts of liberibacter in Brazil. In: HUANGLONGBING - GREENING INTERNATIONAL WORKSHOP, 2006, Ribeirão Preto. **Proceedings...** Ribeirão Preto, July 16, 2006. p.5.

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**, Saint Paul, v.93, p. 257-262, 2009.

MARTINEZ, A.L.; NORA, D.M.; ARMEDILLA, A.L. Supression of syntoms of citrus greening disease in the Philippines by treatment with tetracycline antibiotics. **Plant Disease Reporter**. Washington, v.. 54, p. 1007-1009, 1970.

MARTINEZ, A.L.; WALLACE, J.M. Citrus leaf mottle-yellows disease in the Philipines and transmission of the causal virus by a psyllid, *Diaphorina citri*. **Plant Disease Reporter**, Washington, v. 51, p. 692-695, 1967.

MASSONIÈ, G.; GARNIER, M.; BOVÉ, J.M. Transmission of Indian citrus decline by *Tryoza erytreae* (Del Guercio), the vector of South African greening, In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITROS VIROLOGISTS, 7., 1976. Riverside. **Proceedings...** Riverside, 1976. p. 18-20.

McCLEAN, A.P.D.; OBERHOLZER, P.C.J. Greening disease of the sweet orange: evidence that it is caused by a transmissible virus. **South African Journal of Agricultural Science**, Petroria, v.8, p. 253-276, 1965a.

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

McCLEAN, A.P.D.; SCHWARZ, R.E. Greening of blotchy-mottle disease of citrus. **Phytophylactica**, Pretoria, v. 2, p. 177-194, 1970.

MICHAUD, J.P. Natural mortality of Asian citrus psyllid (Homoptera: Psyllidae) in central Florida. **Biological Control**, Dordrecht, v.49, p. 417-431, 2004.

MILLER, S.A.; JOAQUIM, T.R. Diagnostic techniques for plant pathogens. In: CHET, I. (Ed.). **Biotechnology in plant disease control**. New York: Wiley-Liss, p, 1993. . 321-339.

MOLL, J.N.; MARTIN, M.N. Electron microscope evidence that citrus psylla (*Trioza erytreae*) is a vector of greening disease in South Africa. **Phytophylactica**, Pretoria, v. 5, p. 41-44, 1973.

MORITZ, G.; KUMM, S.; MOUND, L. Tospovirus transmission depends on thrips ontogeny. **Virus Research**, Amsterdam, v. 100, n.1, p.143-149, 2004.

MURRAY, M.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 8, p. 4321-4325, 1980.

NARIANI, T.K.; RAYCHAUDHURI, S.P.; VISWANATH, S.M. Tolerance to greening in certain citrus species. **Current Science**, Bangalore, v.42, p.513-514, 1973.

NAULT, L.R. Arthropod Transmission of Plant Viruses: A New Synthesis. **Annals of the Entomological Society of America**, Lanham, v.90, n.5, p. 521-541, 1997.

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

PAIÃO, F.G.; LEITE JÚNIOR, R.P. Otimização da técnica de PCR para detecção de *Xylella fastidiosa* em insetos vetores associados a cafeeiro. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 2., 2001. Vitória, **Resumos...** Vitória: EMBRAPA, 2001.p.82.

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**. 2009. 65 p. Tese (Doutorado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

PARRA, J.R.P.; LOPES, J.R.S.; GÓMEZ TORRES, M.L.; NAVA, D.E.; PAIVA, P.E.B. Bioecologia do vetor *Diaphorina citri* e transmissão de bactérias associadas ao Huanglongbing. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v.31, n.1, p. 37-51, 2010.

PAFFL, M.W. Quantification strategies in real-time PCR. In: BUSTIN, S.A. (Ed.) **A-Z of quantitative PCR**. La Jolla: University Line (IUL), 2004. chap 3, p 87-112.

SALIBE, A.A.; CORTEZ, R.E. Studies on the leaf mottling disease of citrus in the Philippines. **FAO Plant Protection Bulletin**, Rome, v. 14, p.141-144, 1966.

SAS INSTITUTE. 2003. SAS System. SAS/STAT version 9.1. 2003

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

SOUAZE, F.; NTODOU-THOME, A.; TRAN, C.Y.; ROSTENE, W.; FORGEZ, P. Quantitative RT-PCR: limits and accuracy. **Biotechniques**, New York, v.21, n.2, p.280-285, 1996.

