



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MARIA APARECIDA DA CRUZ BEJATTO

**DESEMPENHO AGRONÔMICO E INFLUÊNCIA DO
HUANGLONGBING NA QUALIDADE DO FRUTO E DO ÓLEO
ESSENCIAL DE VARIEDADES DE LARANJA-DOCE NO
NOROESTE DO PARANÁ**

Londrina
2022

MARIA APARECIDA DA CRUZ BEJATTO

**DESEMPENHO AGRONÔMICO E INFLUÊNCIA DO
HUANGLONGBING NA QUALIDADE DO FRUTO E DO ÓLEO
ESSENCIAL DE VARIEDADES DE LARANJA-DOCE NO
NOROESTE DO PARANÁ**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Curso de Doutorado da Universidade Estadual de Londrina, área de concentração em Fitotecnia.

Orientador: Pesq. Dr. Rui Pereira Leite Junior

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Carmen Silvia Vieira Janeiro Neves

Londrina
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

B423h Bejatto, Maria Aparecida da Cruz.

Horticultural performance and influence of huanglongbing on fruit and essential oil quality of sweet orange varieties in Northwest Paraná, Brazil. / Maria Aparecida da Cruz Bejatto. - Londrina, 2022.
124 f. : il.

Orientador: Rui Pereira Leite Junior.

Coorientador: Carmen Silvia Vieira Janeiro Neves.

Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2022.

Inclui bibliografia.

1. Citrus ×sinensis - Tese. 2. Qualidade dos frutos de laranja-doce - Tese. 3. Subprodutos da laranja - Tese. 4. Incidência de doenças em laranja-doce - Tese. I. Leite Junior, Rui Pereira . II. Neves, Carmen Silvia Vieira Janeiro . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

CDU 63

MARIA APARECIDA DA CRUZ BEJATTO

**DESEMPENHO AGRONÔMICO E INFLUÊNCIA DO
HUANGLONGBING NA QUALIDADE DO FRUTO E DO ÓLEO
ESSENCIAL DE VARIEDADES DE LARANJA-DOCE NO NOROESTE
DO PARANÁ**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, para obtenção do título de doutora em Agronomia.

BANCA EXAMINADORA

Pesq. Dr. Rui Pereira Leite Junior
Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná –
IDR-Paraná

Prof^a. Dr^a. Carmen Silvia Vieira Janeiro Neves
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a. Dr^a. Lígia Erpen Dalla Corte
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Pesq. Dr. Clandio Medeiros da Silva
Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná –
IDR-Paraná

Pesq. Dr. Sérgio Alves Carvalho
Instituto Agronômico de Campinas – IAC,
Centro de Citricultura “Sylvio Moreira”.

Pesq. Dr. Eduardo Augusto Girardi
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária –
Embrapa Mandioca & Fruticultura

Londrina, 30 de maio de 2022.

*Dedico este trabalho à minha
família por todo o apoio, amor,
dedicação e companheirismo.
Em especial ao meu filho, João
Pedro da Cruz Bejatto*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar e colocar pessoas incríveis no meu caminho que têm me auxiliado na caminhada até aqui.

Aos meus pais, Iracema Pereira da Cruz e João José Maria dos Santos por todos os ensinamentos, suporte e amor.

À minha tia-mãe, Filomena Luiza Pereira, sem ela não teria chegado até aqui, obrigada por me amar e dar suporte aos meus sonhos.

À minha sogra, Laura Coux de Ferro, por todo o apoio nessa caminhada, principalmente na fase final, onde foi minha principal rede de apoio com meu filho.

Ao meu esposo, Andrews Ricardo Bejatto, por estar ao meu lado sempre, me dar todo apoio, suporte e amor, por ser compreensivo e paciente e por muitas vezes se anular para ir comigo em busca dos meus sonhos.

Ao meu filho João Pedro da Cruz Bejatto, sem dúvida a pessoa mais importante da minha vida, obrigada filho por ser minha alegria e força diária desde que chegou em minha vida, te amo incondicionalmente.

Ao meu orientador Dr. Rui Pereira Leite Junior, por toda a acolhida desde o primeiro contato, pela confiança deposita em mim, pelos ensinamentos e empenho na realização deste trabalho.

À minha co-orientadora, Prof^a. Dra. Carmen Silvia Vieira Janeiro Neves, por todos os ensinamentos, dedicação e confiança, contribuindo para que chegasse até aqui.

Ao Dr. Jinhe Bai por toda dedicação, ensinamentos, confiança e apoio ao me orientar durante os dois anos que estive no United States Department of Agriculture-USDA, Fort Pierce, FL.

Aos meus amigos Deived Uilian de Carvalho e Talita Vigo Longhi, pelo auxílio e parceria na condução dos experimentos. E a todos os meus queridos amigos que me acompanharam e deram suporte e apoio em mais essa jornada da minha vida.

Ao Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná (IDR-Paraná) e seus colaboradores Vanessa Sugahara, Cícero de Sá, Cícera Martimiano, e demais funcionários e estagiários pelo apoio técnico, tornando possível a realização deste estudo.

E em especial ao colaborador Israel Aurora, por todo o suporte na condução dos experimentos, aprendizado prático e amizade construída nessa caminhada.

À pesquisadora Dra. Michele Regina Lopes da Silva e à colega de laboratório Renata Rodrigues Robaina, pela amizade e conversas que tornaram o percurso ainda mais prazeroso.

Ao Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus), ao Instituto Agronômico de Campinas (IAC) - Centro de Citricultura "Sylvio Moreira" e à Cocamar Cooperativa Agroindustrial, pelo apoio financeiro e técnico para execução desse projeto.

Aos professores, funcionários e alunos da Universidade Estadual de Londrina (UEL) que contribuíram na minha educação e formação profissional, em especial ao prof. Dr. Claudemir Zucareli por sempre ter sido solícito quando precisei.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsas nas modalidades de doutorado regular e doutorado sanduíche no exterior (PDSE) que contribuíram significativamente na minha formação e execução do doutorado.

Ao Dr. Sérgio Alves Carvalho, Dra. Lígia Erpen Dalla Corte, Dr. Cláudio Medeiros da Silva e Dr. Eduardo Augusto Girardi, pelas contribuições nas revisões e avaliação do presente trabalho.

Muito obrigada!!!

BEJATTO, Maria Aparecida da Cruz. **Desempenho agrônomo e influência do huanglongbing na qualidade do fruto e do óleo essencial de variedades de laranja-doce no Noroeste do Paraná**. 2022. 124 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

RESUMO

Estudos com novas variedades de laranja-doce nas condições climáticas do Paraná são importantes para identificar materiais com bom desempenho agrônomo e promover a diversificação dos genótipos plantados no Estado. Atualmente, a produção de laranjas-doces no Paraná se concentra em um pequeno número de cultivares, tornando os pomares vulneráveis às adversidades bióticas e abióticas. Assim, os objetivos deste estudo foram avaliar o crescimento vegetativo, a produção e qualidade físico-química dos frutos, estimar a densidade de plantio e produtividade de pomares e determinar a incidência de cancro cítrico, huanglongbing (HLB) e tristeza (CTV) em 16 clones de laranja Pera (*Citrus ×sinensis*) enxertados sobre limão Cravo (*Citrus ×limonia*) no Noroeste do Paraná de 2012 à 2022 (Artigo A). Tão importante quanto a diversificação de cultivares, é conhecer os efeitos do HLB, uma das doenças mais impactantes para a citricultura atual, sobre a qualidade dos frutos e do óleo da casca, que é um valioso subproduto da indústria de sucos. Dessa maneira, também foi avaliado o efeito do HLB na qualidade físico-química dos frutos e do suco e nos componentes químicos do óleo da casca das laranjas-doces Hamlin IAC e Pera Morretes (Artigo B). No Artigo A, foram avaliados 16 tratamentos (seleções de Pera), empregando delineamento experimental de blocos casualizados com três repetições e 5 plantas por parcela, complementado com esquema fatorial para a variável incidência de cancro cítrico no fruto (16 seleções de Pera x 2 anos de avaliação). Para o artigo B, foram coletados frutos de plantas sadias (HLB-) e com sintomas de HLB (HLB+), e posteriormente foi realizado teste de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) na columela dos frutos para confirmação da doença. Foram realizadas análises físico-químicas nos frutos e o óleo da casca foi extraído e avaliado por cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GC-MS). O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado, complementado com esquema fatorial para as características físico-químicas do fruto e do suco (2 cultivares x 2 níveis da doença - HLB+ and HLB-). No Artigo A, a seleção Pera Perão apresentou crescimento vegetativo vigoroso, baixa produtividade, boa qualidade de fruto e menor incidência de cancro cítrico nos frutos, mas esteve entre as seleções com maior incidência de plantas com HLB. As seleções Ovale, Clone 9 e Clone 42 apresentaram alto vigor, baixa produtividade e qualidade dos frutos. Por outro lado, as seleções Pera IAC, Olímpia, Mel, Bianchi e IPR 159, apresentaram baixo crescimento vegetativo, bom desempenho produtivo e boa qualidade de frutos, além da menor incidência de cancro cítrico e HLB, sendo as mais indicadas para o plantio em condições subtropicais húmidas. No Artigo B, em geral, frutos HLB+ foram menores, mais verdes, com menor rendimento de suco, flavedo mais fino, maior acidez titulável, maior teor de sólidos solúveis (SS) e menor ratio (SS AT⁻¹). Em relação ao perfil de óleo, em comparação com HLB-, as amostras HLB+ apresentaram menores concentrações de componentes típicos do óleo de casca, incluindo aldeídos e ésteres, e foram abundantes em terpenos oxidativos/desidrogenados. O HLB diminuiu a qualidade dos frutos e do óleo essencial de variedades de laranja-doce.

Palavras-chave: Cancro cítrico. *Citrus ×sinensis*. Desenvolvimento vegetativo. Doenças. Produção. Subprodutos da laranja.

BEJATTO, Maria Aparecida da Cruz. **Horticultural performance and influence of huanglongbing on fruit and essential oil quality of sweet orange varieties in Northwest Paraná, Brazil.** 2022. 124 f. Thesis (Doctorate in Agronomy) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2022.

ABSTRACT

Studies with new sweet orange varieties in the climatic conditions of Paraná are important to identify varieties with good agronomic performance and to promote the diversification of genotypes planted in the state. Currently, the production of sweet oranges in Paraná is concentrated in few cultivars, which is a vulnerability factor for both biotic and abiotic stresses. Thus, the objectives of this study were to evaluate the vegetative growth, fruit yield and physicochemical quality, estimate the tree density and orchard productivity, and determine the incidence of citrus canker, huanglongbing (HLB) and citrus tristeza virus (CTV) in 16 selections of Pera sweet orange (*Citrus ×sinensis*) grafted onto Rangpur lime (*Citrus ×limonia*) in Northwestern Paraná (Manuscript A). As important as the diversification of cultivars, it is to know the effects of HLB, one of the most impacting diseases of the citrus industry, on the quality of fruit and peel oil, which is a valuable by-product of the juice industry. Thus, the effect of HLB on the physicochemical quality of the fruit and juice and on the chemical components of the peel oil of Hamlin IAC and Pera Morretes sweet oranges was also evaluated (Manuscript B). For manuscript A, the experimental design was randomized blocks with 16 treatments (Pera selections) and three blocks of 5 trees per plot, complemented with a factorial arrangement for the variable incidence of citrus canker (16 Pera selections x 2 years of evaluation). For manuscript B, fruits were collected from healthy trees (HLB-) and HLB-symptomatic trees (HLB+), confirmed by real-time polymerase chain reaction test (qPCR) performed in the central core tissue of the fruit. The fruits were submitted to physicochemical analyzes and the peel oil was extracted and evaluated by gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS). The statistical design was completely randomized, complemented with a factorial arrangement for the physicochemical characteristics of the fruit and juice in paper B (2 cultivars x 2 disease levels - HLB+ and HLB-). In manuscript A, the Pera Perão selection had high vegetative growth, low fruit yield, good fruit quality and lower incidence of citrus canker in the fruits, but was among the selections with the highest incidence of trees with HLB. The selections Ovale, Clone 9 and Clone 42 showed high vegetative growth, lower fruit yield and quality. On the other hand, the selections Pera IAC, Olimpia, Mel, Bianchi and IPR 159, showed lower vegetative growth, high yield and fruit quality. In addition, these selections had lower incidence of citrus canker and HLB, being the most suitable Pera selections for planting in humid subtropical climate. In manuscript B, in general, HLB+ fruits were smaller, greener, with lower juice yield, thinner flavedo, higher titratable acidity and soluble solids content (SS) and lower ratio (SS TA⁻¹). Regarding the oil profile, the HLB+ samples showed lower concentrations of typical components of the peel oil, including aldehydes and esters, and were abundant in oxidative/dehydrogenated terpenes compared to HLB- ones. The disease decreased fruit and oil quality of the sweet orange varieties.

Keywords: Citrus canker. *Citrus ×sinensis*. Tree growth. Diseases. Fruit yield. Orange by-products.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 Planta adulta (A) e frutos (B) de laranja Pera IAC. Fonte: o próprio autor.	24
Figura 2.2 Planta adulta (A) e frutos (B) de laranja Hamlin. Fonte: o próprio autor. .	27
Figura 2.3 Sintomas do cancro cítrico na face inferior (A) e superior do limbo da folha (B), em fruto (C) e em ramo (D).....	36
Figura 2.4 Situação quanto à presença e controle do cancro cítrico adotado nos diferentes estados brasileiros de acordo com a Instrução Normativa 21 (IN21)	40
Figura 2.5 Municípios brasileiros (em cinza escuro) nos estados de São Paulo (SP), Minas Gerais (MG), Paraná (PR) e Mato Grosso do Sul (MS) onde o HLB foi oficialmente detectado, de março de 2004 a setembro de 2019.	41
Figura 2.6 Sintomas de HLB nas folhas (A) e frutos (HLB +) (B) de laranja-doce Pera Morretes.	44
Figure 3.1 Rainfall, and maximum (Tmax), medium (Tmed) and minimum (Tmin) air temperatures for the 2016-2021 period at the experimental area. Guairaçá, PR, Brazil	51
Figure 3.2 Principal component analysis (PCA) for evaluated variables (vegetative growth, fruit yield, fruit quality, estimates of planting density and disease incidence) of 16 Pera sweet orange selections grafted onto Rangpur lime rootstock in Guairaçá, PR, Brazil.....	69
Figure 4.1 Precipitation, and maximum (Tmax), medium (Tmed) and minimum (Tmin) temperatures for the year of 2019. Guairaçá, PR, Brazil	83
Figure 4.2 Heatmap of the chemical groups increased and/or decreased by huanglongbing (HLB) determined based on the mean concentration of volatiles in the peel oil extracted from fruits of the Hamlin IAC and Pera Morretes sweet orange varieties grafted onto Rangpur lime rootstock and cultivated in Paraná State, Brazil.....	96
Figure 4.3 Principal component analysis (PCA) score plot (A) and loading plot (B) of the volatile compounds present in the peel oils of healthy (HLB-) and HLB-affected (HLB+) mature fruits of Hamlin IAC and Pera Morretes sweet orange varieties grafted onto Rangpur lime rootstock and cultivated in Paraná State, Brazil.....	98

LISTA DE TABELAS

Table 3.1 Mid-season Pera sweet orange (<i>C. ×sinensis</i>) selections evaluated in the study.....	52
Table 3.2 Vegetative growth of 7 years-old 16 Pera sweet orange selections grafted onto Rangpur lime rootstock, in the 2019 season, in Guairaçá, PR.	59
Table 3.3 Annual and cumulative yields, yield efficiency and alternate bearing index of 16 Pera sweet orange selections grafted onto Rangpur lime rootstock for the 2016 through 2021 harvest seasons in Guairaçá, PR, Brazil.	61
Table 3.4 Fruit length (FL), diameter (FD), shape ($FL FD^{-1}$), and weight, and number of seeds per fruit of 16 Pera sweet orange selections, based on the average of the 2019, 2020 and 2021 harvest seasons in Guairaçá, PR, Brazil.....	62
Table 3.5 Peel color (PC), juice color (JC), juice yield (JY), soluble solids content (SS), titratable acidity (TA), ratio ($SS TA^{-1}$) and technological index (TI) of 16 Pera sweet orange selections grafted onto Rangpur lime rootstock, based on the average values of the 2019, 2020 and 2021 harvest seasons	64
Table 3.6 Estimates of minimum in- and between-rows tree spacing, and maximum tree density, fruit productivity and soluble solids yield for 16 Pera sweet orange selections grafted onto Rangpur lime rootstock, seven years after planting in Guairaçá, PR, Brazil.....	66
Table 3.7 Incidence of citrus canker on fruits, cumulative incidence of trees with huanglongbing (HLB) and stem pitting severity due to citrus tristeza virus (CTV) in 16 Pera sweet orange selections grafted onto Rangpur lime rootstock in Guairaçá, PR, Brazil.....	67
Table 4.1 Physical qualities of healthy (HLB-) and HLB-affected (HLB+) mature fruits of Hamlin IAC and Pera Morretes sweet orange varieties grafted onto Rangpur lime rootstock and cultivated in Paraná State, Brazil.	89
Table 4.2 Juice quality of healthy (HLB-) and HLB-affected (HLB+) fruits of Hamlin IAC and Pera Morretes sweet orange varieties grafted onto Rangpur lime rootstock and cultivated in Paraná State, Brazil	91
Table 4.3 Chemical composition of the peel oil of healthy (HLB-) and HLB-affected (HLB+) mature fruits of Hamlin IAC and Pera Morretes sweet orange varieties grafted onto Rangpur lime rootstock and cultivated in Paraná State, Brazil.	93

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	PRODUÇÃO DE LARANJAS-DOCES NO BRASIL E NO MUNDO.....	17
2.2	PRODUÇÃO DE LARANJAS-DOCES NO PARANÁ.....	18
2.3	CULTIVARES DE LARANJAS-DOCES.....	20
2.3.1	Laranja-Doce Pera.....	22
2.3.2	Laranja-Doce Hamlin.....	25
2.4	QUALIDADE DOS FRUTOS.....	27
2.4.1	Cor e Tamanho dos Frutos e Rendimento de Suco.....	28
2.4.2	Açúcares e Ácidos.....	29
2.4.3	Flavonoides e Limonoides.....	31
2.4.4	Compostos Voláteis do Óleo da Casca.....	32
2.5	CANCRO CÍTRICO.....	35
2.6	HUANGLONGBING.....	40
2.6.1	Efeito do HLB na Qualidade dos Frutos.....	43
2.6.2	Controle do HLB.....	45
3	ARTIGO A	47
3.1	INTRODUCTION.....	48
3.2	MATERIAL AND METHODS.....	50
3.2.1	Experimental Location.....	50
3.2.3	Cultural Practices.....	52
3.2.4	Tree and Fruit Evaluations.....	53
3.2.4.1	Vegetative growth.....	53
3.2.4.2	Yield.....	53
3.2.4.3	Fruit quality.....	54
3.2.5	Estimates of Planting Density and Yield.....	56
3.2.6	Disease Evaluation.....	56
3.2.6.1	Citrus canker incidence on fruits.....	56
3.2.6.2	Huanglongbing (HLB) incidence.....	57
3.2.6.3	Citrus Tristeza Virus (CTV) incidence.....	57
3.2.7	Data Analyses.....	58
3.3	RESULTS.....	58
3.3.1	Vegetative Growth.....	58
3.3.2	Yield.....	60
3.3.3	Fruit Quality.....	62

3.3.4	Estimates of Planting Density and Productivity	65
3.3.5	Citrus Canker, HLB and CTV	66
3.3.6	Multivariate Analysis.....	68
3.4	DISCUSSION	70
3.5	CONCLUSIONS	78
4	ARTIGO B.....	80
4.1	INTRODUCTION	80
4.2	MATERIALS AND METHODS	82
4.2.1	Fruit Harvest.....	82
4.2.2	Fruit Quality Evaluation	84
4.2.3	' <i>Candidatus</i> Liberibacter asiaticus – CLas' Diagnosis	85
4.2.4	Peel oil Extraction, Identification and Composition of Volatile Compounds ...	86
4.2.5	Statistical Analyses.....	87
4.3	RESULTS.....	88
4.3.1	Huanglongbing Effect on Fruit and Juice Quality of Hamlin IAC and Pera Morretes Sweet Oranges	88
4.3.2	Huanglongbing Effect on the Volatile Profile of Hamlin IAC and Pera Morretes Sweet Oranges Peel Oil	92
4.4	DISCUSSION	99
4.5	CONCLUSIONS	104
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105

1 INTRODUÇÃO

A citricultura tem grande importância econômica no agronegócio brasileiro, sendo que o país é o maior produtor mundial de laranjas-doces [*Citrus ×sinensis* (L.) Osbeck] (FAO, 2020). A produção nacional é liderada pelo estado de São Paulo, responsável por 75% da produção em 2021, seguido por Minas Gerais com 6,0% e Paraná com 5,0% (IBGE, 2021). O Paraná apresenta grande potencial para expansão da cultura, que tem tido produção crescente nos últimos anos. Na safra 2020/2021, o Estado apresentou a maior produtividade nacional de laranjas-doces, com 35,9 t ha⁻¹, enquanto a média nacional foi de 27,4 t ha⁻¹ (IBGE, 2021). As principais regiões produtoras de laranja-doce do Paraná são Norte e Noroeste (IBGE, 2021; SEAB, 2022), que concentram indústrias para o processamento da fruta, visando principalmente a produção de suco concentrado congelado (FCOJ – frozen concentrated orange juice) para a exportação e suco integral fresco (NFC – not from concentrate) para o mercado interno.

O Paraná também é modelo no controle do cancro cítrico (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*), doença que foi limitante para o cultivo de citros no Estado até o final da década de 1980. As cultivares para o plantio no Estado são liberadas com base na resistência à doença, de acordo com pesquisas realizadas no Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná – IAPAR/Emater (IDR-Paraná) (LEITE JUNIOR, 1992). A produção paranaense de laranjas-doces se concentra em apenas quatro cultivares: a laranja IAPAR 73 de maturação precoce, a laranja Pera de maturação na meia-estação e as laranjas Folha Murcha e Valência de maturação tardia, todas predominantemente enxertadas no limão Cravo [*Citrus ×limonia* Osbeck] (AULER et al., 2014). A laranja Hamlin, cultivar de maturação precoce mais plantada no estado de São Paulo e na Flórida, EUA, não está liberada para o plantio no estado do Paraná devido à sua alta susceptibilidade ao cancro cítrico (TAZIMA; LEITE JUNIOR, 2018).

A laranja Pera, com seus clones IAC e Olímpia, entre outros, é a cultivar mais plantada no Brasil, devido ao bom desempenho agrônomico e boa qualidade dos frutos, tanto para o mercado de fruta fresca quanto para o processamento para suco (STUCHI et al., 2020; RAMOS et al., 2021). Porém, a laranja Pera é a cultivar comercial de laranja doce mais suscetível a tristeza dos citros causada pelo vírus da tristeza dos citros (*Citrus tristeza virus*, CTV) (SALIBE; SOBRINHO; MULLER, 2002).

O sintoma mais comum da tristeza dos citros em laranja-doce Pera enxertada em porta-enxertos tolerantes ao CTV são as caneluras nos ramos e tronco das plantas infectadas (TANAKA et al., 2009). A seleção IAC é um clone pré-imunizado com estirpe fraca e protetiva do vírus da tristeza dos citros (STUCHI et al., 2020). Esta seleção de Pera, juntamente com outras mutações espontâneas (DONADIO et al., 1999), muitas delas, naturalmente infectadas com cepas atenuadas de CTV, foram selecionadas e plantadas em pomares comerciais no Brasil (SALIBE; TEÓFILO SOBRINHO; MULLER, 2002). As diversas seleções de Pera apresentam diferenças consideráveis de tolerância a doenças, crescimento vegetativo, produtividade e qualidade de frutos, como mostram trabalhos anteriores (DONADIO et al., 1999; SALIBE; TEÓFILO SOBRINHO; MULLER, 2002; STUCHI et al., 2020). Com isso, há a necessidade de mais estudos com diferentes seleções, nas condições climáticas do estado do Paraná.

O plantio de diferentes genótipos de copa e porta-enxertos contribui com o manejo de doenças e a redução dos impactos gerados por adversidades climáticas, deixando os pomares menos expostos a fatores bióticos e abióticos (EMMANOUILIDOU; KYRIACOU, 2017; NEVES et al., 2019). As cultivares de laranjas-doces apresentam graus de tolerância diferentes às doenças e adversidades climáticas (EMMANOUILIDOU; KYRIACOU, 2017; NEVES et al., 2019). Além disso, muitas das características de qualidade dos frutos são específicas de cada cultivar e a diversificação pode também contribuir com o aumento da qualidade dos frutos e da eficiência produtiva dos pomares (CASTLE; BALDWIN; MURARO, 2010; MACHADO; TEÓFILO SOBRINHO, 2016). A diversificação das cultivares pode contribuir ainda para suprir o mercado em diferentes épocas, por estratificar a colheita de laranja ao longo do ano. Isto evita a saturação do mercado e permite ao citricultor ofertar frutos de qualidade, colhidos na época adequada de maturação, obtendo assim melhores preços. Essa oferta de frutos ao longo do ano, permite ainda o processamento contínuo de fruta com boa qualidade pelas indústrias (NEVES et al., 2010; 2019). Portanto, há necessidade da diversificação das cultivares copa de laranja-doce no estado do Paraná, visando aumentar a produção e ampliar a época de colheita, com a oferta de frutos de qualidade com maior frequência para o mercado consumidor e a indústria, favorecendo o processamento da fruta ao longo do ano.

Outra grande preocupação para a citricultura é o huanglongbing (HLB), doença

associada a bactérias gram-negativas '*Candidatus Liberibacter spp.*', que são transmitidas no Brasil pelo inseto vetor, psilídeo *Diaphorina citri* (BOVÉ, 2006; LI; HARTUNG; LEVY, 2006). O HLB está presente nas principais regiões produtoras de citros em todo o mundo, exceto na base mediterrânea e Austrália, causando grandes perdas econômicas na citricultura (DALA-PAULA et al., 2019).

Na Flórida o primeiro relato da doença foi em 2005 (HALBERT, 2005), e atualmente, a incidência de HLB no estado Norte americano é de mais de 90%, afetando grandemente a produção de laranjas-doces, que caiu de 150 milhões de caixas na safra 2005–2006 para 72 milhões na safra de 2018–2019 (GRAHAM; GOTTWALD; SETAMOU, 2020). As estimativas de perda devido a doença na Flórida são de aproximadamente US\$1 bilhão de dólares por ano (LI et al., 2020). No Brasil, a doença foi constatada em 2004 no estado de São Paulo (COLETTA-FILHO et al., 2004). De 2005 até meados de 2021 já foram erradicadas mais de 61 milhões de plantas devido ao *greening* no Brasil (CDA, 2021). No estado do Paraná, a doença foi relatada pela primeira vez em 2007 e um plano de ação foi implementado para prevenir e conter a sua ocorrência no Estado, sendo a erradicação de árvores sintomáticas uma das principais medidas adotadas para retardar o progresso da doença (NUNES et al., 2010).

No cinturão citrícola de São Paulo e Sudoeste de Minas Gerais a incidência média de HLB subiu de 22,37% em 2021 para 24,42% em 2022, correspondendo a aproximadamente 48,67 milhões de árvores doentes (FUNDECITRUS, 2022b). Uma das principais causas do aumento da incidência da doença é a prática de se manter árvores doentes em pomares comerciais, principalmente das árvores em produção, com controle insuficiente do psilídeo (FUNDECITRUS, 2022b). A erradicação de plantas sintomáticas com HLB era obrigatória desde 2008, como estabelecido pela Instrução Normativa 53 (IN53) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2008). Porém, em maio de 2021, a IN53 foi revogada, e a portaria 317 foi publicada (BRASIL, 2021), estabelecendo que nos estados com ocorrência de *greening*, a eliminação de plantas com sintomas permanece obrigatória apenas para os pomares de citros até o oitavo ano de idade. Após isso, passa a ser facultativa, desde que realizado o controle eficiente do psilídeo no pomar.

O HLB afeta seriamente a produção de citros, principalmente por causar a queda prematura dos frutos, resultando em uma redução da produção e,

eventualmente, pode causar a morte da planta (BALDWIN et al., 2018; DALA-PAULA et al., 2019). O HLB também afeta a qualidade dos frutos e, conseqüentemente, do suco produzido a partir de frutos provenientes de plantas sintomáticas. Os frutos tendem a ser menores, geralmente assimétricos, mais verdes, com menor teor de açúcares e sólidos solúveis totais (SS), com maior acidez titulável (TA) e teor de limonoides e flavonoides, e menor índice de maturação ou *ratio* ($SS \cdot TA^{-1}$) comparados com frutos de plantas saudáveis. Entre os compostos voláteis, importantes para definir o aroma e sabor, aldeídos e alguns ésteres estão presentes em menores quantidade e alguns monoterpenos em maior quantidade nos sucos de frutos sintomáticos em comparação com suco de frutas saudáveis e assintomáticas (DALA-PAULA et al., 2018; 2019). Com isso, os sucos produzidos a partir de frutos sintomáticos para HLB tendem a ser menos doces, mais ácidos e amargos, e podem apresentar sabor metálico, com menos sabor frutado de laranja. Isto faz com que a indústria tenha muitas vezes que fazer misturas para ajustar o sabor dos sucos, principalmente em regiões com alta incidência de HLB, como é o caso da Flórida nos EUA (DAGULO et al., 2010; DALA-PAULA et al., 2018; 2019).

O HLB também afeta a qualidade dos óleos essenciais extraídos da casca dos frutos de citros (XU et al., 2017a; b; KIEFL et al., 2018; SUN et al., 2021). Os óleos essenciais são subprodutos valiosos obtidos durante o processamento dos citros pela indústria (PLOTTO; BAI; BALDWIN, 2017; SUN et al., 2021). Esses óleos são amplamente utilizados na indústria alimentícia, como aromatizantes naturais de alimentos e bebidas, e também são utilizados em cosméticos, perfumes, detergentes, produtos de higiene corporal e preparações farmacêuticas (SAWAMURA, 2010; DUGO; MONDELLO, 2011; GONZALEZ-MAS et al., 2019). O óleo essencial de citros possui atividade inseticida, antimicrobiana e antioxidante (FANCELLO et al., 2020; OIKEH et al., 2020; OYEDEJI et al., 2020). Possui também propriedades medicinais, como a quimioprevenção contra o câncer, e pode ainda ser utilizado na aromaterapia (SAWAMURA, 2010). Existem poucos estudos avaliando o impacto do HLB nos compostos voláteis do óleo da casca de citros. Alguns resultados disponíveis até o momento indicam que nas laranjas-doces a doença diminui a quantidade de aldeídos, e aumenta a produção de compostos oxidativos, devido ao estresse oxidativo causado pela doença, o que leva à diminuição da qualidade do óleo essencial (XU et al., 2017a; KIEFL et al., 2018; SUN et al., 2021).

Não há ainda relato de nenhum controle curativo para o HLB, nem foram identificados porta-enxertos ou copas resistentes à doença com valor comercial. Praticamente, todas as espécies e cultivares de citros são sensíveis ao HLB, independente do porta-enxerto utilizado (DALA-PAULA et al., 2018; 2019; FERRAREZI, et al., 2020). As laranjas-doces estão entre as espécies de maior susceptibilidade à doença (ABDULLAH et al., 2009). As estratégias de manejo consistem em retardar a infecção das plantas do pomar ou gerenciar as plantas já infectadas, através da remoção de árvores sintomáticas, plantio e replantio de mudas saudáveis, quebra-ventos nos arredores do pomar e monitoramento intensivo e controle dos vetores, com métodos físicos, químicos e biológicos (FERRAREZI, et al., 2020).

Assim, os objetivos do presente estudo foram avaliar o desempenho agrônomo (desenvolvimento vegetativo e produção das plantas e a qualidade físico-química dos frutos e do suco), estimar a densidade ideal de plantio e a produtividade de novos pomares, e avaliar a incidência das doenças HLB, cancro cítrico e tristeza em 16 clones de laranja Pera sob condições de clima subtropical úmido do Noroeste do Paraná. Além disso, avaliou-se o efeito do HLB na qualidade físico-química dos frutos e suco e na composição do óleo da casca de frutos de duas cultivares de laranja-doce, Hamlin IAC e Pera Morretes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PRODUÇÃO DE LARANJAS-DOCES NO BRASIL E NO MUNDO

A laranja-doce é a fruta cítrica mais produzida no mundo, com produção em torno de 75 milhões de toneladas no ano de 2020 (FAO, 2020). As Américas são responsáveis por 40,5% dessa produção, tendo como principais produtores Brasil, Estados Unidos e México. O continente asiático, representado principalmente pela China e Índia, vem em segundo lugar, contribuindo com 37,6% da produção mundial de laranjas (FAO, 2020).

Os Estados Unidos foram o maior produtor mundial de laranjas e de suco dessa fruta até meados da década de 1980, sendo o estado da Flórida o principal produtor. Entretanto, após uma grande geada em 1962 que atingiu os pomares da Flórida, seguida de outras duas geadas na década de 1970 e 1980, EUA perderam a primeira posição no ranking mundial e isso contribuiu para o crescimento da indústria brasileira de produção de suco de laranja, que se consolidou como maior produtora e exportadora de suco concentrado congelado de laranja (FCOJ) a partir da década de 1980 (NEVES et al., 2010; 2019).

Hoje, o Brasil é o maior produtor mundial de laranjas, com mais de 16 milhões de toneladas no ano de 2021 em área de 596 mil hectares (IBGE, 2021). A região Sudeste brasileira é a maior produtora nacional, representada principalmente pelo estado de São Paulo, o qual foi responsável por 75% da produção do país no ano de 2021, com 12 milhões de toneladas produzidas em área de 369 mil hectares (IBGE, 2021). O estado da Minas Gerais aparece como segundo maior produtor nacional com cerca de 39 mil hectares plantados e produção de aproximadamente 981 mil toneladas, seguido pelo estado do Paraná com cerca de 22 mil hectares e 807 mil toneladas produzidas (IBGE, 2021).

Atualmente, as laranjas-doces predominantes nos pomares de São Paulo são as cultivares Natal, Valência e Folha Murcha de maturação tardia, Hamlin, Westin, Rubi e Pineapple de maturação precoce, e seleções de Pera de maturação na meia-estação (NEVES et al., 2019). A maior parte da produção nacional de laranjas é destinada à produção de suco concentrado congelado (FCOJ), visando principalmente a exportação. O Brasil é responsável por 75% das exportações globais de suco de laranja (NEVES et al., 2019; SPREEN et al., 2020; USDA, 2022).

O consumo mundial de suco concentrado congelado de laranja vem caindo nos últimos anos, com projeção de se igualar à produção mundial na safra de 2021/2022 (USDA, 2022). O restante da produção de laranjas-doces brasileira visa o mercado de fruta fresca, e a produção de suco de laranja não concentrado (NFC). O mercado interno consome cerca de 30% do total de laranjas produzidas no País (NEVES et al., 2019). A citricultura nacional gera mais de 200 mil empregos diretos e indiretos, e movimenta cerca de US\$ 14 bilhões de dólares anualmente (FUNDECITRUS, 2021).

A citricultura brasileira tem sofrido com a incidência de doenças nas últimas décadas, como a tristeza dos citros (CTV), o cancro cítrico, a clorose variegada dos citros (CVC) e, mais recentemente, o Huanglongbing (HLB) (NEVES et al., 2019; SPREEN et al., 2020). Entretanto, os investimentos em estudos científicos e em novas tecnologias, como o adensamento de plantios e uso de irrigação nos pomares, têm contribuído para o aumento da produtividade mesmo sob a pressão do HLB, permitindo que o Brasil se mantenha na liderança da produção mundial de laranjas-doces (MACHADO; TÉOFILO SOBRINHO, 2016; NEVES et al., 2019; FAO, 2020). Estudos sobre a avaliação do desempenho agrônomico e da adaptação de cultivares à diferentes condições edafoclimáticas no País são necessários para a diversificação dos pomares, com plantio de um maior número de cultivares, favorecendo a ampliação da época de colheita e a qualidade dos frutos.

