

INCIDÊNCIA DE *HUANGLONGBING* (HLB) (*GREENING*) EM CITROS NA REGIÃO DE ARARAQUARA¹

JAMIL ATIHE JUNIOR², FRANCISCO ALBERTO PINO³
ENOCH TADEU DE MENDONÇA⁴ e VERA LÚCIA FERRAZ DOS SANTOS FRANCISCO⁵

RESUMO

A doença denominada *huanglongbing* (HLB), ou *greening* foi detectada em plantas cítricas na principal região produtora brasileira, ao redor de Araraquara, Estado de São Paulo. A Coordenadoria de Defesa Agropecuária realizou um levantamento por amostragem, com estratificação por município e três estádios (unidades de produção agrícola, talhões e plantas), para estimar o percentual de árvores doentes. Coletaram-se, também, amostras de folhas e de frutos, com sintomas, para posterior análise laboratorial. Encontrou-se 1% de plantas sintomáticas, mas somente 0,6% apresentava a bactéria e, portanto, a doença. O principal fator de risco encontrado foi a presença do psílideo *Diaphorina citri*.

Termos de indexação: doença do ramo amarelo; levantamento por amostragem; modelo logit; fator de risco.

¹ Trabalho apresentado na palestra “Levantamento de HLB na região de Araraquara”, por Enoch Tadeu de Mendonça, durante o Simpósio *Huanglongbing* (HLB, *ex-greening*) no Estado de São Paulo, dentro da 28ª Semana da Citricultura, no Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC, Cordeirópolis (SP), em 10/6/2005. Os autores agradecem a colaboração do Dr. Antonio Ambrosio Amaro, Pesquisador Científico do Instituto de Economia Agrícola, e dos Engenheiros Agrônomos da Coordenadoria da Defesa Agropecuária: Geysa Josefina Pala Ruiz, Mário Sérgio Tomazela, Paulo Fernando de Brito, Paulo Roberto Pastori, Maria Cândida Segnini Rossi, Berenice Buso Spir, Marco Alexandre Galbiati Parminondi, Rui Nobuo Maegawa, José Roberto Zancaner Vita, Vicente Paulo Martello, Oraldo de Carvalho Junior, Osvaldo Carlos Batista, Osvaldo Luiz Fachini de Cesare. Agradecem, também, aos auxiliares de campo da Coordenadoria da Defesa Agropecuária.

² Engenheiro Agrônomo, Diretor do Centro de Defesa Sanitária Vegetal, da Coordenadoria de Defesa Agropecuária (CDA), do Estado de São Paulo. E-mail: jaj@cda.sp.gov.br

³ Engenheiro Agrônomo, Doutor em Estatística, Pesquisador Científico do Instituto de Economia Agrícola (IEA). E-mail: pino@iea.sp.gov.br

⁴ Engenheiro Agrônomo, Coordenador da Coordenadoria de Defesa Agropecuária (CDA). E-mail: enochtm@cda.sp.gov.br].

⁵ Estatístico, Pesquisador Científico do Instituto de Economia Agrícola (IEA). E-mail: veralfrancisco@iea.sp.gov.br.

OCCURRENCE OF CITRUS HUANGLONGBING (GREENING) DISEASE IN ARARAQUARA REGION, BRAZIL

SUMMARY

The *huanglongbing* (HLB), or greening, disease has been detected in citrus plants in the main Brazilian citrus producing region, surrounding Araraquara, in São Paulo State. A stratified three-stage sample survey of farms, plots and plants has been used to estimate the percentage of diseased trees. Leaf and fruit samples with symptoms were also collected for later laboratory analysis. Symptomatic plants were found to be 1%, but only 0.6% actually had the bacterium and, therefore, the disease. The main risk factor is shown to be the psyllid *Diaphorina citri* presence.

Index terms: yellow shoot disease; sample survey; logit model; risk factor.