TEXEIRA, D.C.; AYRES, J.; KITAJIMA, E.W.; DANET, L.; JAGOUEIX-EVEILLARD, S.; SAILLARD, C.; BOVÉ, J.M.. First report of a Huanglongbing-like disease of *Citrus* in Sao Paulo State, Brazil and association of a new *Liberibacter* specie, "*Candidatus Liberibacter americanus*", with the disease. **Plant Disease**, St. Paul, v. 89, p. 107, 2005a.

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

TICHOPAD, A.; DILGER, M.; SCHWARZ, G.; PFAFFL, M.W. Standardised determination of real-time PCR efficiency from a single reaction setup. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 31, n. 21, p.122, 2003.

TSAI, J.H.; LIU, Y.H. Biology of *Diaphorina citri* (Hemoptera: Psyllidae) on four host plants. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.93, n. 6, p. 1721-1725, 2000.

TURATI, D.T. **Efeito de filme de partículas de caulim sobre a deleção hospedeira e desenvolvimento de *Diaphorina citri* Kuwayama em *Citrus sinensis* (L.) Osbeck.** 2008. 74 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

VAN DEN BERG, M.; VAN VUUREN, F.; DEACON, V. E. Studies on greening disease transmission by the citrus psylla *Trioza erytreae* (Hemiptera: Triozidae). **Israel Journal of Entomology**, Bet Dagan, v.25 e 26, p.51-56, 1991-92.

VICHIN-NETO, R.; NASCIMENTO, F.E., BALBINOTTE, J.; COLETTA-FILHO, H.D.; LOPES, J.R.S. Comparação da capacidade de aquisição de *Candidatus Liberibacter asiaticus* em citros por ninfas e adultos de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA – USP, 16., São Paulo, 2008, **Resumos...** São Paulo, 2008.

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. CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITROS VIROLOGISTS, 10., 1988, , Riverside. **Proceedings...** Riverside: University of California, 1988. p.243-248.

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**, Londrina, v.30, n.1, p.165-170, 2001.

YAMAMOTO, P.T.; FELIPPE, M.R.; GARBIM, L.F.; COELHO, J.H.C.; XIMENES, N.L.; MARTINS, E.C.; LEITE, A.P.R.; SOUSA, M.C.; ABRAHÃO, D.P.; BRAZ, J.D. *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae): vector of the bacterium *Candidatus Liberibacter americanus*. In: HUANGLONGBING INTERNATIONAL WORKSHOP, 2006, Ribeirão Preto. **Proceedings...**Ribeirão Preto: Fundecitrus, 2006. p. 96.

ANEXOS

ANEXO A – Dados referentes ao experimento: ‘Aquisição de “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” e “*Ca. L. americanus*” por *Diaphorina citri* em diferentes estágios de desenvolvimento do inseto’.

Para cada inseto, a reação de Q-PCR foi realizada em duplicata, sendo cada um desses valores apresentados (Ct 1 e Ct 2) juntamente com o desvio padrão individual de cada amostra.

Tabela 10 – Valores de Ct (cycle threshold) do teste de Q-PCR (Ct<36), dos insetos positivos oriundos do experimento de “Aquisição de “*Ca. Liberibacter americanus*” (LAM) por *Diaphorina citri* em diferentes estágios de desenvolvimento do inseto – Bloco C”, correspondente aos resultados apresentados no item 2.3.2 deste trabalho

Bloco C - LAM	Estágio de Desenvolvimento	Nº insetos positivos/ Nº insetos testados	Análise individual dos insetos por Q-PCR para a presença da bactéria LAM				Desvio Padrão	Taxa de infectividade
			Nº am.	Ct 1	Ct 2	Ct médio		
	1º ínstar	x	x	x	x	x	x	
	2º ínstar	3/4	291	27,5865	27,8755	27,731	0,204	75%
			293	31,0124	31,3836	31,198	0,262	
			294	25,7468	25,3239	25,5353	0,299	
	3º ínstar	2/2	295	29,1534	29,0921	29,1227	0,0433	100%
			296	29,4862	29,9519	29,719	0,329	
	4º ínstar	4/4	297	26,3866	26,249	26,3178	0,0973	100%
			298	28,1107	28,0586	28,0846	0,0369	
			299	27,4046	27,7618	27,5832	0,253	
			300	27,3351	27,5155	27,4253	0,128	
	5º ínstar	3/4	301	26,3231	26,1036	26,2133	0,155	75%
			302	28,6053	28,3696	28,4874	0,167	
			304	30,2996	29,1226	29,7111	0,832	
	Adultos	3/10	305	31,4387	31,0039	31,2213	0,307	30%
			310	28,9794	32,7611	30,8702	2,67	
			315	26,2577	25,5868	25,9222	0,474	
	Controle Neg.	0/10

... Valor numérico não se aplica. Não houve amostras positivas para este tratamento.