2.2 PRODUÇÃO DE LARANJAS-DOCES NO PARANÁ

A citricultura no estado do Paraná foi inviabilizada por mais de 30 anos devido ao cancro cítrico, causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (LEITE JUNIOR, 1990; LEITE JUNIOR; MOHAN, 1990). Essa doença foi constatada primeiramente no estado de São Paulo em 1957 e rapidamente se alastrou para outros estados, chegando ao Paraná e se disseminando pelas regiões Norte, Noroeste, Oeste e Sudoeste, impossibilitando o cultivo de citros nesses locais (ROSSETTI, 1977; LEITE JUNIOR, 1989; 1990; LEITE JUNIOR; MOHAN, 1990). A citricultura apenas voltou a se desenvolver no Paraná no final da década de 1980, quando o antigo Instituto Agrônomico do Paraná -IAPAR (atual IDR-Paraná), através de pesquisas, introduziu e selecionou material cítrico resistente ao cancro cítrico e desenvolveu medidas para o manejo integrado da doença no Estado (LEITE JUNIOR,

1989).

Além dos materiais resistentes ao cancro cítrico, a adoção do manejo integrado possibilitou a implantação de pomares cítricos nas regiões com ocorrência da doença, e conseqüentemente levou à expansão da área cultivada com citros no Estado. No manejo integrado foram incluídas medidas regulatórias, como a quarentena de material propagativo, regulamentação na implantação de pomares, produção de mudas sadias, plantio de cultivares mais resistentes à doença, inspeções de propriedades e viveiros, emprego de quebra-ventos, controle do minador-dos-citros (*Phyllocnistis citrella* Stainton) e controle químico da doença com produtos à base de cobre (LEITE JUNIOR; MOHAN, 1990). Essas medidas, juntamente com ações do governo estadual e do setor privado, principalmente de cooperativas, possibilitaram que a citricultura se desenvolvesse nas regiões Norte e Noroeste do Paraná no final da década de 1980 (TAZIMA; LEITE JUNIOR, 2018).

A produção de citros no Paraná está dividida em dois grandes polos, um na região do Vale do Ribeira, que produz tangerinas para consumo *in natura*, principalmente a Ponkan (*C. ×reticulata* Blanco), e outro nas regiões Norte e Noroeste produzindo laranjas-doces, principalmente para indústrias (NUNES et al., 2010; TAZIMA; LEITE JUNIOR, 2018). As principais cultivares de laranjas-doces plantadas no Estado são: Pera, Folha Murcha, Valência e IAPAR-73 (AULER et al., 2014).

A região Noroeste é a maior produtora de laranjas do Estado, sendo os municípios de Paranavaí, Alto Paraná, Guairaçá e Nova Esperança os maiores produtores, responsáveis por mais de 8,5 mil dos 22 mil hectares plantados no Estado (IBGE, 2021; SEAB, 2022). Essa região conta com duas grandes indústrias de suco FCOJ, a Louis Dreyfus Company Sucos S.A (LDC) e a Citri Agroindustrial S/A que faz parte do grupo Prat's. A maior parte das laranjas processadas por essas indústrias tem como destino a produção de suco de laranja concentrado congelado (FCOJ) visando a exportação. Outra parte da laranja produzida é destinada ao mercado de frutas frescas e à produção de suco de laranja não concentrado (NFC). Os óleos essenciais e o D-limoneno são alguns dos subprodutos também extraídos e comercializado por essas empresas (CITRI, 2022; LDC, 2022). Além disso, a região Noroeste conta com outras empresas, que visam o fornecimento de suco de laranja não concentrado (NFC) para o mercado interno, como a Prat's e a Garoto.

A região Norte do Paraná conta com a uma unidade industrial de sucos da

Cooperativa Agroindustrial Integrada, inaugurada em 2013 no município de Uraí. A indústria tem capacidade para processar mais de dois milhões de caixas de laranjas por ano, destinados à produção de suco de laranja concentrado congelado (FCOJ) para exportação. A Indústria também fabrica outros produtos derivados da laranja, como o D-limoneno extraído dos resíduos da extração do suco (INTEGRADA, 2022).

Atualmente, o estado do Paraná é o terceiro maior produtor nacional de laranjas-doces, responsável por 5% da safra em 2021 (IBGE, 2021). A produção de laranjas-doces teve grande aumento nos últimos 10 anos, passando de 302.000 toneladas em 2001, em área de aproximadamente 14 mil hectares para 807.684 toneladas em 2021, em área de cerca de 22 mil hectares (IBGE, 2021). Fatores como condições edafoclimáticas favoráveis e o estabelecimento de indústrias para o processamento de frutos, têm contribuído para o aumento da área plantada no Paraná (TAZIMA; LEITE JUNIOR, 2018). Além disso, o Estado detém a maior produtividade nacional de laranjas-doces, com 35,9 t ha⁻¹, muito superior à média nacional que foi de 27,4 t ha⁻¹ em 2021, e acima também da produtividade obtida pelo estado de São Paulo, maior produtor nacional, que foi de 32,7 t ha⁻¹ na safra de 2021 (IBGE, 2021). Isso demonstra o alto potencial do Paraná para o cultivo de laranjas-doces, havendo a necessidade de mais estudos visando a seleção de novos materiais para cultivo no Estado, aperfeiçoamento do manejo dos pomares, e, conseqüentemente, maior produtividade, qualidade e rentabilidade ao citricultor.

2.3 CULTIVARES DE LARANJAS-DOCES

As laranjas-doces são originárias da Ásia, possivelmente da Índia e China (TADEO et al., 2020). Elas são produzidas na maioria das regiões subtropicais e tropicais do mundo (PLOTTO; BAI; BALDWIN, 2017). As laranjas-doces podem ser separadas em quatro grupos com base em suas características. O grupo das laranjas comuns é o mais importante comercialmente, compreendendo a maior parte das laranjas-doces cultivadas em todo o mundo (Hamlin, Iapar 73, Pera, Valência, Natal, Rubi, Westin e Folha Murcha). Já as laranjas de umbigo constituem o segundo grupo mais plantado, visando basicamente o consumo *in natura* (Baía, Baianinha, Washington Navel, Navelina, Navelate, Lane Late e Mars Navel). O terceiro grupo é constituído pelas laranjas sanguíneas (Moro, Sanguinelli, Sanguinello, Tarocco e

Sanguínea); e o quarto grupo pelas laranjas de baixa acidez (Lima, Piralima, Lima Tardia e Serra d'água) (ALBRIGO; STELINSKI; TIMMER, 2019).

Outra forma de classificação das laranjas-doces é pelo número de sementes. Considera-se sem sementes, quando contêm de 0 a 8 sementes por fruto, com baixo número de sementes, entre 9 e 15, e com alto número de sementes, quando contém mais de 15 por fruto (ALBRIGO; STELINSKI; TIMMER, 2019). As cultivares comerciais mais importantes, como Valência, Pera e laranjas de umbigo, são classificadas como sem sementes (ALBRIGO; STELINSKI; TIMMER, 2019). A esterilidade natural dos frutos de citros é um caráter herdável (CARUSO et al., 2020). Como regra geral, genitores sem sementes ou com baixo número de sementes irão gerar híbridos com característica similar (YAMAMOTO; MATSUMOTO; YAMADA, 1995). A ausência de sementes pode ser alcançada também através da auto-incompatibilidade gametofítica, porém, essa característica é prejudicada em caso de polinização cruzada nos pomares (CARUSO et al., 2020). O baixo número de sementes observado em laranja Valência está relacionado à fraca partenocarpia desta cultivar, resultado de algum defeito durante a gametogênese feminina (KOLTUNOW et al., 1995).

Conforme a época de maturação dos frutos, as laranjas podem ser classificadas como precoces, meia-estação ou tardias. As precoces, como é o caso da Hamlin, IAPAR 73, Westin, Rubi, Salustiana, Valência Americana e Pineapple, atingem o estágio ideal de maturação 6 a 9 meses após a plena floração, entre os meses de maio e agosto. As cultivares tardias ou muito tardias atingem a maturação após 12 ou até 18 meses da antese. Exemplos de cultivares tardias são as laranjas Natal, Valência e Folha Murcha que atingem maturação entre os meses de outubro e janeiro. As variedades de meia estação, como é o caso da cultivar Pera, tem maturação 9 a 12 meses após a antese, entre julho e outubro, preenchendo a lacuna entre os outros dois grupos, principalmente no mês de setembro. A maturação dos frutos de citros também depende das condições edafoclimáticas e de cultivo e do porta-enxerto utilizado (NEGRI; STUCHI; BLASCO, 2005; POZZAN; TRIBONI, 2005; NEVES et al., 2010; ALBRIGO; STELINSKI; TIMMER, 2019).

A diversificação das cultivares nos pomares estratifica a colheita de laranja ao longo do ano. Isto evita a saturação do mercado e permite ao citricultor ofertar frutos de qualidade em épocas diferenciadas para obter melhores preços, além de permitir

o processamento industrial e a produção de suco ao longo do ano. Cultivares de maturação de meia estação, como a laranja Pera, são bem aceitas pelos consumidores e produtores por apresentarem boa qualidade, com alto teor de sólidos solúveis e apresentarem produção no período de entressafra (NEVES et al., 2010).

O plantio de cultivares de laranja-doce de maturação precoce também tem aumentado nas principais regiões produtoras do Brasil. Cerca de 29% das plantas cítricas são de cultivares de maturação precoce (NEVES et al., 2019). A laranja Hamlin é a laranja-doce de maturação precoce mais plantada no Brasil. Juntamente com outras cultivares com período de maturação similar, aumentam a oferta de frutos de qualidade no início da safra de laranjas (CAPUTO et al., 2012; NEVES et al., 2019).

Há necessidade de abastecimento frequente do mercado com frutos de qualidade. Estudos para avaliar a adaptação de cultivares à diferentes regiões são extremamente necessários, bem como estudos para a identificação de cultivares com diferentes épocas de maturação visando o abastecimento do mercado com frutos de qualidade. Isto é particularmente importante no estado do Paraná que ainda concentra a produção de laranjas em um pequeno número de copas.

2.3.1 Laranja-Doce Pera

A laranja Pera é a cultivar mais plantada no Brasil (ALBRIGO; STELINSKI; TIMMER, 2019; STUCHI et al., 2020; FUNDECITRUS, 2021). Apesar de sua importância na citricultura brasileira e de ser considerada uma cultivar brasileira, a origem da laranja Pera não é bem conhecida (DONADIO, 1999). Ela é muito similar às laranjas Ovale da Itália, Verna da Espanha, Lamb Summer da Flórida, e a Pera de Vidigueira de Portugal (DONADIO, 1999). A laranja Pera possivelmente teve sua origem genética em Portugal ou Espanha, por seleção da Verna Peret. A Verna é uma cultivar de laranja arredondada, enquanto a Peret apresenta formato de pera, com coroa na região estilar e folhas lanceoladas, muito semelhante às características da Pera (SALIBE; TEÓFILO SOBRINHO; MULLER, 2002).

No Brasil, a laranja Pera foi inicialmente cultivada na Baixada Fluminense, no Rio de Janeiro, de onde foi levada, no início do século 20, para Limeira, São Paulo. A partir de Limeira, foi difundida por todo o estado de São Paulo e pelo Brasil, com os nomes de Pera Rio, Pera Coroa ou simplesmente Pera (SALIBE; TEÓFILO

SOBRINHO; MULLER, 2002). A cultivar tornou-se a mais plantada no país, com o clone IAC sendo o mais importante. A Pera IAC é um clone pré-imunizado com estirpe fraca e protetiva do vírus da tristeza dos citros (STUCHI et al., 2020). No estado do Paraná, a laranja Pera, foi liberada para o plantio a partir de 1985, e com seus clones IPR 158, IPR 159 e IPR 153, se tornou a cultivar mais plantada com aproximadamente 45% da área cultivada no estado (TAZIMA; LEITE JUNIOR, 2018).

A laranja Pera é moderadamente resistente ao cancro-cítrico, e apresenta intolerância ao vírus da tristeza (CTV) e à clorose variegada dos citros (CVC) (LEITE JUNIOR, 1992; PIO et al., 2005; AULER et al., 2014; CARVALHO et al., 2015a). Em 1961, foi criado o programa de pré-imunização com o objetivo de infectar clones de Pera saudáveis com isolados fracos do vírus da tristeza para promover proteção contra estirpes mais fortes do vírus (STUCHI et al., 2020). Com isso, em 1968 foi criado o clone denominado pré-imunizado, conhecido hoje como Pera IAC. Esse clone juntamente com outros clones selecionados por serem portadores naturais de estirpes atenuadas do vírus possibilitaram a exploração da cultivar em larga escala (PIO et al., 2005; TAZIMA et al., 2010; STUCHI et al., 2020).

A laranja Pera possui maturação na meia estação, entre os meses de julho a novembro, 9 a 12 meses após a antese (PIO et al., 2005). Ela apresenta três a quatro floradas por ano, o que gera a produção de frutas temporãs, praticamente durante o ano todo. Porém, isto aumenta os custos com tratamentos culturais e dificulta a colheita dos frutos (PIO et al., 2005; POMPEU JUNIOR; BLUMER, 2008; ALBRIGO; STELINSKI; TIMMER, 2019). As plantas de laranja Pera são eretas, vigorosas e com grande densidade de folhas, com altura variando entre 2,6 e 4,5 m entre seus clones (Figura 2.1 A) (TAZIMA et al., 2016; ALBRIGO; STELINSKI; TIMMER, 2019). A laranja Pera é considerada incompatível com os porta-enxertos de limões Rugoso da Flórida (*C. ×jambhiri* Lush), e Volkameriano (*C. ×volkameriana*), com o Citrumelo Swingle (*C. ×paradisi* × *Poncirus ×trifoliata*) e com o *Poncirus trifoliata* (*P. ×trifoliata*) (SALIBE; TEÓFILO SOBRINHO; MULLER, 2002).

Os frutos da Pera são de tamanho médio, com peso em torno de 145 g, formato oval, casca medianamente fina, com bom número de vesículas de óleo, cujo teor médio varia de 0,6 a 0,8% em peso. Contêm de 3 a 4 sementes por fruto, sendo comercialmente classificados como sem sementes (Figura 2.1 B) (PIO et al., 2005; POZZAN; TRIBONI, 2005; ALBRIGO; STELINSKI; TIMMER, 2019; STUCHI et al.,

2020). A laranja Pera produz suco de excelente qualidade com ótima coloração e rendimento elevado, com teores entre 45 e 61% (STUCHI et al., 2020). A cultivar também tem bom rendimento industrial, pois apresenta teor de sólidos solúveis acima de 11,5%, podendo alcançar, em algumas safras, valores superiores a 13,0% (POZZAN; TRIBONI, 2005).

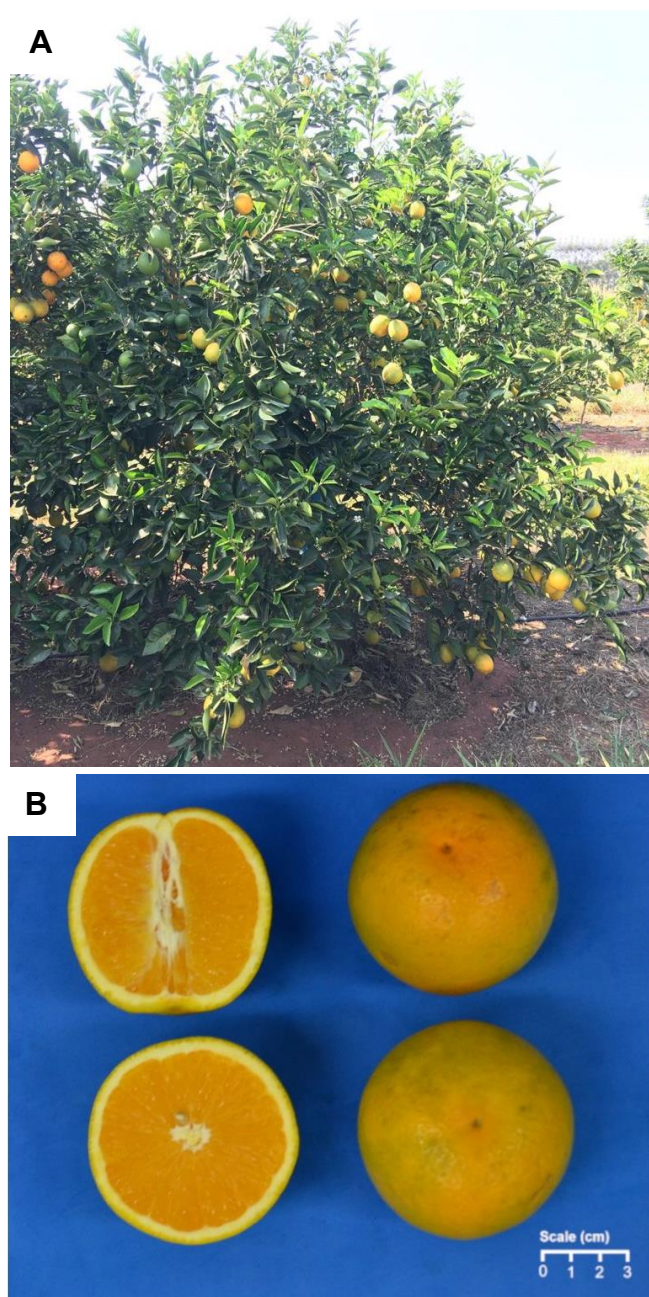


Figura 2.1 Planta adulta (A) e frutos (B) de laranja Pera IAC. Fonte: o próprio autor.

Estudos com mais de 30 seleções de laranja Pera provenientes de pomares da região de Bebedouro, do Centro de Citricultura Sylvio Moreira, em Cordeirópolis,

e do Instituto Agrônomo, em Campinas, têm sido realizados com o objetivo de selecionar material superior para utilização comercial (PIO et al., 2005). Atualmente, a Pera IAC é o clone de laranja-doce mais cultivado em pomares comerciais no Brasil, com a Pera Olímpia sendo utilizada em alguns pomares, ambas com alta produtividade (STUCHI et al., 2020).

Em estudos envolvendo diversos clones de laranja Pera, o clone Olímpia produziu plantas com altura reduzida e alta eficiência produtiva, enquanto os clones IAC e Bianchi produziram plantas com vigor médio e boa eficiência produtiva (CARVALHO et al., 2015b). Os clones Seleção 27 e Seleção 12 apresentam alto vigor vegetativo e alta produção (GIAMPANI et al., 2016). Tazima et al. (2016), analisando diversos clones de Pera na região Norte do estado do Paraná, dentre eles a Pera Bianchi, Morretes, Seleção 12 e Seleção 27, observaram frutos de tamanho médio, com peso variando de 124 a 161 g, altura de 6,6 a 7,4 cm e diâmetro do fruto de 6,3 a 6,9 cm. Pera clone 9 e Pera clone 42 são mutantes obtidos via irradiação gama visando redução no número de sementes (LATADO et al., 2001), e tiveram a menor incidência de cancro citrico, em experimento realizado com diferentes clones de Pera na região de Presidente Prudente, São Paulo, porém, com baixa produtividade em comparação com o controle (LATADO et al., 2006). A Pera Perão é um clone antigo de Pera, selecionada devido à sua maior tolerância ao vírus da tristeza, possui frutos grandes que lembram os frutos da laranja Shamouti (CASTLE; BALDWIN, 2011; UCR, 2021).

2.3.2 Laranja-Doce Hamlin

A laranja Hamlin se originou de um cruzamento não intencional na Flórida, Estados Unidos, no ano de 1879 (ALBRIGO; STELINSKI; TIMMER, 2019). É uma cultivar de maturação precoce, com colheita de setembro a dezembro, no hemisfério Norte e de abril a julho no hemisfério Sul, compreendendo de 6 a 9 meses após a floração (PIO et al., 2005; ALBRIGO; STELINSKI; TIMMER, 2019). A produção dessa cultivar está em torno de 60 a 80 t ha⁻¹ (LADANIYA, 2008). É a cultivar de maturação precoce mais plantada no Brasil e nos Estados Unidos, principalmente nos estados de São Paulo e da Flórida (CASTLE; BALDWIN, 2011; CAPUTO et al., 2012; FUNDECITRUS, 2021). O cultivo da laranja Hamlin não é liberado no estado do

Paraná devido à sua alta susceptibilidade ao cancro cítrico (TAZIMA; LEITE JUNIOR, 2018).

As plantas da laranja Hamlin crescem de forma ereta e simétrica, com copa arredondada e porte médio a alto (Figura 2.2 A) (PIO et al., 2005; BASTOS et al., 2014). Os frutos são esféricos e possuem qualidade relativamente baixa, geralmente são menores do que de outros cultivares de laranja-doce, sendo normalmente muito pequenos para o mercado de frutas frescas (BARRY; CARUSO; GMITTER JR, 2020). Os frutos da laranja-doce Hamlin possuem casca lisa e fina, de cor amarela pálida, com cerca de 3 sementes por fruto, sendo classificados como sem sementes (Figura 2.2 B). Eles apresentam baixo teor de suco, entre 36 e 40%, com teor de sólidos solúveis entre 8 e 9 °Brix e são destinados principalmente para o processamento industrial e produção de suco, mas também são comercializados como fruta fresca no início da estação (LADANIYA, 2008; ALBRIGO; STELINSKI; TIMMER, 2019; BARRY; CARUSO; GMITTER JR, 2020).

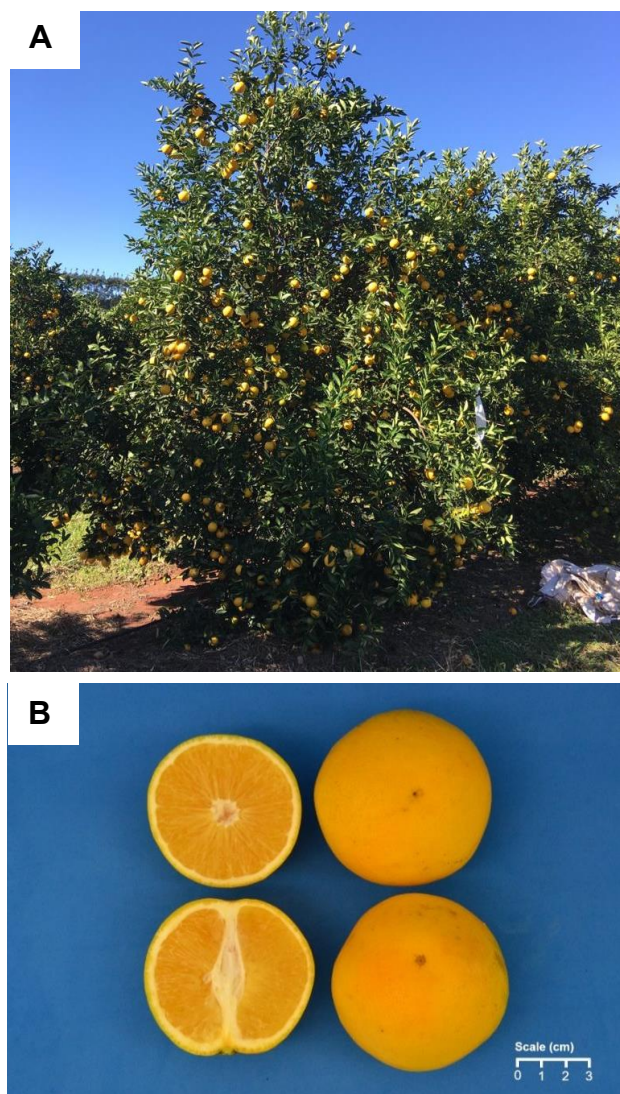


Figura 2.2 Planta adulta (A) e frutos (B) de laranja Hamlin. Fonte: o próprio autor.

2.4 QUALIDADE DOS FRUTOS

A época de colheita é determinante na qualidade dos frutos de citros. Portanto, é necessário que a colheita dos frutos seja realizada no estágio adequado de maturação, visto que a laranja, por se tratar de um fruto não-climatérico, não é capaz de completar o processo de amadurecimento após a colheita (BEBER; ÁLVARES; KUSDRA, 2018). A maturação envolve diversas transformações nos frutos de citros, que cessam apenas após a colheita. Com isso, são necessárias avaliações físico-químicas dos frutos ao longo desse processo para determinar a época adequada de colheita. Os principais parâmetros para determinação do momento ideal de colheita são a concentração de sólidos solúveis e a acidez do suco, as quais podem variar

grandemente conforme a região de produção e as cultivares (POZZAN; TRIBONI, 2005).

A indústria prioriza padrões de qualidade do suco, principalmente o teor de sólidos solúveis, acidez e *ratio*. Por outro lado, o mercado de frutas *in natura* prioriza aspectos de aparência dos frutos, como tamanho, coloração e espessura da casca, além de optar por cultivares com menor número ou ausência de sementes e adequado *ratio* (CASTLE; BALDWIN; MURARO, 2010; CAPUTO et al., 2012).

Os citros, principalmente laranjas e tangerinas, são frutas presentes na dieta dos brasileiros, devido à sua disponibilidade, preço acessível e importância nutricional. São fonte de fibras, vitaminas, e têm ação antioxidante devido à presença de ácido ascórbico, flavonoides e limonoides. Esses compostos podem ajudar a diminuir a incidência de doenças degenerativas, cardiovasculares, inflamações, disfunções cerebrais, além de retardar o envelhecimento precoce (PIMENTEL; FRANCKI; GOLLÜCKE, 2005; JAYAPRAKASHA; PATIL, 2007). A vitamina C e os polifenóis, principalmente flavonoides, compreendem a maioria dos antioxidantes presentes em citros (JAYAPRAKASHA; PATIL, 2007; KLIMCZAK et al., 2007). A quantidade de vitamina C nos frutos é mensurada através da quantidade de ácido ascórbico no suco. O ácido ascórbico é encontrado abundantemente em frutos de citros, sendo que as laranjas tendem a apresentar maiores teores que as tangerinas e conseqüentemente, também possuem maior atividade antioxidante (LADANIYA, 2008; COUTO; CANNIATTI-BRAZACA, 2010).

2.4.1 Cor e Tamanho dos Frutos e Rendimento de Suco

As condições climáticas também interferem na produção e qualidade das frutas cítricas, influenciando em características como coloração da casca e balanço açúcar/acidez (SANTOS et al., 2010). No mercado *in natura*, a cor da casca é considerada um dos fatores externos mais importantes da qualidade das frutas cítricas, pois a aparência do fruto é o primeiro aspecto a influenciar o consumidor no momento da compra (SINGH; REDDY, 2006; CARMONA; ZACARÍAS; RODRIGO, 2012). Essa característica é grandemente influenciada pela temperatura, sendo que baixas temperaturas e maior amplitude térmica durante o período de maturação estimulam o desenvolvimento da cor característica da variedade. No Brasil, grande

parte das regiões produtoras de citros possuem dias quentes com poucas diferenças entre as temperaturas diurnas e noturnas, não promovendo o desenvolvimento da cor típica das variedades. Assim, a epiderme se apresenta com tonalidade amarelo-esverdeada, o que diminui sua aceitação comercial fora do país, dificultando a exportação de frutos *in natura* (JOMORI et al., 2014).

O tamanho dos frutos é inversamente relacionado ao número de frutos na planta, em que plantas com grandes produções, tendem a produzir frutos de tamanho menor, devido à maior competição por fotoassimilados (GUARDIOLA; MONERRI; AGUSTÍ, 1982; CRUZ et al., 2021). Além disso, manejos culturais, como irrigação, nutrição e poda, também podem influenciar no tamanho do fruto (ALBRIGO; STELINSKI; TIMMER, 2019). O maior suprimento de água durante o desenvolvimento dos frutos leva a um aumento no tamanho e massa dos frutos (ALBRIGO; STELINSKI; TIMMER, 2019).

O rendimento de suco é um parâmetro de qualidade importante tanto para a indústria de processamento de suco quanto para o mercado de frutas frescas. O padrão mínimo exigido pelo mercado internacional de frutas frescas é um rendimento de suco de 35% para laranjas comuns (LADANIYA, 2008; OECD, 2010). Para comercialização no mercado interno, as laranjas devem apresentar como requisitos mínimos de qualidade rendimento de suco entre 35 e 45 %, conforme a cultivar. O rendimento mínimo de suco exigido para as laranjas Hamlin, Baía e Lima é de 35%, para a laranja Pera e seus clones é de 45%, enquanto para a laranja Valência e seus clones e a laranja Natal é de 44% (CEAGESP, 2011).

2.4.2 Açúcares e Ácidos

Açúcares e ácidos orgânicos estão entre os principais compostos da polpa de frutos de citros, sendo os principais compostos não voláteis que determinam a qualidade dos frutos de citros. Sua natureza e concentração afetam amplamente as características gustativas e qualidade organoléptica dos sucos, sendo necessário um equilíbrio entre eles para que os frutos atinjam a maturação ideal. Os frutos de citros acumulam açúcares e ácidos à medida que se desenvolvem, e os ácidos geralmente diminuem com o amadurecimento, enquanto os açúcares aumentam até o ponto em que a fruta se torne agradável ao paladar e adequada ao consumo. O *ratio* é a relação

entre esses dois compostos e determina o estágio de maturação, através do balanço entre o sabor doce e ácido dos frutos (LADANIYA, 2008; COUTO; CANNIATTI-BRAZACA, 2010; PLOTTO; BAI; BALDWIN, 2017).

Os principais açúcares da polpa dos frutos de citros são sacarose, frutose e glicose, sendo a sacarose encontrada em maior quantidade nas laranjas-doces comuns. Sólidos solúveis totais (SS) de laranjas-doces são constituídos principalmente pelos açúcares, que compreendem de 80 a 85% dos SS. O restante é composto por ácido cítrico e outros ácidos e seus sais, compostos nitrogenados e outras substâncias solúveis menores, como vitaminas solúveis em água. Portanto, o valor médio em °Brix indica todos os sólidos solúveis, não sendo apenas uma medida de açúcares. Os sólidos no suco podem ser medidos a partir do índice de refração, sendo os refratômetros calibrados para fornecer °Brix ou valores percentuais de sólidos solúveis totais diretamente (LADANIYA, 2008).

Em relação aos ácidos, o ácido cítrico é um importante e abundante ácido orgânico em frutos de laranjas maduras, correspondendo de 80 a 95% do total de ácidos, seguido pelo ácido málico e succínico (LADANIYA, 2008; BALDWIN et al., 2018). Os ácidos orgânicos têm propriedades ácidas porque têm um grupo carboxila (COOH) em um estado livre. Esses ácidos são importantes para conferir o sabor ácido às frutas e também constituem uma fonte de energia nas células vegetais. As vesículas de suco da fruta também são locais ativos de síntese de ácido. A acidez titulável (AT) do suco da maioria das frutas cítricas é mensurada principalmente em ácido cítrico. A acidez total pode ser determinada usando NaOH 0,1 N e a fenolftaleína é geralmente utilizada como um indicador visual do ponto final de titulação, quando a mistura fica com coloração rosa. O ponto final de titulação também pode ser determinado através do pH da mistura, quando ele atinge 8,2 (TING; ROUSEFF, 1986; LADANIYA, 2008).

Frutos com *ratio* acima de 20 não são apreciados pelos consumidores por apresentar sabor extremamente doce, devido à baixa acidez. Os valores de *ratio* precisam sempre ser apresentados em conjunto com os valores de SS, por exemplo, o *ratio* de 14 pode ser atingido tanto com SS de 14 e AT de 1,00, quanto com SS de 8 e AT de 0,57. Entretanto, os frutos do primeiro caso seriam mais saborosos do que o último, pois com apenas 8 °Brix de SS, as laranjas não têm açúcares suficientes para uma boa mistura com os ácidos (LADANIYA, 2008).

O padrão mínimo de maturidade exigido para a comercialização de laranjas-doces varia de acordo com os padrões locais. Porém, de forma geral, os SS devem estar entre 8 e 10 °Brix, a acidez entre 0,6 e 1,4 e o SS:AT ratio entre 7:1 e 9,5: 1 (CEAGESP, 2011; LADO; ZACARÍAS; RODRIGO, 2014; ALBRIGO; STELINSKI; TIMMER, 2019). Para o processamento industrial, as extratoras têm preferência por um SS AT⁻¹ ratio mais alto para a produção de suco de laranja, geralmente entre 12 e 18 (POZZAN; TRIBONI, 2005).

2.4.3 Flavonoides e Limonoides

Os flavonoides são metabólitos secundários sintetizados a partir da glicose via ácido chiquímico, com função defensiva para as plantas, agindo como antioxidantes (MASSENTI et al., 2016). Eles também apresentam importante ação na saúde humana, sendo considerados substâncias nutracêuticas, agindo como poderosos antioxidantes contra os radicais livres, e tendo propriedades anticancerígenas, antimicrobianas e antiinflamatórias (TRIPOLI et al., 2007). Compostos fenólicos e perfis de flavonoides são detectados por *high-performance liquid chromatography* (HPLC) (TRIPOLI et al., 2007).

Os flavonoides podem ser divididos em seis classes de acordo com suas estruturas moleculares: flavonas, flavanonas, flavonóis, isoflavonas e antocianinas (TRIPOLI et al., 2007). As laranjas contêm muitos metabólitos secundários, incluindo flavonas, flavanonas, flavonas polimetoxiladas e hidroxicinamatos (RAITHORE et al., 2020). Os principais flavonoides glicosídeos em citros são a hesperidina, a naringina e a neoesperidina. Em geral, a concentração de flavanonas diminui à medida que a fruta amadurece. Alguns flavonoides têm adstringência ou sabor amargo associados a eles quando presentes em níveis acima do limite (RAITHORE et al., 2020). A hesperidina é o principal flavonoide nas laranjas, não possui sabor amargo e é pouco solúvel em água (LADANIYA, 2008).

O teor de flavonoides das frutas cítricas aumenta ao máximo durante o estágio inicial de desenvolvimento e estabiliza com o aumento do tamanho do fruto. Durante a maturação, a concentração de flavonoides diminui. Apenas cerca de 30% da hesperidina total do fruto é encontrada no suco da laranja (LADANIYA, 2008). Diferentes tecidos dos frutos apresentam diferentes concentrações de flavonoides. A

concentração de flavanona, por exemplo, é maior no albedo e flavedo dos frutos do que na vesícula de suco (KIEFL et al., 2018). Assim, dependendo do método de extração, pode ocorrer variações na concentração de flavonoides no suco.

Limonoides são responsáveis pelo sabor amargo do suco das frutas de citros, bem como das sementes, onde estão presentes em maior concentração. Limonina é um limonoide amplamente encontrado em frutos de citros, e seu conteúdo também diminui com o amadurecimento dos frutos (LADANIYA, 2008). O sabor amargo conferido ao suco processado industrialmente de frutos de laranjas do tipo navel, se deve à liberação dos limonoides, limonina e nomilina durante o processo de extração do suco, e também estão presentes em maiores concentrações em sucos produzidos com frutos afetados pelo HLB (PLOTTO; BAI; BALDWIN, 2017). Alguns flavonoides e limonoides reportados para as laranjas Hamlin e Valência são: hesperidina, narirutina, eriocitrina, didymina, diosmina, sinensetina, nobiletina, heptametoxiflavona, tangeretina, glucosídeo de limonina, limonin e nomilina (BALDWIN et al., 2018; KIEFL et al., 2018).

2.4.4 Compostos Voláteis do Óleo da Casca

As frutas de citros emanam aromas distintos, pois liberam pequenas quantidades de voláteis na atmosfera. O aroma característico dessas frutas pode ser atribuído a óleos com alto ponto de ebulição e solúveis em água (LADANIYA, 2008). Os óleos essenciais de citros são obtidos principalmente da casca do fruto (flavedo), embora também estejam presentes nas flores, folhas e em bolsas de óleo embutidas nas vesículas do suco (LADANIYA, 2008; GONZALEZ-MAS et al., 2019). A casca de frutos de citros é composta por exocarpo ou flavedo e mesocarpo ou albedo (TADEO et al., 2020). O flavedo contém pigmentos e glândulas de óleo essencial. Essas glândulas de óleo ficam posicionadas no flavedo e se misturam com as células do albedo. O número de glândulas de óleo e as propriedades do óleo variam grandemente entre as espécies de citros (TADEO et al., 2020).