1. INTRODUÇÃO

A doença bacteriana de citros conhecida por *huanglongbing* (HLB)⁶, anteriormente denominada *greening*, é caracterizada pela presença de microrganismos procarióticos nos floemas, que são vasos condutores de seiva elaborada (GARNIER, M. et al, 1984). Foi descrita, originariamente, na África e na Ásia, mas, atualmente, apresenta distribuição geográfica ampla. O agente etiológico é uma bactéria não cultivável, tendo sido caracterizadas duas espécies: *Candidatus Liberibacter asiaticus* e *Candidatus Liberibacter africanus*⁷. O estudo dos espaços das regiões intergênicas 16S/23S revela homologia entre ambas as espécies, variando de 79,46% a 87,5% (Jagoueix al., 1994 e 1996). Elas podem ser detectadas por PCR pela amplificação do fragmento ribossômico 16S e diferenciadas pela amplificação de DNA com

⁶ Nome chinês que pode ser traduzido por “doença do dragão amarelo” (AUSTRALIA, 2005). Pin yin: *huang* = amarelo, *long* = dragão, *bing* = doença (PRISTINE LEXICON, 2005).

⁷ A palavra *Candidatus* designa uma categoria taxonômica não coberta pelas Regras do Código Bacteriológico. É usada para descrever entidades procarióticas para as quais se dispõe de mais do que uma mera seqüência, mas ainda não se dispõem de todas as características necessárias para a descrição completa (Euzéby, 2006). O nome *Liberobacter* anteriormente proposto foi revisto e corrigido para *Liberibacter* (Garnier et al., 2000).

auxílio de Xbal (JAGOUEIX et al., 1996; HOCQUELLET et al., 1999) e por sonda não radioativa (HOCQUELLET et al., 1997).

No Brasil, os primeiros relatos ocorreram no Estado de São Paulo, em março de 2004, atribuindo-se a etiologia a *Candidatus Liberibacter asiaticus* (COLETTA-FILHO et al., 2004) e, a transmissão, ao vetor *Diaphorina citri*, embora possa haver transmissão por contacto entre a planta doente e a sadia, através da enxertia. Além da forma asiática, constatou-se outra forma bacteriana então denominada *Candidatus Liberibacter americanus* (TEIXEIRA et al., 2005a, TEIXEIRA et al., 2005b).

Os sintomas podem ser reconhecidos na árvore ou na fruta. Na árvore, as partes inicialmente afetadas são os ramos ou galhos, que manifestam coloração amarelada, facilmente diferenciada da cor verde dos ramos não afetados. As folhas apresentam-se amarelas pálidas, com áreas verdes que adquirem aspecto de manchas irregulares, como que mosqueadas. Ocasionalmente, pode-se observar engrossamento e clareamento das nervuras da folha, que adquirem aspecto corticoso. Com a evolução da doença, as folhas dos ramos afetados caem e novos ramos aparecem afetados, indicando a propagação da doença na mesma árvore. Em estádios mais avançados, toda a copa pode ser afetada, chegando a culminar com ponteiros secos, que morrem em seguida. Os frutos apresentam aspecto deformado e assimétrico que, ao corte longitudinal, mostram, na parte interna, filetes alaranjados, partindo da região de inserção com o pedúnculo. Os frutos de árvores afetadas crescem menos e caem mais freqüentemente que os das normais. Sementes podem mostrar-se abortadas e, os frutos, revelar diversos graus de maturação das partes. A casca pode apresentar pequenas manchas circulares, verdes claras, contrastando com o verde normal e, ocasionalmente, a porção branca da casca apresenta-se espessada.

Como não existe lugar do mundo onde o controle da doença tenha sido completamente bem sucedido, e como sua erradicação pode ser possível apenas se detectada precocemente, HALBERT & MANJUNATH (2004) argumentam que é necessária pesquisa sobre o diagnóstico rápido e eficiente, a epidemiologia da doença e controle do psilídeo vetor. O presente artigo trata exatamente do diagnóstico rápido e barato da extensão do problema, para que as providências cabíveis possam ser tomadas, propondo, para isso, um esquema de levantamento amostral.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a ocorrência de plantas afetadas por *huanglongbing* em talhões de citros de municípios da região de Araraquara, para que pudessem ser tomadas as medidas de profilaxia da doença.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O levantamento foi realizado no campo pela Coordenadoria de Defesa Agropecuária (CDA), da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, na região citrícola de Araraquara (SP), por ser aquela com maior frequência da doença, abrangendo doze municípios: Américo Brasiliense, Araraquara, Boa Esperança do Sul, Gavião Peixoto, Ibaté, Matão, Motuca, Nova Europa, Rincão, Santa Lúcia, São Carlos e Tabatinga, totalizando 131.753 plantas em 336 UPAs (Relação 1). O levantamento consistiu em:

- a) identificação e geoposicionamento da unidade sorteada;
- b) preenchimento de questionário com perguntas mediante entrevista com o proprietário ou responsável;
- c) sorteio de talhões e plantas;
- d) inspeção para identificação de plantas com sintomas da doença;

Relação 1. Número de UPAs com citros na região de Araraquara, (SP), abril/maio de 2005

Município	População	Amostra
Américo Brasiliense	5	2
Araraquara	225	40
Boa Esperança do Sul	60	12
Gavião Peixoto	91	18
Ibaté	7	2
Matão	238	48
Motuca	91	15
Nova Europa	109	22
Rincão	18	5
Santa Lúcia	14	5
São Carlos	80	16
Tabatinga	731	151
Região	1.669	336

- e) coleta oficial de amostra de folhas e frutos para análise e confirmação da doença, nos talhões onde se constatarem plantas com sintomas da doença;
- f) envio de amostras ao laboratório do Centro APTA Citros Sylvio Moreira – IAC, em Cordeirópolis, para realização de testes de diagnósticos através da reação em cadeia de *Taq* DNA polimerase (PCR).

O levantamento de dados foi feito por amostragem probabilística de conglomerados desiguais, em três estádios, estratificados por município (Kish, 1965). No primeiro, sortearam-se unidades de produção agropecuária (UPAs)⁸, no segundo, sortearam-se talhões dentro das UPAs sorteadas e, no terceiro, sortearam-se plantas dentro dos talhões sorteados.

O tamanho total da amostra foi estabelecido com base no custo de levantamento. A partir desse valor, procurou-se maximizar a precisão das estimativas, mediante procedimentos de seleção da amostra. No primeiro estádio sorteiam-se 20% das UPAs (sem reposição), com probabilidade proporcional ao seu tamanho em termos de número de plantas (pps)⁹. As UPAs foram sorteadas com base no cadastro do Projeto LUPA, atualizado pela Coordenadoria de Assistência Técnica Integral (CATI) até 2003.

No segundo estádio consideraram-se somente os talhões das UPAs sorteadas no primeiro, sorteando-se dois talhões com probabilidade proporcional ao tamanho do talhão em termos de número de plantas (pps).

No terceiro estádio consideraram-se somente as plantas dos talhões sorteados no segundo, sorteando-se 10% das plantas, de forma sistemática. O tamanho da amostra (número de plantas) foi, portanto variável, mas parcialmente controlado pelo uso de pps. As estimativas foram obtidas com base em KISH (1965).

Convém chamar a atenção para o fato de que o estudo amostral da incidência de uma doença como essa, nos estádios iniciais de sua propagação

⁸ Geralmente, o conceito de UPA aqui utilizado coincide com o conceito de imóvel rural, utilizado no Projeto LUPA, um censo agropecuário realizado pela Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo (Pino et al., 1997).

⁹ O uso de probabilidades de seleção proporcionais ao tamanho (procedimento conhecido por pps, de *probability proportional to size*) do conglomerado visa diminuir possíveis vieses de seleção, conforme Kish (1965).

em dada região, pode ser considerado um caso de amostragem de evento raro, com estimativas percentuais muito baixas. É fácil mostrar que o coeficiente de variação de uma proporção muito pequena é um valor alto, mesmo com amostras relativamente grandes. Por isso, é comum que os resultados sejam expressos em termos de um intervalo de dois desvios padrões, para mais e para menos, omitindo-se os respectivos coeficientes de variação, apresentados nas amostras usuais. No presente artigo, apresentar-se-ão os resultados nas duas formas.