^x Tratamento perdido por morte dos insetos.

Tabela 11 – Valores de Ct (cycle threshold) do teste de Q-PCR (Ct<36), dos insetos positivos oriundos do experimento de “Aquisição de “*Ca. Liberibacter asiaticus*” (LAS) por *Diaphorina citri* em diferentes estágios de desenvolvimento do inseto – Bloco E”, correspondente ao item 2.3.2 deste trabalho

Estágio de Desenvolvimento	Nº insetos positivos/ Nº insetos testados	Análise individual dos insetos por qPCR para a presença da bactéria LAS					Taxa de infectividade
		Nº am.	Ct 1	Ct 2	Ct médio	Desvio Padrão	
1º ínstar	4/4	131	31,4499	31,3707	31,4103	0,056	100%
		132	31,8518	31,923	31,8874	0,0503	
		133	32,7393	32,5434	32,6413	0,139	
		134	33,1702	33,3703	33,2702	0,141	
2º ínstar	3/7	135	33,8017	34,0489	33,9253	0,175	42%
		137	33,0392	32,9573	32,9982	0,0579	
		138	29,0238	28,9957	29,0097	0,0199	
3º ínstar	4/7	144	31,6335	31,6337	31,6336	0,00014	57%
		145	36,1862	35,2466	35,7164	0,664	
		146	34,5497	34,7573	34,6535	0,147	
		148	35,1423	34,7908	34,9665	0,249	
4º ínstar	7/10	149	25,1194	26,0015	25,5604	0,624	70%
		151	36,4239	35,518	35,9709	0,641	
		152	32,5686	33,5066	33,0376	0,663	
		153	30,8443	31,1991	31,0217	0,251	
		154	34,1257	35,0159	34,5708	0,629	
		155	33,1622	32,3907	32,7764	0,546	
5º ínstar	3/6	158	undt.	33,0943	33,0943	...	50%
		159	30,8916	30,8933	30,8924	0,0012	
		160	32,5914	33,0067	32,7991	0,294	
Adultos	0/4	162	32,0073	31,5568	31,7821	0,319	...
		
Controle Neg.	0/10

... Valor numérico não se aplica. Não houve amostras positivas para este tratamento.

Tabela 12 – Valores de Ct (cycle threshold) do teste de Q-PCR (Ct<36), dos insetos positivos oriundos do experimento de “Aquisição de “*Ca. Liberibacter asiaticus*” (LAS) por *Diaphorina citri* em diferentes estágios de desenvolvimento do inseto – Bloco G”, correspondente ao item 2.3.2 deste trabalho

(Continua)

Bloco G - LAS	N° insetos positivos/N° insetos testados	Análise individual dos insetos por Q-PCR para a presença da bactéria LAS					Taxa de infectividade
		N° am	Ct 1	Ct 2	Ct médio	Desvio Padrão	
1° ínstar	5/5	173	30,3	30,7203	30,5101	0,297	100%
		174	32,3281	32,5308	32,4294	0,143	
		175	30,7134	30,2845	30,4989	0,303	
		176	27,5937	27,5461	27,5699	0,034	
		177	27,6289	27,7738	27,7013	0,102	
2° ínstar	5/5	178	34,4216	34,0175	34,2195	0,286	100%
		179	29,3892	28,8091	29,0991	0,410	
		180	33,3142	33,6273	33,4707	0,221	
		181	33,6293	32,6276	33,1284	0,708	
		182	32,8772	31,2507	32,0639	1,150	
3° ínstar	7/8	183	26,1845	26,1356	26,16	0,035	87,50%
		184	29,0997	30,2209	29,6603	0,793	
		185	32,7161	32,0765	32,3963	0,452	
		186	29,1653	30,353	29,7591	0,840	
		187	27,9175	28,4573	28,1874	0,382	
		189	26,3908	26,7425	26,5666	0,249	
		190	28,6651	28,8498	28,7574	0,131	
4° ínstar	8/8	191	25,2614	25,0813	25,1713	0,127	100%
		192	26,8307	26,7264	26,7785	0,074	
		193	24,5308	24,6468	24,5888	0,082	
		194	26,5185	26,4666	26,4925	0,037	
		195	27,4995	27,6508	27,5751	0,107	
		196	29,8333	29,2838	29,5585	0,389	
		197	35,8997	35,9339	35,9168	0,024	
		198	29,3224	29,4751	29,3987	0,108	
		5° ínstar	8/10	199	27,2118	26,9116	
200	29,5118			30,3219	29,9168	0,573	
201	33,7412			33,5881	33,6646	0,108	
202	33,034			33,0436	33,0388	0,007	
205	29,4011			29,2483	29,3247	0,108	
206	34,6148			34,431	34,5229	0,130	
207	27,915			27,4937	27,7043	0,298	
208	26,5245			26,2933	26,4089	0,163	