Os óleos essenciais da casca de laranjas-doces e do pomelo são extraídos como um subproduto no processamento de sucos, enquanto outras espécies, como algumas mexericas e laranjas azedas, são cultivados exclusivamente para a extração de seus óleos de casca e/ou folhas (PLOTTO; BAI; BALDWIN, 2017). A técnica mais

utilizada para a análise de compostos voláteis e semivoláteis em espécies de citros é a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) (GONZALEZ-MAS et al., 2019).

Os óleos essenciais de citros são aromatizantes naturais utilizados na indústria alimentícia em alimentos e bebidas, sendo também amplamente utilizados em cosméticos, perfumes, detergentes, produtos de higiene corporal e preparações farmacêuticas (SAWAMURA, 2010; DUGO; MONDELLO, 2011; GONZALEZ-MAS et al., 2019). O óleo de citros possui fortes atividades inseticidas (OYEDEJI et al., 2020), antimicrobianas e antioxidantes (FANCELLO et al., 2020; OIKEH et al., 2020). É conhecido não apenas por suas propriedades aromáticas, mas também por suas propriedades medicinais, como a quimioprevenção contra o câncer e os efeitos da aromaterapia (SAWAMURA, 2010).

Os óleos essenciais incluem hidrocarbonetos terpênicos como monoterpenos e sesquiterpenos, que são os compostos mais abundantes, seguidos por C6-C12 aldeídos alifáticos e aldeídos terpenos, álcoois, cetonas, ésteres e ácidos (GONZALEZ-MAS et al., 2019). O hidrocarboneto monoterpeno D-limoneno é o principal composto volátil presente na casca de frutos de citros (PLOTTO; BAI; BALDWIN, 2017). O D-limoneno geralmente compõe de 60 a 95% do óleo essencial, dependendo da espécie. Em laranjas-doces e pomelo, D-limoneno compreende cerca de 90 a 97% do óleo, nas tangerinas de 60 a 96%, no limão tipo Siciliano [*C. ×limon* (L.) Burm] de 60 a 80% e na lima-ácida Tahiti [*C. ×latifolia* (L.) Tanaka] de 49 a 60% (PLOTTO; BAI; BALDWIN, 2017; GONZALEZ-MAS et al., 2019).

O D-limoneno é um composto amplamente utilizado pela indústria farmacêutica. Esse monoterpeno tem funções quimiopreventivas, como a indução da atividade da glutatona-S-transferase e da atividade da uridina difosfato glucuronosil-transferase no intestino delgado e no fígado (HAYES; PULFORD, 1995; CHAUDHARY; JAYAPRAKASHA, PATIL, 2017). O D-Limoneno também tem atividade quimioterápica contra tumores pancreáticos, mamários e prostáticos (CROWELL; AYOUBI; BURKE, 1996), ajudando a prevenir o início e também a suprimir a progressão do câncer de mama e no fígado (GOULD, 1997).

Outros compostos voláteis abundantes nos óleos essenciais de citros incluem α -pineno, β -mirceno, γ -terpineno, citral (mistura de isômeros de geranial e neral), linalol, valenceno, α -sinensal e β -sinensal. O β -mirceno possui aroma de musgo,

sendo mais aromático que o D-limoneno. Esse composto quando presente em quantidades elevadas no suco de laranjas-doces, afeta negativamente o seu aroma após o processamento do fruto (AHMED; DENNISON; SHAW, 1978). Porém, o β -mirceno pode ser utilizado em diferentes aplicações, principalmente nas indústrias de perfumes e fragrâncias (BEHR; JOHNNEN, 2009). Por outro lado, α -pineno apresenta um aroma de resina de pinheiro e contribui positivamente para o aroma de citros (AHMED; DENNISON; SHAW, 1978; PEREZ-CACHO; ROUSEFF, 2008). Os níveis desses terpenos no suco de laranja dependem do teor de óleo da casca do fruto (SAWAMURA, 2010).

O total de compostos voláteis, principalmente terpenos, em sucos extraídos mecanicamente são três a 10 vezes maiores do que os sucos espremidos à mão, devido aos níveis elevados de óleo da casca que se misturam ao suco quando a casca é cortada ou rompida durante a extração (PEREZ-CACHO; ROUSEFF, 2008). O sabor da laranja é determinado por mais de 200 voláteis, porém, apenas cerca de 36 a 49 têm atividade de aroma e contribuem para o odor cítrico (PLOTTO; BAI; BALDWIN, 2017). Normalmente, as laranjas processadas industrialmente contêm mais óleo de casca no suco, e, portanto, mais voláteis associados com sabor de óleo de casca, como terpenos (α -pineno, β -mirceno, D-limoneno e valenceno) e aldeídos de cadeia linear (octanal, nonanal e decanal). Em contraste, suco espremido à mão ou voláteis de frutas frescas são mais ricos em ésteres, aldeídos de cadeia curta (C2 a C7) e etanol (PEREZ-CACHO; ROUSEFF, 2008; PLOTTO; BAI; BALDWIN, 2017).

O teor de aldeídos no óleo da casca dos citros é um fator importante para avaliar a qualidade do óleo, em que uma maior concentração de aldeídos geralmente significa óleos de melhor qualidade (Xu et al., 2017b). Os aldeídos são conhecidos por suas fragrâncias potentes; contribuem para os aromas cítricos, florais e verdes (similar a grama recém cortada) e muitas vezes são os principais contribuintes para o sabor geral de um óleo essencial (HOGNADÓTTIR; ROUSEFF, 2003; SPADARO et al., 2012). Terpeno aldeídos com forte atividade aromática são: citronelal, neral, geranial e β -sinensal (HOGNADÓTTIR; ROUSEFF, 2003). Os aldeídos também são conhecidos por contribuir muito para o aroma do suco devido a seu aroma cítrico. Exemplos de aldeídos com aroma cítrico, são os de cadeia longa, octanal, nonanal e decanal (PLOTTO; BAI; BALDWIN, 2017). Os terpenos aldeídos como neral, geranial, sinensal e citronelal e o álcool linalol também contribuem com o aroma e sabor cítrico

floral dos sucos de laranjas-doces (PLOTTO; BAI; BALDWIN, 2017). Os voláteis de frutos de citros estão associados ao seu sabor e aroma característicos. Compostos voláteis podem aumentar a percepção de doçura ou amargor quando presentes acima do limite no suco (PLOTTO et al., 2008).

A qualidade e composição dos óleos essenciais de citros também são afetadas por condições climáticas, manejo da cultura, doenças, ponto de maturação dos frutos no momento da colheita e pelas condições de armazenamento dos frutos (VEKIARI et al., 2002; ZOUAGHI et al., 2019). As quantidades de voláteis aumentam com o amadurecimento dos frutos e com o aumento da temperatura de armazenamento (LADANIYA, 2008; PLOTTO; BAI; BALDWIN, 2017). A incidência de doenças, como o HLB, também altera os compostos voláteis do óleo da casca de citros (XU et al., 2017a; b; KIEFL et al., 2018; SUN et al., 2021), demandando entretanto, maiores estudos para avaliar o impacto do HLB sobre eles. Nas laranjas-doces, o HLB altera significativamente os compostos voláteis do óleo de casca (XU et al., 2017a; b; KIEFL et al., 2018; SUN et al., 2021). A doença diminui a quantidade de alguns aldeídos chave, como octanal e decanal, conseqüentemente reduzindo a qualidade do óleo (KIEFL et al., 2018; SUN et al., 2021). Muitos terpenos são acumulados em um nível mais alto no óleo da casca de frutos afetados pelo HLB (SUN et al., 2021). Os compostos oxidativos típicos dos terpenos, como carvona e óxido de limoneno, estão presentes em maiores quantidades nas amostras afetadas pelo HLB. É possível que esses compostos aumentem devido ao estresse oxidativo, que ocorre nas plantas com sintomas severos de HLB (XU et al., 2017a; SUN et al., 2021).

2.5 CANCRO CÍTRICO

O cancro cítrico é uma doença causada pela bactéria gram negativa *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e afeta toda a parte aérea da planta de citros (DONADIO et al., 2005). A doença é originária da Ásia, onde ocorre endemicamente em todos os países produtores. Ela foi constatada pela primeira vez entre 1827 e 1831 na Índia, porém, só foi descrita em 1915, quando chegou aos Estados Unidos (LARANJEIRA et al., 2005). No Brasil, a doença foi relatada pela primeira vez em 1957 na região sudoeste do estado de São Paulo (DONADIO et al., 2005). No mesmo ano, foi encontrada também no estado do Paraná, no município de Lupionópolis (LEITE JUNIOR, 1990).

A doença afeta a produtividade devido à queda prematura e aparência dos frutos, tornando-os impróprios para a comercialização no mercado de fruta fresca (BEHLAU, 2021). Os sintomas consistem em lesões circulares pequenas, entre 0,1-1,0 mm, podendo atingir até 10 mm de diâmetro em cultivares suscetíveis. As lesões formam pústulas elevadas de cor parda, com halo amarelo ao redor. As lesões estão presentes nas superfícies dos frutos, galhos e folhas (Figura 2.3). O centro das lesões velhas é corticoso, duro e lignificado, podendo haver a formação de rugas concêntricas. A superfície do fruto fica com textura áspera, mas a parte interna não é afetada. As folhas são suscetíveis à doença entre 14 e 42 dias da brotação, enquanto os frutos são suscetíveis até 60 a 90 dias após a queda das pétalas. Os frutos sintomáticos muitas vezes caem da planta antes de atingir a maturação. Nos ramos, as lesões só aparecem em cultivares muito suscetíveis, sendo corticosas, salientes e de coloração creme. Pode ocorrer a morte do ramo quando há coalescência de lesões (LEITE JUNIOR, 1990; LARANJEIRA et al., 2005; LADANIYA, 2008).

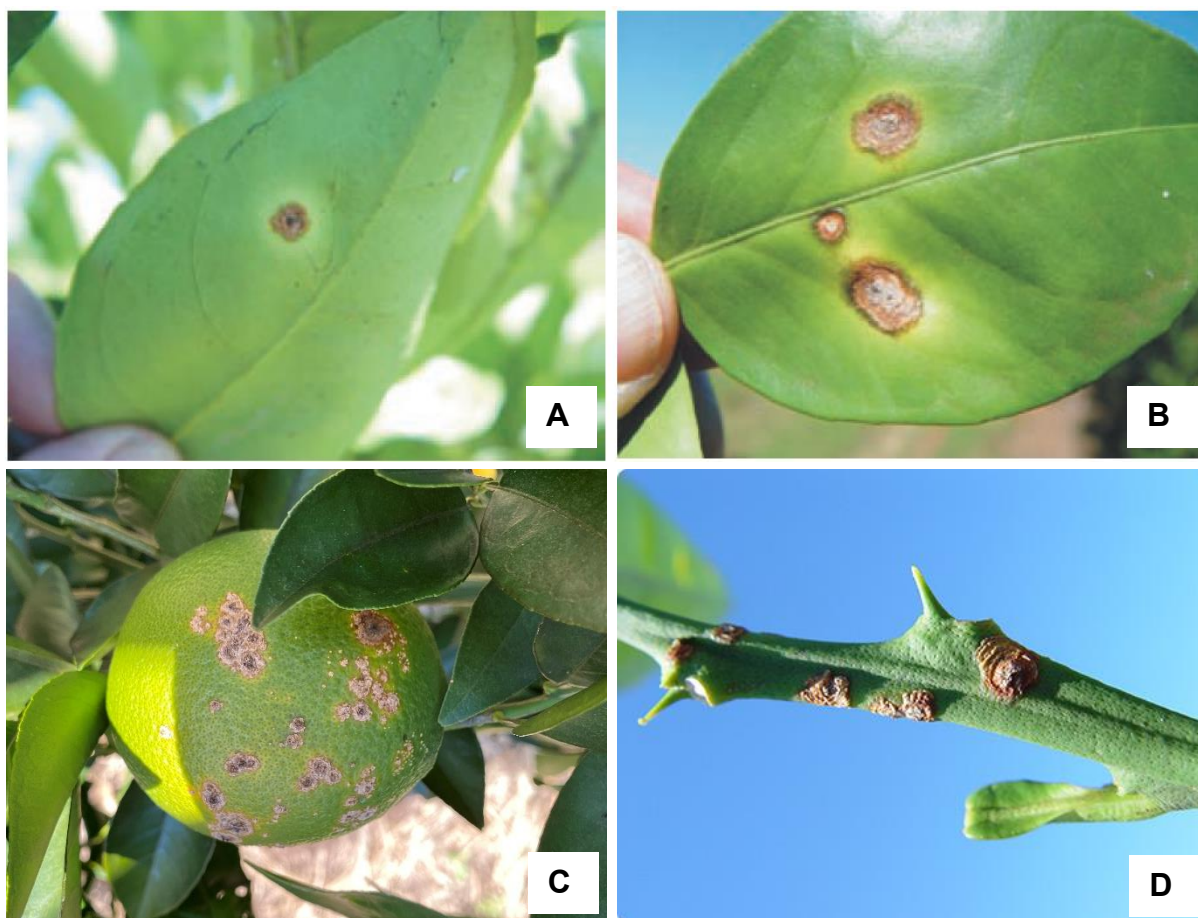


Figura 2.3 Sintomas do cancro cítrico na face inferior (A) e superior do limbo da folha (B), em fruto (C) e em ramo (D). Fonte: A, B e D: Laranjeira et al. (2005); C: próprio autor.

durante chuvas com respingos de água. As células da *X. citri* subsp. *citri* são envoltas por uma camada mucilaginosa, e ficam facilmente suspensas em água, dispersando-se em gotículas de água que são transportadas pelo vento (LADANIYA, 2008). Dessa maneira, o cancro é mais severo nas condições do Sudeste brasileiro no início do verão, quando altas temperaturas, chuvas intensas e ventos ocorrem ao mesmo tempo (LARANJEIRA et al., 2005). A bactéria se desenvolve bem em clima úmido, com temperatura favorável em torno de 28 a 30 °C, sendo comum nas regiões tropicais. A bactéria não é capaz de sobreviver por longos períodos em restos de cultura incorporados ao solo ou em plantas daninhas, porém, pode sobreviver por anos em tecidos infectados mantidos secos, livres de solo e protegidos da luz solar (LEITE JUNIOR, 1990).

O cancro cítrico está intimamente associado ao inseto praga lagarta-minadora-dos-citros (*Phyllocnistis citrella* Stainton) presente na Flórida desde 1993 e no Brasil desde 1996 (LARANJEIRA et al., 2005; GOTTWALD et al., 2007). Embora não seja um inseto vetor, as lagartas da minadora-dos-citros fazem galerias nas folhas jovens durante a alimentação, tornando-as altamente suscetíveis à infecção pela bactéria causadora do cancro cítrico (HALL; GOTTWALD; BOCK, 2010). Esses ferimentos permitem a penetração da bactéria durante um período de 10 a 14 dias após a sua produção, enquanto os ferimentos produzidos por outras causas, como espinhos e abrasões por partículas de solo carregadas pelo vento, cicatrizam-se em um ou dois dias (LARANJEIRA et al., 2005).

Logo após a detecção da doença em São Paulo, em 1957, foi estabelecido um programa de erradicação baseado na remoção de árvores doentes e assintomáticas em um raio de 12 m (SANTOS, 1991). Essas medidas não foram suficientes para erradicar a doença, que continuou se alastrando pelo Estado, e no mesmo ano foi realizada a erradicação total de plantas de todos os pomares e viveiros de citros, bem como a proibição de novos plantios na região contaminada do Estado, que consistia em 29 municípios (SANTOS, 1991; BEHLAU, 2021). Em 1961, o cancro cítrico foi declarado erradicado em 21 municípios. Porém, novos focos da doença foram encontrados no ano seguinte e foi estabelecida a erradicação de todas as plantas de citros das propriedades afetadas e das localizadas em um raio de 1000 m (SANTOS, 1991).

O cancro cítrico continuou avançando em São Paulo, e em 1975, iniciou-se

uma campanha nacional de erradicação, lançada pelo Ministério da Agricultura e conhecida como CANECC (BEHLAU, 2021). Em 1977, o Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus) foi criado visando o controle da doença. O órgão ficou encarregado de arrecadar recursos financeiros de produtores, indústrias, comerciantes e outros setores ligados à citricultura e aplicar na campanha da erradicação do cancro cítrico (DONADIO et al., 2005).

Em 1987, o raio de erradicação foi reduzido para 50 m, e em 1995 para 30 m. O protocolo de 1995 determinava a remoção das árvores afetadas associada à remoção, poda drástica ou desfolha das demais árvores de citros em um raio de 30 m da árvore foco. Em 1997, um novo protocolo acrescentou as podas drásticas das árvores afetadas associadas a pulverizações de cobre nas árvores vizinhas em um raio de 30 m (BEHLAU, 2021). Em 1999, a eliminação de todas as plantas dos talhões infestados passou a ser obrigatória quando a incidência de plantas doentes era superior a 0,5%. Para incidências iguais ou menores que 0,5%, as plantas doentes e as demais contidas num raio de 30 m eram eliminadas (BELASQUE JUNIOR; FERNANDES; MASSARI, 2009).

A partir de 2009, a legislação de controle do cancro cítrico foi alterada pelo governo paulista, e passou a ser obrigatória apenas a erradicação das plantas sintomáticas e as demais contidas num raio de 30 metros (SÃO PAULO, 2009). A resolução mudou novamente em 2013, quando deixou de ser obrigatória a erradicação das plantas contidas no raio de 30 m e se passou a adotar apenas a eliminação das plantas sintomáticas. As demais plantas no raio de 30 m, deveriam ser pulverizadas com produtos cúpricos, repetindo a pulverização a cada fluxo de crescimento das plantas (SÃO PAULO, 2009).

A partir de 2016, a nova legislação estabeleceu que, a nível nacional, as estratégias de controle do cancro cítrico deveriam ser adotadas dependendo da situação fitossanitária da doença na área (BEHLAU, 2021; FUNDECITROS, 2022a). Com base na Instrução Normativa 21 (IN21) de 2018 (BRASIL, 2018), foram estabelecidas as seguintes áreas fitossaniárias: Área sem ocorrência: estados do país onde a doença não ocorre e devem ser adotadas medidas preventivas, como o monitoramento do trânsito de material vegetal e plantio de mudas saudáveis; Área livre da praga (ALP): área em que o cancro cítrico não ocorre, podendo estar inserida em um território de maior amplitude com ocorrência da doença e nessas áreas também

são adotadas medidas preventivas; Área sob erradicação: áreas onde o cancro cítrico ocorre em baixa incidência e o controle é feito principalmente pelo plantio de mudas sadias e eliminação de plantas de citros contaminadas ou suspeitas de contaminação; Área sob sistema de mitigação de risco (SMR): área onde o cancro cítrico apresenta incidência intermediária ou alta nos pomares e a erradicação de plantas doentes não é mais uma alternativa viável, sendo que a mitigação de risco permite ao citricultor manter as plantas com sintomas de cancro cítrico nos pomares, com adoção de medidas de manejo da doença e descontaminação de frutos. O objetivo geral do estabelecimento de diferentes áreas em relação ao cancro cítrico é restringir o avanço da doença e minimizar as perdas provocadas no campo e em unidades de beneficiamento, diminuindo os riscos de comercialização de frutos com sintomas da doença (BEHLAU, 2021; FUNDECITROS, 2022a).

As medidas de controle da doença incluem uso de quebra-ventos, sobretudo em áreas sujeitas a fortes ventos e chuvas associadas; uso de mudas sadias; restrição da circulação de pessoas, veículos, máquinas e implementos em pomares, principalmente quando provenientes de outras propriedades citrícolas; controle da lagarta-minadora-dos-citros e pulverizações preventivas com produtos à base de cobre (LEITE JUNIOR, 1990; LARANJEIRA et al., 2005; BEHLAU et al., 2021). O controle químico do cancro cítrico é feito principalmente com produtos à base de cobre. As pulverizações devem ser feitas durante a estação de crescimento das plantas para a proteção dos fluxos de crescimento, que são mais sujeitos à infecção pela bactéria. Essas pulverizações também são efetivas para a redução do inóculo produzido em ramos e folhas (LARANJEIRA et al., 2005; FUNDECITROS, 2022a). No Paraná, além do mencionado acima, é permitido o plantio apenas de cultivares mais resistentes à doença, como mencionado no item 2.2 dessa revisão (LEITE JUNIOR, 1990).

O estado de São Paulo e a maior parte do estado do Paraná, incluindo as regiões Norte e Noroeste, estão sobre o sistema de mitigação de risco do cancro cítrico. Os estados de Minas Gerais e Bahia, também grandes produtores de laranjas-doces, estão em área sem ocorrência da doença (BEHLAU, 2021) (Figura 2.4).

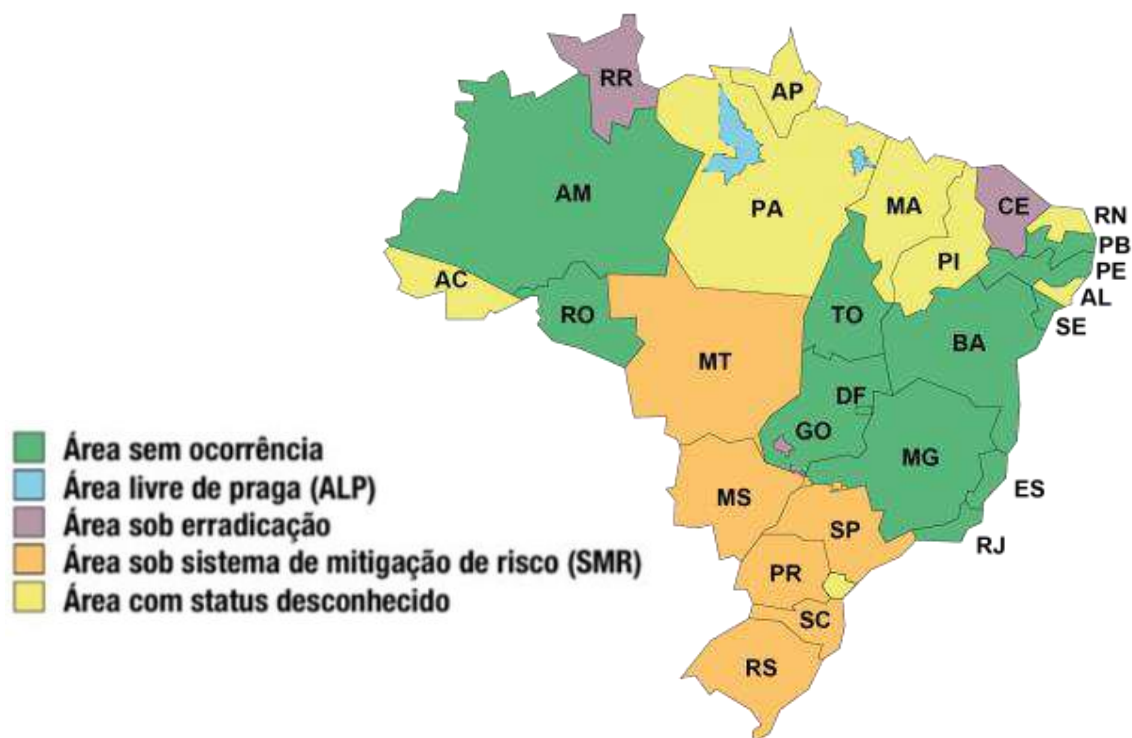


Figura 2.4 Situação quanto à presença e controle do cancro cítrico adotado nos diferentes estados brasileiros de acordo com a Instrução Normativa 21 (IN21) Fonte: Behlau (2021).

2.6 HUANGLONGBING

Huanglongbing (HLB) significa "doença do dragão amarelo" em chinês e também é conhecida como *greening*. O HLB é a doença mais preocupante da citricultura devido à severidade, rápida disseminação e difícil controle. A doença está presente nas principais regiões produtoras de citros do mundo, exceto bacia do Mediterrâneo e Austrália, causando grandes prejuízos econômicos à citricultura (DALA-PAULA et al., 2019).

O HLB é associado a bactérias gram-negativas '*Candidatus Liberibacter spp.*', com três espécies patogênicas para plantas de citros: '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' (CLas), '*Candidatus Liberibacter americanus*' (CLam) e '*Candidatus Liberibacter africanus*' (CLaf). A espécie asiática e a americana são transmitidas pelo psíldeo-asiático-dos-citros, *Diaphorina citri* Kuwayama, enquanto a espécie africana é transmitida pelo psíldeo-africano *Trioza erytreae* (BOVÉ, 2006; MCCOLLUM; BALDWIN, 2017).

Há relatos que apontam que o HLB é originário da Índia, tendo sido reportado

durante o século XVIII como responsável pela morte de diversas plantas cítricas (DA GRAÇA, 2008; DALA-PAULA et al., 2019). Posteriormente, foi relatado na China, em 1919, onde foi descrito como a doença do ramo amarelo dos citros (BOVÉ, 2006). A variação africana da doença foi descrita na África do Sul pela primeira vez em 1937, sendo referida como *citrus greening* (ALBRIGO; STELINSKI; TIMMER, 2019). Atualmente, a doença está presente em mais de 50 países da África, Ásia, Oceania e das Américas (DALA-PAULA et al., 2019).

No Brasil, o primeiro relato do HLB foi em 2004, na região de Araraquara, São Paulo (COLETTA-FILHO et al., 2004). No ano seguinte, a doença foi detectada em Minas Gerais (CASTRO et al. 2010), e em 2007, no estado do Paraná (NUNES et al., 2010). Em 2019, foi constatada no Mato Grosso do Sul (Figura 2.5) (BELASQUE JUNIOR et al., 2009; BASSANEZI et al., 2020). Logo após a detecção da doença no Brasil, o HLB também foi encontrado na Flórida, Estados Unidos, em 2005 (HALBERT, 2005).

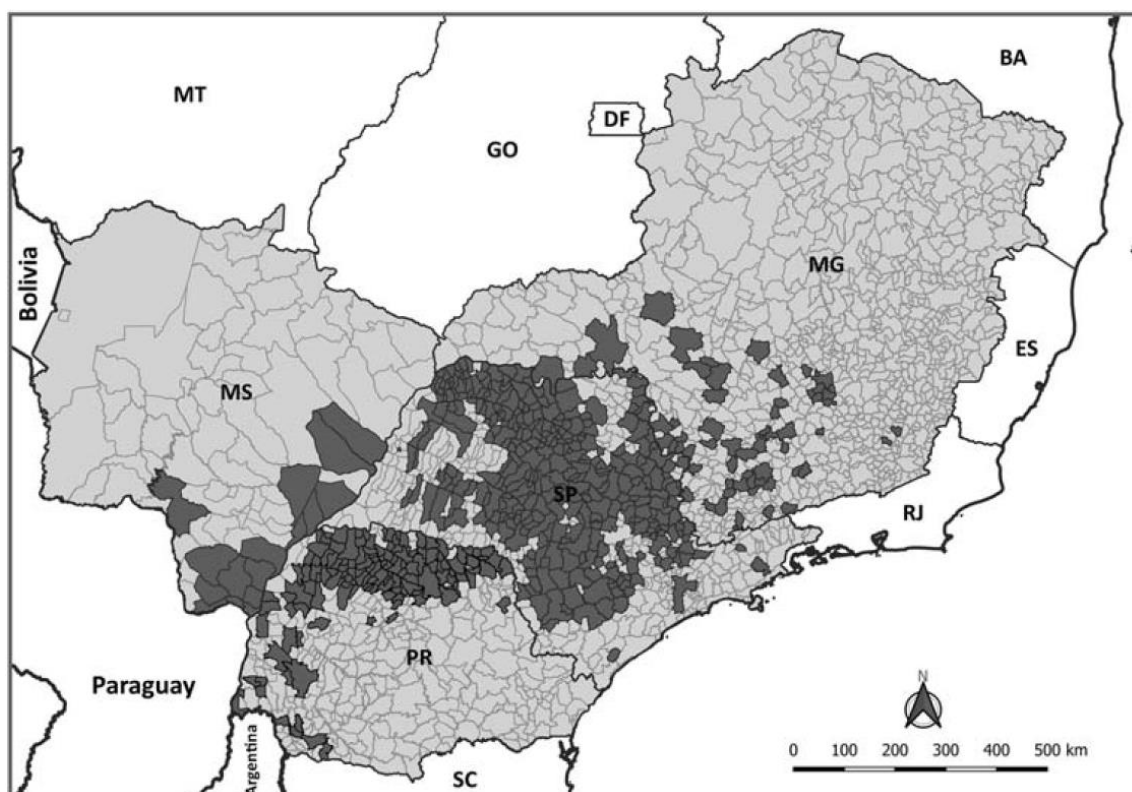


Figura 2.5 Municípios brasileiros dos estados de São Paulo (SP), Minas Gerais (MG), Paraná (PR) e Mato Grosso do Sul (MS) (em cinza escuro) onde o HLB foi oficialmente detectado, de março de 2004 a setembro de 2019. Fonte: Bassanezi et al. (2020).

(CLam) foi a prevalente, com mais de 90% das árvores infectadas em 2005, sendo a incidência reduzida para 60% em 2007. Durante este período, houve aumento na ocorrência de CLas causando o HLB, passando de 5 para 35% o percentual de árvores infectadas por esta estirpe (COLETTA-FILHO et al., 2007; TEIXEIRA et al., 2005). Já no ano de 2009, CLas tornou-se a espécie predominante em todos os pomares de São Paulo e de outros locais onde o HLB foi detectado nas Américas. Atualmente, o CLas está presente em mais de 99,9% dos pomares brasileiros afetados pelo HLB (BASSANEZI et al., 2020). Essa rápida ascensão de CLas sobre a população de CLam provavelmente se deu devido ao CLas tolerar temperaturas mais altas e alcançar populações mais elevadas de bactéria nos tecidos da planta, facilitando a aquisição e transmissão pelo inseto vetor (LOPES et al., 2009; BASSANEZI et al., 2020).

Entre janeiro de 2005 e junho de 2010, mais de 55,5 milhões de plantas de laranja-doce com sintomas de HLB foram eliminadas dos pomares no estado de São Paulo e sudoeste mineiro (BASSANEZI et al., 2020). A incidência da doença tem aumentado nessa região nos últimos anos, sendo que o percentual de plantas de laranja com sintomas de HLB no cinturão citrícola passou de 22,37% em 2021 para 24,42% em 2022, correspondendo a aproximadamente 48,67 milhões de árvores doentes (FUNDECITRUS, 2022b).

A identificação de plantas com HLB é feita inicialmente pela observação dos sintomas da doença em folhas e frutos, seguido pela confirmação por teste de reação em cadeia da polimerase (PCR) visando o gene 16S rDNA (LI; HARTUNG; LEVY, 2006). De acordo com estudos realizados por Li, Hartung e Levy (2006), o limite de ciclo (Ct, *cycle threshold*) para considerar árvores infectadas por HLB é um valor Ct de 32. O PCR também é útil para determinar a espécie de '*Candidatus Liberibacter* spp.' associada à doença (LI; HARTUNG; LEVY, 2006; ALBRIGO; STELINSKI; TIMMER, 2019).

O diagnóstico com base nos sintomas é dificultado principalmente no estágio inicial da doença, pois nessa fase, estão presentes apenas em alguns ramos da planta. O HLB geralmente aparece primeiro como um ou vários ramos amarelos, completamente cloróticos. Com o tempo, há aumento da abrangência dos sintomas, podendo causar uma clorose severa em toda a copa da planta. Uma característica que diferencia a clorose causada pelo HLB de deficiências nutricionais é uma

irregularidade na clorose foliar, referida como mosqueado, em que as folhas apresentam vários tons de amarelo, verde-claro e verde-escuro mesclados (Figura 2.6 A) (MCCOLLUM; BALDWIN, 2017). Plantas sintomáticas também apresentam um desequilíbrio no transporte e concentração de açúcares, com acúmulo excessivo de carboidratos nas partes aéreas da planta. Estes carboidratos acumulados na parte aérea não se degradam e afetam outras partes da planta, como o sistema radicular, que se apresenta pouco desenvolvido e com poucas raízes fibrosas em plantas com HLB (DALA-PAULA et al., 2019).

2.6.1 Efeito do HLB na Qualidade dos Frutos

O HLB afeta seriamente a produção de citros, principalmente devido à queda prematura dos frutos, resultando em uma redução do rendimento na colheita (BALDWIN et al., 2018). Além disso, a doença pode levar à morte precoce da planta, entre dois e dez anos após a infecção, reduzindo sua vida útil (BALDWIN et al., 2010). A doença também compromete grandemente a qualidade dos frutos, principalmente em plantas mais afetadas nas quais os frutos são sintomáticos.

As laranjas apresentam grande susceptibilidade ao HLB, e os frutos de plantas afetadas pela doença apresentam perda na qualidade. Geralmente, esses frutos são menores, assimétricos, mais verdes, podendo apresentar sementes abortadas, teor de açúcares reduzido e acidez elevada. Ocorre ainda maiores teores de limonoides e flavonoides, que deixam os frutos com sabor mais amargo e adstringente, especialmente no início da temporada de colheita (BALDWIN et al., 2010; 2018). Estudos sensoriais em suco proveniente de frutos sintomáticos de HLB confirmam o perfil químico, com os avaliadores percebendo que o suco apresenta sabor menos doce, sendo mais amargo e mais adstringente do que o suco de frutas provenientes de plantas sadias (PLOTTO et al., 2010).

Em frutos sintomáticos, a perda de clorofila começa de forma invertida, a partir do pedúnculo, e não da parte inferior como ocorre em laranjas de plantas sadias. Além disso, esses frutos muitas vezes não desenvolvem a mesma coloração observada em frutos de plantas sadias, ficando parcialmente verdes (MCCOLLUM; BALDWIN, 2017). Os frutos afetados pelo HLB são menores em diâmetro quando comparados com os assintomáticos e de plantas sadias, os quais apresentam

diâmetro semelhante. A massa e o teor de suco desses frutos também são menores (Figura 2.6 B) (DALA-PAULA et al., 2019).

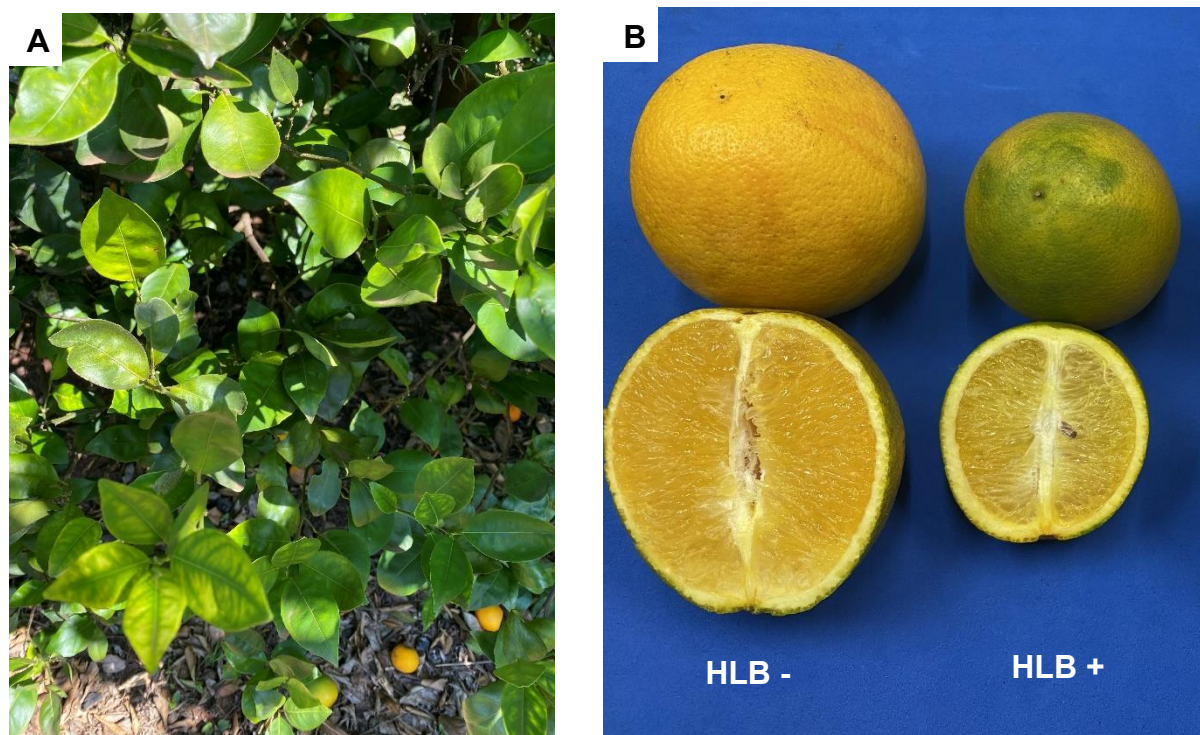


Figura 2.6 Sintomas de HLB nas folhas (A) e frutos (HLB +) (B) de laranja-doce Pera Morretes. Fonte: o próprio autor.