Como subproduto do trabalho, estimou-se um modelo logit (GREENE, 1997), relacionando a ocorrência de sintomas da doença num talhão (ou, alternativamente, a incidência de *L. americanus* nos exames de laboratório) em função de possíveis fatores de risco, levantados no questionário aplicado durante a entrevista com o proprietário ou responsável: a) presença do vetor transmissor *Diaphorina citri*; b) presença na UPA de murta [(*Murraya paniculata* (L.) Jack)], um arbusto que também pode hospedar a bactéria; c) variedade citrícola no talhão; d) origem das mudas de citros, dividida em quatro categorias (região Norte, região Sul, muda própria e sem informação); e) faz ou não análise de solo, usada como variável *proxy* que indica o grau tecnológico do produtor; f) utiliza ou não irrigação, que tanto serve como indicativo do grau tecnológico quanto de uso de muda própria de citros; g) ano de plantio, relacionado ao ano de produção da muda, uma vez que a partir de 2003 os viveiros paulistas passaram a ser todos telados e, portanto, menos suscetíveis a infestações; h) variáveis a respeito do proprietário, como pessoa física ou jurídica, anos de instrução e absenteísmo (se pessoa física); i) disponibilidade de assistência técnica e de engenheiro agrônomo; j) adensamento da cultura. A estimação foi feita com o SAS® (*Statistical Analysis Software*) conforme SAS INSTITUTE (2002), sendo as observações ponderadas pelos respectivos pesos na amostra. O modelo é dado por:

$$p = \frac{1}{1 + e^{-\beta'x}}$$

onde p é a probabilidade de ocorrência de planta com sintoma ou de planta doente, x é uma matriz de observações dos fatores de risco e β é o vetor de parâmetros a serem estimados. Para verificar a significância das estimativas, utiliza-se o teste de qui-quadrado de Wald.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Estimativa da incidência

Encontrou-se no campo 1,07% de plantas com sintomas da doença na região de Araraquara (intervalo de dois desvios padrões variando de 0,90% a 1,23%, o que corresponde a um coeficiente de variação de 7,89%), estimando-se que 192.140 plantas possam estar apresentando os sintomas (coeficiente de variação de 3,56%). Desse percentual, apenas 0,60% dos casos foi confirmado pelo exame laboratorial, sendo todos de *Candidatus Liberibacter americanus*, exceto um de *Candidatus Liberibacter asiaticus* (intervalo de dois desvios padrões variando de 0,45% a 0,75%, o que corresponde a um coeficiente de variação de 12,62%), estimando-se que 108.051 plantas pudessem estar doentes (coeficiente de variação de 3,30%). Tal discrepância entre sintomas de HLB e detecção de seu agente causal pode dever-se ao fato de muitas dessas plantas não apresentarem sintomas característicos da doença ou apresentarem sintomas parecidos, mas devidos a outros fatores. A incidência maior ocorreu no município de São Carlos: 2,18% (intervalo de dois desvios padrões variando de 1,76% a 2,60%, correspondendo a um coeficiente de variação de 9,67%). Finalmente, estimou-se que 342 UPAs apresentavam plantas com sintomas da doença (coeficiente de variação de 8,59%).

Como subproduto do levantamento, o número total de plantas foi estimado em 18.031.975 (coeficiente de variação de 14,18%), valor este menor do que as 24.769.043 existentes no cadastro utilizado (atualizado até 2003) ou as 22.357.000 existentes no levantamento subjetivo do Instituto de Economia Agrícola (INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA, 2004). Alguma diminuição do número de plantas é coerente e esperada, devendo-se à ocorrência da doença e à substituição por cana-de-açúcar, fenômeno já detectado na região.

3.2. Estimativa dos modelos

Os modelos estimados (Tabelas 1 e 2) mostraram bom ajustamento, servindo para verificar a importância relativa dos fatores de risco, bem como das variáveis *proxy*.

Tabela 1. Incidência de plantas cítricas apresentando sintomas de *huanglongbing*. Modelo Logit, região de Araraquara, (SP), abril/maio de 2005

Variável	Estimativa do parâmetro	Qui-quadrado de Wald	Razão de chance (<i>odds ratio</i>)		
			Estimativa	Inferior	Superior
Análise de solo	-1,2019	248,5505**	0,301	0,265	0,341
Presença do vetor	4,0125	14,1142**	55,285	9,542	320,307
Presença de murta	0,8969	25,0467**	2,452	1,826	3,293
Disponibilidade de agrônomo	-0,6617	23,2041**	0,516	0,412	0,647
Muda da região Norte	-2,2699	14,2573**	0,103	0,038	0,278
Muda da região Sul	-0,7059	9,8879*	0,494	0,341	0,714
Muda própria	-1,1107	4,2358*	0,329	0,136	0,800