Tabela 13 – Valores de Ct (cycle threshold) do teste de Q-PCR (Ct<36), dos insetos positivos oriundos do experimento de “Aquisição de “*Ca. Liberibacter asiaticus*” (LAS) por *Diaphorina citri* em diferentes estágios de desenvolvimento do inseto – Bloco G”, correspondente ao item 2.3.2 deste trabalho

(Conclusão)

Estágio de Desenvolvimento	Nº insetos positivos/Nº insetos testados	Análise individual dos insetos por Q-PCR para a presença da bactéria LAS					Taxa de infectividade
		Nº am	Ct 1	Ct 2	Ct médio	Desvio Padrão	
Adultos	6/7	210	35,3371	36,1129	35,725	0,549	71%
		211	31,705	30,9194	31,3122	0,556	
		212	30,8242	31,241	31,0326	0,295	
		213	31,377	28,2893	29,8331	2,183	
		214	35,4125	36,0157	35,7141	0,427	
		215	35,3263	35,574	35,45015	0,175	
Controle Neg.	0/5	

... Valor numérico não se aplica. Não houve amostras positivas para este tratamento.

Tabela 14 – Valores de Ct (cycle threshold) do teste de Q-PCR (Ct<36), dos insetos positivos oriundos do experimento de “Aquisição de “*Ca. Liberibacter asiaticus*” (LAS) por *Diaphorina citri* em diferentes estágios de desenvolvimento do inseto – Bloco H”, correspondente ao item 2.3.2 deste trabalho

(Continua)

Estágio de Desenvolvimento	Nº insetos positivos/Nº insetos testados	Análise individual dos insetos por Q-PCR para a presença da bactéria LAS					Taxa de infectividade
		Nº am	Ct 1	Ct 2	Ct médio	Desvio Padrão	
1º ínstar	4/10	1o 4	34,5167	34,7943	34,6555	0,196	40%
		1o 5	35,8575	35,9105	35,884	0,037	
		1o 8	32,6047	32,6235	32,6141	0,013	
		1o 10	34,8235	34,8875	34,8555	0,045	
2º ínstar	1/3	2o 1	34,884	34,9085	34,8962	0,017	33,3%
3º ínstar	3/6	3o 1	31,4401	31,7336	31,5868	0,207	50%
		3o 3	24,4098	24,1709	24,2903	0,169	
		3o 5	31,1722	30,8031	30,9876	0,261	
4º ínstar	7/7	4o 1	27,9424	28,0168	27,9796	0,053	100%
		4o 2	27,2753	27,075	27,1751	0,142	
		4o 3	26,1191	26,3346	26,2268	0,152	
		4o 4	29,7815	29,6233	29,7024	0,112	
		4o 5	29,8938	29,2997	29,5967	0,42	
		4o 6	25,348	25,4152	25,3816	0,047	
		4o 7	29,3153	29,4029	29,3591	0,062	

Tabela 15 – Valores de Ct (cycle threshold) do teste de Q-PCR (Ct<36), dos insetos positivos oriundos do experimento de “Aquisição de “*Ca. Liberibacter asiaticus*” (LAS) por *Diaphorina citri* em diferentes estágios de desenvolvimento do inseto – Bloco H”, correspondente ao item 2.3.2 deste trabalho