Flavonoides no suco de laranja geralmente contribuem para a adstringência e sabor amargo, o que é ainda mais perceptível em sucos de frutos sintomáticos para o HLB, os quais apresentam maiores concentrações de flavonoides e limonoides (LI et al., 2021). Apesar da perda significativa de qualidade, frutos com sintomas típicos de HLB acumulam altas quantidades de flavonoides na casca, polpa e suco, principalmente de narirutina, hesperidina e didimina (MASSENTI et al., 2016; DALA-PAULA et al., 2018; KIEFL et al., 2018; LI et al., 2021). Por outro lado, isto pode possibilitar a extração de antioxidantes naturais desses tecidos vegetais, visto que eles apresentam grandes benefícios para a saúde, como redução do risco de doença cardiovascular (RAITHORE et al., 2020).

A maioria dos estudos avaliando a influência do HLB na qualidade dos frutos de laranjas-doces foram feitos com frutos das cultivares Hamlin e Valência, que são as mais produzidas nas principais regiões produtoras de laranja-doce no mundo (BALDWIN et al., 2010; 2018; PLOTTO et al., 2010; LIAO; BURNS, 2012; MASSENTI et al., 2016). Outras variedades estudadas são as laranjas-doces Pera e Westin

(BASSANEZI; MONTESINO; STUCHI, 2009). Estudos revelaram que o sabor do fruto de algumas cultivares de laranja é mais afetado pelo HLB do que o de outras. O suco da laranja Hamlin proveniente de frutos de plantas com HLB apresentou sabor mais amargo e azedo comparado ao de frutos de laranja Valência, porém, a qualidade do suco de frutos de todas as cultivares testadas até agora é afetada pela doença (PLOTTO et al., 2010).

Frutos sintomáticos de HLB da laranja-doce Valência Americana tiveram massa e diâmetro menos afetados que as de Hamlin e Pera (BASSANEZI; MONTESINO; STUCHI, 2009). Nesse mesmo estudo, as cultivares Westin, Hamlin, Pera e Valência apresentaram redução no teor de suco, sendo os frutos da cultivar Valência aqueles com a maior redução, seguidos dos frutos de Westin, Hamlin e Pera. A concentração de SS em frutos sintomáticos foi significativamente menor para todas as cultivares em comparação com frutos assintomáticos, exceto para aqueles da cultivar Valência Americana (BASSANEZI; MONTESINO; STUCHI, 2009).

2.6.2 Controle do HLB

Não há ainda relato de nenhum controle curativo para o HLB. O controle atual é preventivo, utilizando mudas sadias e de qualidade, evitando que as árvores sejam infectadas, além da injeção regular e eliminação de inóculo pela remoção de árvores infectadas e tratamentos químicos, principalmente com inseticidas contra o inseto vetor (BOVÉ, 2006; MCCOLLUM; BALDWIN, 2017). O manejo preventivo da doença inclui o uso de quebra-ventos e adensamento de plantio especialmente na faixa da borda (FUNDECITRUS, 2022a). Cerca de 80% dos psilídeos e das plantas contaminadas encontram-se na faixa da borda, que compreende os primeiros 100 a 200 m da divisa da propriedade (BASSANEZI et al., 2010; FUNDECITRUS, 2022a). O plantio adensado na faixa da borda facilita pulverizações e cria uma barreira para a entrada do inseto vetor, protegendo o interior do pomar (FUNDECITRUS, 2022a).

A maior incidência de plantas com sintomas de HLB é observada entre o final do verão e o início da primavera, com máxima detecção ocorrendo entre o outono e o inverno (BASSANEZI et al., 2010). Essa expressão mais intensa dos sintomas está relacionada às menores temperaturas prevalentes nestas épocas, que favorecem as taxas de multiplicação da bactéria nos tecidos das plantas (LOPES et al., 2009). Com

isso, o monitoramento e o controle do psilídeo vetor são necessários durante o ano todo, mas a inspeção e eliminação das plantas sintomáticas são mais efetivas na época mais favorável para a expressão dos sintomas (BASSANEZI et al., 2010).

Desde 2008, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), através da publicação da Instrução Normativa 53 (IN53) estabeleceu critérios relacionados ao controle do HLB, impondo a obrigatoriedade da erradicação de plantas sintomáticas (BRASIL, 2008). Porém, em maio de 2021, a IN53 foi revogada, e a portaria 317 foi publicada (BRASIL, 2021). Essa nova portaria estabelece o Programa Nacional de Prevenção e Controle do HLB, abordando o problema de acordo com a situação da doença em cada Estado, e estabelece as diretrizes gerais das ações locais de controle. Nos estados com ocorrência de *greening*, a eliminação de plantas com sintomas permanece obrigatória para os pomares de citros até o oitavo ano. Após isso, passa a ser facultativa, desde que realizado o controle eficiente do psilídeo no pomar.

Algumas variedades de porta-enxertos e copas mais tolerantes foram identificadas, com o potencial para reduzir a taxa de progressão da doença, retardando o aparecimento de sintomas de HLB em árvores infectadas com CLas (MCCOLLUM; BALDWIN, 2017). Entre estes, estão os porta-enxertos US-897 (*C. reticulata* Cleopatra × *P. trifoliata*) e US-942 (*C. reticulata* Sunki × *P. trifoliata*) (ALBRECHT; FIEHN; BOWMAN, 2016). Porém, ainda não foram identificados porta-enxertos ou copas comerciais, efetivamente resistentes à doença (FERRAREZI, et al., 2020). Praticamente, todas as espécies e cultivares comerciais de citros são sensíveis ao HLB, independentemente do porta-enxerto utilizado. O pomelo, a laranja-doce e alguns tangelos e tangerinas são os mais sensíveis à doença, enquanto as limas-ácidas, limões, laranjas-azedas e trifoliatas apresentam menor susceptibilidade ao HLB (ABDULLAH et al., 2009). Com base nas pesquisas até o momento, a solução definitiva para esta doença provavelmente será uma abordagem transgênica que insira vários genes que conferem tolerância ou resistência ao patógeno (MCCOLLUM; BALDWIN, 2017).

3 ARTIGO A

LONG-TERM FIELD EVALUATION OF PERA SWEET ORANGE SELECTIONS IN THE BRAZILIAN HUMID SUBTROPICAL CLIMATE IN THE HUANGLONGBING ERA

ABSTRACT

Few citrus cultivars are commercially planted to attend the Brazilian citrus industry. The diversification of cultivars is an important strategy to avoid diseases outbreaks and to allow growers to obtain higher profits during the off-season, as well as to allow a longer period of fruit supply for the orange juice industry. The aim of this study was to evaluate the vegetative growth, fruit yield and quality, and disease incidence in 16 Pera sweet orange selections (*Citrus ×sinensis* Osbeck) under a humid subtropical climate in the Northwest region of the state of Paraná, Brazil. The experimental orchard was planted in December 2012 in a randomized block design with three replications and five trees per plot. All scions were grafted onto Rangpur lime rootstock (*C. ×limonia* Osbeck). The evaluations, performed from 2016 through 2022, included vegetative growth, yield, fruit quality, estimated tree density and productivity for new plantings, and incidences of citrus canker, huanglongbing and citrus tristeza virus diseases. All data was submitted to analysis of variance and the means were grouped by the Scott Knott's test ($p \leq 0.05$). Pera Perão selection showed higher vegetative growth, and fruits with larger size, shape and weight, and high soluble solids content (SS), titratable acidity (TA) and juice yield. However, it showed a greener juice color, and low SS TA⁻¹ ratio. Pera Perão had the lowest citrus canker incidence on fruits but was among the selections with the highest incidence of trees with HLB. The Ovale, Clone 9 and Clone 42 selections also presented higher vegetative growth, higher fruit length and lower SS, juice yield and technological indices. All other Pera selections showed lower tree height and canopy volume, and good overall fruit quality. However, Pera Comprida, Dibbern, Morretes, and Seleção 12 presented lower cumulative fruit yield. Pera Pirangi and Comprida had the highest incidence of citrus canker on fruits, while Pera Morretes, Ovo, Pirangi, Seleção 12 and Seleção 27 had the highest incidence of trees with HLB alongside with Perão. Low severity level of stem pitting was observed among the Pera selections evaluated, with scores between 1 (absence of stem pitting) and 2 (sparse surface stem pitting). Therefore, the IAC, Olimpia, Mel, Bianchi, and IPR 159 selections of Pera were more suitable for planting under the subtropical conditions of Northwest region of the state of Paraná, Brazil, due to the small vegetative growth, good yield performance and fruit quality and lower citrus canker and HLB incidences.

Keywords: *Candidatus* Liberibacter asiaticus, Citrus canker; *Citrus ×sinensis*, fruit quality; fruit yield; mid-season maturation; varietal selection; vegetative growth.

3.1 INTRODUCTION

Brazil is the world's largest sweet orange producer, with more than 16 million tons produced in an area of 596,257 hectares in 2021 (IBGE, 2021). São Paulo state is the main producer and was responsible for 75% of the Brazilian production of sweet oranges, followed by the states of Minas Gerais, Paraná, and Bahia (IBGE, 2021). Despite of the importance of the Brazilian citrus industry, the range of commercially planted sweet orange cultivars are still very limited. The mid-season Pera sweet orange [*Citrus ×sinensis* (L.) Osbeck] is the main cultivar grown in Brazil, accounting for 37% and 45% of the total sweet orange trees growing in São Paulo and Paraná states, respectively (AULER et al., 2014; STUCHI et al., 2020; FUNDECITRUS, 2021).

Pera sweet orange is a very important cultivar for the Brazilian citrus industry, because of the good overall horticultural performance, and fruit quality for both juice processing and the fresh fruit market (STUCHI et al., 2020; RAMOS et al., 2021). Besides, Pera harvest season is between July and October, covering the gap between the early and late season sweet oranges (POZZAN; TRIBONI, 2005). The most cultivated clone is Pera IAC, followed by Pera Olímpia (STUCHI et al., 2020), but there are several other selections of Pera in Brazil, which possibly originated from spontaneous mutations that occurred in the orchards (DONADIO et al., 1999; SALIBE; TEÓFILO SOBRINHO; MULLER, 2002). Furthermore, there are considerable differences among these Pera selections regarding characteristics, such as vegetative growth, internal and external fruit quality, and fruit yield (DONADIO et al., 1999; SALIBE; TEÓFILO SOBRINHO; MULLER, 2002; STUCHI et al., 2020). In addition, the Pera selections may perform differently in the different sweet orange producing regions, considering tree yield and fruit quality, as well as tolerance to diseases (TAZIMA et al., 2016).

In the state of Paraná, Southern Brazil, the main sweet orange cultivars planted are Pera IPR 159, Folha Murcha, Valencia and IAPAR-73 (AULER et al., 2014). Moreover, only citrus cultivars with certain level of resistance to citrus canker disease (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*) are allowed to be planted in the state (LEITE JUNIOR, 1992; VARGAS et al., 2013). The planting of less-susceptible citrus cultivars, along with wind-break barriers, and frequent copper sprays to manage citrus canker,

reduces the incidence of the disease and, consequently, maintain yield by reducing losses from defoliation, fruit drop, and stem dieback (CARVALHO et al., 2015b).

In a Long-term canker-resistance field screening experiment developed in Paraná state, twelve Pera selections were classified as intermediate susceptible to citrus canker (CARVALHO et al., 2015a). It is expected that these and other materials can perform even better, as that research was developed without the adoption of adequate management practices for the disease, such as the application of copper.

Another important disease for the citrus industry worldwide is huanglongbing (HLB), due to its severe impact on citrus fruit yield and quality. HLB is associated with the phloem-restricted bacteria *Candidatus Liberibacter* spp. transmitted by the Asian citrus psyllid (ACP) *Diaphorina citri* Kuwayama (BOVÉ, 2006; GOTTWALD, 2010). HLB causes leaf mottle, misshapen low-quality fruits, and premature fruit drop, resulting in yield reduction, and, ultimately, early economic death of the citrus tree (DALA-PAULA et al., 2019). All commercial citrus species and cultivars are susceptible to HLB (BASSANEZI et al., 2011; DALA-PAULA et al., 2019; FERRAREZI, et al., 2020).

Pera sweet orange is the most susceptible commercial sweet orange cultivar to the Citrus tristeza virus (CTV) the causal agent of citrus tristeza disease (SALIBE; SOBRINHO; MULLER, 2002). In 1968, a pre-immunized selection, later called Pera IAC, was created with attenuated and protective CTV isolates, creating a cross protection against stronger virus strains (STUCHI et al., 2020). This Pera selection along with other spontaneous mutations (DONADIO et al., 1999), many of them, naturally infected with attenuated CTV strains, were selected, and planted in commercial orchards in Brazil (SALIBE; TEÓFILO SOBRINHO; MULLER, 2002). The most common symptoms of citrus tristeza in Pera sweet orange grafted on rootstocks tolerant to CTV are stem pitting in the trunk and branches (TANAKA et al., 2009).

Juice quality standards, particularly soluble solids content, acidity, and ratio, are of utmost importance for the citrus industry. On the other hand, the fresh fruit market prioritizes fruit appearance, including size, peel color and thickness, lower number or absence of seeds, and adequate soluble solids and acidity ratio (CASTLE; BALDWIN; MURARO, 2010; CAPUTO et al., 2012). Despite looking at different aspects of quality, both sectors require fruits with high quality throughout the year, particularly during the off-season, so they can attend the consumer's needs.

In addition to the selection or creation of new varieties in breeding programs, the evaluation of these materials under field conditions is extremely important to determine the agronomic performance of the citrus cultivars under different environmental conditions to attend the needs of diversification for the citrus growers. Therefore, the aim of this study was to evaluate the vegetative growth, fruit yield, physicochemical quality of the fruits and tolerance to HLB, citrus canker and CTV diseases of 16 mid-season Pera sweet orange selections under the humid subtropical conditions of the Northwest region of the state of Paraná, Brazil.

3.2 MATERIAL AND METHODS

3.2.1 Experimental Location

The experimental orchard was planted in Guairaça, PR, Brazil (22° 56' 04" S; 52° 41' 08" W; 518 m a. s. l.). The climate of the region is Cfa type (humid subtropical), according to the Köppen's classification, with maximum and minimum mean temperatures of 28.4 °C and 17.9 °C, respectively, annual average rainfall of 1,517 mm (Figure 3.1), and mean relative humidity of 69% (IDR- PARANÁ, 2021). The soil of the region is classified as a Typic Haplustox with 90% sand, 1% clay, base saturation of 20%, and pH of 3.9 in the 0-40 cm layer (LARACH, 1984).

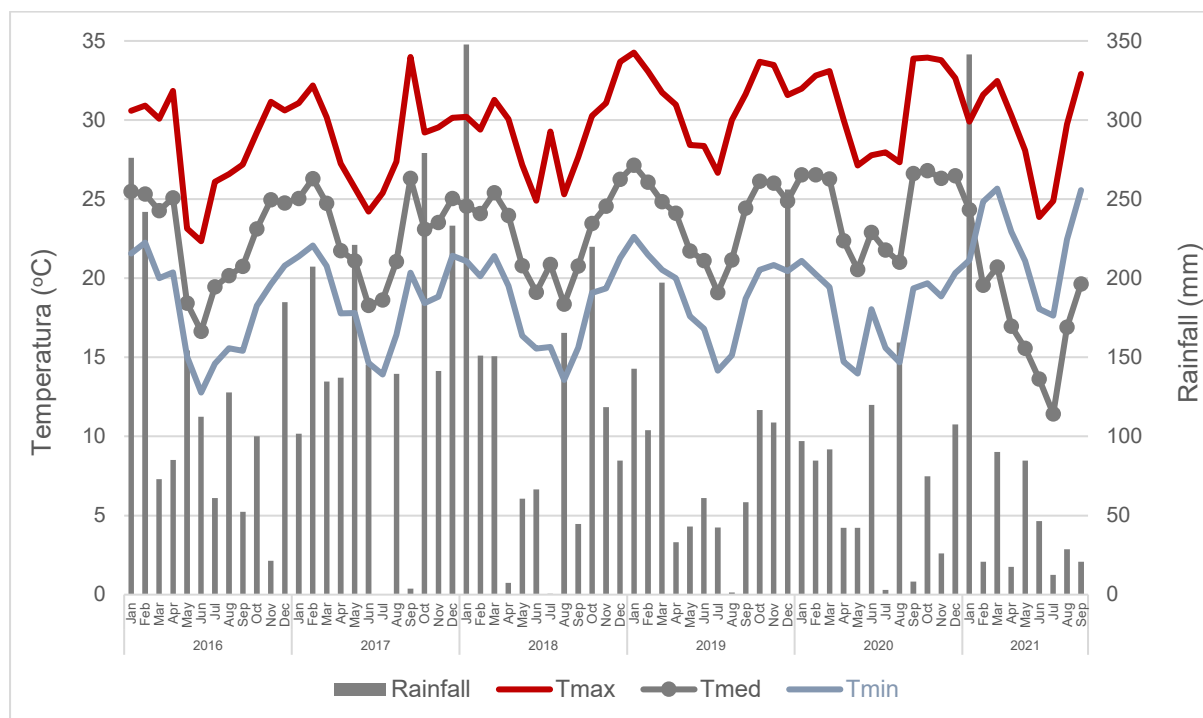


Figure 3.1 Rainfall, and maximum (Tmax), medium (Tmed) and minimum (Tmin) air temperatures for the 2016-2021 period at the experimental area. Guairaçá, PR, Brazil. Source: IDR-Paraná (2022).

3.2.2 Plant Material and Experimental Design

The orchard was planted in December 2012, at tree spacing of 6.5 m × 4.5 m, and planting density of 341 trees ha⁻¹. The experimental design was randomized blocks with 16 treatments and three replications of five trees per plot. The evaluations were carried out in the three central trees of each plot, while the other two trees were considered as border. The treatments consisted of 16 mid-season Pera sweet orange (*C. ×sinensis*) selections (Table 3.1), grafted onto Rangpur lime (*C. ×limonia*), which is graft-compatible with Pera scions and adapted to a wide range of soil and climate conditions (TAZIMA et al., 2016). Propagative materials were obtained from the Citrus Active Germplasm Bank of the Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná – IAPAR/Emater (IDR–Paraná), in Londrina, PR, Brazil, and from the Centro APTA Citros Sylvio Moreira – IAC, in Cordeirópolis, SP, Brazil. The trial was surrounded by double-row windbreaks of *Eucalyptus grandis* (Hill) ex Maiden.

Table 3.1 Mid-season Pera sweet orange (*C. ×sinensis*) selections evaluated in the study.

Pera Selection	Origin ¹	Name in the source institution
IAC	CCSM ¹	Pera IAC
Olímpia	CCSM	Pera Olímpia IAC 1572
Mel	CCSM	Pera Mel IAC 153
Bianchi	CCSM	Pera Bianchi 2001
Perão	CCSM	Pera Perão IAC 150
Comprida	CCSM	Pera Comprida IAC 389
Ovo	CCSM	Pera Ovo IAC 156
Ovale	CCSM	Ovale IAC 172
Dibbern	CCSM	Pera Dibbern 1748
Morretes	IDR-Paraná ²	IPR Pera Morretes (I-34)
Pirangi	CCSM	Pera Pirangi IAC 484
IPR 159	IDR-Paraná	IPR 159
Seleção 12	IDR-Paraná	IPR Pera Seleção 12 (I-403)
Seleção 27	IDR-Paraná	IPR Pera Seleção 27 (I-404)
Clone 9	CCSM	Pera Clone 9 BAG 1385
Clone 42	CCSM	Pera IAC 2014

¹CCSM – IAC Centro de Citricultura Sylvio Moreira – Instituto Agronômico de Campinas, Cordeirópolis, SP, Brazil; ²IDR-Paraná – Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná - IAPAR/EMATER, Londrina, PR, Brazil.

3.2.3 Cultural Practices

The management of the experimental orchard followed the recommendations for the state of Parana, Brazil, which included fertilization based on soil analyses (IAPAR, 1992; LEITE JUNIOR, 1990; NUNES et al., 2010). Weed control was performed with periodic mowing and herbicides application (IAPAR, 1992). The orchard was irrigated by localized drip irrigation. The amount of water was determined according to the crop evapotranspiration (ET_c), which is determined by the crop coefficient procedure whereby the effect of the various weather conditions is incorporated into the reference crop evapotranspiration (ET_o), and the crop characteristics into the single crop coefficient (K_c ; ALLEN et al., 1998):

$$ET_c = ET_o \times K_c$$

where ET_c = crop evapotranspiration, ET_o = reference crop evapotranspiration, and K_c = single crop coefficient.

Disease and insect pest management included monthly preventive copper sprays to control citrus canker (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*) (BEHLAU et al., 2010; 2021) and two-monthly insecticide sprays (Pyriproxyfen at 0.625 g ai 100 L⁻¹ of water) to control the Asian citrus psyllid (*Diaphorina citri* Kuwayama) (NUNES et al., 2010). Pruning was not performed in the trees, in order to evaluate the natural tree growth over the evaluation period.

3.2.4 Tree and Fruit Evaluations

3.2.4.1 Vegetative growth

Vegetative growth was evaluated after crop harvest in the 2019 season, when the trees were seven years old. The trunk circumference was measured 10 cm above (TDA) and 10 cm below (TDB) the graft union using a cloth measuring tape and converted to diameter. The ratio between the TDB TDA⁻¹ diameters was also calculated.

Tree height (m) and canopy diameter (m) were measured with a graduate pole and canopy volume (m³) was determined according to the equation proposed by Mendel (1956):

$$CV = \frac{2}{3} \times \pi \times CR^2 \times TH$$

where, CV = canopy volume (m³); CR = canopy radius; and TH = tree height (m).

3.2.4.2 Yield

Fruit yield was determined for the harvests of 2016 through 2021 seasons. The fruits collected in each plot were weighted by using a digital scale, and the results were

expressed in fruit weight (kg) per tree. The cumulative fruit yield was determined by the sum of the yields of all six seasons, except for Pera Seleção 12 and Pera Clone 9 that started to produce fruit later and had no production in the first year of evaluation. Furthermore, no yield data was collected for Pera Ovale and Pera Clone 9 in 2020 season due to technical issues during the evaluation. Yield efficiency was calculated by the ratio between the fruit yield (kg tree⁻¹) and the canopy volume (m³ tree⁻¹), and expressed in kilograms per cubic meter (kg m⁻³). The alternate bearing index was determined according to Pearce and Doberšek-Urbanc (1967):

$$ABI = \frac{1}{n-1} \times \left\{ \frac{|a_2 - a_1|}{a_2 + a_1} + \frac{|a_3 - a_2|}{a_3 + a_2} + \dots + \frac{|a_n - a_{n-1}|}{a_n + a_{n-1}} \right\},$$

where, *ABI* = alternate bearing index, *n* = number of evaluated years, and *a*₁, *a*₂, ..., *a*_(*n*-1), *a*_(*n*) = yields of the corresponding years.

3.2.4.3 Fruit quality

Samples of 10-fruit of each block were picked randomly at a tree height of 1.0 to 2.0 m for determination of fruit quality attributes. The samples were collected in August of each year, from 2019 through 2021, before the annual harvest. Fruit length (FL) and diameter (FD) (mm) were measured using a Vernier digital caliper (Mitutoyo, ABS, Kawasaki, Konagawa, Japan) and used to determine the fruit shape (FL FD⁻¹). Fruit weight (g) was determined using a scale of 15 kg capacity with 5 g precision (Filizola, BP15, Campo Grande, MS, Brazil).

Peel and juice colors were measured for the 2021 harvest using a Chromameter (Minolta CR-400, Tokyo, Japan), calibrated to a white plate using the CIE L*, a*, b* color space (McGUIRE, 1992). Peel color (PC) was measured in four points around the equatorial circumference of the fruit. Juice color (JC) was determined for each sample by readings taken through a 10 mL cuvette filled with juice (LI et al., 2021). L*, a*, and b* were used to calculate the citrus color index (CCI). The CCI is a comprehensive indicator for color impression, with positive values for orange-red, negative values for blue-green, and zero for an intermediate mixture of red, yellow, and blue-green (ZHOU et al., 2010; DOMINGUES et al., 2021). CCI was calculated

according to the equation proposed by Jimenez-Cuesta; Cayuela; Martinez-Javega (1981):

$$CCI = \frac{1000 \times a^*}{L^* \times b^*},$$

where, CCI = citrus color index; L^* = lightness; a^* = red-green color value, and b^* = yellow-blue color value.

Juice was extracted using a Croydon extractor (Croydon, Duque de Caxias, RJ, Brazil), and the juice yield (JY) was calculated based on the relationship between the extracted juice weight and the fruit weight, and expressed as percentage:

$$JY = \frac{JW}{FW} \times 100$$

where, JY = juice yield (%); FW = fruit weight (g); and JW = juice weight (g).

The seeds were extracted from the fruits and manually counted. Soluble solid concentration (SS) was measured using a digital refractometer (Atago® Co., Ltd, Tokyo, Japan), with results expressed in °Brix. Titratable acidity (TA) was determined by titration of 25 ml of juice with a standard solution of 0.1 N NaOH, in a TitroLine easy titrator (Schott Instruments GmbH, Mainz, Rhineland-Palatinate, Germany), using phenolphthalein as the indicator. The juice acidity was expressed in grams of citric acid per 100 mL of juice ($\text{g } 100\text{mL}^{-1}$) (AOAC, 2019). The ratio of SS and TA ($SS \text{ } TA^{-1}$) was calculated to indicate the fruit maturity index. The technological index or the amount of soluble solids in the juice from a box of oranges (40.8 kg) was calculated according to the equation:

$$TI = \frac{SS \times JY \times 40.8}{10000}$$

where, TI = technological index (kg TSS box^{-1}); SS = soluble solids (°Brix); and JY = juice yield (%) (Adapted from DI GIORGI et al., 1990).

3.2.5 Estimates of Planting Density and Yield

The theoretical planting density was determined based on the equations proposed by Negri, Stuchi and Blasco (2005):

$$E1 = (CD + 2.5) \text{ and } E2 = (CD \times 0.75)$$

where, $E1$ = theoretical distance between rows (m); CD = canopy diameter for each cultivar in 2019; and $E2$ = theoretical distance between trees (m).

The recommended between-row spacing was 2.5 m for the accomplishment of the cultural practices and harvest, with 25% of canopy in-row overlapping (NEGRI; STUCHI; BLASCO, 2005). Productivity ($t\ ha^{-1}$) was estimated based on the theoretical number of trees per hectare and the average fruit yield. The soluble solids yield (SS yield) was determined according to the estimated yield and expressed in tons of SS per hectare ($t\ SS\ ha^{-1}$):

$$SS\ yield = \frac{SS \times JY \times YE}{10000}$$

where, SS = soluble solids ($^{\circ}Brix$); JY = juice yield (%) and YE = yield estimation. (Adapted from DI GIORGI et al., 1990).

3.2.6 Disease Evaluation

3.2.6.1 Citrus canker incidence on fruits

The incidence of citrus canker (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*) in the fruits was evaluated in the harvests of 2020 and 2021. A sample of 100 fruits, harvested from the three central trees of each plot, was visually inspected for the presence or absence of citrus canker lesions and the disease incidence was expressed in percentage (%) (BEHLAU et al., 2010).

3.2.6.2 Huanglongbing (HLB) incidence

Polymerase chain reaction (PCR) was carried out to determine the infection rate of the citrus trees by *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs). In the 2022 growth season, a sample of 12 mature leaves per tree (five trees per plot) was collected. Total genomic DNA was extracted (MURRAY; THOMPSON, 1980) from the samples and subjected to PCR amplification with the primers set Oi1/Oi2c (JAGOUEIX; BOVÉ; GARNIER 1994). PCR reaction was performed in 20 μL of reaction mixture containing 0.1 μL of each primer (0.5 mM), 0.8 μL of dNTP (5 mM), 0.8 μL of MgCl_2 (50 mM), 2.0 μL of buffer ($10\times$), 1.0 μL of Taq DNA Polymerase Recombinant ($5 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 14.2 μL of ultrapure water and 1 μL of total genomic DNA. PCR reactions were performed in a thermal cycler (Veriti™ 96-Well, Applied Biosystems®, Waltham, MA, USA). The thermal cycler was setup to 35 cycles at 92 °C for 40 s, and 72 °C for 90 s (JAGOUEIX; BOVÉ; GARNIER, 1994). After amplification, one aliquot of each PCR reaction was electrophoresed on 1.0% (w/v) agarose gel and visualized with SYBR™ Gold Nucleic Acid Gel Stain (ThermoFisher Scientific, Carlsbad, CA, USA). The gel was visualized through a photo documenter (L-PIX EX, Loccus do Brasil Ltda., Cotia, SP, Brazil) under UV light.

3.2.6.3 Citrus Tristeza Virus (CTV) incidence

Pera sweet orange selections were evaluated in regard to the severity of tristeza stem pitting symptoms caused by the CTV complex on 2022, when trees were 10 years old. Circular and lignified branches with approximately 0.5 to 1.0 cm of diameter and 15 cm long were collected from the middle part of each side of the tree (five trees per plot), comprising a total of four branches per tree. The branches were autoclaved at 120 °C for five minutes to facilitate bark removal (GIAMPANI et al., 2016). Stem pitting was evaluated based on the intensity and severity, using a scale from 1 to 5, proposed by Meissner Filho et al. (2002), where 1 = no stem pitting; 2 = few surface stem pitting; 3 = intermediate surface stem pitting; 4 = large amount of surface stem pitting, rarely deep; and 5 = branch completely covered by stem pitting.

3.2.7 Data Analyses

The data were tested for normal distribution and homogeneity and arc sin $\sqrt{(x/100)}$ transformations were used for all data that did not follow normal distribution. All data were evaluated using analysis of variance (ANOVA), and the means were grouped by Scott-Knott's test ($p \leq 0.05$). Incidence of citrus canker on fruits were assessed in a randomized block design with a 16x2 factorial arrangement, (main factor 1: 16 selections of Pera \times main factor 2: two cropping seasons. Significant variables were taken together and submitted to the multivariate analyses using a mean value for each selection and variable, and a principal component analysis (PCA) was plotted. All statistical analyses were carried out using the R software, 4.1.0 version (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

3.3 RESULTS

3.3.1 Vegetative Growth

Pera Perão showed the widest trunk diameters below and above the graft union, 20.2 and 19.3 cm, respectively. This selection also had the highest tree, and the largest canopy volume at seven years after planting, followed by Pera Ovale, Clone 9 and Clone 42. In contrast, all other Pera selections had lower vegetative growth, with shorter trees, and higher canopy volumes. The ratio between scion and rootstock trunk diameters ranged from 0.95 up to 1.07, being higher for the selections Ovo, Pirangi and Seleção 12 (Table 3.2).

Table 3.2 Vegetative growth of 7 years-old 16 Pera sweet orange selections grafted onto Rangpur lime rootstock, in the 2019 season, in Guairaçá, PR, Brazil.

Pera Selection	Trunk diameter ¹			Tree height (m)	Canopy	
	Rootstock (cm)	Scion (cm)	Index ²		Diameter (m)	Volume (m ³)
IAC	16.1 c ³	15.3 c	0.95 b	3.7 c	3.9 b	29.6 c
Olímpia	14.9 c	14.2 c	0.96 b	3.5 c	3.8 b	26.9 c
Mel	14.8 c	14.1 c	0.95 b	3.7 c	3.7 b	26.3 c
Bianchi	15.5 c	14.9 c	0.97 b	3.7 c	3.8 b	28.5 c
Perão	20.2 a	19.3 a	0.96 b	4.5 a	4.4 a	45.1 a
Comprida	15.1 c	14.4 c	0.95 b	3.4 c	3.8 b	25.9 c
Ovo	14.9 c	15.9 b	1.07 a	3.7 c	3.9 b	29.4 c
Ovale	17.0 b	16.4 b	0.97 b	3.9 b	4.1 a	33.7 b
Dibbern	14.6 c	13.9 c	0.95 b	3.6 c	3.5 b	23.5 c
Morretes	12.8 d	12.6 c	0.99 b	3.5 c	3.8 b	26.9 c
Pirangi	14.6 c	15.6 b	1.07 a	3.7 c	4.0 a	31.8 c
IPR 159	14.9 c	15.1 c	1.01 b	3.8 c	4.0 a	31.6 c
Seleção 12	14.1 d	14.1 c	1.00 b	3.4 c	3.6 b	23.5 c
Seleção 27	13.5 d	14.4 c	1.07 a	3.6 c	4.0 a	30.0 c
Clone 9	15.7 c	15.7 b	1.00 b	4.0 b	4.1 a	34.8 b
Clone 42	17.1 b	16.4 b	0.96 b	4.1 b	4.2 a	37.0 b
CV (%)	5.71	5.20	4.24	5.16	4.97	12.00
<i>F</i> value	11.28***	10.85***	3.22**	6.21***	3.50**	6.88***

¹Trunk diameters were calculated based on trunk circumference measured 10 cm below and 10 cm above the graft union.

²Trunk diameter index is the ratio between the scion and the rootstock trunk diameters.

³Means followed by the same letter in the column belong to the same group according to the Scott-Knott's test. Significance level: ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.

3.3.2 Yield

The IAC, Mel, Bianchi, Ovo, and Pirangi selections of Pera, began to produce fruits at early age, reaching higher initial yields and maintaining it for the other seasons. These selections, as well as Pera Olimpia, IPR 159, Pera Seleção 27, and Pera Clone 42, had higher cumulative yield and yield efficiency. In contrast, Pera Clone 9 presented low fruit yield during the evaluated period, resulting in the lowest cumulative yield and yield efficiency. This selection began to produce fruits later, five years after planting, and was among the ones with lower fruit yield in four seasons of production (Table 3.3).

The Perão, Ovale and Morretes selections were also among the ones with low fruit yields in most of the seasons, resulting in lower cumulative yield and yield efficiency than most of the Pera selections (Table 3.3). The Comprida, Dibbern, and Seleção 12 selections showed higher yield efficiency due to the lower canopy volume (Tables 3.2; 3.3). However, they did not differ from Perão, Ovale and Morretes in regard to the cumulative yield (Tables 3.2; 3.3). Alternate bearing indices ranged from 0.10 for Pera Mel up to 0.37 for Pera Clone 9, with significant differences ($p \leq 0.05$) among the selections. This index was higher for Pera Clone 9 and Pera Perão (Table 3.3).

Table 3.3 Annual and cumulative yields, yield efficiency and alternate bearing index of 16 Pera sweet orange selections grafted onto Rangpur lime rootstock for the 2016 through 2021 harvest seasons in Guairaçá, PR, Brazil.