** Significativo ao nível de 1%. * Significativo ao nível de 5%.

Tabela 2. Incidência de *Candidatus liberibacter americanus* em plantas cítricas apresentando sintomas de *huanglongbing*. Modelo Logit, região de Araraquara, (SP), abril/maio de 2005

Variável	Estimativa do parâmetro	Qui-quadrado de Wald	Razão de chance (<i>odds ratio</i>)		
			Estimativa	Inferior	Superior
Análise de solo	-2,4146	607,3009**	0,089	0,076	0,105
Presença do vetor	4,2477	37,7457**	69,941	22,431	218,083
Muda da região Norte	-1,5556	14,4352**	0,211	0,108	0,414

** Significativo ao nível de 1%.

A importância relativa das variáveis pode ser analisada de dois pontos de vista: conforme a ordem de entrada da variável no procedimento *stepwise* (as Tabelas 1 e 2 apresentam as variáveis por ordem de entrada) e conforme a razão de chance (*odds ratio*). O sinal positivo na estimativa do parâmetro ou o valor maior do que um, na razão de chance, indicam que a ocorrência da variável aumenta a probabilidade da presença de sintomas (ou da doença), ocorrendo o contrário com sinal negativo ou com valor menor do que um. Como todas as variedades são suscetíveis à doença, não se encontrou diferença significativa entre elas.

Na região e época em estudo, a probabilidade de haver num dado talhão plantas cítricas apresentando sintomas de *huanglongbing* era diretamente proporcional à presença do vetor e de murta, como esperado (Tabela 1). A probabilidade de plantas de um talhão apresentarem sintomas da doença quando se nota a presença do vetor é 55 vezes maior do que quando o vetor não está presente. A presença de murta aumenta essa probabilidade em 2,5 vezes. Unidades com mais alto nível tecnológico (medido pelo fato de se fazer análise de solo) têm apenas 30% da probabilidade de apresentar plantas com sintomas em relação àquelas com nível mais baixo. A disponibilidade de engenheiro agrônomo faz cair pela metade essa probabilidade. Em relação ao uso de mudas sem origem especificada, o uso de mudas da região Sul faz cair essa probabilidade pela metade, o de mudas próprias faz cair a 30% e o de mudas da região Norte, a apenas 10%.

No modelo de probabilidade de incidência de *Liberibacter americanus* em plantas que apresentavam sintomas da doença aparecem apenas três variáveis (Tabela 2). O fato de que apenas 56% das plantas com sintomas realmente apresentavam a doença quando examinadas em laboratório significa que os sintomas das demais plantas se deviam a outros problemas, explicáveis pelas outras variáveis. A probabilidade de plantas de um talhão com sintomas apresentarem a bactéria é 70 vezes maior quando se detecta a presença do vetor do que em caso contrário. Quando se usam mudas provenientes da região Norte, essa probabilidade cai a 21%, em relação ao uso de mudas de outras procedências. Nas unidades em que se faz análise de solo essa probabilidade cai a 9% em relação às que não a fazem.

4. CONCLUSÕES

Encontrou-se na região de Araraquara 1% de plantas cítricas com sintomas de *huanglongbing*, mas somente 0,6% de plantas com a bactéria, sendo todos os casos de *Candidatus Liberibacter americanus*, exceto um de *Candidatus Liberibacter asiaticus*. Logo, parte dessas plantas apresentavam sintomas parecidos, mas devidos a outras causas.

A presença do vetor transmissor na propriedade, o psílideo *Diaphorina citri*, aumenta muito a probabilidade de ocorrência tanto de sintomas quanto da própria doença, sendo, portanto, importante indicador que pode ser usado na prática. Também a presença de murta aumenta essa probabilidade. Por outro lado, a ocorrência é maior nos cultivos com menor grau tecnológico.