							(Conclusão)
Bloco H - LAS	Nº insetos positivos/ Nº insetos testados	Análise individual dos insetos por Q-PCR para a presença da bactéria LAS					Taxa de infectividade
		Nº am.	Ct 1	Ct 2	Ct médio	desvio padrão	
5º ínstar	6/10	5o 2	33,9577	32,8633	33,4105	0,774	60%
		5o 3	30,9812	30,4805	30,7308	0,354	
		5o 5	30,0977	30,5928	30,3452	0,35	
		5o 6	31,9284	31,826	31,8772	0,072	
		5o 8	29,3853	29,43	29,4076	0,032	
		5o 9	31,036	31,9033	31,4696	0,613	
Adultos	3/10	Ad 5	36,1487	35,3648	35,7567	0,554	30%
		Ad 6	25,9604	28,3166	27,1385	1,67	
		Ad 9	35,9265	35,8802	35,9033	0,033	
Controle Neg.	0/9

... Valor numérico não se aplica. Não houve amostras positivas para este tratamento.

ANEXO B – Dados referentes ao experimento: ‘Avaliação do crescimento da população bacteriana de “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” no inseto vetor’.

Para cada inseto, a reação de Q-PCR foi realizada em duplicata, sendo cada um desses valores apresentados (Ct 1 e Ct 2) juntamente com o desvio padrão para cada amostra.

Tabela 16 – Valores de Ct (cycle threshold) do teste de Q-PCR (Ct<36), dos insetos **adultos** positivos oriundos do experimento de ‘Avaliação do crescimento da população bacteriana de “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” no inseto vetor’, correspondente ao item 2.3.3 deste trabalho. (Valores utilizados para análise de **regressão linear**)

Dias após PAA	Insetos do Grupo Reserva - Adultos					Nº insetos positivos/ Nº insetos testados	Taxa de infectividade
	Nº am.	Ct 1	Ct 2	Ct médio	Desvio Padrão		
7	LATAS 6	33,8591	34,2715	34,0653	0,292	5/10	50%
	LATAS 7	33,0813	33,538	33,3096	0,323		
	Ad 7A	28,5817	28,5849	28,5833	0,002		
	Ad 7B	28,5457	28,182	28,3638	0,257		
	Ad 7C	28,1599	28,1929	28,1764	0,023		
14	Ad 14A	28,6526	28,306	28,4793	0,245	3/10	30%
	Ad 14B	28,3558	28,2686	28,3122	0,062		
	Ad 14C	27,946	27,6393	27,7926	0,217		
21	LATAS 22	35,7895	35,8291	35,8093	0,028	5/10	50%
	LATAS 26	31,604	31,3129	31,4584	0,206		
	Ad 21A	27,7568	27,725	27,7409	0,022		
	Ad 21B	27,8481	30,5234	29,1857	1,89		
	Ad 21C	26,9663	26,5083	26,7373	0,324		
28	LATAS 27	35,6873	36,1702	35,9287	0,341	4/10	40%
	LATAS 31	32,7546	32,5153	32,6349	0,169		
	LATAS 33	33,5392	33,6495	33,5943	0,078		
	Ad 28 B	35,6592	35,8795	35,7693	0,156		

Tabela 17 – Valores de Ct (cycle threshold) do teste de Q-PCR (Ct<36), das ninfas positivas oriundas do experimento de ‘Avaliação do crescimento da população bacteriana de “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” no inseto vetor’, correspondente ao item 2.3.3 deste trabalho. (Valores utilizados para análise de **regressão**)

Dias após PAA	Insetos do Grupo Reserva - Ninfas					N° insetos positivos/ N° insetos testados	Taxa de infectividade
	N° am.	Ct 1	Ct 2	Ct médio	Desvio Padrão		
7 dias	LATAS 2	33,0823	33,2811	33,1817	0,141	3/5	60%
	N 7B	35,7079	30,2817	32,9948	3,836		
	N 7C	30,347	31,0687	30,7078	0,51		
14 dias	LATAS 10	30,1461	29,8406	29,9933	0,216	5/5	100%
	LATAS 11	35,319	34,6226	34,9708	0,492		
	N 14A	32,5782	30,4741	31,5261	1,488		
	N 14B	29,4739	29,4651	29,4695	0,006		
	N 14C	27,2691	27,1722	27,2206	0,68		
21 dias	N 21A	28,7991	28,3398	28,5694	0,324	3/4	75%
	N 21B	28,5055	28,7113	28,6084	0,145		
	N 21C	25,5768	25,594	25,5854	0,012		

ANEXO C – Dados referentes ao experimento 'avaliação do crescimento da população bacteriana de ambas as bactérias, "Ca. Liberibacter asiaticus" e "Ca. L. americanus", no inseto vetor'

Para cada inseto, a reação de Q-PCR foi realizada em duplicata, sendo cada um desses valores apresentados (Ct 1 e Ct 2) juntamente com o desvio padrão para cada amostra.