Pera Selection	Yield (kg tree ⁻¹)						Cumulative yield (kg)	Yield efficiency (kg m ⁻³) ²	Alternate bearing Index
	2016	2017	2018	2019	2020	2021			
	4 ¹	5	6	7	8	9			
IAC	62.1 a ³	81.7 a	71.0 a	93.2 a	101.5 a	55.7 c	480.3 a	2.85 a	0.14 b
Olímpia	36.5 b	85.7 a	86.0 a	123.9 a	93.3 a	68.0 c	493.4 a	3.42 a	0.20 b
Mel	68.3 a	93.0 a	82.3 a	94.1 a	91.8 a	78.0 c	507.5 a	3.38 a	0.10 b
Bianchi	65.6 a	89.4 a	76.4 a	82.8 a	88.7 a	74.8 c	477.7 a	2.96 a	0.19 b
Perão	21.0 b	47.7 b	28.9 c	49.6 b	95.0 a	112.6 b	354.8 b	1.46 b	0.30 a
Comprida	33.6 b	67.5 b	47.5 b	81.2 a	74.0 b	55.3 c	359.2 b	2.51 a	0.21 b
Ovo	77.3 a	82.9 a	68.2 a	93.0 a	110.0 a	55.0 c	486.4 a	2.83 a	0.20 b
Ovale	31.6 b	58.1 b	45.3 b	60.2 a	--- ⁴	80.8 c	276.0 b ⁵	1.79 b ⁶	0.25 b
Dibbern	37.1 b	58.8 b	46.3 b	59.9 a	73.0 b	100.8 b	375.8 b	2.88 a	0.19 b
Morretes	53.3 a	63.2 b	47.7 b	56.7 a	43.3 b	57.2 c	321.3 b	2.04 b	0.17 b
Pirangi	63.6 a	100.2 a	50.3 b	77.2 a	103.0 a	51.5 c	445.7 a	2.41 a	0.25 b
IPR 159	44.8 b	69.6 b	63.9 a	78.5 a	86.7 a	76.8 c	420.3 a	2.38 a	0.12 b
Seleção 12	0.0 c	81.5 a	76.7 a	97.6 a	70.3 b	69.7 c	395.7 b	3.41 a	0.13 b
Seleção 27	33.0 b	86.2 a	102.2 a	74.9 a	103.8 a	70.7 c	470.7 a	2.94 a	0.22 b
Clone 9	0.0 c	21.5 c	13.2 c	37.2 b	--- ⁴	55.0 c	126.9 c ⁵	0.92 c ⁶	0.37 a
Clone 42	34.7 b	106.7 a	61.6 a	88.0 a	73.3 b	148.0 a	512.2 a	2.59 a	0.28 b
CV (%)	35.00	18.64	25.00	31.06	21.46	28.87	17.07	18.20	19.97
F value	3.30**	7.17***	6.71***	2.36*	2.79*	3.66*	6.65***	7.00***	2.32*

¹Plant age. ²Yield efficiency was based on the average yield from 2017 through 2021 and the canopy volume assessed in 2019. ³Means followed by the same letter in the column belong to the same group according to the Scott-Knott's test. Significance level: * p ≤ 0.05; ** p ≤ 0.01; *** p ≤ 0.001. ⁴No data for the respective year. ⁵Cumulative yield of five seasons. ⁶Yield efficiency was based on the average yield of 2017, 2018, 2019 and 2021, and the canopy volume assessed in 2019.

3.3.3 Fruit Quality

By presenting higher fruit length, Pera Comprida had the highest shape value, 1.17, followed by Pera Perão and Pera Ovale with 1.12 that are, more elongated or less cylindrical. On the other hand, with the lowest values for fruit length, Pera Olímpia presented a round fruit shape of 1.0. Pera Perão showed larger and heavier fruits, with higher fruit length, diameter, and weight. Pera Pirangi had the highest number of seeds per fruit, 6.5 seeds, while the selections Perão, Clone 9, Clone 42, and Ovale had the lowest number of seeds, around one seed per fruit (Table 3.4).

Table 3.4 Fruit length (FL), diameter (FD), shape (FL FD⁻¹), and weight, and number of seeds per fruit of 16 Pera sweet orange selections, based on the average of the 2019, 2020 and 2021 harvest seasons in Guairaçá, PR, Brazil.

Pera Selection	Fruit length (FL) (mm)	Fruit diameter (FD) (mm)	Fruit shape (FL FD ⁻¹)	Fruit weight (g)	Seeds per fruit
IAC	78.3 c ¹	74.7 c	1.05 d	207.5 c	3.1 d
Olímpia	73.5 d	73.2 c	1.00 f	190.6 d	5.4 b
Mel	77.8 c	72.8 c	1.07 d	194.7 d	4.8 c
Bianchi	77.9 c	78.2 a	1.07 d	210.4 c	4.4 c
Perão	87.3 a	78.2 a	1.12 b	271.4 a	0.1 e
Comprida	86.9 a	74.1 c	1.17 a	229.8 b	4.3 c
Ovo	73.5 d	70.5 c	1.04 e	187.9 d	5.5 b
Ovale	85.3 a	76.2 b	1.12 b	218.9 c	1.3 e
Dibbern	76.5 c	72.6 c	1.05 d	202.6 d	3.8 d
Morretes	82.3 b	79.1 a	1.04 e	239.5 b	3.6 d
Pirangi	81.4 b	74.4 c	1.09 c	225.7 b	6.5 a
IPR 159	78.1 c	73.9 c	1.06 d	217.4 c	4.6 c
Seleção 12	77.1 c	72.2 c	1.07 d	204.4 d	3.9 d
Seleção 27	79.1 c	77.0 b	1.03 e	221.4 c	4.3 c
Clone 9	80.2 c	73.5 c	1.09 c	205.3 d	0.8 e
Clone 42	80.9 b	75.7 b	1.07 d	216.3 c	1.0 e
CV (%)	2.37	1.89	1.32	5.33	16.01
F value	14.47***	7.88***	25.05***	9.64***	31.26***

¹Means followed by the same letter in the column belong to the same group according to the Scott-Knott's test. Significance level:*** p ≤ 0.001.

The citrus color index (CCI) is a comprehensive indicator for color impression, as the orange color develops during fruit ripening, the CCI value increases. The peel color (PC) ranged from -2.09 up to 1.77, with significant differences (p ≤ 0.01) among

the Pera selections. The Perão, Olimpia, Seleção 12, Ovo, Dibbern, Morretes, Bianchi and Mel selections showed higher PC values, differing from the other selections. Juice color (JC) values ranged from -5.39 up to -3.04. Further, Pera Olimpia and Pera Perão had the lowest values of juice color, differing from the other Pera selections (Table 3.5). Pera Olimpia, Perão, Dibbern and IPR 159 had the highest juice yield among the selections, with mean values above 42%, while Pera Ovale and Pera Clone 9 had the lowest values, below 33%. The other Pera selections, including Pera IAC, had intermediate levels of juice yield, ranging from 38% for Pera Comprida up to 41.7% for Pera Morretes (Table 3.5).

The soluble solids content (SS) was higher for the IAC, Olímpia, Mel, Bianchi, Perão, Comprida, Ovo, Morretes, IPR 159 and Seleção 12 selections of Pera, ranging from 9.1 up to 10.1 °Brix, while in the other selections the soluble solids content ranged from 7.8 up to 8.8 °Brix. The titratable acidity (TA) was higher for the Perão and Comprida selections, with 0.94 and 0.88 g 100 mL⁻¹, respectively. The highest SS TA⁻¹ ratio was for Pera Bianchi and IPR 159, while Perão, Comprida and Clone 9 had the lowest ratios. The lowest technological indexes were observed for Pera Clone 9 and Pera Ovale, followed by Pera Clone 42 (Table 3.5).

Table 3.5 Peel color (PC), juice color (JC), juice yield (JY), soluble solids content (SS), titratable acidity (TA), ratio (SS TA⁻¹) and technological index (TI) of 16 Pera sweet orange selections grafted onto Rangpur lime rootstock, based on the average values of the 2019, 2020 and 2021 harvest seasons in Guairaçá, PR, Brazil.

Pera Selection	Peel color (PC) (CCI ¹)	Juice color (JC) (CCI ¹)	Juice yield (JY) (%)	Soluble solids content (SS) (°Brix)	Titratable acidity (TA) (g 100 mL ⁻¹)	Ratio (SS TA ⁻¹)	Technological index (TI) (Kg SS box ⁻¹)
IAC	-1.13 b ²	-4.12 a	41.4 b	9.2 a	0.68 b	13.6 b	1.59 a
Olímpia	0.34 a	-5.25 b	42.7 a	9.4 a	0.65 b	14.5 b	1.64 a
Mel	-0.51 a	-3.98 a	39.9 b	9.1 a	0.68 b	13.9 b	1.49 a
Bianchi	-0.45 a	-3.60 a	40.2 b	9.6 a	0.60 b	16.0 a	1.58 a
Perão	1.77 a	-5.39 b	45.1 a	10.1 a	0.94 a	10.9 d	1.86 a
Comprida	-1.72 b	-4.18 a	38.0 b	9.0 a	0.88 a	10.5 d	1.41 a
Ovo	0.16 a	-3.21 a	41.6 b	9.3 a	0.77 b	12.4 c	1.58 a
Ovale	-1.56 b	-3.72 a	31.0 c	8.1 b	0.69 b	12.0 c	1.08 c
Dibbern	-0.13 a	-3.61 a	43.8 a	8.6 b	0.69 b	12.5 c	1.54 a
Morretes	-0.19 a	-4.31 a	41.7 b	9.4 a	0.76 b	12.7 c	1.61 a
Pirangi	-1.49 b	-3.37 a	41.1 b	8.8 b	0.72 b	12.5 c	1.49 a
IPR 159	-0.95 b	-3.61 a	43.1 a	9.7 a	0.61 b	15.9 a	1.71 a
Seleção 12	0.29 a	-4.26 a	41.5 b	10.0 a	0.70 b	14.3 b	1.72 a
Seleção 27	-1.02 b	-4.33 a	40.2 b	8.5 b	0.64 b	13.9 b	1.41 a
Clone 9	-2.09 b	-3.89 a	32.5 c	7.8 b	0.68 b	11.5 d	0.96 c
Clone 42	-1.55 b	-3.04 a	40.1 b	7.9 b	0.61 b	13.4 b	1.30 b
CV (%)	5.3	18.08	4.07	6.97	9.12	6.4	9.24
F value	3.21**	2.42*	15.58***	3.64**	6.07***	10.73***	8.42***

¹CCI = citrus color index was measured only in the 2021 harvest season. ²Means followed by the same letter in the column belong to the same group according to the Scott-Knott's test. Significance level: * p ≤ 0.05; ** p ≤ 0.01; *** p ≤ 0.001.

3.3.4 Estimates of Planting Density and Productivity

Estimated plant density and yield considering the canopy diameter and theoretical distance between trees. The IAC, Olímpia, Mel, Bianchi, Comprida, Ovo, Dibbern, Morretes, and Seleção 12 selections required the smallest theoretical row and tree spacing, resulting in the highest planting density with more than 533 trees ha⁻¹ (Table 3.6). The selections with larger canopy diameter resulted in the lowest planting density (Tables 3.2; 3.6). Based on the canopy volume, Pera Perão allows 29% less trees ha⁻¹ than Pera Dibbern, which showed the highest plant density (Table 3.6). Pera Clone 9 had the lowest estimate for fruit productivity, followed by Pera Perão, Morretes and Ovale (Table 3.6). Furthermore, Pera Clone 9 also had the lowest SS yield, as well as Pera Ovale, due basically to the lowest juice yield associated with their low SS and yield estimation (Tables 3.5; 3.6).

Table 3.6 Estimates of minimum in- and between-rows tree spacing, and maximum tree density, fruit productivity and soluble solids yield for 16 Pera sweet orange selections grafted onto Rangpur lime rootstock, seven years after planting in Guairaçá, PR, Brazil.

Pera Selection	Estimated in-row spacing (m)	Estimated between-row spacing (m)	Tree density (trees ha ⁻¹)	Productivity (t ha ⁻¹)	SS yield (t SS ha ⁻¹)
IAC	2.9 b ¹	6.4 b	533.1 a	44.8 a	1.74 a
Olímpia	2.9 b	6.3 b	550.1 a	50.2 a	1.82 a
Mel	2.8 b	6.2 b	588.0 a	51.6 a	1.76 a
Bianchi	2.9 b	6.3 b	552.6 a	45.8 a	1.73 a
Perão	3.3 a	6.9 a	444.9 b	29.0 b	1.33 b
Comprida	2.9 b	6.3 b	558.5 a	36.3 a	1.25 b
Ovo	2.9 b	6.4 b	538.9 a	43.7 a	1.60 a
Ovale	3.1 a	6.6 a	500.6 b	30.0 b	0.78 c
Dibbern	2.7 b	6.0 b	624.2 a	42.2 a	1.35 b
Morretes	2.9 b	6.3 b	550.9 a	29.6 b	1.20 b
Pirangi	3.0 a	6.5 a	508.6 b	38.9 a	1.62 a
IPR 159	3.0 a	6.5 a	512.5 b	38.5 a	1.46 a
Seleção 12	2.7 b	6.1 b	600.0 a	47.5 a	1.21 b
Seleção 27	3.0 a	6.5 a	529.4 b	43.9 a	1.81 a
Clone 9	3.1 a	6.6 a	499.4 b	15.9 c	0.62 c
Clone 42	3.1 a	6.7 a	481.4 b	46.3 a	1.84 a
CV (%)	4.97	3.03	7.68	15.53	18.11
<i>F</i> value	3.50 **	3.50 **	3.65 **	7.13***	5.97***

¹Means followed by the same letter in the column belong to the same group according to the Scott-Knott's test. Significance level : ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.

3.3.5 Citrus Canker, HLB and CTV

The Comprida, Pirangi and Ovale Pera selections had the highest incidence of citrus canker on fruits during the period evaluated, while Pera Perão showed the lowest incidence of the disease. In 2021, the disease incidence on Pera sweet orange fruits was higher than 2020, 24.3% and 6.3%, respectively. Pera IAC had no incidence of trees with Huanglongbing, though not differing from Pera Clone 9, which showed only 6.7% of the trees affected by the disease. The highest HLB disease incidence was observed for the Ovo, Pirangi, Seleção 12, Seleção 27, Perão and Morretes selections, with more than 53% of the trees affected by HLB. Stem pitting severity due to citrus tristeza virus (CTV) significant differed ($p \leq 0.001$) among the Pera selections. The Comprida, Pirangi,

Seleção 27, IPR 159, Mel, Ovale, Ovo and Clone 42 selections showed the highest scores for steam pitting severity, ranging from 1.37 up to 1.68, while the other clones showed lower scores, ranging from 1.03 up to 1.29 (Table 3.7). Severity of citrus tristeza virus symptoms ranged from 1.03 for the selection Morretes up to 1.68 for the selection Comprida (Table 3.7).

Table 3.7 Incidence of citrus canker on fruits, cumulative incidence of trees with Huanglongbing (HLB) and stem pitting severity due to citrus tristeza virus (CTV) in 16 Pera sweet orange selections grafted onto Rangpur lime rootstock in Guairaçá, PR, Brazil.

Pera Selection	Incidence of citrus canker (%) ¹	Incidence of HLB (%) ²	Stem pitting severity ³
IAC	14.2 b ⁴	0.0 d	1.12 b
Olímpia	14.1 b	40.0 b	1.29 b
Mel	11.2 b	20.0 c	1.45 a
Bianchi	12.3 b	33.3 c	1.15 b
Perão	6.5 c	53.3 a	1.04 b
Comprida	24.2 a	40.0 b	1.68 a
Ovo	16.5 b	60.0 a	1.39 a
Ovale	21.3 a	40.0 b	1.44 a
Dibbern	15.8 b	26.7 c	1.22 b
Morretes	15.6 b	53.3 a	1.03 b
Pirangi	20.8 a	60.0 a	1.58 a
IPR 159	17.7 b	26.7 c	1.47 a
Seleção 12	13.0 b	60.0 a	1.27 b
Seleção 27	12.0 b	60.0 a	1.48 a
Clone 9	13.7 b	6.7 d	1.07 b
Clone 42	15.2 b	26.7 c	1.07 b
2020	6.3 B	-	-
2021	24.3 A	-	-
CV (%)	26.19	22.21	11.16
<i>F</i> value <i>Cultivar</i>	3.68***	10.49***	5.42***
<i>F</i> value <i>Year</i>	165.3***	-	-
<i>F</i> value <i>Block</i>	11.77***	2.44 ns	0.42 ns
<i>F</i> value <i>Cultivar x Year</i>	1.00 ns	-	-

¹Incidence of citrus canker on fruits was based on the 2020 and 2021 harvest seasons.

²Cumulative incidence of HLB disease trees was based on evaluations for nine years after planting.

³Stem pitting severity on trees due to citrus tristeza virus (CTV) was based on the 2022 season.

⁴Means followed by the same letter in the column belong to the same group according to the Scott-Knott's test. Significance level: *** $p \leq 0.001$; ns- not-significant.

3.3.6 Multivariate Analysis

The principal component analysis (PCA) was carried out to explore the contribution of each significant parameter in the performance of the Pera sweet orange selections, including vegetative growth, fruit yield, fruit quality, estimation of planting and yield, and incidence of diseases. The first two principal components were responsible for 58.3% of the total variation. Principal component 1 (Dim1) represented 39.8% and principal component 2 (Dim2) explained 18.5% of the variation. Three distinct groups were formed based on the similarity of several characteristics presented by the Pera selections, as showed in the projection of the first two principal components. Pera Perão comprised a single group related to the vegetative growth, fruit physical quality, and estimates of planting density. This selection showed trees with large size and wide trunk diameters below and above the graft line, and also fruits with large size and weight, as well as high TA, and larger estimates for in-row and between-row spacing. The second group was formed by the Ovale, Clone 9 and Clone 42 selections, which showed large fruit length and shape index, as well as high alternate bearing index. All other selections grouped together based on the higher yield, fruit quality and plant density (Figure 3.2).

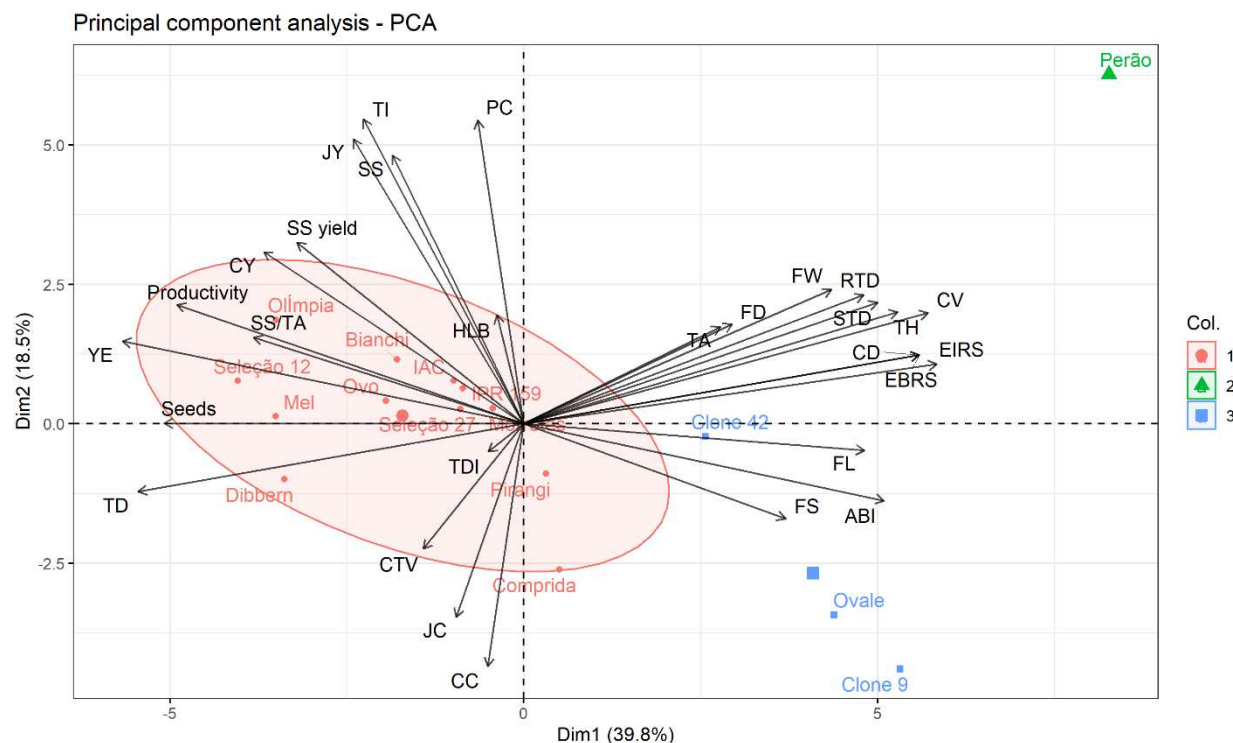


Figure 3.2 Principal component analysis (PCA) for evaluated variables (vegetative growth, fruit yield, fruit quality, estimates of planting density and disease incidence) of 16 Pera sweet orange selections grafted onto Rangpur lime rootstock in Guairaçá, PR, Brazil. The variables were arranged according to their principal component scores and the individuals (Pera selections) were grouped into three distinct clusters (Col.): 1, 2, and 3. Variables: TH-tree height (m); CV-canopy volume (m^3); CD-canopy diameter (m); RTD-rootstock trunk diameter (cm); STD-scion trunk diameter (cm); TDI-trunk diameter index ($STD \ RTD^{-1}$); CY-cumulative yield ($kg \ tree^{-1}$); YE-yield efficiency ($kg \ m^{-3}$); ABI-alternate bearing index; FL-fruit length (mm); FD-fruit diameter (mm); FS-fruit shape; FW-fruit weight (g); Seeds -seeds per fruit; PC-peel color; JC-juice color; SS-soluble solids ($^{\circ}Brix$); TA-titratable acidity ($g \ 100 \ mL^{-1}$); SS/TA - SS TA^{-1} ratio; JY-juice yield (%); TI-technological index ($kg \ SS \ box^{-1}$); EIRS-estimated in-row spacing (m); EBRS-estimated between-row spacing (m); TD-tree density ($trees \ ha^{-1}$); Productivity ($t \ ha^{-1}$); SS yield ($t \ SS \ box^{-1}$); CC- citrus canker on fruits (%); HLB - Incidence of trees with HLB (%); CTV- stem pitting severity due to citrus tristeza virus.

3.4 DISCUSSION

All Pera selections grafted onto Rangpur lime showed trunk diameter indices close to 1.0, with no trunk overgrowth or tree decline observed in the first seven years after planting (Table 3.2). The majority of the citrus genotypes are graft-compatible with Rangpur lime, including several selections of Pera sweet orange (BASTOS; SOMBRA; ANDRADE, 2017; ALVES et al., 2021).

Tree size is of major importance in the orchard planning and management, including pruning, fruit harvesting, and spraying for the control of pests and diseases (PAULA et al., 2022). In our study, the majority of the Pera selections showed small tree height and canopy volume at seven years after planting (Table 3.2). A reduced vegetative growth is desirable in modern citrus production, as it allows the increase in plant density and facilitates all orchard operations (CRUZ et al., 2021). The IAC, Olímpia, Mel, Bianchi, Comprida, Ovo, Dibbern, Morretes, and Seleção 12 selections required the smallest between- and in-rows tree spacing, resulting in the highest theoretical planting density (Table 3.6). High planting density maximizes fruit yield, and optimizes field operations, decreasing harvest costs, and facilitating crop management (STUCHI, 2012; PAULA et al., 2022). In addition, high-density orchards may improve profitability for growers and minimize the economic impact caused by the removal of HLB-symptomatic trees in HLB endemic areas (STUCHI, 2012; MOREIRA et al., 2019; CRUZ et al., 2021). On the other hand, Pera Perão had the highest vegetative growth, which resulted in lower number of trees per area, as demonstrated by the estimates of planting (Table 3.2; 3.6).

Most of the trees in our study can be classified as semi-dwarf according to Bitters, Cole and McMarty (1979), due to the tree height around 3.6 m. The tree height and canopy volume observed in our study were similar to the ones reported by Tazima et al. (2016) for ten years old Pera selections grafted onto Rangpur lime in a study carried out in Londrina, PR, Brazil. However, even the selections with smaller tree size showed higher height and canopy volume than the ones observed by Ramos et al. (2021) for the same seven years old selections of Pera grafted onto Sunki mandarin, in Iaras, state of São Paulo, Brazil. These differences can be related to the use of different rootstocks, as the size of the citrus trees is influenced by the scion-rootstock combination (PASSOS;

BOSWELL, 1979; ROBERTO et al., 1992; DONADIO et al., 2019).

Grafted sweet orange trees began to produce fruits within two to five years after planting (PAULA et al., 2022), and they reach full production by 10 to 12 years of age (SPREEN; BROWN; MURARO, 2007). The earliness in fruit bearing showed by Pera IAC, Mel, Bianchi, Ovo, and Pirangi is desirable in modern citriculture, under the current HLB pressure. HLB infection usually results in a short lifespan for the citrus trees, reducing the economic potential of the groves (STOVER; CASTLE; SPYKE, 2008). Citrus trees with early fruiting, that reach high initial yields and that maintain the production for as long as possible during the orchard life, are preferred (CRUZ et al., 2021). Pera IAC, the most planted sweet orange selection in commercial orchards in Brazil, along with Pera Bianchi, also showed good yield in previous studies conducted in São Paulo state (TEÓFILO SOBRINHO et al., 1988; CARVALHO et al., 2015b).

In general, the vigorous trees began to produce fruits later than the less vigorous ones (Tables 3.2; 3.3). Pera Perão, Ovale, and Clone 9, that showed high tree height and canopy volume (Table 3.2), were among the selections with the lowest fruit loads in most of the harvest seasons, resulting in a low cumulative yield and yield efficiency and started to increase production only seven to eight years after planting (Table 3.3). The vigorous vegetative growth may be associated with the low yield in young citrus trees, due to the energy consumption in the intense vegetative growth, limiting the fruit production.

The alternate bearing index ranges from 0 up to 1, where values closer to 0 indicate lower yield alternation (TAZIMA et al., 2014). Therefore, all Pera selections showed low alternate bearing indices in our study, ranging from 0.10 up to 0.37 (Table 3.3). A low bearing index indicates yield stability over the cropping seasons.

Pera sweet orange is produced for both the processing industry and the fresh citrus market in Brazil. For the processing industry, the internal quality is more important, while for the fresh citrus market, fruit external appearance, mainly peel color, determines consumer's preference (LADANIYA, 2008; ALBRIGO; STELINSKI; TIMMER, 2019). Fruit size and weight are also important fruit quality attributes, particularly for sweet oranges for the fresh fruit market (RAMOS et al., 2021). They can be influenced by several factors, such as cultivar, rootstock, crop load, climate, and cultural practices (ALBRIGO; STELINSKI; TIMMER, 2019; CRUZ et al., 2021). According to the Brazilian fresh citrus

standards for common sweet oranges, most of the evaluated Pera selections could be classified as large-sized fruits, due to the fruit diameters above 71 mm, except for Pera Ovo, which had fruit diameter below this size (Table 3.4) and was classified as medium-sized (CEAGESP, 2011).

The fruit weight observed in our study ranged from 187.9 up to 271.4 g (Table 3.4), being higher than the ones reported by Giampani et al. (2016), which ranged from 164.2 up to 189.2 g. These differences may be due to the water supply, and crop load, as our study was conducted under irrigation, and had lower fruit yield. Higher water supply during fruit development leads to an increase in fruit size and weight (ALBRIGO; STELINSKI; TIMMER, 2019). Besides that, a high crop load, with high number of developing organs, may lead to strong competition for photosynthates and mineral elements and, consequently, to smaller fruit sizes (CRUZ et al., 2021).

Variation in shape is usually characteristic of the cultivar (ALBRIGO; STELINSKI; TIMMER, 2019). In our study, the selections Comprida, Perão, and Ovale presented higher values of fruit shape, above 1.12 (Table 3.4), characterizing an oblong fruit shape. On the other hand, Pera Olimpia had the smallest values for fruit shape, 1.0 (Table 3.4), which means that the fruit length and fruit diameter were very similar, characteristic of a round shaped fruit. Moreover, Pera Perão showed larger and heavier fruits (Table 3.4), which is characteristic of this selection, that has bigger fruits than other selection of Pera, being similar to Shamouti sweet orange (CASTLE; BALDWIN, 2011). Besides that, Pera Perão showed low fruit yield along the evaluation period (Table 3.3), and the fruit size and weight can be inversely related to plant yield, with a final fruit size inversely related to the number of fruits that reach maturity (CASTLE; BALDWIN, 2011).

The amount of seeds in the citrus fruit is also important for most markets. Commercially, seedless fruits, or those with up to eight seeds per fruit, are more desirable than seedy fruits (ALBRIGO; STELINSKI; TIMMER, 2019). The number of seeds per fruit in our study ranged from 0.1 for Pera Perão up to 6.5 for Pera Pirangi, with significant differences ($p \leq 0.001$) among the selections (Table 3.4). Despite the differences, all Pera selections could be considered commercially as seedless, with fewer than seven seeds per fruit (ALBRIGO; STELINSKI; TIMMER, 2019).

Peel Color is another important attribute in the citrus fruit quality, particularly for the

fresh fruit market, as it influences consumer's perception and acceptance (LADO; ZACARÍAS; RODRIGO, 2014). The citrus color index is a comprehensive indicator for color impression, with positive values for orange-red, negative values for blue-green, and zero for an intermediate mixture of red, yellow, and blue-green (ZHOU et al., 2010; DOMINGUES et al., 2021). As the orange color develops during fruit ripening, the citrus color index (CCI) increases. In our study, the Perão, Olímpia, Seleção 12 and Ovo selections showed more intense orange peel color with positive CCI values (Table 3.5). Other selections, as Mel, Bianchi, Dibbern, and Morretes, showed CCI values close to zero, indicating a yellowish peel color (Table 3.5).

The development of the skin color in the citrus fruits during the maturation period is stimulated by the low air temperature and by the range of the thermal amplitude (LADO; ZACARÍAS; RODRIGO, 2014). Regions with warm days and cold nights favor good skin pigmentation, because they allow chlorophyll degradation and carotenoids synthesis, which are responsible for the yellow or orange color of the citrus fruits (LADANIYA, 2008; JOMORI; BERNO; KLUGE, 2016). However, peel color is generally poor in growing regions with high average annual temperatures, as most of the Brazilian citrus growing areas (ALBRIGO; STELINSKI; TIMMER, 2019). In these regions, some oranges will present a pale-yellow color by the time they are harvested, as observed for Pera IAC, Comprida, Ovale, Pirangi, IPR 59, Seleção 27, Clone 9 and Clone 42 in our study (Table 3.5).

For the citrus processing industry, the juice color is more important than the peel color, as a more orange juice provides an A-grade FCOJ product (LADANIYA, 2008). In our study, Pera Olímpia and Pera Perão differed from the other selections with the lowest citrus color indices (CCI) (Table 3.5), indicating a light yellow juice color, while the other selections had a more yellowish coloration (DOMINGUES et al., 2021). According to Albrigo, Stelinski and Timmer (2019), fruits of Pera sweet orange have a lighter juice color than the fruits of other cultivars, as Valencia. Despite presenting an orange-peel color, Pera Perão had a light yellow juice color (Table 3.5). Generally, the external and internal colors develop together. However, the peel tissue (exocarp) is from one type and the other internal tissues are from other types, so, the external tissues can show different characteristics, e.g. darker peel coloration (ALBRIGO; STELINSKI; TIMMER, 2019).

Juice yield is another important quality parameter for both the citrus juice processing industry and the fresh fruit market. The minimal standard of the international fresh citrus market is a juice yield of 35% for common oranges (LADANIYA, 2008; OECD, 2010). In our study, all Pera selections reached this minimal standard, except Pera Ovale and Pera Clone 9, which had the lowest juice yield, below 33% (Table 3.5). Regarding the Brazilian fresh citrus market, the minimal marketable juice yield required for Pera sweet orange and its selections is 45% (CEAGESP, 2011). Considering this standard, only fruits of Pera Perão reached the minimal requirement (Table 3.5).

The juice yields of the Pera sweet orange selections were lower than the ones reported in previous studies conducted in other growing regions, where the values ranged from 47.9 up to 61.0% (TAZIMA et al., 2010; 2016; CASTLE; BALDWIN, 2011; STUCHI et al., 2020). On the other hand, in an experiment in Iaras, Southwest São Paulo state, Brazil, Ramos et al., (2021) observed juice yield values for Pera selections between 41% and 46%, closer to the ones observed in our study (Table 3.5). These differences in juice yield of Pera sweet orange fruits of different selections growing in distinct locations can be due to several factors, such as, field management, rootstocks, soil and climate conditions and water relations (CASTLE, 2010; ALBRIGO; STELINSKI; TIMMER, 2019).

Citrus fruits are non-climacteric, so no relevant maturation changes will occur after harvest, the fruits must be harvested at adequate maturity stage (LADO; ZACARÍAS; RODRIGO, 2014; ALBRIGO; STELINSKI; TIMMER, 2019). As the orange fruit matures, the SS increases and the TA levels decrease (LADO; ZACARÍAS; RODRIGO, 2014). The ratios between them will affect the fruit and juice palatability and marketability (LADANIYA, 2008; ALBRIGO; STELINSKI; TIMMER, 2019). Regarding the SS content, the Pera selections were divided into two different groups. The group formed by the Pera IAC, Olimpia, Mel, Bianchi, Perão, Comprida, Ovo, Morretes, IPR 159 and Seleção 12 had higher SS, ranging from 9.1 up to 10.1 °Brix, and the other group that included Pera Ovale, Dibbern, Pirangi, Seleção 27, Clone 9 and Clone 42 had lower SS, between 7.8 and 8.8 °Brix (Table 3.5). Stuchi et al. (2020) observed similar tendency among Pera selections regarding SS. One group had SS ranging from 9.5 up to 10.2 °Brix, which included Pera IAC and Pera Olimpia, and the second group comprised by Pera 3, Sérgio Pimenta-1946, Fazenda Vila São João-1948, Gibran-1958, Gibran-1959 and Nair

Hernandes-1954 had lower SS, ranging from 8.8 up to 9.2 °Brix (STUCHI et al., 2020).

SS TA⁻¹ ratio has been used worldwide as the main commercial maturity parameter (LADANIYA, 2008; LADO; ZACARÍAS; RODRIGO, 2014). The minimum maturity standard required for commercial marketability of sweet orange fresh fruits varies depending on local standards, but the SS usually ranges from 8 up to 10 °Brix, the acidity from 0.6 up to 1.4 g 100 mL⁻¹ and the SS TA⁻¹ ratio from 7:1 up to 9.5:1 (CEAGESP, 2011; LADO; ZACARÍAS; RODRIGO, 2014; ALBRIGO; STELINSKI; TIMMER, 2019). On the other hand, the processing industry requires a SS TA⁻¹ ratio between 12 and 18 for orange juice production (POZZAN; TRIBONI, 2005). Considering these values, most of the Pera selections included in our study produced fruits that meet the standards for the fresh consumption, except Pera Clone 9 and Pera Clone 42, which had SS below 8 °Brix (Table 3.5). Regarding the processing industry, only Pera Clone 9, Pera Perão and Pera Comprida, which had SS TA⁻¹ ratio below 12, did not attend the required standard (Table 3.5). The low SS TA⁻¹ ratio observed for Pera Perão and Comprida may be due to the high TA for these selections, 0.94 and 0.88, respectively (Table 3.5).

The lowest technological indices were observed for Pera Clone 9 and Pera Ovale, 0.96 and 1.08 kg SS box⁻¹ (Table 3.5). This may be due to the low juice yield associated with the low SS presented by these selections (Table 3.5). The values of the technological indices revealed by our study were lower than the ones reported for different selections of Pera in Bebedouro, SP, Brazil (STUCHI et al., 2020) and in Londrina, PR, Brazil (TAZIMA et al., 2016). The technological index (TI) is also taken into consideration to access fruit quality in sweet oranges for industrial processing (PAULA et al., 2022).

Regarding diseases incidences, all evaluated Pera selections had a moderate level of susceptibility to citrus canker in previous studies (LEITE JUNIOR, 1992; CARVALHO et al., 2015a). Moreover, Pera Perão was one of the Pera selections with the lowest citrus canker incidence on leaves (CARVALHO et al., 2015a). This agrees with our study for the incidence of citrus canker on fruits, where Pera Perão had the lowest canker incidence (Table 3.7).

