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

Potencial de *Ruta graveolens* L. (Rutaceae) como planta-isca visando ao manejo de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) em citros

Thalita de Freitas Albuquerque

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

Piracicaba
2020

Thalita de Freitas Albuquerque
Engenheira Agrônoma

Potencial de *Ruta graveolens* L. (Rutaceae) como planta-isca visando ao manejo de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) em citros

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof^o Dr^o **JOÃO ROBERTO SPOTTI LOPES**

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

Piracicaba
2020

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP**

Albuquerque, Thalita de Freitas

Potencial de *Ruta graveolens* L. (Rutaceae) como planta isca visando ao manejo de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) em citros / Thalita de Freitas Albuquerque. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2020.

97 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. *Huanglongbing* 2. Psílideo vetor 3. Controle cultural 4. Arruda I. Título

DEDICATÓRIA

Ao meu querido orientador Profº Drº João Roberto Spotti Lopes.

À minha mãe, irmã e pai (*in memoriam*).

A todos aqueles que fizeram parte desta jornada direta e indiretamente.

À todas as mulheres que lutaram pela nossa inserção nos diversos espaços, inclusive na pesquisa, e diante disso me permitiram estar aqui hoje. Ainda há muito o que lutar.

AGRADECIMENTOS

À vida e ao universo por me guiarem neste caminho espetacular, pelas coisas serem exatamente como são. Sou muito grata por tudo que tem me proporcionado.

Ao meu querido orientador Prof^o Dr^o João Roberto Spotti Lopes por todo ensinamento, paciência, carinho. Por estar ao meu lado nos momentos especiais, por me dar esperança de dias melhores, pela pessoa excepcional, exemplo de ser humano e de profissional.

À minha família por todo apoio, incentivo e carinho, em especial minha mãe Val e minha irmã Thainã, mesmo com toda a distância, vocês se fizeram presente em todos os momentos. Sem o amor de vocês não seria possível. Amo vocês.

A meu Pai Francisco que me olha e me cuida onde quer que ele esteja. Deus esteja contigo, pai. Te amo para sempre. Saudades.

À minha família Piracicabana, Felipe Chagas, Maysa Tomé, Isabella Bueno, Fernando Madalon, que desde as primeiras semanas de ingresso na ESALQ a gente se amou e não se desgrudou mais. Quando um cai, o outro está ali para levantar. Aos novos integrantes desta querida família Larine Mendonça, Kamila Azevedo e Paolo Salazar. Vocês foram meu apoio emocional e profissional, que estiveram ao meu lado em todos os momentos, vivendo o mestrado junto comigo. Aprendi e continuo aprendendo muito com cada um de vocês.

À minha namorada, Paloma Gabrielle, pelo apoio, incentivo, amor, companheirismo, por sempre me mostrar o lado bom da vida e me presentear com dias incríveis, tenho muita admiração por você.

Ao Laboratório de Insetos Vetores de Fitopatógenos, em especial as amigas/irmãs do coração Mariana Bossi, Carla Detoni e Tatiana Borbon, pela amizade, carinho, contribuição profissional e dividir vários momentos especiais comigo. Aos estagiários Mateus e Leandro por toda ajuda nos experimentos. Ao Ricardo Sesso por todo apoio profissional. À Joyce pela amizade e prestatividade, quando precisei você sempre esteve presente.

Aos professores Fernando Cônsoli, Wesley Godoy, José Parra, Maurício Bento, Roberto Zucchi, Sinval, José Djair, Pedro Yamamoto por todo ensinamento durante e fora às disciplinas.

À CAPES pelo suporte e apoio financeiro.

Aos laboratórios do departamento: Laboratório de Interações em Insetos, em especial Diandra; Controle Microbiano e Patologia de Insetos, em especial Solange e Celeste; Biologia de insetos, em especial Alexandre Diniz, Gustavo, Luan; Ecologia química e Comportamento de Insetos, em especial, Arodi. Gratidão por todo apoio e ensinamento durante a pesquisa fornecendo ambientes e equipamentos para a realização dos experimentos.