Tabela 18 – Valores de Ct (cycle threshold) do teste de Q-PCR (Ct<36), das ninfas positivas oriundas do experimento de 'avaliação do crescimento da população bacteriana de "Ca. Liberibacter americanus", no inseto vetor', correspondente ao item 2.3.4 deste trabalho. (Valores utilizados para análise de **comparação de médias**) (não houve adultos positivos para este teste)

Nº Am.	Desvio Padrão	Ct 1	Ct 2	Ct médio	Dias após PAA
140	0.402	33,1656	33,7343	33,44995	15
141	0.0755	32,619	32,5122	32,5656	15
145	0.423	36,0026	35,4039	35,70325	15
178	0.0299	24,7588	24,8011	24,77995	20
181	0.19	34,7348	35,0037	34,86925	20
183	0.536	33,9294	34,6881	34,30875	20
215	0.194	32,7625	33,0369	32,8997	25
216	0.95	31,2791	29,9362	30,60765	25
217	0.0184	28,2627	28,2887	28,2757	25
218	0.119	33,5439	33,3757	33,4598	25
219	0.0175	32,2402	32,2154	32,2278	25
221	0.118	29,2616	29,0944	29,178	25
252	0.0701	30,1468	30,0477	30,09725	30
253	0.0993	29,0002	29,1406	29,0704	30
256	0.358	34,4373	34,9439	34,6906	30
259	0.151	33,9549	33,7419	33,8484	30

Tabela 19 – Valores de Ct (cycle threshold) do teste de Q-PCR (Ct<36), das ninfas positivas oriundas do experimento de ‘avaliação do crescimento da população bacteriana de “Ca. Liberibacter asiaticus”, no inseto vetor’, correspondente ao item 2.3.4 deste trabalho. (Valores utilizados para análise de **comparação de médias**)

N° Am.	Desvio Padrão	Ct 1	Ct 2	Ct médio	Dias após PAA
158	1.2	34,7165	33,0133	33,8649	20
161	0.515	35,4693	36,1970	35,83315	20
198	0.979	31,7661	33,1508	32,45845	25
199	0.163	34,2092	34,4398	34,3245	25
241	0.468	31,5569	32,2184	31,88765	30
242	0.241	23,7985	23,4582	23,62835	30

Tabela 20 – Valores de Ct (cycle threshold) do teste de Q-PCR (Ct<36), dos adultos positivos oriundos do experimento de ‘avaliação do crescimento da população bacteriana de “Ca. Liberibacter asiaticus”, no inseto vetor’, correspondente ao item 2.3.4 deste trabalho. (Valores utilizados para análise de **comparação de médias**)

N° Am.	Desvio Padrão	Ct 1	Ct 2	Ct médio	Dias após PAA
51	0.947	34,1074	35,4462	34,7768	10
171	0.39	30,0086	29,4575	29,73305	20
251	0.896	32,5563	31,2889	31,9226	30

ANEXO D – Dados referentes ao experimento 'Comparação da multiplicação de “Ca. L. asiaticus” e “Ca. L. americanus” no vetor’. Para cada inseto, a reação de Q-PCR foi realizada em duplicata, sendo cada um desses valores apresentados (Ct 1 e Ct 2) juntamente com o desvio padrão para cada amostra

Tabela 21 – Valores de Ct (cycle threshold) do teste de Q-PCR (Ct<36), dos ninfas positivas (Repetição I) do experimento de comparação da multiplicação de “Ca. L. asiaticus” e “Ca. L. americanus” no inseto vetor’, correspondente ao item 2.3.5 deste trabalho. (Continua)