The citrus canker disease incidence on Pera sweet orange fruits was higher in the 2021 harvest season, probably due to the higher rainfall reported during the early period of fruit development, particularly in January 2021 (Figure 3.1; Table 3.7). Frequent and

heavy rainfall, associated with blowing wind and high temperatures, are favorable conditions for the dispersal of large amounts of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and bacterial infections in the grove (BEHLAU et al., 2007; 2021; BOCK et al., 2010). The cells of the bacterium are involved in a mucilaginous cover which are easily released in water and dispersed in rain droplets (LADANIYA, 2008). Pera Rio planted in the Northwest of Parana State showed high citrus canker incidence on leaves during the months of December to February due to the high temperatures and heavy rainfall during this period (BEHLAU et al., 2007).

Likewise, there are some variabilities in the degree of susceptibility of the citrus species and varieties to HLB. However, there is no resistant material to HLB disease (MCCOLLUM; BALDWIN, 2017; BASSANEZI et al., 2020). The incidence of Huanglongbing in the Pera sweet orange selections ranged from none up to 60% of disease trees (Table 3.7). Pera IAC, the most planted selection in commercial orchards in Brazil, showed no incidence of HLB in trees in the edaphoclimatic conditions of the present study (Table 3.7). Furthermore, all trees of this Pera selection tested negative for HLB by PCR in 2022, when the trees were ten years old. The economic life of the citrus orchards has been reduced in regions of endemic HLB (PAULA et al., 2022). Later infection by the HLB bacterium would be a strategy to maintain the profitability of the citrus orchards under this condition. After the first HLB symptoms in 8- to 12-year-old sweet orange trees, it may take up to five years for the yield to decrease by approximately 60% (BASSANEZI et al., 2020). Furthermore, the damage caused by HLB varies according to the age and size of the citrus tree at infection. This damage is higher on young trees compared to older and larger trees (GOTTWALD, 2010). According to the current Brazilian legislation, the elimination of HLB-symptomatic trees remains mandatory only for citrus orchards with eighth year old or younger (BRAZIL, 2021).

In previous studies, Pera sweet orange exhibited a higher incidence of HLB compared to Folha Murcha and IPR Folha Murcha (ALMEIDA et al., 2016). Rodrigues et al. (2020) reported 48% of cumulative incidence of HLB, eight years after planting, for Valencia sweet orange grafted onto Rangpur lime. This value is lower than the ones observed in our study for the selections Ovo, Pirangi, Seleção 12, Seleção 27, Perão and

Morretes, which had between 53% and 60% of the trees infected by HLB nine years after planting (Table 3.7).

The most common symptom of citrus tristeza virus is stem pitting in the trunk and branches, it is common in Pera sweet orange, including the trees cross protected with mild strains of the virus (SALIBE; TEÓFILO SOBRINHO; MULLER, 2002). Low severity level of stem pitting was observed among the Pera selections evaluated (Table 3.7). All Pera selections evaluated presented scores between 1 (absence of stem pitting) and 2 (sparse surface stem pitting), being therefore considered resistant to the CTV strains present in the region (MEISSNER FILHO et al., 2002). Severity of citrus tristeza virus symptoms ranged from 1.03 for the selection Morretes up to 1.68 for the selection Comprida (Table 3.7).

The development of citrus tristeza symptoms depends on the rootstock-scion combination, aggressiveness of the CTV complex, and environmental conditions, particularly temperature (BENNETT; COSTA 1949; SALIBE; TEÓFILO SOBRINHO; MULLER, 2002; GIAMPANI et al., 2016, GIAMPANI et al., 2018). The low severity level of stem pitting in the present study can be attributed to the effectiveness of their pre-immunization against CTV, as Pera IAC, the most planted selection of Pera in Brazil is preimmunized with the attenuated and protective isolate of the citrus tristeza virus (CTV) (STUCHI et al., 2020); and several Pera selections selected and planted in commercial orchards in Brazil are originated from the occurrence of spontaneous mutations from Pera IAC (DONADIO et al., 1999), or were naturally infected with attenuated CTV strains (SALIBE; TEÓFILO SOBRINHO; MULLER, 2002). Furthermore, Rangpur lime is a CTV tolerant rootstock (PRUDENTE; SILVA, 2006). The mild temperature of the Northwest region of the state of Paraná may also have contributed to the low severity of stem pitting observed among the Pera selections, as the severity of citrus tristeza virus decreases in high temperature conditions (ROISTACHER et al., 1974; SALIBE; TEÓFILO SOBRINHO; MULLER, 2002). In a previous study in the Northern region of São Paulo state, evaluating several Pera selections, including IAC and Olímpia, no stem pitting symptoms were observed (STUCHI et al., 2020). The authors attributed this result in part to the mild mean air temperature of the region, 24 °C, which is similar to the main air temperature of the Northwest region of the state of Paraná, 23 °C.

In general, the Pera sweet orange trees formed three distinct groups based on the principal component analysis, considering several characteristics (Figure 3.2). Pera Perão formed a single group based on the vegetative growth, fruit physical and chemical quality, diseases incidence and estimation of new planting. This selection showed the highest vegetative growth, requiring larger in- and between-rows tree spacing, which allows low planting density. This would decrease fruit yield, and increase harvest costs, turning the crop management and field operations more difficult. Pera Perão also showed low cumulative yield and yield efficiency. Regarding fruit quality, this selection produced larger and heavier fruits, with an orange peel color, and high SS, TA and juice yield. However, it showed a light yellow juice color, and low SS TA⁻¹ ratio. These characteristics are not desirable by the citrus juice industry. Further, Pera Perão had the lowest citrus canker incidence on fruits but was among the clones with the highest incidence of trees with HLB.

Pera Ovale, Clone 9 and Clone 42 grouped together and presented a higher vegetative growth than the other clones, except by Pera Perão (Figure 3.2). They had poor fruit quality, with low SS, and juice yield, which did not meet the minimal standards for the fresh citrus market. Consequently, this selection also had the lowest technological indices.

All other Pera selections grouped together based on the lower vegetative growth, higher yield performance, plant density and fruit quality (Figure 3.2). However, the selections IAC, Olimpia, Mel, Bianchi, and IPR 159 had the best overall performance, by presenting small vegetative growth, allowing high planting density, and having high estimates for productivity and technological index. These selections also had higher cumulative yield, and yield efficiency. Regarding fruit quality, they attended the minimal standards for fruit and juice markets, by showing SS and SS TA⁻¹ ratio above 8.5 and 12, respectively, and higher technological indices. Besides that, these clones had low incidences of citrus canker on fruits and HLB diseased trees.

3.5 CONCLUSIONS

Based on our findings, the IAC, Olimpia, Mel, Bianchi, and IPR 159 selections of

Pera are the most suitable for planting under the Brazilian humid subtropical climatic conditions due to the best overall performance. This includes small vegetative growth, high yield and fruit quality, attending the minimal standards for citrus fruit and juice marketings. In addition, they present low incidences of citrus canker on fruits, HLB-diseased trees and stem pitting in the branches due to the citrus tristeza virus disease.

The Perão, Ovale, Clone 9 and Clone 42 selections are not suitable for planting under the Brazilian humid subtropical climatic conditions of the Northwest Paraná state or similar edaphoclimatic conditions, because they have excessive vegetative growth, low fruit yield and poor fruit quality.

4 ARTIGO B

HUANGLONGBING INFECTION AFFECTS THE PHYSICOCHEMICAL FRUIT QUALITY AND VOLATILE COMPOUNDS COMPOSITION IN THE PEEL OIL OF SWEET ORANGES

ABSTRACT

Huanglongbing (HLB) is the most devastating citrus disease worldwide and seriously affects the citrus fruit and juice qualities. Sweet orange essential oil is a valuable by-product of the juice processing industry and it is also affected by HLB. The aim of this study was to evaluate the effect of HLB on the physicochemical quality and chemical composition of the peel oil of Hamlin IAC and Pera Morretes sweet oranges (*Citrus ×sinensis* Osbeck) grafted onto Rangpur lime (*C. ×limonia* Osbeck) rootstock. Mature fruit samples were harvested from HLB-symptomatic trees (HLB+) and trees free of the disease (HLB-) in the 2019 season, when plants were seven years old. The presence or absence of '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' infection was determined by quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) analysis of the central core tissue of the fruits. The fruits were characterized based on the physicochemical characteristics and then the flavedo was removed for peel oil extraction by hydrodistillation. The peel oil was evaluated by gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) analysis. Each evaluation was performed in triplicate of 10 fruits per treatment. In general, the HLB+ fruits were smaller and greener, and had less juice content, thinner flavedo, higher titratable acidity and soluble solids content (SS) and lower ratio (SS TA⁻¹) than HLB- fruits. Several volatile compounds were decreased by HLB in the peel oil. Compared with HLB-, HLB+ samples had lower concentrations of typical peel oil components, including aldehydes, and esters, and were abundant in oxidative/dehydrogenated terpenes, such as (Z,E)-limonene oxide. It is known that HLB cause shifts in biochemical pathways and oxidative stress in affected trees, which may negatively impact the peel oil quality. Overall, HLB substantially decreases fruit and peel oil qualities of Hamlin IAC and Pera Morretes sweet oranges.

Keywords: *Candidatus* Liberibacter asiaticus; *Citrus ×sinensis* (L.) Osbeck; flavedo tissue; HLB; fruit quality; essential oil.

4.1 INTRODUCTION

Nowadays, huanglongbing (HLB) is the major concern for citrus production around the world, because of the rapid spread and severe damage to the fruit yield and quality, combined with the difficulty of control. Furthermore, the disease has spread throughout

the major citrus-producing areas worldwide, causing large economic losses to the citrus industry (BOVÉ, 2006; DALA-PAULA et al., 2019).

HLB is associated with gram-negative bacteria, '*Candidatus Liberibacter spp.*', which are transmitted by insect vectors, as the Asian citrus psyllid *Diaphorina citri* in the Americas (LI; HARTUNG; LEVY, 2006). All known commercial citrus species and cultivars are susceptible to HLB (DALA-PAULA et al., 2019). Sweet oranges (*C. ×sinensis*), grapefruit (*C. paradisi*), some mandarins (*C. ×reticulata*) and tangelos (*C. ×reticulata* x *C. ×paradisi*) are among the most susceptible species to the disease (ABDULLAH et al., 2009). The development of resistant or tolerant cultivars to HLB is still a long-term challenge. Therefore, HLB management has been based on preventive measures such as the planting of healthy nursery trees, elimination of diseased trees, and vector control, specially under area-wide management (BASSANEZI et al., 2020).

HLB seriously affects the citrus fruit quality. Fruits from HLB-infected trees are usually reduced in size, asymmetric or misshapen, greener, and have lower sugars and soluble solids contents (SS), and higher titratable acidity (TA), higher limonoid and flavonoid contents, and lower SS TA⁻¹ ratio (DAGULO et al., 2010; DALA-PAULA et al., 2018; 2019). Variation in juice quality of fruits from HLB-affected trees have been reported recently. Higher SS was observed in the juice from HLB symptomatic Hamlin and Valencia sweet oranges, as well as higher SS TA⁻¹ ratio for the Hamlin HLB-affected fruits, compared to the healthy ones (BALDWIN et al., 2018; HUNG; WANG, 2018).

Other valuable product affected by the disease is the orange essential oil (XU et al., 2017a; b; KIEFL et al., 2018; SUN et al., 2021). It is a natural flavoring material obtained as a by-product of the juice processing industry (HOGNADÓTTIR; ROUSEFF, 2003). The citrus fruit peel or rind is composed by exocarp or flavedo and mesocarp or albedo (TADEO et al., 2020). The essential oil glands are positioned in the flavedo and blend with the albedo cells near to the bottom of the glands (TADEO et al., 2020). Citrus oils are used in a wide array of applications, in foods, perfumery, and cosmetics, and as a cleaner, solvent, fungicide, insecticide, antimicrobial as well as, presenting antioxidant and antimicrobial activities (DUGO; MONDELLO, 2011; GONZALEZ-MAS et al., 2019; FANCELLO et al., 2020; OIKEH et al., 2020; OYEDEJI et al., 2020; SUN et al., 2021).

Peel oil quality is determined by the chemical combination of volatile compounds

(SUN et al., 2021). D-limonene is the major volatile compound in the citrus fruit and is a major contributor to the citrus flavor (SPADARO et al., 2012; BAI et al., 2014; PLOTTO; BAI; BALDWIN, 2017). Aldehydes are other important compounds for evaluation of citrus peel oil quality. They have potent fragrances, and are often the main contributors to the overall flavor of essential oil, so higher concentration of aldehydes is associated with a better-quality orange oil (SPADARO et al., 2012; XU et al., 2017b). The citrus peel oil quality is frequently affected by climatic condition, diseases, and fruit maturity at harvest (VEKIARI et al., 2002; ZOUAGHI et al., 2019).

There are few studies concerning the impact of HLB on the citrus peel oil volatiles. Furthermore, the published studies were performed with few sweet oranges varieties, and showed significant changes in the volatile profile of the peel oil after HLB incidence (XU et al., 2017a; b; KIEFL et al., 2018; SUN et al., 2021). The disease can suppress some key aldehydes in the peel oil, decreasing the peel oil quality (KIEFL et al., 2018; SUN et al., 2021). Moreover, most of the studies concerning the effect of HLB on sweet orange fruit quality were performed with Valencia and Hamlin sweet oranges (BASSANEZI; MONTESINO; STUCHI, 2009; PLOTTO et al., 2010; LIAO; BURNS, 2012; MASSENTI et al., 2016; BALDWIN et al., 2018). However, the effect of the disease on the quality of the orange juice and peel oil may vary due to the citrus cultivar, harvest time, and fruit maturity (PLOTTO et al., 2010; SUN et al., 2021). In this sense, the aim of this study was to evaluate the effect of HLB in the physicochemical quality and peel oil volatiles of Pera Morretes sweet orange fruits in comparison to the ones of Hamlin IAC.

4.2 MATERIALS AND METHODS

4.2.1 Fruit Harvest

The experimental grove was located in the municipality of Guairaça, PR, Brazil, at the latitude of 22° 56' 04" S; longitude of 52°41'08" W; and altitude of 518 m. The climate of the region is Cfa, a subtropical humid climate, according to the Köppen's classification, with maximum and minimum mean temperatures of 28.4 °C and 17.9 °C, respectively,

annual average rainfall of 1,517 mm, with mean relative humidity of 68.9% (Figure 4.1- IDR- PARANÁ, 2022).

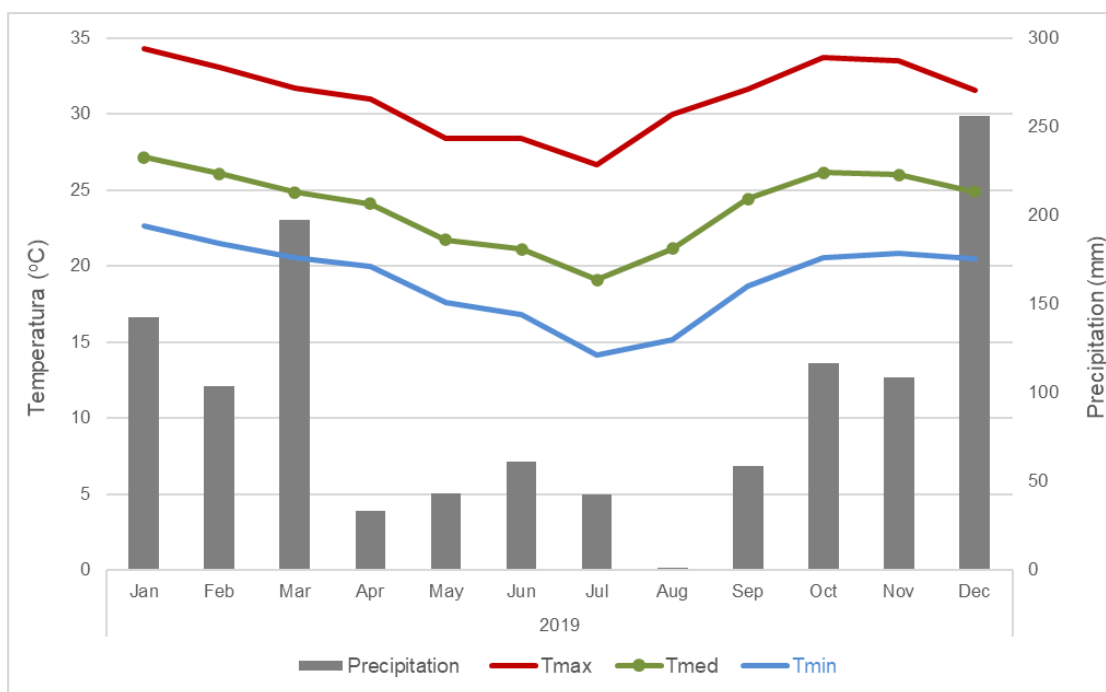


Figure 4.1 Precipitation, and maximum (Tmax), medium (Tmed) and minimum (Tmin) temperatures for the year of 2019. Guairaçá, PR, Brazil. Source: IDR-Paraná (2021).

The experiment comprised four treatments: Hamlin IAC healthy (HLB–) and HLB-affected fruits (HLB+) and Pera Morretes healthy (HLB–) and HLB-affected fruits (HLB+). Three replications of 20 fully mature fruits per treatment were harvested. HLB+ fruits were harvested from HLB-symptomatic trees, while HLB– fruits were harvest from healthy trees. All trees were grown under similar edaphoclimatic conditions and received the same cultural practices and pest and disease management (LEITE JUNIOR, 1992). The presence or absence of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus* – CLas’ infection was determined by quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) analysis in the central core tissue of the fruits, as described below.

The evaluated sweet oranges (*C. ×sinensis*) were grafted onto Rangpur lime (*C. ×limonia*) rootstock. Fruit samples from the early season Hamlin IAC were harvested in June of 2019, while fruit samples from the mid-season Pera Morretes were harvested in August of 2019, when the trees were seven-year-old. After harvest, the fruits were hand

washed with neutral detergent under tap water, rinsed with distilled water, air dried at room temperature for about 30 minutes.

4.2.2 Fruit Quality Evaluation

Biochemical fruit quality evaluations were conducted at the Plant Protection Lab of the Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná – IAPAR/Emater (IDR-Paraná) in Londrina, PR, Brazil. Samples of 10 fruits per replication of each HLB+ and HLB– cultivar were used in the first part of the analysis. The fruits were weighted in a scale of 15 kg capacity and 5 g precision (Filizola, BP15, Campo Grande, MS, Brazil). Fruit peel color was measured by readings taken at four equidistant points in the equatorial circumference of the fruit using a chromameter (Minolta CR-400, Tokyo, Japan), calibrated to a white plate using the CIE L^* , a^* , b^* color space (McGUIRE, 1992). L^* , a^* , and b^* were used to calculate the citrus color index (CCI) through the equation:

$$CCI = \frac{(1000 \times a^*)}{(L^* \times b^*)}$$

where, CCI = citrus color index; L^* = lightness; a^* = red-green color value, and b^* = yellow-blue color value (Adapted from JIMENEZ-CUESTA; CAYUELA; MARTINEZ-JAVEGA, 1981).

Fruit length, diameter, flavedo and albedo thickness (mm) of the fruits were measured using a Vernier digital caliper (Mitutoyo, ABS, Kawasaki, Konagawa, Japan). Fruit shape index was calculated based on the relation between fruit length and diameter. The fruit samples were juiced using a Croydon extractor (Croydon, Duque de Caxias, RJ, Brazil) and the juice content (JC) was calculated based on the relationship between the extracted juice weight and the fruit weight, and expressed as percentage:

$$JC = \frac{JW}{FW} \times 100$$

where, JC = juice content (%); FW = fruit weight (g); and JW = juice weight (g).

The number of seeds per fruit was manually counted. Soluble solids content (SS) was determined by refractive index using a digital refractometer (Atago® Co., Ltd, Tokyo, Japan), with results expressed in °Brix. Titratable acidity (TA) was determined in 25 mL of diluted juice with a standard solution of 0.1 N NaOH, in a TitroLine easy titrator (Schott Instruments GmbH, Mainz, Rhineland-Palatinate, Germany), using phenolphthalein as indicator. The acidity concentration was expressed in grams of citric acid per 100 mL of juice ($\text{g } 100\text{mL}^{-1}$) (AOAC, 2019). The ratio between SS and TA (SS TA^{-1} ratio) was then calculated to determine the fruit maturity index.

Individual sugars (glucose, fructose, and sucrose) analysis was performed by high-performance liquid chromatography (HPLC). For individual sugars, 10 g of juice was mixed with 30 g of deionized water, and insoluble solids were removed by filtration using a Whatman 0.45- μm GD/X Nylon syringe filter and diluted 200 \times for HPLC analysis. Soluble sugars (glucose, fructose, and sucrose) were quantified using a standard external method, with 2-deoxy galactose at 0.01%, as an internal standard. All injections were performed in duplicate, and the results of averaged sugar concentration values were reported in $\text{g } 100 \text{ mL}^{-1}$.

4.2.3 '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' – CLas Diagnosis

The central core of 10 fruits per replication of each treatment was freeze-dried at -40 °C under vacuum (Labconco Co., Freeze Drier 8, Kansas City, KA, USA) until total dehydration (~48 h) and transported to the U.S. Horticultural Research Laboratory (USDA ARS) in Fort Pierce, FL, USA, where qPCR analysis was performed. The freeze-dried central core tissue was grounded using liquid nitrogen, with a mortar and pestle. The powdered tissue was used to extract DNA. The DNA was extracted from 10 mg of fruit tissue using a DNeasy plant minikit (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's instructions, and used for detection of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' (CLas) by quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR).

For 'CLas' detection, the primers HLBas (TCGAGCGCGTATGCAATACG) and HLBBr (GCGTTATCCCGTAGAAAAAGGTAG) were used to target the 16S rRNA genes of the bacterium (LI; HARTUNG; LEVY, 2006; ZHAO et al., 2015). PCR mix with a total volume of 15 μ l contained 7.5 μ l of SYBR green PCR master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 250 nM concentrations of each target primer (HLBas and HLBBr) (total of 0.75 μ l), 4.75 μ l of nuclease-free water, and 2 μ l of template DNA. Real-time PCR amplifications were performed in a 7500 real-time PCR system (Applied Biosystems). The qPCR parameters were as follows: 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles at 95 °C for 15 s, and 60 °C for 1 min, with fluorescence signal capture at each stage of 60 °C. The default melting curve (disassociation) stage was continued after the 40 cycles of PCR. The Ct values were analyzed using the ABI 7500 software version 2.0.6 (Applied Biosystems) with a manually set threshold at 0.02 and automated baseline settings (ZHAO et al., 2015).

The cycle threshold (Ct) to consider trees infected by the HLB bacterium was a Ct value of CLas of 32 (LI; HARTUNG; LEVY, 2006). Fruit samples from HLB-symptomatic trees (HLB+) were 'CLas' positive with Ct values ranging from 19 to 32, while samples from healthy trees (HLB-) were all 'CLas' negative, with Ct values > 32.

4.2.4 Peel oil Extraction, Identification and Composition of Volatile Compounds

The same fruits used to extract the central core were processed to extract the flavedo tissue. The flavedo tissue (1-2 mm deep from the fruit surface) was manually extracted using a sharp stainless-steel knife. The peel oil was extracted at the Plant Science Laboratory of the Department of Agronomy of the Londrina State University – UEL, Londrina, PR, Brazil, by hydrodistillation using a Mini Distiller 1 kg capacity (D1-LINAX®, Votuporanga, SP, Brazil). A sample of 200 g of flavedo was used in the extraction for 2 h, until no more essential oil was obtained. The temperature in the process was 90°C. The distilled essential oil mixture/emulsion was allowed to settle for 15 min, then, the oil layer was collected and centrifuged at 8,740 \times g at room temperature for 5 min. The purified oil was transferred to brown glass vials and transported to the U.S.

Horticultural Research Laboratory (USDA ARS) in Fort Pierce, FL, USA, to further analysis. All extractions were performed in three biological replicates.

The peel oil samples volatile composition were analyzed by gas chromatograph–mass spectrometry (GC-MS, 6890N GC and 5975 MS, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipped with a capillary column DB-5; with 60 m length, 0.25 mm diameter and 1 μm film thickness (J&W Scientific, Folsom, CA, USA) (SUN et al., 2021). One microliter of the peel oil was injected in a split/splitless injector in the split mode (split ratio 40:1). The oven was held at 40 °C for 0.5 min, then, increased to 225 °C at 4 °C min^{-1} and held for 13.25 min. Mass spectrometry data were recorded in the scan mode at ionization energy of 70 eV. The mass range was from 40 to 400 at 2 scans s^{-1} . The ionizing source and transfer line were kept at 250, 230, and 280 °C, respectively (SUN et al., 2021). To accurately quantify the D-limonene content, the oil samples were diluted with methanol for 50-fold and measured by using the same GC-MS settings.

Volatile compounds were identified by matching their spectra with those from NIST/EPA/NIH Mass Spectral library (NIST 14) and by comparing their retention indices (RI) with those from corresponding literature data (LOTA et al., 2002; DENG et al., 2017). The retention indices were calculated using a series of n-alkanes (C5-C18) and run under the same GC conditions as the peel oil volatiles samples (BAI et al., 2014).

4.2.5 Statistical Analyses

The experimental design was completely randomized in a 2x2 factorial arrangement, with four treatments, two cultivars (Hamlin IAC and Pera Morretes) \times two disease treatments (HLB+ and HLB–), and three replications of each treatment. The data were submitted to the analysis of variance (ANOVA) and the means were compared by Student's t-test ($p \leq 0.05$). Fruit quality statistical analyses were conducted using the R software, 4.1.0 version (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria), with the ExpDes and easyanova packages. The volatiles analyses were conducted using the JMP software, version 11.2.2 (SAS Institute, Cary, NC, USA). A heatmap was generated using the Microsoft Excel 365, based on the average values of three replicates.

Principal component analysis (PCA) was applied to characterize the chemical profile of the peel oil across the HLB+ and HLB– samples.

4.3 RESULTS

4.3.1 Huanglongbing Effect on Fruit and Juice Quality of Hamlin IAC and Pera Morretes Sweet Oranges

HLB decreased ($p \leq 0.001$) the fruit weight, length, and diameter, as well as the flavedo thickness of the sweet orange fruits (Table 4.1). Fruits of the early season Hamlin IAC sweet orange had lower fruit weight, length, and shape than the mid-season Pera Morretes (Table 4.1). However, no interactions between cultivar and disease was observed for fruit quality variables, i.e. fruit weight, size, and shape, as well as in the flavedo thickness. Moreover, the albedo thickness and the number of seeds per fruit were not affected by cultivar and/or disease. Significant interaction ($p \leq 0.01$) were observed between cultivar and the HLB disease for the citrus color index (CCI). CCI values were lower for HLB+ samples, particularly for the fruits of Pera Morretes, differing significantly from the healthy samples, with negative values (Table 4.1).

Table 4.1 Physical qualities of healthy (HLB–) and HLB-affected (HLB+) mature fruits of Hamlin IAC and Pera Morretes sweet orange varieties grafted onto Rangpur lime rootstock and cultivated in Paraná State, Brazil.

Cultivar	Fruit weight (g)		Fruit length (FL) (mm)		Fruit diameter (FD) (mm)		Fruit shape (FL FD ⁻¹) (mm)	
	HLB–	HLB+	HLB–	HLB+	HLB–	HLB+	HLB–	HLB+
Hamlin IAC	144.3Ba ¹	87.0Bb	69.0Ba	58.9Bb	69.7Aa	60.4Bb	0.99Ba	0.97Ba
Pera Morretes	185.5Aa	108.3Ab	77.8Aa	69.3Ab	73.5Aa	67.3Ab	1.06Aa	1.03Aa
<i>F-value</i> Cultivar (C)	9.29*		29.55***		18.30**		23.11**	
<i>F-value</i> Disease (D)	43.02***		28.13***		38.39***		2.92ns	
<i>F-value</i> C x D	0.94ns		0.21ns		1.41ns		0.20ns	
CV (%)	13.53		4.43		3.2		2.17	
Cultivar	CCI ²		Flavedo thickness (mm)		Albedo thickness (mm)		Number of seeds	
	HLB–	HLB+	HLB–	HLB+	HLB–	HLB+	HLB–	HLB+
Hamlin IAC	0.53Aa	0.38Aa	2.7Aa	2.3Ab	2.5Aa	2.3Aa	1.4 Aa	2.3Aa
PeraMorretes	0.59Aa	-1.70Bb	2.6Aa	2.3Ab	2.3Aa	2.0Aa	2.2 Aa	1.7Aa
<i>F-value</i> Cultivar (C)	11.34**		0.22ns		2.74ns		0.07ns	
<i>F-value</i> Disease (D)	16.11**		16.67**		2.61ns		0.44ns	
<i>F-value</i> C x D	12.70**		0.52ns		0.02ns		1.90ns	
CV (%)	5.66		5.53		12.62		20.95	

¹Means followed by the same capital letter within columns or the same lowercase letter within rows are not significantly different according to the Student's t-test. Significance level: * p≤0.05; ** p≤0.01; *** p≤0.001; ns- not-significant. ²CCI= citrus color index.

HLB+ juice samples had lower juice content compared to the HLB– samples, mainly for the Pera Morretes fruits, that significantly ($p \leq 0.05$) differed from the healthy ones. SS was lower in the juice of the HLB– fruits, particularly for the Hamlin IAC sweet orange ones, which significantly differed from the juice of the HLB+ fruits. Significant interactions ($p \leq 0.05$) were also observed between cultivar and HLB disease for glucose, fructose, and titratable acidity. Glucose was lower in the juice of HLB– fruits compared to the juice of the HLB+ ones for Hamlin IAC. Fructose, sucrose and total sugar content were also lower in the juice of HLB– fruits of Hamlin IAC compared to the ones of Pera Morretes HLB– samples. HLB significantly ($p \leq 0.0001$) increased titratable acidity and decreased SS TA⁻¹ ratio in the juice of the fruits of Hamlin IAC and Pera Morretes sweet oranges (Table 4.2).

Table 4.2 Juice quality of healthy (HLB–) and HLB-affected (HLB+) fruits of Hamlin IAC and Pera Morretes sweet orange varieties grafted onto Rangpur lime rootstock and cultivated in Paraná State, Brazil

Cultivar	Juice content (%)		Soluble Solids (SS) (°Brix)		Glucose (g 100 mL ⁻¹)		Fructose (g 100 mL ⁻¹)	
	HLB–	HLB+	HLB–	HLB+	HLB–	HLB+	HLB–	HLB+
Hamlin IAC	34.4Ba ¹	32.4Aa	8.9 Ab	12.5Aa	1.09Ab	1.62Aa	1.32Ba	1.73Aa
Pera Morretes	41.4Aa	36.1Ab	11.2Aa	12.4Aa	1.52Aa	1.23Aa	1.96Aa	1.56Aa
<i>F-value</i> Cultivar (C)	14.46**		1.59ns		0.02ns		1.81ns	
<i>F-value</i> Disease (D)	6.90*		7.23*		0.70ns		0.00ns	
<i>F-value</i> C x D	1.38ns		1.88ns		8.59*		5.35*	
CV (%)	6.73		13.64		17.81		18.34	

Cultivar	Sucrose (g 100 mL ⁻¹)		Total sugar (g 100 mL ⁻¹)		Titratable Acidity (TA) (g 100 mL ⁻¹)		Ratio (SS TA ⁻¹)	
	HLB–	HLB+	HLB–	HLB+	HLB–	HLB+	HLB–	HLB+
Hamlin IAC	4.18Ba	4.92Aa	6.6Ba	8.3Aa	0.68Bb	1.15Aa	13.1Aa	10.9Ab
PeraMorretes	5.98Aa	5.30Aa	9.5Aa	8.1Aa	0.77Ab	0.93Ba	14.6Aa	11.4Ab
<i>F-value</i> Cultivar (C)	5.20*		5.15*		6.12*		4.81ns	
<i>F-value</i> Disease (D)	0.00ns		0.03ns		150.6***		35.36***	
<i>F-value</i> C x D	1.93ns		3.41ns		35.97***		1.10	
CV (%)	17.44		17.66		5.03		6.34	

¹Means followed by the same capital letter within columns or the same lowercase letter within rows are not significantly different according to the Student's t-test. Significance level: * p≤0.05; ** p≤0.01; *** p≤0.001; ns- not-significant.

4.3.2 Huanglongbing Effect on the Volatile Profile of Hamlin IAC and Pera Morretes Sweet Oranges Peel Oil

A total of 49 different volatiles compounds were detected in the peel oil of the evaluated sweet oranges peel oil samples, 46 in the Hamlin IAC and 44 in Pera Morretes samples. The volatiles compounds include 14 monoterpene hydrocarbons, 11 sesquiterpene hydrocarbons, five aliphatic aldehydes, five terpene aldehydes, four esters, three alcohols, two ketones, and two terpene oxides (Table 4.3).

The most abundant chemical class in the peel oil of the sweet oranges was the monoterpene hydrocarbons, with D-limonene as the main volatile in total ion current (Tables 4.3; 4.4). D-limonene was found in both sweet orange varieties comprising approximately 96% of the peel oil content. Further, the amount of D-limonene was not affected by the HLB disease. Other abundant compounds found in the sweet oranges peel oil samples were β -myrcene, α -pinene, sabinene, and decanal (Table 4.3). The peel oil of the early season Hamlin IAC had higher amounts of sabinene and decanal than the one of the mid-season Pera Morretes. However, the content of these compounds was lower in the HLB+ samples of both sweet oranges (Table 4.3, Figure 4.2). The peel oil of the Hamlin IAC also had higher amounts of (E)-limonene oxide, citronellal, neral, undecanal, neryl propanoate, and dodecanal; while the Pera Morretes peel oil had higher amounts of α -phellandrene, 3-carene, α -terpinene, (E)-sabinene hydrate, linalool and β -copaene (Table 4.3).

Nonanal, citronellyl acetate, RI1422, (Z)- β -farnesene and β -sinensal were detected only in the Hamlin IAC peel oil samples, with nonanal, (Z)- β -farnesene and β -sinensal decreased by HLB disease. On the other hand, terpinolene, camphor, and (E)- β -ocimene were detected only in the Pera Morretes samples. Furthermore, terpinolene and (E)- β -ocimene were increased by the HLB. Hexyl butanoate, dodecanal, β -copaene, and germacrene D were significantly ($p \leq 0.01$) lower in the peel oil of the HLB+ samples of both sweet orange varieties (Table 4.3).

Table 4.3 Chemical composition of the peel oil of healthy (HLB–) and HLB-affected (HLB+) mature fruits of Hamlin IAC and Pera Morretes sweet orange varieties grafted onto Rangpur lime rootstock and cultivated in Paraná State, Brazil.