O levantamento por amostragem probabilística mostrou-se ferramenta útil para conhecer a incidência de uma doença em plantas, particularmente em citros, quando se dispõe de pouco tempo e/ou de poucos recursos para o trabalho de campo. Podem-se obter resultados de boa qualidade, com boa precisão, em curto prazo. O processo de amostragem mostra-se especialmente útil no início da ocorrência da moléstia, quando ainda não se dispõem de muitas informações nem de muitos recursos para fazer a inspeção de todas as plantas, porém se necessita de uma resposta rápida a respeito da gravidade da situação. Evidentemente, quando se passa para a fase de tratar ou de erradicar plantas, não se pode prescindir da varredura completa, isto é, da inspeção de todas elas, pois, nesse caso, é preciso encontrar todas as plantas doentes e não apenas estimar seu número.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AUSTRALIA. Minister for Agriculture, Fisheries and Forestry. **AQIS keeps weather eye on citrus industry's 'yellow dragon' in PNG**. Disponível em: <<http://www.maff.gov.au/releases/02/02326wt.html>> Acesso em: 16 de maio de 2005.
- COLETTA FILHO, H.D.; TARGON, M.L.P.N.; TAKITA, M.A.; DE NEGRI, J.D.; POMPEU JR., J. & MACHADO, M.A. First report of the causal agent of huanglongbing ("*Candidatus Liberibacter asiaticus*") in Brazil. **Plant Disease**, v. 88, p. 1382, 2004.
- EUZÉBY, J.P. **List of prokaryotic names with standing in nomenclature**. Disponível em: <http://www.bacterio.cict.fr/candidatus.html> . **Atualizado em 3 jun. de 2006.**

- GARNIER, M.; DANIEL, N. & BOVE, J.M. Aetiology of citrus greening disease. **Annals of Microbiology**, v. 135A, n. 1, p. 169-179, 1984.
- GARNIER, M.; JAGOUEIX-EVEILLARD, S.; CRONJE, P.R.; Le ROUX, H.F. & BOVE, J.M. Genomic characterization of a liberibacter present in an ornamental rutaceous tree, *Calodendrum capense*, in the Western Cape province of South Africa. Proposal of '*Candidatus Liberibacter africanus* subsp. *Capensis*'. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p. 2119-2125, 2000.
- GREENE, W.H. **Econometric analysis**. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall, 1997. 3. ed., 1075p.
- 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**, v. 87, n.3, p. 330-353, Sept. 2004.
- HOCQUELLET, A.; BOVE, J.M. & GARNIER, M. Production and evaluation of non-radioactive probes for the detection of the two *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus huanglongbing (greening). **Molecular and Cellular Probes**, v. 11, n. 6, p. 433-438, 1997.
- HOCQUELLET, A.; TOORAWA, P.; BOVE, J.M. & GARNIER, M. Detection and identification of the two *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus huanglongbing by PCR amplification of ribosomal protein genes of the operon. **Molecular and Cellular Probes**, v. 13, n. 5, p.373-379, 1999.
- INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA. **Banco de Dados IEA**. Disponível em: www.ica.sp.gov.br . Acesso em: 31 dez de 2004.
- JAGOUEIX, S.; BOVE, J.M. & GARNIER, M. The phloem-limited bacterium on greening disease of citrus is a member of the alpha subdivision of the Proteobacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 44, n. 3, p. 379-386, 1994.
- JAGOUEIX, S.; BOVE, J.M. & GARNIER, M. PCR detection of the two *Candidatus Liberibacter* species associated with greening disease of citrus. **Molecular and Cellular Probes**, v. 10, n. 1, p. 43-50, 1996.
- JAGOUEIX, S.; BOVE, J.M. & GARNIER, M. Comparaison of the 16S/23S ribosomal intergenic regions of *Candidatus Liberibacter asiaticus* and *Candidatus Liberibacter africanus*, the two species associated with citrus huanglongbing (greening) disease. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, n.1, p. 224-227, 1997.

KISH, L. **Survey sampling**. New York: Wiley, 1965. 643p.

PINO, F.A. et al. (orgs.) **Levantamento censitário de unidades de produção agrícola do Estado de São Paulo**. São Paulo: IEA/CATI/SAA, 1997. 4v., 1996p.

PRISTINE LEXICON. Disponível em: <http://www.kamous.com/translator/s.asp?l=1101>. Acesso em 18 maio de 2005.

SAS INSTITUTE. **SAS OnlineDoc**: version eight. Disponível em: www.rz.tu-claust-hal.de/sashtml . Acesso em 27 mar. 2002.

TEIXEIRA, D.C. et al. **Citrus huanglongbing in São Paulo State, Brazil: PCR detection of the *Candidatus Liberibacter* species associated with the disease. *Molecular and Cellular Probes***, v. 19, n. 3, p. 173-179, June 2005a.

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