Dias após PAA	Plantas fonte	qPCR LAM	LAM					qPCR LAS	LAS					
			N° Am	Ct 1	Ct 2	Ct médio	erro		N° Am	Ct 1	Ct 2	Ct médio	erro	
8	LAS	—						0/10						
	LAS/LAM	0/10						0/10						
16	LAS	—						2/10	423	34,9608	35,0949	35,0278	0,095	
									424	35,173	35,2954	35,2342	0,086	
	LAS/LAM	1/10	461	35,7372	35,697	35,7171	0,0284	0/10						
24	LAS	—						1/10	477	32,8993	33,2607	33,08	0,256	
	LAS/LAM	3/10	516	30,2054	30,7535	30,4794	0,388	0/10						
			517	33,6183	31,7901	32,7042	1,29							
			519	33,4807	34,8246	34,1526	0,95							
32	LAS	—						2/10	540	35,4236	35,2142	35,3189	0,148	
									544	30,4975	30,689	30,5932	0,135	
	LAS/LAM	3/10	576	28,2331	27,6787	27,9559	0,392	2/10	578	35,1791	34,8939	35,0365	0,202	
			577	25,8497	25,9743	25,912	0,0881		580	32,176	32,3976	32,2868	0,486	
			583	25,9536	26,1732	26,0634	0,155							
40	LAS	—						7/10	596	29,4906	29,3638	29,4272	0,089	
									598	29,2902	29,275	29,2826	0,011	
									599	29,5296	29,5073	29,5184	0,016	
									600	30,8658	30,6191	30,7424	0,174	
									601	29,4996	29,9429	29,7212	0,313	
									602	25,8685	25,964	25,9162	0,067	
									605	26,8298	26,6322	26,731	0,14	

Tabela 21 – Valores de Ct (cycle threshold) do teste de Q-PCR (Ct<36), das ninfas positivas (Repetição I) do experimento de comparação da multiplicação de “Ca. L. asiaticus” e “Ca. L. americanus” no inseto vetor, correspondente ao item 2.3.5 deste trabalho. (Conclusão)

Dias após PAA	Plantas-fonte	qPCR LAM	LAM					qPCR LAS	LAS				
			N° Am.	Ct 1	Ct 2	Ct médio	erro		N° Am.	Ct 1	Ct 2	Ct médio	erro
40	LAS/LAM	4/10	619	23,9274	23,7856	23,8565	0,1	0/10					
			621	32,8952	32,8187	32,8569	0,054						
			622	29,5365	29,7268	29,6316	0,135						
			624	26,5627	26,5667	26,5647	0,003						

Tabela 22 – Valores de Ct (cycle threshold) do teste de Q-PCR (Ct<36), dos adultos positivos (Repetição I) do experimento de comparação da multiplicação de “Ca. L. asiaticus” e “Ca. L. americanus” no inseto vetor, correspondente ao item 2.3.5 deste trabalho (Continua)

Dias após PAA	Plantas fonte	qPCR LAM						qPCR LAS					
		LAM	N° Am.	Ct 1	Ct 2	Ct médio	erro	LAS	N° Am.	Ct 1	Ct 2	Ct médio	erro
8	LAS	—						0/10					
	LAM	0/10						—					
	LAM/LAS	0/10						0/10					
	LAS/LAM	0/10						0/10					
16	LAS	—						0/10					
	LAM	1/10	429	36,2978	34,8463	35,572	1,03	—					
	LAM/LAS	0/10						0/10					
	LAS/LAM	0/10						0/10					
24	LAS	—						1/10	469	34,366	34,4648	34,4156	0,069
	LAM	1/10	492	35,0502	35,2864	35,1683	0,167	—					
	LAM/LAS	0/10						0/10					
	LAS/LAM	0/10						0/10					
32	LAS	—						0/10					
	LAM	0/10						—					
	LAM/LAS	2/10	556	29,3836	29,3142	29,3489	0,045	0/10					
			558	29,2769	29,3963	29,3366	0,084						
40	LAS/LAM	0/10						0/10					
	LAS	—						1/10	592	32,069	32,2139	32,1413	0,103
	LAS/LAM	0/10						0/10					

Tabela 23 – Valores de Ct (cycle threshold) do teste de Q-PCR (Ct<36), das ninfas positivas (Repetição II) do experimento de comparação da multiplicação de “Ca. L. asiaticus” e “Ca. L. americanus” no inseto vetor, correspondente ao item 2.3.5 deste trabalho

(Continua)