Peak	Compound	RI	Hamlin IAC		Pera Morretes		<i>p</i> -value
			HLB –	HLB+	HLB –	HLB+	
1	α-Thujene	938	0.002	0.002	0.002	0.002	0.7426
2	α-Pinene	949	0.383	0.361	0.391	0.397	0.5526
3	Camphene	968	0.002	0.002	0.002	0.002	0.1373
4	Sabinene	989	0.465 ^a	0.401 ^b	0.309 ^c	0.307 ^c	0.0010*
5	β-Myrcene	998	1.652	1.715	1.614	1.629	0.5683
6	Octanal	1008	0.202	0.128	0.098	0.097	0.1305
7	α-Phellandrene	1021	0.037 ^b	0.040 ^b	0.055 ^a	0.054 ^a	0.0016*
8	3-Carene	1028	0.004 ^b	0.010 ^b	0.180 ^a	0.201 ^a	<0.0001*
9	α-Terpinene	1033	0.002 ^c	0.003 ^{bc}	0.004 ^{ab}	0.005 ^a	0.0085*
10	D-Limonene	1052	95.958	96.159	95.885	95.881	0.5202
11	β-Phellandrene	1055	0.129	0.136	0.128	0.135	0.9290
12	γ-Terpinene	1074	0.006	0.007	0.007	0.007	0.2667
13	(E)-Sabinene hydrate	1086	0.006 ^b	0.005 ^b	0.014 ^a	0.015 ^a	0.0034*
14	Terpinolene	1105	- ¹	-	0.051 ^b	0.055 ^a	0.0007*
15	Linalool	1108	0.162 ^b	0.155 ^b	0.607 ^a	0.597 ^a	<0.0001*
16	Nonanal	1110	0.056 ^a	0.052 ^b	-	-	0.0010*
17	(Z)-Limonene oxide	1151	0.005	0.005	0.004	0.005	0.5141
18	(E)-Limonene oxide	1155	0.028 ^a	0.038 ^a	0.012 ^b	0.012 ^b	0.0036*
19	Citronellal	1160	0.046 ^a	0.031 ^b	0.013 ^c	0.013 ^c	0.0026*
20	Camphor	1171	-	-	0.002	0.002	0.8840
21	Hexyl Butanoate	1192	0.009 ^a	0.006 ^b	0.008 ^a	0.003 ^c	0.0058*
22	Terpinen-4-ol	1199	0.009	0.007	0.007	0.006	0.2733
23	Decanal	1210	0.268 ^a	0.239 ^{ab}	0.177 ^b	0.174 ^b	0.0328*
24	(E)-β-Ocimene	1220	-	-	0.005 ^b	0.007 ^a	0.0340*
25	Neral	1251	0.042 ^a	0.028 ^{ab}	0.021 ^b	0.019 ^b	0.0473*
26	Carvone	1263	0.007	0.007	0.024	0.005	0.0709
27	Geranial	1278	0.061	0.04	0.034	0.029	0.0884
28	Perilla aldehyde	1298	0.027	0.021	0.018	0.013	0.1848
29	Undecanal	1310	0.014 ^a	0.013 ^a	0.005 ^b	0.005 ^b	0.0067*
30	Decanol	1325	0.080	0.089	0.053	0.064	0.1972
31	Citronellyl acetate	1351	0.004	0.004	-	-	0.8050
32	Neryl propanoate	1363	0.005 ^a	0.005 ^a	-	0.003 ^b	0.0003*
33	Geranyl acetate	1381	0.004	0.004	0.004	0.003	0.7896
34	RI1386	1386	0.006	0.005	0.004	0.002	0.1089
35	α-Copaene	1406	0.031	0.028	0.027	0.024	0.1401

Continued

Table 4.3 Continuation

Peak	Compound	RI	Hamlin IAC		Pera Morretes		<i>p</i> -value
			HLB –	HLB+	HLB –	HLB+	
36	Dodecanal	1411	0.037 ^a	0.034 ^b	0.022 ^c	0.019 ^d	0.0086*
37	β-Cubebene	1417	0.026	0.025	0.026	0.023	0.3216
38	RI1422	1422	0.002	0.002	-	-	0.9988
39	(E)-Caryophyllene	1458	0.014	0.018	0.026	0.019	0.1521
40	(Z)-β-Farnesene	1461	0.005 ^a	0.003 ^b	-	-	0.0444*
41	β-Copaene	1465	0.012 ^b	0.008 ^c	0.021 ^a	0.019 ^{ab}	<0.0001*
42	α-Humulene	1494	0.005	0.005	0.004	0.004	0.4968
43	α-Farnesene	1513	0.006	0.004	0.005	0.005	0.2280
44	Germacrene D	1520	0.011 ^{ab}	0.007 ^b	0.013 ^a	0.010 ^{ab}	0.0431*
45	Valencene	1531	0.051 ^{ab}	0.083 ^a	0.064 ^{ab}	0.042 ^b	0.0500*
46	δ-Cadinene	1552	0.039	0.027	0.027	0.027	0.1873
47	7-epi-α-Selinene	1562	0.005	0.004	0.003	-	0.0520
48	RI1580	1580	0.057 ^a	0.017 ^b	0.015 ^b	0.015 ^b	0.0029*
49	β-Sinensal	1724	0.009 ^a	0.006 ^b	-	-	0.0049*

*Significant differences according to the Student's t-test, means followed by different letter within rows are significantly different according to the Student's t-test. ¹Not detected.

HLB had substantial effect on the chemical composition of the peel oil of the Hamlin IAC and Pera Morretes sweet orange fruits (Table 4.4). Several aldehydes were decreased by the HLB disease (Table 4.3; Figure 4.2). Peel oil of the fruits of Hamlin IAC HLB+ samples had significantly ($p \leq 0.05$) lower aliphatic and terpene aldehydes content compared to the healthy ones. On the other hand, the peel oil of the Pera Morretes sweet orange fruits, despite presenting slightly lower aldehydes content in the HLB+ samples, did not showed significant differences. Total aldehydes and esters content were lower for HLB+ samples compared to the healthy ones for both sweet orange cultivars (Table 4.4). Hamlin IAC had higher amounts of aldehydes than Pera Morretes (Tables 4.3; 4.4). However, total alcohols content was significantly ($p \leq 0.01$) higher in the Pera Morretes samples compared to the Hamlin IAC ones, and no effect of the HLB disease was observed (Table 4.4).

Table 4.4 Chemical class composition of the peel oil of healthy (HLB–) and HLB-affected (HLB+) mature fruits of Hamlin IAC and Pera Morretes sweet orange varieties grafted onto Rangpur lime rootstock and cultivated in Paraná State, Brazil.

Chemical class	Hamlin IAC		Pera Morretes		<i>p</i> -value
	HLB –	HLB+	HLB –	HLB+	
Monoterpene hydrocarbons	98.65	98.84	98.65	98.57	0.3157
Aliphatic aldehydes	0.58 ^a	0.47 ^b	0.24 ^c	0.23 ^c	0.0174*
Terpene aldehydes	0.18 ^a	0.13 ^b	0.09 ^c	0.07 ^c	0.0244*
Total aldehydes	0.76 ^a	0.59 ^{ab}	0.39 ^{bc}	0.37 ^c	0.0163*
Esters	0.022 ^a	0.018 ^{ab}	0.012 ^{bc}	0.009 ^c	0.0092*
Sesquiterpene hydrocarbons	0.21	0.21	0.21	0.17	0.0707
Terpene oxide	0.03 ^a	0.04 ^a	0.02 ^b	0.02 ^b	0.0067*
Ketones	0.01 ^b	0.01 ^b	0.03 ^a	0.01 ^b	<0.001*
Alcohols	0.25 ^b	0.25 ^b	0.67 ^a	0.67 ^a	0.0002*
Other	0.06 ^a	0.02 ^b	0.02 ^b	0.02 ^b	0.0032*

*Significant differences according to the Student's t-test, means followed by different letter within rows are significantly different according to the Student's t-test.

The heatmap showed in group I, in green color, which compounds were decreased by the HLB in the peel oil samples of both sweet orange cultivars, in group II, in orange color, which ones were increased by the HLB in both varieties, in group III, in yellow color, which compounds were decreased in Hamlin IAC peel oil, and/or increased in Pera Morretes peel oil, and in group IV, in light green color, which volatiles were increased in Hamlin IAC, and/or decreased in Pera Morretes. Color intensity in the heatmap indicates the relative content, in which darker colors indicate higher content and lighter colors indicates lower content of the corresponding volatile compound (Figure 4.2).

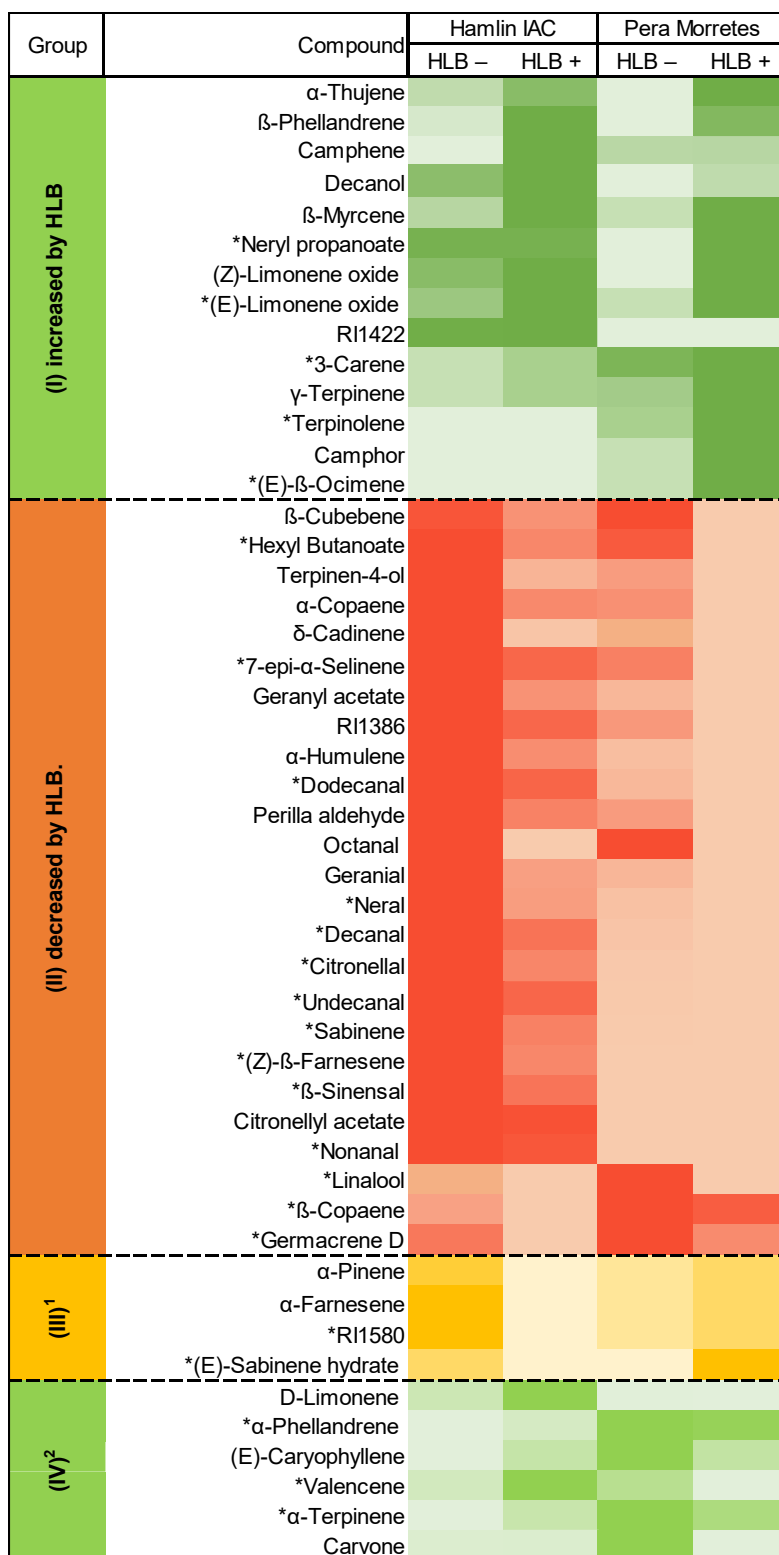


Figure 4.0.2 Heatmap of the chemical groups increased and/or decreased by huanglongbing (HLB) determined based on the mean concentration of volatiles in the peel oil extracted from fruits of the Hamlin IAC and Pera Morretes sweet orange varieties grafted onto Rangpur lime rootstock and cultivated in Paraná State, Brazil. *Significant differences according to the student's t-test. ¹(III) decreased by HLB in Hamlin IAC, and/or increased in Pera Morretes. ²(IV) increased by HLB in Hamlin IAC, and/or decreased in Pera Morretes. Color density indicates the relative content.

The principal component analysis discriminated the HLB- from HLB+ fruit samples in both PC1 and PC2 (Figure 4.3B), explaining 62.4% of the variation in the first two components (Figure 4.3A). The Hamlin IAC samples were located in the positive side of the PC1 and the Pera Morretes samples were in the negative side. HLB+ samples of both sweet oranges grouped in the negative side of PC2 (Figure 4.3A). Most of the peel oil volatiles were in the positive side of PC2, which was associated with the healthy samples (Figures 4.3A, B).

4.4 DISCUSSION

HLB seriously affects the quality of the citrus fruits. HLB-affected sweet orange fruits are usually reduced in size, greener, with higher titratable acidity, and lower in SS, and SS TA⁻¹ ratio compared to healthy ones (PLOTTO et al., 2008; 2010; BASSANEZI; MONTESINO; STUCHI, 2009; DAGULO et al., 2010; LIAO; BURNS, 2012; RAITHORE et al., 2015; HUNG; WANG, 2018). In our study, we observed similar changes in fruit quality, except for SS, that was higher in HLB+ samples (Table 4.2). Higher SS was also observed in the juice of the fruits of HLB-symptomatic Valencia and Hamlin sweet oranges compared to the ones of healthy fruits (PLOTTO et al., 2010; BALDWIN et al., 2018). These changes in fruit quality usually reflect in quality losses, causing serious problems for the fruit commercialization (DAGULO et al., 2010; DALA-PAULA et al., 2018; 2019).

The external color of the sweet orange fruits is an important parameter for the fresh fruit market, because it determines the attractiveness of the fruit to the consumer (DALA-PAULA et al., 2019). Citrus color index (CCI) is commonly used as an indicative for color impression, in which positive values mean an orange-red color, negative values indicate a blue-green, and zero represents a mix of red, yellow, and blue green colors (ZHOU et al., 2010; DOMINGUES et al., 2021). In our study, fruits of the HLB+ samples showed a more yellowish/greenish peel color, less orange than the healthy fruits (Table 4.2). HLB+ samples of Pera Morretes had an even greener color, with negative values for CCI (Table 4.2). During fruit ripening, as the fruits mature, the CCI index increases, and the orange color develops. However, HLB-affected fruits tend to have a greener or less orange (pale yellow) peel color compared to the HLB-unaffected fruits. This is a point of major concern for the fresh fruit citrus industry (DALA-PAULA et al., 2019). This effect has also been observed for Hamlin and Valencia sweet oranges fruits in other studies (LIAO; BURNS, 2012; BALDWIN et al., 2018).

Fruit size and weight, the result from the accumulation of dry matter and water, are important orange fruit quality attributes, particularly for the fresh fruit market (ALBRIGO; STELINSKI; TIMMER, 2019; RAMOS et al., 2021). They can be influenced by several factors, such as scion cultivar, rootstock, crop load, climate, cultural practices, and diseases (ALBRIGO; STELINSKI; TIMMER, 2019; CRUZ et al., 2021). HLB has been associated with reduction in fruit size and weight of the citrus fruits,

probably due to the impaired transport and accumulation of photoassimilates caused by the HLB disease in the citrus tree (BASSANEZI; MONTESINO; STUCHI, 2009).

According to the international standard for fruit and vegetables (OECD, 2010), all sweet orange samples in our study showed fruit diameters above 53 mm, that is the minimal diameter required for comercialization of sweet oranges in the fresh fruit market. The healthy fruits of Pera Morretes could be classified as large size, due to the fruit diameters above 71 mm. On the other hand, the Hamlin IAC HLB- and Pera Morretes HLB+ fruits could be classified as medium size due to the diameters ranging from 65 up to 71 mm. Further, the fruits of Hamlin IAC HLB+ could be classified as small size due to diameters below 65 mm (Table 3.4) (CEAGESP, 2011).

Fruits of the mid-season Pera Morretes sweet orange trees presented higher FL FD^{-1} ratio values than the ones of the Hamlin IAC, for both healthy and HLB-affected samples (Table 4.1). The values for fruit shape of the Pera Morretes were above 1.0, indicating an oblong format of these fruits. On the other hand, the Hamlin IAC fruits had FL FD^{-1} ratio below 1.0, characteristic of an oblate shaped fruit (SANTOS et al., 2010).

The thickness of the flavedo was significantly reduced in the HLB diseased samples. Furthermore, the albedo thickness was also slightly thinner in the HLB-affected fruits of both cultivars (Table 4.1). Flavedo and albedo play an important role in regulating the water exchange between the fruit and the environment, maintaining fruit quality (LADANIYA, 2008). The albedo thickness influences the ability to adjust to changes in water relations. A thinner albedo allows a faster water potential adjustment compared to a thicker albedo (CRONJÉ; ZACARÍAS; ALFÉREZ, 2017). HLB disease did not affected the number of seeds in the fruits (Table 4.1). All samples had less than three seeds per fruit, thus they can be considered commercially as seedless (ALBRIGO; STELINSKI; TIMMER, 2019).

Juice content, an important quality parameter for the citrus juice industry and the fresh fruit market, was lower in the HLB-affected fruits (Table 4.1). This is common in HLB-symptomatic sweet orange fruits and has been reported in a few previous studies with Valencia and Hamlin sweet oranges (LIAO; BURNS, 2012; MASSENTI et al., 2016; BALDWIN et al., 2018), and Westin and Pera cultivars (BASSANEZI; MONTESINO; STUCHI, 2009). Sweet orange fruits for the fresh fruit market must have at least 35% of juice content (LADANIYA, 2008; OECD, 2010). Considering this standard, the fruits of Pera Morretes met the minimal requirement in juice content, even

the HLB+ ones (Table 4.2). On the other hand, fruits of Hamlin IAC showed juice content below 35% in both cases, healthy and HLB-affected fruits, though HLB+ fruits presented slightly lower juice content (Table 4.2).

Sugars had no specific pattern, though glucose, fructose, sucrose, and total sugar were slightly higher for the juice of HLB+ samples of Hamlin IAC and slightly lower for the juice of HLB+ Pera Morretes (Table 4.2). This result for Pera Morretes fruits is similar to that observed in previous studies, as glucose and fructose decreased slightly in sweet orange fruits under the effect of HLB (PLOTTO et al., 2008; BALDWIN et al., 2010) (Table 4.2). On the other hand, some studies revealed a significant increase in glucose and fructose content in the juice of HLB+ fruits compared with the healthy ones (BALDWIN et al., 2018; DALA-PAULA et al., 2018). This same pattern was also observed in our study for the Hamlin IAC fruits (Table 4.2). These changes in sugars in the HLB-affected fruits may be due to the disruption in the plant carbohydrate metabolism as reported for leaves of citrus affected by the disease (FAN et al., 2010), as well as the impaired sugar transport due to the disease (LIAO; BURNS, 2012; CHIN et al., 2014; DALA-PAULA et al., 2019).

The impaired transport and accumulation of photoassimilates caused by HLB in affected trees could partially explain the reduction in fruit size, weight, juice content, SS, and SS TA⁻¹ ratio and the increase in fruit TA as observed in the HLB+ sweet orange samples (BASSANEZI; MONTESINO; STUCHI, 2009). Despite the effect of the disease in the SS, TA and SS TA⁻¹ ratio (Table 4.2), all fruit samples met the minimum maturity standard required for commercial marketability of orange fruits, that ranges from 8 up to 10 °Brix, acidity between 0.6 and 1.4, and SS TA⁻¹ ratio from 7:1 up to 9.5:1 (CEAGESP, 2011; LADO; ZACARÍAS; RODRIGO, 2014; ALBRIGO; STELINSKI; TIMMER, 2019). These results demonstrated that even the HLB-affected sweet orange fruits could still be marketable at the point of the evaluations. However, the quality of these fruits can change with the advance of the disease in the citrus tree, consequently, the quality may decrease below the standard requirements for commercialization.

Other important aspect of citrus fruit quality relates to its essential oil content. The aroma and quality of the orange oil is determined by the combination and relative balance of volatile compounds (HOGNADÓTTIR; ROUSEFF, 2003; SUN et al., 2021). D-limonene is the most abundant volatile compound found in the citrus fruits and is a major contributor to the citrus flavor (BAI et al., 2014; PLOTTO; BAI; BALDWIN, 2017).

In our study, D-limonene was the dominant component of the peel oil of both sweet orange varieties, and the HLB disease apparently did not affect the biosynthesis pathway of this compound (Table 4.3). HLB also had no effect in D-limonene content of the Valencia sweet orange peel oil (SUN et al., 2021). Other major terpenes found in the sweet orange oil were α -pinene and β -myrcene, which also showed only minor changes in their concentration regarding HLB (Table 4.3). These results agree with the ones reported previously for Hamlin and Valencia sweet oranges, where the disease slightly influenced α -pinene and β -myrcene contents (XU et al., 2017a).

Although sweet orange essential oil has more than 90% terpenes (Table 4.4), only few terpenes display aroma activity, including α -pinene, β -myrcene, D-limonene, α -phellandrene, β -phellandrene, γ -terpinene, and (E)-caryophyllene, a sesquiterpene (HOGNADÓTTIR; ROUSEFF, 2003; QIAO et al., 2008). These terpenes give a relatively low intensity musty, green, and minty aroma to the peel oil (HOGNADÓTTIR; ROUSEFF, 2003).

In our study, most of the peel oil volatiles were decreased by HLB (Figures 4.2). Furthermore, this was confirmed by PCA analysis, in which most of the volatiles were associated with the healthy samples (Figure 4.3A; B). The stress associated with the increase in HLB severity in the citrus trees could substantially inhibit host secondary metabolism and certain volatile formation (XU et al., 2017a; SUN et al., 2021).

Aldehydes were decreased by HLB in both sweet oranges peel oil samples (Figure 4.2; Table 4.4). These compounds come from the enzymatic degradation products of the unsaturated fatty acids, and they are the major contributors to the sweet orange essential oil aroma. Further, they are considered one of the standards for the characterization of sweet orange peel oil (HOGNADÓTTIR; ROUSEFF, 2003; QIAO et al., 2008). Aldehydes contribute to the citrusy, floral, fatty, and green aromas (HOGNADÓTTIR; ROUSEFF, 2003). Terpene aldehydes, with strong aroma activity, include citronellal, neral, geranial, and β -sinensal (HOGNADÓTTIR; ROUSEFF, 2003), which were all decreased by HLB in all evaluated peel oil samples (Figure 4.2).

Previous research also showed that the development of the HLB disease in the citrus tree is associated with a significant reduction in aldehydes in the sweet orange peel oil, resulting in lower quality by the pharmaceutical standards (XU et al., 2017b; KIEFL et al., 2018; SUN et al., 2021). In our study, the lower concentration of citronellal, geranial and dodecanal in the oil samples from HLB+ fruits compared to the ones from HLB- (Table 4.3, Figure 4.2) was also observed for Hamlin and Valencia sweet

oranges (XU et al., 2017a; SUN et al., 2021). Aldehydes might be formed during the normal ripening of the sweet orange fruits (KIEFL et al., 2018). The reduction of key aldehydes in the peel oil due to HLB may negatively impact peel oil quality, as they are key aroma volatiles in the oil (SUN et al., 2021). A higher concentration of aldehydes generally means better-quality oils (SPADARO et al., 2012; XU et al., 2017b).

Besides the disease effect, aldehydes content in the peel oil was also influenced by the sweet orange cultivar. Hamlin IAC had higher amounts of aldehydes in the peel oil samples than Pera Morretes (Table 4.3; 4.4). Thus, Pera Morretes peel oil samples would be considered of lower quality than that of the Hamlin IAC. Hamlin IAC total aldehydes content is similar to the observed in previous studies (XU et al., 2017b). These differences are probably due to the citrus genotype, but no previous studies on the chemical composition of Pera selections peel oil are available.

HLB+ fruits had higher concentration of terpene oxides, as (Z,E)-Limonene oxide, compared with HLB- ones (Tables 4.3; 4.4). Some volatile compounds can increase in concentration during stress, so these compounds may have increased due to shifts in the biochemical pathways, and the oxidative stress that occurs in the HLB-symptomatic trees (XU et al., 2017a; SUN et al., 2021). Alcohols also contributed to the aroma of the peel oil, with linalool as one of the key aroma compounds, presenting a fruity and floral aroma (HOGNADÓTTIR; ROUSEFF, 2003; XU et al., 2017b). In our study, total alcohols, as well as linalool content, were found in higher concentration in the Pera Morretes samples compared to the Hamlin IAC ones. However, no effect of the HLB disease was observed in the accumulation of these compounds (Tables 4.3; 4.4).

There are other reasons besides the effect of disease in the differences observed in the physicochemical properties of the sweet orange samples (XU et al., 2017b). The quality of the citrus oil can also be affected by climatic condition, the citrus genotype and the fruit maturity at harvest (VEKIARI et al., 2002; ZOUAGHI et al., 2019; SUN et al., 2021). Furthermore, season to season and cultivar differences may also play a role in how HLB can affect volatile concentrations in the sweet orange peel oil (XU et al., 2017a). Therefore, the differences observed between the sweet orange varieties in our study can be due to the genotypes, as well as the harvest time, as Hamlin IAC is an early-season cultivar and was harvest in June, while the mid-season Pera Morretes was harvested in August, in a period of drought (Figure 4.1).

4.5 CONCLUSIONS

HLB disease changes Hamlin IAC and Pera Morretes fruit quality and the volatile profile of the peel oil. The disease reduces the fruit quality, by inducing smaller and greener fruits with thinner flavedo, lower juice yield and SS TA⁻¹ ratio, and higher acidity than healthy fruits.

Many volatile compounds are decreased by HLB in the peel oil, including some key aldehydes, and esters, while terpene oxides are increased by the disease. This indicates that HLB may cause shifts in some biochemical pathways, and oxidative stress in affected trees, that may negatively impact the peel oil quality.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULLAH, T. L.; SHOKROLLAH, H.; SIJAM, K.; ABDULLAH, S. N. A. Control of Huanglongbing (HLB) disease with reference to its occurrence in Malaysia. **African Journal of Biotechnology**, Victoria island, v.8, p.4007-4015, 2009.

AHMED, E. M.; DENNISON, R. A.; SHAW, P. E. Effect of selected oil and essence volatile components on flavor quality of pumpout orange juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 26, n. 2, p. 368-372, 1978.

ALBRECHT, U.; FIEHN, O.; BOWMAN, K. D. Metabolic variations in different citrus rootstock cultivars associated with different responses to Huanglongbing. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v.107, p.33-44, 2016.

ALBRIGO, L. G.; STELINSKI, L. L.; TIMMER, L. **Citrus**. 2nd ed. Boston: CABI, 2019. 324p.

ALLEN, R. G.; PEREIRA, L. S.; RAES, D.; SMITH, M. **Crop Evapotranspiration: Guidelines for Computing Crop Water Requirements**. FAO: Rome, 1998. 328p.

ALMEIDA, E. P. D.; JANEIRO, V.; GUEDES, T. A.; MULATI, F.; CARNEIRO, J. W. P.; NUNES, W. M. D. C. Modeling citrus huanglongbing data using a zero-inflated negative binomial distribution. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 38, n. 3, p. 299–306. 2016.

ALVES, M. N.; LOPES, S. A.; RAIOL-JUNIOR, L. L.; WULFF, N. A.; GIRARDI, E. A.; OLLITRAULT, P.; PEÑA, L. Resistance to '*Candidatus liberibacter asiaticus*,' the huanglongbing associated bacterium, in sexually and/or graft-compatible citrus relatives. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 11, p. 2166. 2021.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis of the AOAC International**. 21st ed. Arlington: AOAC International, 2019.

AULER, P. A. M.; LEITE JUNIOR, R. P.; TAZIMA, Z. H.; ANDRADE, P. F. S. A citricultura no Paraná. **Citricultura Atual**, Cordeirópolis, n.99, p. 17-20, 2014.

BAI, J.; BALDWIN, E.; HEARN, J.; DRIGGERS, R.; STOVER, E. Volatile profile comparison of USDA sweet orange-like hybrids versus 'Hamlin' and 'Ambersweet'. **HortScience**, Alexandria, v.49, n.10, p.1262-1267, 2014.

BALDWIN, E. A.; PLOTTO, A.; BAI, J.; MANTHEY, J.; ZHAO, W.; RAITHORE, S.; IREY, M. Effect of abscission zone formation on orange (*Citrus sinensis*) fruit/juice quality for trees affected by Huanglongbing (HLB). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.66, p.2877-2890, 2018.

BALDWIN, E.; PLOTTO, A.; MANTHEY, J.; MCCOLLUM, G.; BAI, J. IREY, M.; CAMERON, R.; LUZIO, G. Effect of Liberibacter infection (Huanglongbing disease) of citrus on orange fruit physiology and fruit/fruit juice quality: chemical and physical analyses. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.58, p.1247-1262, 2010.

BARRY, G. H.; CARUSO, M.; GMITTER JR, F. G. Commercial scion varieties. In: TALON, M.; CARUSO, M.; GMITTER JR, F. G. (Eds.). **The Genus Citrus**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2020. pp. 83–104.

BASSANEZI, R. B.; LOPES, S. A.; BELASQUE JÚNIOR, J.; SPÓSITO, M. B.; YAMAMOTO, P. T.; DE MIRANDA, M. P.; TEIXEIRA, D. C.; WULFF, N. A. Epidemiologia do *huanglongbing* e suas implicações para o manejo da doença. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v.31, n.1, p.11-23, 2010.

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

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

BASSANEZI, R. B.; MONTESINO, L. H.; STUCHI, E. S. Effects of huanglongbing on fruit quality of sweet orange cultivars in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.125, p.565-572, 2009.

BASTOS, D. C.; FERREIRA, E.A.; PASSOS, O. S.; FERREIRA DE SÁ, J.; ATAÍDE, E.M.; CALGARO, M. Cultivares copa e porta-enxertos para a citricultura brasileira. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.35, n.281, p.36-45, 2014.

BASTOS, D. C.; SOMBRA, K. E. S.; ANDRADE, H. M. Biometric evaluation of orange cultivars using different rootstocks in the semiarid region of Ceará, Brazil. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v. 38, n. 1, p. 71–76. 2017.

BEBER, P. M.; ÁLVARES, V. S.; KUSDRA, J. F. Qualidade industrial e maturação de frutos de laranjeiras-doce em Rio Branco, Acre. **Citrus Research and Technology**, Cordeirópolis, v.39, e-1030, 2018.

BEHLAU, F.; BELASQUE JÚNIOR, J.; BERGAMIN FILHO, A.; LEITE JÚNIOR, R. P. Incidência e severidade de cancro cítrico em laranja 'Pêra Rio' sob condições de controle químico e proteção com quebra-vento. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 4, 2007.

BEHLAU, F.; BELASQUE JÚNIOR, J.; GRAHAM, J. H.; LEITE JÚNIOR, R. P. Effect of frequency of copper applications on control of citrus canker and the yield of young bearing sweet orange trees. **Crop Protection**, Amsterdam, v. 29, p. 300–305. 2010.

BEHLAU, F. An overview of citrus canker in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 46, n. 1, p. 1–12. 2021.

BEHLAU, F.; BELASQUE JÚNIOR, J.; LEITE JÚNIOR, R. P.; FILHO, A. B.; GOTTWALD, T. R.; GRAHAM, J. H.; SCANDELAI, L. H. M.; PRIMIANO, I. V.; BASSANEZI, R. B.; AYRES, A. J. Relative contribution of windbreak, copper sprays, and leafminer control for citrus canker management and prevention of crop loss in sweet orange trees. **Plant Disease**, St. Paul, v. 105, 2097–2105. 2021.

BEHR, A.; JOHNNEN, L. Myrcene as a natural base chemical in sustainable chemistry: a critical review. **Chemistry & Sustainability Energy & Materials**, Weinheim, v. 2, n. 12, p. 1072-1095, 2009.

BELASQUE JUNIOR, J.; BERGAMIN FILHO, A.; BASSANEZI, R. B.; BARBOSA, J. C.; FERNANDES, N. G.; YAMAMOTO, P. T.; LOPES, S. A.; MACHADO, M. A.; LEITE JUNIOR, R. P.; AYRES, A. J.; MASSARI, C. A. Base científica para a erradicação de plantas sintomáticas e assintomáticas de Huanglongbing (HLB, Greening) visando o controle efetivo da doença. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 34, n.3, p.137-145, 2009.

BELASQUE JUNIOR, J.; FERNANDES, N. G.; MASSARI, C. A. O Sucesso da Campanha de Erradicação do Cancro Cítrico no Estado de São Paulo, Brasil. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 35, n. 2, p. 91-92, 2009.

BENNETT, C. W.; COSTA, A. S. Tristeza disease of citrus. **Journal of Agricultural Research**, Punjab, v.78, p. 207-237, 1949.

BITTERS, W.P.; COLE, D.A.; McMARTY, C.D. Facts about dwarf citrus trees. **Citrograph**, Los Angeles, v.64, n.3, p.54- 56, 1979.

BOCK, C. H.; GRAHAM, J. H.; GOTTWALD, T. R.; COOK, A. Z.; PARKER, P. E. Wind speed effects on the quantity of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* dispersed downwind from canopies of grapefruit trees infected with citrus canker. **Plant Disease**, St. Paul, v. 94, p. 725–736. 2010.

BOVÉ, J. M. Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. **Journal of Plant Pathology**, Pisa, v.88, n.1, p.7-37. 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento- Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa Nº 21, de 25 de abril de 2018. **Diário Oficial da União**, Brasília, 11 de maio de 2018. Nº. 90, seção 1, p. 9–12.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento-Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa Nº 53, de 16 de outubro de 2008. **Diário Oficial da União**, Brasília, 17 de outubro de 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento-Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria Nº 317, de 21 de maio de 2021. Institui o Programa Nacional de Prevenção e Controle à doença denominada Huanglongbing (HLB). **Diário Oficial da União**, Brasília, 25 de maio de 2021, 97.ed., seção: 1, p.17.

CAPUTO, M. M.; MOURÃO FILHO, F. A. A.; SILVA, S. R.; BREMER NETO, H.; COUTO; H. T. Z.; TUCHI, E. S. Seleção de cultivares de laranja doce de maturação precoce por índices de desempenho. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.47, n.11, p.1669-1672, 2012.

CARMONA, L.; ZACARÍAS, L.; RODRIGO, M. J. Stimulation of coloration and carotenoid biosynthesis during postharvest storage of 'Navelina' orange fruit at 12 °C. et al. **Postharvest Biology and Technology**. Amsterdam, v.74, p.108-117, 2012.

CARUSO, M.; SMITH, M. W.; FROELICHER, Y.; RUSSO, G.; GMITTER JR, F. G. Traditional breeding. In: TALON, M.; CARUSO, M.; GMITTER JR, F. G. (Eds.). **The Genus Citrus**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2020. pp. 129-144.

CARVALHO, D. U.; NEVES, C. S. V. J.; CRUZ, M. A.; COLOMBO, R. C.; YADA, I. F. U.; LEITE JUNIOR, R. P.; TAZIMA, Z. H. Performance of 'Salustiana' sweet orange on different rootstocks under Brazilian subtropical conditions. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 287, p. 110226. 2021.

CARVALHO, S. A.; CARVALHO NUNES, W. M.; BELASQUE JR, J.; MACHADO, M. A.; CROCE-FILHO, J.; BOCK, C. H.; ABDO, Z. Comparison of resistance to Asiatic citrus canker among different genotypes of citrus in a long-term canker-resistance field screening experiment in Brazil. **Plant Disease**, St. Paul, v. 99, n. 2, p. 207–218. 2015a.

CARVALHO, S. A.; LATADO, R. R.; SILVA, L. F. C.; MULLER, G. W. Agronomic performance of thirty-two Clones of 'Pera' sweet orange in São Paulo State, Brazil. **ISHS Acta Horticulturae**, Estados Unidos, v.1065, p. 281-291, 2015b.

CASTLE, W. S. A. career perspective on Citrus rootstocks, their development, and commercialization. **HortScience**, Alexandria, v. 45, n. 1, p. 11–15. 2010.

CASTLE, W. S; BALDWIN, J. C. Young-tree performance of juvenile sweet orange scions on swingle citrumelo rootstock. **HortScience**, Alexandria, v.456, n.4, p.541–552, 2011.

CASTLE, W. S; BALDWIN, J. C.; MURARO, R. P. Performance of 'Valencia' sweet orange trees on 12 rootstocks at two locations and an economic interpretation as a basis for rootstock selection. **HortScience**, Alexandria, v.45, n.4, p.523–533, 2010.

CASTRO, M. E. A.; BEZERRA, A. R.; LEITE, W. A.; MUNDIN FILHO, W.; NOGUEIRA, N. D. Situação e ações do estado de Minas Gerais frente ao huanglongbing. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v. 31, p.163-168, 2010.

CDA. Coordenadoria de Defesa Agropecuária – Governo do Estado de São Paulo. **Dados da citricultura Paulista**. 2021. Disponível em: <<https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/www/gdsv/index.php?action=dadosCitriculturaPaulista>>. Acesso em: 20 maio de 2022.

CEAGESP. Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais do estado de São Paulo. **Normas de classificação de citros de mesa**: Programa Brasileiro para Modernização da Horticultura. São Paulo: CEAGESP, 2011. 12 p.

CITRI. Citri Agroindustrial S/A. **Produtos**. 2022. Disponível em: <<http://www.citri.com.br/mobile/produtos.php>>. Acesso em: 05 maio de 2022.

CHAUDHARY, P. R.; JAYAPRAKASHA, G. K.; PATIL, B. S. Identification of volatile profiles of Rio Red grapefruit at various developmental to maturity stages. **Journal of essential oil research**, United Kingdom, v. 30, n. 2, p. 77-83, 2017.

CHIN, E. L.; MISHCHUK, D. O.; BREKSA, A. P.; SLUPSKY, C. M. Metabolite Signature of *Candidatus Liberibacter asiaticus* Infection in Two Citrus Varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 62, p. 6585-6591, 2014.

COLETTA-FILHO, H. D.; CARLOS, E. F.; LOTTO, L. L.; LUCIANE, F. C.; ALVES, K. C. S.; PEREIRA, M. A. R.; MACHADO, M. A. Prevalence of *Candidatus Liberibacter* spp. In HLB-diseased citrus plants in São Paulo State, Brazil. **Proceedings of the Seventeenth International Organization of Citrus Virologists**, Adana, v.10, p.110-115, 2007.

COLETTA-FILHO, H.D.; TARGON, M. L. P. N.; TAKITA, M. A.; NEGRI, J. D.; POMPEU, JUNIOR, J.; MACHADO, M. A. First Report of the Causal Agent of Huanglongbing ("*Candidatus Liberibacter asiaticus*") in Brazil. **Plant Disease**, Cordeiropolis, v. 88, n. 12, p. 1382, 2004.

COUTO, M. A. L.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G. Quantificação de vitamina C e capacidade antioxidante de variedades cítricas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 1, p. 15-19, 2010.

CRUZ, M. A.; NEVES, C. S. V. J.; CARVALHO, D. U.; COLOMBO, R. C.; BAI, J.; YADA, I. F. U.; LEITE JÚNIOR, R. P.; TAZIMA, Z. H. Five Rootstocks for "Emperor" Mandarin Under Subtropical Climate in Southern Brazil. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 12, p. 777871. 2021.

CRUZ, M. A.; NEVES, C. S. V. J.; CARVALHO, D. U.; COLOMBO, R. C.; LEITE, R. P.; TAZIMA, Z. H. 'Navelina' sweet orange trees on five rootstocks in Northern Parana state, Brazil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.41, n. 3, p. e-006, 2019.

CRONJÉ, P. J.; ZACARÍAS, L.; ALFÉREZ, F. Susceptibility to postharvest peel pitting in Citrus fruits as related to albedo thickness, water loss and phospholipase activity. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 123, p. 77–82. 2017.

CROWELL, P. L.; AYOUBI, A. S.; BURKE, Y. D. Antitumorigenic effects of limonene and perillyl alcohol against pancreatic and breast cancer. **Dietary phytochemicals in cancer prevention and treatment**, Washington, p. 131-136, 1996.

DA GRAÇA, J. V. Biology, history and world status of Huanglongbing. **I Taller Internacional sobre Huanglongbing de los cítricos (*Candidatus Liberibacter***

spp.) y el psílido asiático de los cítricos (*Diaphorina citri*), Hermosillo, p. 1-7, 2008.

DAGULO, L.; DANYLUK, M. D.; SPANN, T. M.; VALIM, M. F.; GOODRICH-SCHNEIDER, R.; SIMS, C.; ROUSEFF, R. Chemical characterization of orange juice from trees infected with citrus greening (Huanglongbing). **Journal of Food Chemistry**, Kidlington, v.75, n.2, p.199-207, 2010.

DALA-PAULA, B. M.; PLOTTO, A.; BAI, J.; MANTHEY, J. A., BALDWIN, E. A., FERRAREZI, R. S., GLORIA, M. B. A. Effect of Huanglongbing or greening disease on orange juice quality, a Review. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v.9, p.1976, 2019.

DALA-PAULA, B. M., RAITHORE, S., MANTHEY, J. A., BALDWIN, E. A., BAI, J., ZHAO, W. GLORIA, M. B. A., PLOTTO, A. Active taste compounds in juice from oranges symptomatic for Huanglongbing (HLB) citrus greening disease. **Food Science and Technology**, Campinas, v.91, p.518-525, 2018.

DENG, G.; CRAFT, J. D.; STEINBERG, K. M.; LI, P. L.; POKHAREL, S. K.; SETZER, W. N. Influence of different isolation methods on chemical composition and bioactivities of the fruit peel oil of citrus medica L. var. sarcodactylis (Noot.) Swingle. **Medicines**, Basel, v.4, n.1, p. 2-11, 2017.

DI GIORGI, F.; IDE, B. Y.; DIB, K.; MARCHI, R. J.; TRIBONI, H. R.; WAGNER, R. L. Contribuição ao estudo do comportamento de algumas variedades de citros e suas implicações agroindustriais. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 11, n. 2, p. 567-612, 1990.

DOMINGUES, A. R.; MARCOLINI, C. D. M.; GONÇALVES, C. H. D. S.; RESENDE, J. T. V. D.; ROBERTO, S. R.; CARLOS, E. F. Rootstocks genotypes impact on tree development and industrial properties of 'Valencia' sweet orange juice. **Horticulturae**, Basel, v. 7, n. 6, p. 141. 2021.

DONADIO, L. C. **Laranja Pêra**. Jaboticabal: FUNEP, 1999. 51p. (Boletim Citrícola, 11).

DONADIO, L. C.; ALVES, F. A.; MOURÃO FILHO F. A. A.; MOREIRA, C. S. Centros de origem, distribuição geográfica das plantas cítricas e histórico da citricultura no Brasil. In: MATTOS JUNIOR, D. M.; NEGRI, J. D.; PIO, R. M. POMPEU JUNIOR, J.(Ed.). **Citros**. 1. ed. Campinas: Instituto Agrônômico e FUNDAG, 2005. pp. 3-15.

DONADIO, L. C.; LEDERMAN, I. E.; ROBERTO, S. R.; STUCCHI, E. S. Dwarfing-canopy and rootstock cultivars for fruit trees. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 41, n. 3, p. e-997, 2019.

DUGO, G.; MONDELLO, L. Citrus Oil: Composition, Advanced Analytical Techniques, Contaminants, and Biological Activity. Boca Raton: CRC Press, 2011. pp. 592.

EMMANOUILIDOU, M. G., KYRIACOU, M. C. Rootstock-modulated yield performance, fruit maturation and phytochemical quality of 'Lane Late' and 'Delta' sweet orange. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 225, p. 112–121. 2017.

FAN, J.; CHEN, C.; BRLANSKY, R. H.; GMITTER JR., F. G.; LI, Z. G. Changes in carbohydrate metabolism in *Citrus sinensis* infected with '*Candidatus Liberibacter asiaticus*'. **Plant Pathology**, Italy, v. 59, p.1037-1043, 2010.

FANCELLO, F.; PETRETTO, G. L.; MARCEDDU, S.; VENDITTI, T.; PINTORE, G.; ZARA, G.; MANNAZZU, I.; BULDRONI, M.; ZARA, S. Antimicrobial activity of gaseous Citrus limon var pompia leaf essential oil against *Listeria monocytogenes* on ricotta salata cheese. **Food Microbiology**, France, v. 87, p.103386, 2020.

FAO. Food Agricultural Organization. **Crops and livestock products 2020**. Disponível em: < <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize> >. Acesso em: 05 maio 2022.

FERRAREZI, R. S.; VINCENT, C. I.; URBANEJA, A; MACHADO, M. A. Editorial: Unravelling Citrus Huanglongbing Disease. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 11, p. 609655, 2020.

FUNDECITRUS. Fundo de Defesa da Citricultura. **Tree inventory of the São Paulo and West-Southwest Minas Gerais citrus belt**: snapshot of groves in March 2021. Araraquara: Fundecitrus, 2021. 103p.

FUNDECITRUS. Fundo de Defesa da Citricultura. **Doenças e pragas**. 2022a. Disponível em: <<https://www.fundecitrus.com.br/doencas/Araraquara>>. Acesso em: 05 maio 2022.

FUNDECITRUS. Fundo de Defesa da Citricultura. **Levantamento da incidência das doenças dos citros**: greening, CVC e cancro cítrico. Araraquara, SP: Fundecitrus, 2022b. 75 p.

GIAMPANI, J. S.; TAZIMA, Z. H.; BABA, V. Y.; YADA, I. F. U.; LEITE JUNIOR, R. P. Citrus tristeza disease severity and agronomic performance of 'Pera' sweet orange cultivars and selections in the North and Northwest regions of the State of Paraná, Brazil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.38, n.3 p.e-073, 2016.

GIAMPANI, J. S.; SANTOS, K. S.; SILVA, C. C.; MOLINA, R. O.; RODRIGUES, L. K.; EIRAS, M.; TAZIMA, Z. H.; LEITE JÚNIOR, R. P. Severity and genetic diversity of Citrus tristeza virus complexes infecting 'Pêra Bianchi' sweet orange in Paraná, Brazil. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 43, p.59-68, 2018.

GOULD, M. N. Cancer chemoprevention and therapy by monoterpenes. **Environmental Health Perspectives**, Durham, v. 105, n. 4, p. 977-979, 1997.

GONZALEZ-MAS, M. C.; RAMBLA, J. L.; LÓPEZ-GRESA, M. P.; BLÁZQUEZ, M. A.; GRANELL, A. Volatile Compounds in *Citrus* Essential Oils: A Comprehensive Review. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 10, n. 12, p. 1-18, 2019.

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

GOTTWALD, T. R.; BASSANEZI, R. B.; AMORIM, L.; BERGAMIN-FILHO, A. Spatial pattern analysis of citrus canker-infected plantings in São Paulo, Brazil, and augmentation of infection elicited by the Asian leafminer. **Phytopathology**, Saint Paul, v.97, p.674-683, 2007.

GRAHAM, J.; GOTTWALD, T.; SETAMOU, M. Status of Huanglongbing (HLB) outbreaks in Florida, California and Texas. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v.45, p. 265-278, 2020.

GUARDIOLA, J. L.; MONERRI, C.; AGUSTÍ, M. The inhibitory effect of gibberellic acid on flowering in Citrus. **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 62, p. 297-302. 1982.

HALBERT, S. The discovery of huanglongbing in Florida. **Proceedings of the 2nd international citrus canker and huanglongbing research workshop**, Florida, v.2, p.50, 2005.

HALL, D. G.; GOTTWALD, T. R.; BOCK, C. H. Exacerbation of citrus canker by citrus leafminer *Phyllocnistis citrella* in Florida. **Florida Entomologist**, Lutz, v.93, p.558-566, 2010.

HOGNADÓTTIR, Á.; ROUSEFF, R. L. Identification of aroma active compounds in orange essence oil using gas chromatography–olfactometry and gas chromatography– mass spectrometry, **Journal of Chromatography A**, Netherlands, v. 998, p. 201-211, 2003.

HUNG, W. L.; WANG, Y. Metabolite profiling of *Candidatus Liberibacter* infection in Hamlin sweet oranges. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. Chichester, v.66, p.3983-3991, 2018.

HAYES, J. D.; PULFORD, D. J. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the Isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance part I. **Critical reviews in biochemistry and molecular biology**, London, v. 30, n. 6, p. 445-520, 1995.

IAPAR. Instituto Agronômico do Paraná. **A Citricultura no Paraná**, 1st ed. Londrina: IAPAR. 1992.

IDR-PARANÁ. Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná. **Estações meteorológicas**. Disponível em: <<http://www.idrparana.pr.gov.br/Pagina/Dados-Meteorologicos-Historicos-e-Atuais>>. Acesso em: 16 fev. de 2022.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. 2021. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/Tabela/1618>>. Acesso em: 05 maio de 2022.

INTEGRADA. Cooperativa Agroindustrial Integrada. **Unidade Industrial de Sucos**. 2022. Disponível em: <<https://www.integrada.coop.br/industria-sucos.xhtml>>. Acesso em: 05 maio de 2022.

JAGOUEIX, S.; BOVÉ, J.M.; GARNIER, M. The phloem-limited bacterium of Greening is a member of the alpha subdivision of the proteobacteria. **International Journal of Systemic Bacteriology**, England, v.44, p.379-386, 1994.

JAYAPRAKASHA, G. K.; PATIL, B. S. In vitro evaluation of the antioxidant activities in fruit extracts from citron and blood orange. **Food Chemistry**, Barking, v. 101, n. 1, p. 410-418, 2007.

JIMENEZ-CUESTA, M.; CAYUELA, C. J.; MARTINEZ-JAVEGA, J.M. **Teoría y Practica de la Desverdización de Los Cítricos**. Madrid, Spain: INIA, 1983. pp. 22.

JOMORI, M. L. L.; BERNO, N. D.; KLUGE, R. A. Ethylene application after cold storage improves skin color of 'Valencia' oranges. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.38, n. 4, p. e-639, 2016.

JOMORI, M. L. L.; SASAKI, F. F. C. S.; BERNO, N. D.; GIMENES, L. C.; KLUGE, R. A. Desverdecimento e armazenamento refrigerado de tangor 'Murcott' em função de concentração e tempo de exposição ao etileno. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 35, n. 2, p. 825-834, 2014.

KIEFL, J.; KOHLENBERG, B.; HARTMANN, A.; OBST, K.; PAETZ, S.; KRAMMER, G. E.; TRAUTZSCH, S. Investigation on key molecules of Huanglongbing (HLB)-induced orange juice off-flavor. **Journal of Food Chemistry**, Kidlington, v.66, p.2370-2377, 2018.

KLIMCZAK, I.; MALECKA, M.; SZLACHTA, M.; GLISZCZYNSKA-SWIGLO, A. Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. **Journal of Food Composition and Analysis**, London, v. 20, n. 3-4, p. 313-322, 2007.

KOLTUNOW, A. M.; SOLTYS, K.; NITO, N.; McCLURE, S. Anther, ovule, seed, and nucellar embryo development in *Citrus sinensis* cv. Valencia. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 73, p. 1567-1582. 1995.

LADANIYA, M. S. **Citrus fruit: biology, technology and evaluation**. San Diego: Elsevier Academic Press, 2008. 558p.

LADO, J.; ZACARÍAS, L.; RODRIGO, M. J. Maturity indicators and citrus quality. **Stewart Postharvest Review**, United Kingdom, v.10, p. 1-6, 2014.

LARACH, J. O. I.; CARDOSO, A.; DE CARVALHO, A. P.; HOCHMÜLLER, D. P.; MARTINS, J. S.; RAUEN, M. D. J.; FASOLO, P. J.; PÖTTER, R. O. **Levantamento de Reconhecimento dos Solos do Estado do Paraná**. Recife: Embrapa Solos, 1984.

LARANJEIRA, F. F.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; COLETTA FILHO, H. D. Fungos, procariotos e doenças abióticas. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JÚNIOR, J. (Eds.). **Citros**. Campinas: IAC/FUNDAG, 2005. p. 511-558.

LATADO, R. R.; TULMANN NETO, A. T.; ANDO, A.; IEMMA, A. F.; POMPEU JUNIOR, J.; FIGUEIREDO, J. O.; PIO, R. M.; MACHADO, M. A.; NAMEKATA, T.;

CERAVOLO, L.; ROSSI, A. C. Mutantes de laranja 'Pêra' com número reduzido de sementes obtidos através de mutações induzidas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.23, n.2, p.339-344, 2001.

LATADO, R. R.; TULMANN NETO, A. T.; POMPEU JUNIOR, J.; FIGUEIREDO, J. O.; PIO, R. M.; MACHADO, M. A.; NAMEKATA, T.; CERAVOLO, L.; MONTES, S. M. N. M.; ROSSI, A. C. Seedless and citrus canker tolerant mutant clones in sweet orange induced by gamma rays. Short Communication. **Plant Mutation Reports**, Vienna, v.1, n.2, p.21-22, 2006.

LDC. Louis Dreyfus Company. **Alimentos e Bebidas**. 2022. Disponível em: <<https://www ldc.com/br/pt/product/suco-de-frutas/>>. Acesso em: 05 maio de 2022.

LEITE JUNIOR, R. P. Cancro cítrico no Estado do Paraná. **Laranja**, Cordeirópolis, v.10, n.2, p.489-502, 1989.

LEITE JUNIOR, R. P. **Cancro cítrico**: prevenção e controle no Paraná. Londrina: IAPAR, 1990. 51p. (IAPAR. Circular Técnica, 61).

LEITE JUNIOR, R. P. Cultivares de copa e porta-enxertos. In: CARVALHO, S. L. C. **A Citricultura no Paraná**. Londrina: IAPAR, 1992. p. 91-116. (IAPAR. Circular Técnica 72).

LEITE JUNIOR, R. P.; MOHAN, S. K. Integrated management of the citrus bacterial canker disease caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri* in the State of Paraná, Brazil. **Crop Protection**, Guildford, v.9, n.1, p.3-7, 1990.

LIAO, H.L.; BURNS, J. K. Gene expression in *Citrus sinensis* fruit tissues harvested from huanglongbing-infected trees: comparison with girdled fruit. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.63, n. 8, p. 3307-3319, 2012.

LI, Q.; LI, T.; BALDWIN, E. A.; MANTHEY, J. A.; PLOTTO, A.; ZHANG, Q.; GAO, W.; BAI, J.; SHAN, Y. Extraction method affects contents of flavonoids and carotenoids in huanglongbing-affected "valencia" orange juice. **Foods**, Basel, v.10, n.4, p.783, 2021.

LI, S.; WU, F.; DUAN, Y.; SINGERMAN, A.; GUAN, Z. Citrus greening: management strategies and their economic impact. **HortScience**, Alexandria, v.55, n.5, p.604-612, 2020.

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

LOPES, S. A.; FRARE, G. F.; BERTOLINI, E.; CAMBRA, M.; FERNANDES, N. G.; AYRES, A. J.; BOVÉ, J. M. Liberibacters associated citrus huanglongbing in Brazil: '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' is heat tolerant, '*Ca. L. americanus*' is heat sensitive. **Plant Disease**, St. Paul, v.93, p.257-262, 2009.

LOTA, M. L.; SERRA, D. R.; TOMI, F.; JACQUEMOND, C.; CASANOVA, J. Volatile components of peel and leaf oils of lemon and lime species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.50, p.796-805, 2002.

MACHADO, M. A.; TEÓFILO SOBRINHO, J. IAC na bioeconomia da citricultura brasileira. **O Agrônomo**, Campinas, v.68, 2016. Disponível em: <<http://oagronomico.iac.sp.gov.br/?p=16>>. Acesso em: 13 jun. 2021.

MASSENTI, R.; BIANCO, R. L.; SANDHU, A. K.; GU, L.; SIMS, C. Huanglongbing modifies quality components and flavonoid content of 'Valencia' oranges. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. Chichester, v.96, p.73-78, 2016.

MCCOLLUM, G.; BALDWIN, E. Huanglongbing: Devastating disease of citrus. In: JANICK, J. (Ed.). **Horticultural Reviews**. Hoboken: JOHNWILEY AND SONS, 2017. p.315-361.

McGUIRE, R. G. Reporting of objective color measurements. **HortScience**, Alexandria, v. 27, p. 1254–1255. 1992.

MENDEL, K. Rootstock-scion relationships in Shamouti trees on light soil. **Ktavim**, Rehovot, v. 6, p. 35-60, 1956.

MEISSNER FILHO, P. E.; SOARES FILHO, W. S.; VELAME, K. V. C.; DIAMANTINO, E. P.; DIAMANTINO, M. S. A. S. Reação de porta-enxertos híbridos ao Citrus tristeza virus. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.27, n.3, p.312-315, 2002.

MOREIRA, A. S.; STUCHI, E. S.; SILVA, P. R.; BASSANEZI, R. B.; GIRARDI, E. A.; LARANJEIRA, F. F. Could tree density play a role in managing Citrus huanglongbing epidemics?. **Tropical Plant Pathology**, Brasília v. 44, p.268-274, 2019.

MURRAY, M. G.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.8, n.19, p.4321–4325. 1980.

NEGRI, J. D.; STUCHI, E. S.; BLASCO, E. E. A. Planejamento e implantação do pomar cítrico. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JÚNIOR, J. (Eds.). **Citros**. Campinas: IAC/FUNDAG, 2005. p. 411-424.

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; MILAN, P.; LOPES, F. F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. **O Retrato da Citricultura Brasileira**. Ribeirão Preto: CitrusBR, 2010. 137p.

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; NETO, L. C. M.; KALAKI, R. B. **Orange juice chain: past, presente and future**. África do Sul: Kaap Agri. 2019. 179p.

NUNES, W. M. C.; SOUZA, E. B.; LEITE JUNIOR, R. P.; SALVADOR, C. A.; RINALDI, D. A.; CROCE FILHO, J.; PAIVA, P. G. Plan of action for the control of Huanglongbing in the Paraná state, Brazil. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v. 31, p. 169–177, 2010.

OECD - ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **International Standards for Fruit and Vegetables: Citrus**, 1st ed. Paris: OECD, 2010.

OIKEH, E. I.; AYEVBUMWAN, M.; IRABOR, F.; OIKEH, A. O.; OVIASOGIE, F. E.; OMOREGIE, E. S. Evaluation of the phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of oil and non-oil extracts of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck Seeds. **Preventive Nutrition and Food Science**, Busan, v.25, p. 280-285, 2020.

OYEDEJI, A. O.; OKUNOWO, W. O.; OSUNTOKI, A. A.; OLABODE, T. B.; AYO-FOLORUNSO, F. Insecticidal and biochemical activity of essential oil from *Citrus sinensis* peel and constituents on *Callosobruchus maculatus* and *Sitophilus zeamais*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, United States, v.168, p. 104643, 2020.

PASSOS, O. P.; BOSWELL, S. B. A review of citrus tree spacing. **Citrograph**, Los Angeles, v. 64, n. 9, p. 211-218, 1979.

PAULA, M. C. M. S.; CARVALHO, D. U.; CRUZ, M. A.; LONGHI, T. V.; TAZIMA, Z. H.; BEHLAU, F.; CARVALHO, S. A.; LEITE JUNIOR, R. P. Agronomic Performance of Sweet Orange Genotypes under the Brazilian Humid Subtropical Climate. **Horticulturae**, Basel, v.8, n.4, p. 254, 2022.

PEARCE, S. C.; DOBERŠEK-URBANC, S. The measurement of irregularity in growth and cropping. **Journal of Horticultural Sciences**, v. 42, p. 295–305. 1967.

PEREZ-CACHO, P. R.; ROUSEFF, R. Processing and storage effects on orange juice aroma: A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 56, p. 9785-9796, 2008.

PIMENTEL, C. V. M. B.; FRANCKI, V. M.; GOLLÜCKE, A. P. B. **Alimentos funcionais**: Introdução as principais substâncias bioativas em alimentos. São Paulo: Ed. Varela, 2005. 95 p.

PIO, R. M.; FIGUEIREDO, J. O.; STUCHI, E. S.; CARDOSO, S. A. B. Variedades copas. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JÚNIOR, J. (Eds.). **Citros**. Campinas: IAC/FUNDAG, 2005. p. 37-60.

PLOTTO, A.; BAI, J.; BALDWIN, E. Fruits. In: A. BUETTNER (Ed.). **Springer Handbook of Odor**. Switzerland: Springer-Verlag, 2017. p. 171-190.

PLOTTO, A.; BALDWIN, E.; MCCOLLUM, G.; MANTHEY, J.; NARCISO, J.; IREY, M. Effect of *Liberibacter* infection (huanglongbing or greening disease) of citrus on orange juice flavor quality by sensory evaluation. **Journal of Food Science**, Malden, v.75, n.4, p.220–230, 2010.

PLOTTO, A.; MARGARÍA, C. A.; GOODNER, K. L.; BALDWIN, E. Odour and flavour thresholds for key aroma components in an orange juice matrix: esters and miscellaneous compounds. **Flavour and Fragrance Journal**, Switzerland, v. 23, p. 398-406, 2008.

POMPEU JUNIOR, J.; BLUMER, S. Morte súbita dos citros: suscetibilidade de seleções de limão-cravo e uso de interenxertos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.30, n.4, p.1159-1161, 2008.

POZZAN, M.; TRIBONI, H. R. Colheita e qualidade do fruto. In: MATTOS JUNIOR, D. M.; NEGRI, J. D.; PIO, R. M. POMPEU JUNIOR, J. (Eds.). **Citros**. 1 ed. Campinas: Instituto Agronômico e Fapesp, 2005. p. 800-822.

QIAO, Y.; XIE, B. J.; ZHANG, Y.; ZHANG, Y.; FAN, G.; YAO, X. L.; PAN, S. Y. Characterization of aroma active compounds in fruit juice and peel oil of Jinchen sweet orange fruit (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) by GC-MS and GC-O. **Molecules**, Basel, v.13, p. 1333-1344, 2008.

RAITHORE, S.; DEA, S.; PLOTTO, A.; BAI, J.; MANTHEY, J.; NARCISO, J.; ET AL. (2015). Effect of blending Huanglongbing (HLB) disease affected orange juice with juice from healthy orange on flavor quality. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 62, n. 2, p.868-874, 2015.

RAITHORE, S.; KIEFL, J.; MANTHEY, J. A.; PLOTTO, A.; BAI, J.; ZHAO, W.; BALDWIN, E. Mitigation of off-flavor in huanglongbing-affected orange juice using natural citrus non-volatile compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.68, n.4, p.1038-1050, 2020.

RAMOS, Y. C.; FADEL, A. L.; NETO, H. B.; CAPUTO, M. M.; STUCHI, E. S.; MOURÃO FILHO, F. D. A. A. Mid-season sweet oranges for fresh and processing markets in Brazil. **Experimental Agriculture**, Cambridge, v. 57, n. 1, p. 15–32. 2021.

ROBERTO, S.R.; DONADIO, L.C.; SEMPIONATO, O.; CABRITA, J.R.M.; DE NEGRI, J.D. Tree growth in high densities and costs for citrus planting in Brazil. **Proceedings of the International Society of Citricultura**, Acireale, v. 7, p.721-722, 1992.

RODRIGUES, J. D. B.; MOREIRA, A. S.; STUCHI, E. S.; BASSANEZI, R. B.; LARANJEIRA, F. F.; GIRARDI, E. A. Huanglongbing incidence, canopy volume, and sprouting dynamics of 'Valencia' sweet orange grafted onto 16 rootstocks. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 45, n. 6, p. 611–619. 2020.

ROSSETTI, V. Citrus canker in Latin America: a review. **Proceedings of the International Society of Citriculture**, Riverside, v.3, p.918-924, 1977.

ROISTACHER, C. N.; BLUE, R. L.; NAUER, E. M.; CALAVAN, E. C. Suppression of tristeza virus symptoms in Mexican lime seedlings grown at warm temperatures. **The Plant Disease Reporter**, United States, v.58, p.757-760, 1974.

SALIBE A. A.; TEÓFILO SOBRINHO J.; MULLER G. W. Sinopse de conhecimentos e pesquisas sobre a laranja 'Pêra'. **Laranja**, Cordeirópolis, v.23, n.1, p.231-245, 2002.

SANTOS, C. F. O cancro cítrico: ocorrência no Brasil e seu controle. In: RODRIGUES, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JUNIOR, J.; AMARO, A. A. (Eds.). **Citricultura Brasileira**. Campinas: Fundação Cargill, 1991, p. 787- 823.

SANTOS, D.; MATARAZZO, P. H. M.; SILVA, D. F. P.; SIQUEIRA, D. L.; SANTOS, D. C. M.; LUCENA, C. C. Caracterização físico-química de frutos cítricos apirênicos

produzidos em Viçosa, Minas Gerais. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 57, n.3, p. 393-400, 2010.

SÃO PAULO. Resolução da Secretaria de Agricultura e Abastecimento (SAA) nº 43, 25 de junho de 2009. **Diário Oficial do Estado de São Paulo**, 27 de junho de 2009, seção 1, p. 47.

SAWAMURA, M. Citrus essential oils flavor and fragrance. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. 2010, pp. 381.

SEAB. Secretaria da Agricultura e do Abastecimento. **Diagnóstico agropecuário paranaense - safra 2019/2020**. 2022. Disponível em: <<https://www.agricultura.pr.gov.br/Pagina/Diagnostico-Agropecuario-Paranaense>>. Acesso em: 05 maio de 2022.

SINGH, K. K.; REDDY, B. S. Post-harvest physico-mechanical properties of orange peel and fruit. **Journal of Food Engineering**, Kidlington, v. 73, p.112-120, 2006.

SPADARO, F.; COSTA, R.; CIRCOSTA, C.; OCCHIUTO, F. Volatile Composition and Biological Activity of Key Lime *Citrus aurantifolia* Essential Oil. **Natural Product Communications**, United States, v.7, n.11, p.1523-1526, 2012.

SPREEN, T. H.; BROWN, M. G.; MURARO, R. P. The projected impact of citrus greening in Sao Paulo and Florida on processed orange production and price. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Florida, v. 120, p. 132–135. 2007.

SPREEN, T. H.; GAO, Z.; FERNANDES JUNIOR, W.; ZANSLER, M. L. Global economics and marketing of citrus products. In: TALON, M.; CARUSO, M.; GMITTER JR, F. G. (Eds.). **The Genus Citrus**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2020. pp. 471-493.

STOVER, E.; CASTLE, W. S.; SPYKE, P. The citrus grove of the future and its implications for huanglongbing management. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Florida, v.121, p.155-159, 2008.

STUCHI, E. S. Controle do tamanho de plantas cítricas. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v.33, n.2, p.91-112, 2012.

STUCHI, E. S.; GIRARDI, E. A.; SILVA, S. R.; PAROLIN, L. G.; MÜLLER, G. W.; DONADIO, L. C. Performance of field-selected clones of Pera sweet orange in Northern São Paulo state, Brazil. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v. 41, p.e1061, 2020.

SUN, X.; YANG, H.; ZHAO, W.; BOURCIER, E.; BALDWIN, E. A.; PLOTTO, A.; IREY, M.; BAI, J. Huanglongbing and foliar spray programs affect the chemical profile of 'Valencia' orange peel oil. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v.12, p. 611449, 2021.

TADEO, F. R.; TEROL, J.; RODRIGO, M. J.; LICCIARDELLO, C.; SADKA, A. Fruit growth and development. In: TALON, M.; CARUSO, M.; GMITTER JUNIOR, F. G. (Eds.). **The Genus Citrus**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2020. pp. 245–269.

TANAKA, F. A. O.; KITAJIMA, E. W.; MACHADO, M. A.; MACHADO, S. R. Ontogênese de caneluras em pedúnculo de flores de laranjeira infectados pelo vírus da tristeza dos citros estirpe "Capão Bonito". **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.35, n.4, p.316-321, 2009.

TAZIMA, Z. H.; LEITE JUNIOR, R. P. Novas Cultivares de Citros. **Synergismus científica UTFPR**, Pato Branco, v.13, n.1, p. 49-52, 2018.

TAZIMA, Z. H.; NEVES, C. S. V. J.; YADA, I. F. U.; LEITE JUNIOR, R. P. Produção e qualidade dos frutos de clones de laranjeira 'Pera' no norte do Paraná. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.32, n.1, p.189-195, 2010.

TAZIMA, Z. H.; NEVES, C. S. V. J.; YADA, I. F. U.; LEITE JUNIOR, R. P. Performance of 'Oktisu' satsuma mandarin trees on different rootstocks in Northwestern Paraná state. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.35, p.2297-2308, 2014.

TAZIMA, Z. H.; NEVES, C. S. V. J.; YADA, I. F. U.; LEITE JUNIOR, R. P. Performance of Pera sweet orange clones in clay soils in Southern Brazil. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v. 37, p. 37-46, n. 1, 2016.

TEIXEIRA, D. C.; AYRES, A. J.; KITAJIMA, E. W.; TANAKA, F. A. O.; JAGOUÉIX-EVEILLARD, S.; SAILLARD, S.; BOVÉ, J. M. First report of a huanglongbing-like disease of citrus in São Paulo State, Brazil, and association of a new liberibacter species, *Candidatus Liberibacter americanus*, with the disease. **Plant Disease**, St Paul, v.89, p.107, 2005.

TEÓFILO SOBRINHO, J.; POMPEU JR., J.; FIGUEIREDO, J.O.; GUIRADO, N.; BARBIN, D. Resultados de experimento de clones de laranja 'Pera' enxertados sobre limão Cravo. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 9, p.209-223, 1988.

TING, S. V.; ROUSEFF, R. L. **Citrus fruits and their products**: analysis and technology. New York: MERCEL DEKKER, INC. 1986. 293 p.

TRIPOLI, E.; LA GUARDIA, M.; GIAMMANCO, S.; DI MAJO, D.; GIAMMANCO, M. Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. **Food Chemistry**, Kidlington, v.104, p.466-479, 2007.

UCR. University of California Riverside. **Citrus clonal protection plan, citrus variety**. Disponível em: <<https://ccpp.ucr.edu/variety/index.php#99919>>. Acesso em: 15 de jul. 2021.

USDA. United States Department of Agriculture. **Citrus: World Markets and Trade**. Washington: USDA, 2022. 15 p.

VARGAS, R. G.; GONÇALVES-ZULIANI, A. M. O.; CROCE FILHO, J.; CARVALHO, S. A. D.; NOCCHI, P. T. R.; NUNES, W. M. D. C. Avaliação da resistência de variedades de *Citrus* spp. à *Xanthomonas citri* subsp. *citri* na região Noroeste Paranaense, em condições de campo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 39, n. 4, p. 235-241. 2013.

VEKIARI, S. A.; PROTOPAPADAKIS, E. E.; PAPADOPOULOU, P.; PAPANICOLAOU, D.; PANOU, C.; VAMVAKIAS, M. Composition and seasonal variation of the essential oil from leaves and peel of a cretan lemon variety. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, p. 147-153, 2002.

XU, B. M.; BAKER, G. L.; SARNOSKI, P. J.; GOODRICH-SCHNEIDER, R. M. A comparison of the volatile components of cold pressed Hamlin and Valencia (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) orange oils affected by Huanglongbing. **Journal of Food Quality**, London, v. 2017, p. 1-20. 2017a.

XU, B. M.; SIMS, C. A.; ETXEBERRIA, E.; SCHNEIDER, R. M. G. Physicochemical and sensory properties of cold pressed oils from Florida Hamlin and Valencia oranges affected by Huanglongbing. **Journal of Food Science**, Malden, v.82, n. 9, p. 2158-2166, 2017b.

YAMAMOTO, M.; MATSUMOTO, R.; YAMADA, Y. Relationship between sterility and seedlessness in Citrus. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Japão, v. 64, p. 23-29, 1995.

ZHAO, W.; BAI, J.; MCCOLLUM, G.; BALDWIN, E. High incidence of pre-harvest colonization of huanglongbing-symptomatic *Citrus sinensis* fruit by *Lasiodiplodia theobromae* (*Diplodia natalensis*) and its exacerbation of postharvest fruit decay by that fungus. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.81, p.364-372, 2015.

ZHOU, J. Y.; SUN, C. D.; ZHANG, L. L.; DAI, X.; XU, C. J.; CHEN, K. S. Preferential accumulation of orange-colored carotenoids in Ponkan (*Citrus reticulata*) fruit peel following postharvest application of ethylene or ethephon. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 126, n. 2, p. 229–235. 2010.

ZOUAGHI, G.; NAJAR, A.; AYDI, A.; CLAUMANN, C. A.; ZIBETTI, A. W.; BEN MAHMOUD, K.; JEMMALI, A.; BLETON, J.; MOUSSA, F.; ABDERRABBA, M.; CHAMMEM, N. Essential oil components of Citrus cultivar 'Maltaise demi sanguine' (*Citrus sinensis*) as affected by the effects of rootstocks and viroid infection. **International Journal of Food Properties**, v. 22, p. 438-448, 2019.