Dias após PAA	Plantas Fonte	qPCR			LAM			qPCR			LAS			
		LAM	Nº Am.	Ct 1	Ct 2	Ct médio	erro	LAS	Nº Am.	Ct 1	Ct 2	Ct médio	erro	
8	LAS	—						0/5						
	LAM	0/10						—						
	LAM/LAS	0/5						0/5						
16	LAS	—						1/5	804	34,1709	33,4469	33,8089	0,512	
	LAM	0/7						—						
	LAM/LAS	0/5						3/5	834	34,9472	34,6348	34,791	0,221	
									836	33,4956	33,6581	33,5768	0,115	
24	LAM/LAS	0/6							838	29,2119	29,108	29,1599	0,073	
									1/5	862	33,7776	32,7847	33,2811	0,702
										—				
									4/6	892	31,5736	31,6561	31,6148	0,058
32	LAM/LAS	0/5							894	34,5996	34,5596	34,5796	0,028	
									895	34,9632	35,4055	35,1843	0,313	
									896	33,2011	33,1951	33,1981	0,004	
									3/5	918	29,9591	31,8767	30,9179	1,36
40	LAM/LAS	0/5							920	32,3926	30,032	31,2123	1,67	
									921	32,4266	36,3924	34,4095	2,8	
									—					
40	LAS	—						4/10	979	31,5366	32,4446	31,9906	0,642	
									980	34,9904	34,359	34,6747	0,447	
									981	32,7606	35,4253	34,0929	1,88	
									985	27,5769	28,9467	28,2618	0,969	

Tabela 23 – Valores de Ct (cycle threshold) do teste de Q-PCR (Ct<36), das ninfas positivas (Repetição II) do experimento de comparação da multiplicação de “Ca. L. asiaticus” e “Ca. L. americanus” no inseto vetor’, correspondente ao item 2.3.5 deste trabalho

Dias após PAA	Plantas Fonte	qPCR						qPCR						(Conclusão)
		LAM	N° Am.	Ct 1	Ct 2	Ct médio	erro	LAS	N° Am.	Ct 1	Ct 2	Ct médio	erro	
40	LAM	0/10						—						
	LAM/LAS	1/10	1019	33,3808	33,4311	33,4059	0,035	8/10	1016	31,6095	31,4965	31,553	0,08	
									1017	25,3088	25,5392	25,424	0,163	
									1018	31,2688	31,3369	31,3028	0,0482	
									1020	33,5351	33,5059	33,5205	0,0207	
									1021	30,8466	30,828	30,8373	0,0132	
									1022	33,3874	33,3047	33,346	0,0584	
									1023	28,2149	26,6159	27,4154	1,13	
									1025	29,3222	29,4111	29,3666	0,0628	

Tabela 24 – Valores de Ct (cycle threshold) do teste de Q-PCR (Ct<36), dos adultos positivos (Repetição II) do experimento de comparação da multiplicação de “Ca. L. asiaticus” e “Ca. L. americanus” no inseto vetor, correspondente ao item 2.3.5 deste trabalho

Dias após PAA	Plantas fonte	q PCR LAM	LAM				q PCR LAS	LAS					
			N° Am.	Ct 1	Ct 2	Ct médio		erro	N° Am.	Ct 1	Ct 2	Ct médio	erro
8	LAS	—					0/7						
	LAM	0/10					—						
	LAM/LAS	0/10					0/10						
	LAS/LAM	0/10					0/10						
16	LAS	—					0/10						
	LAM	0/10					—						
	LAM/LAS	0/10					1/10	826	35,5983	35,7421	35,6702	0,102	
	LAS/LAM	0/10					0/10						
24	LAS	—					2/10	849	33,1341	33,1032	33,1186	0,022	
								858	35,2494	34,5059	34,8776	0,526	
	LAM	0/10					—						
	LAM/LAS	0/10					2/10	882	34,7568	34,3669	34,5618	0,276	
								890	34,7197	35,3932	35,0564	0,476	
	LAS/LAM	0/10					0/10						
32	LAS	—					0/11						
	LAM	0/10					—						
	LAM/LAS	0/10					0/10						
	LAS/LAM	0/10					0/10						
40	LAS	—					0/10						
	LAM	0/10					—						
	LAM/LAS	1/10	1008	30,667	30,797	30,7319	0,092	1/10	1006	32,7094	32,0862	32,3978	0,441
	LAS/LAM	0/9						1/9	1028	31,6996	31,6514	31,6755	0,034

ANEXO E – Foto da planta infectada com “*Candidatus Liberibacter americanus*” por transmissão pelo psílido *Diaphorina citri* no 2º instar.



Figura 6 – Foto da planta infectada com “*Candidatus Liberibacter americanus*”, 11 meses após inoculação por *Diaphorina citri*

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)