Ao INCT pela utilização dos equipamentos de fotografia e de bioensaios de olfatometria.

À Dr^a Marilene Fancelli por todo apoio profissional, pessoal, pela amizade e carinho que sempre demonstra por mim.

A Bruno Malaquias pela ajuda com as análises estatísticas, por todos os ensinamentos. Aprendi muito com você. Obrigada pelo exemplo de profissional, de humildade.

À Michele Timossi por todo apoio pessoal e profissional, por todo carinho, preocupação e palavras de incentivo. Pelo abraço nas horas em que mais precisava. Gratidão pela pessoa verdadeira que és.

Aos amigos Camila Haddad, Taciana Melissa, Karen Komada, Caio César, Felipe, Renata Brito, Fernando Sujimoto pelo carinho, apoio, momentos especiais, sou muito grata pela amizade de vocês.

Aos amigos Baianos, em especial, Kally Moraes, Rosana D'juda, Zé Oliveira, Allan Ferreira, Dan Cerqueira, Rodrigo Macedo por tornar os nossos encontros espetaculares e mostrar que o amor vence a distância. Gratidão por todo apoio e amizade.

Aos amigos de vivência em imersão no Paralello proporcionando passagens de ano incríveis, marcando o início e final desta jornada que foi o mestrado, Jeykson Araujo, Tiago dos Anjos, Deibson Oliveira, Rafael Bonfim, Yuri.

Deus está em todos os detalhes, pessoas, vivências, oportunidades, dificuldades, caminhos, no amor, nos amigos, na família de sangue, alma e coração. Sou feliz, grata pela vida e por cada um de vocês.

Gratidão.

*“É justo que muito custe
o que muito vale.”*

Santa Tereza D'Ávila

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1. Atual cenário da citricultura e incidência de <i>Huanglongbing</i> (HLB) no Brasil..	15
2.2. Agentes etiológicos do HLB e aspectos epidemiológicos	16
2.3. Interação vetor-patógeno.....	19
2.4. <i>Diaphorina citri</i> e seus aspectos bioecológicos	20
2.5. Manejo cultural e de <i>D. citri</i> com reflexos sobre o controle de HLB.....	23
2.6. <i>Ruta graveolens</i> e efeitos sobre biologia e comportamento de insetos.....	27
2.7. Mecanismo de seleção hospedeira de insetos fitófagos, principalmente <i>Diaphorina citri</i>	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1. Obtenção e manutenção de plantas	33
3.2. Criação de <i>D. citri</i>	34
3.3. Comportamento de escolha hospedeira de <i>D. citri</i> frente a plantas de <i>R. graveolens</i> e <i>C. sinensis</i>	38
3.3.1. Teste de pouso e permanência sob condições de livre escolha	38
3.3.2. Teste de comportamento arrestante	39
3.3.3. Teste de pista visuais.....	40
3.3.4. Teste de oviposição sob condições de confinamento	43
3.3.5. Teste de excreção de honeydew de adultos de <i>D. citri</i> sob condições de confinamento.....	44
3.3.6. Bioensaios de olfatometria contrastando voláteis de <i>R. graveolens</i> e <i>C. sinensis</i>	46
3.4. Avaliação da transmissão de CLas para plantas de <i>R. graveolens</i> e <i>C. sinensis</i>	49
3.5. Detecção molecular de CLas em insetos e plantas	50
3.5.1. Extração de DNA dos insetos e das plantas	50
3.5.2. Detecção de CLas por PCR em tempo real (qPCR)	52
3.6. Análise dos dados	53

4. RESULTADOS	55
4.1. Comportamento de escolha hospedeira de <i>D. citri</i> frente a plantas de <i>R. graveolens</i> e <i>C. sinensis</i>	55
4.1.1. Teste de pouso e permanência sob condições de livre escolha.....	55
4.1.2. Teste de comportamento arrestante.....	55
4.1.3. Teste de pistas visuais em quadrado latino.....	59
4.1.4. Teste de oviposição sob condições de confinamento.....	60
4.1.5. Teste de excreção de honeydew de adultos machos e fêmeas de <i>D. citri</i> sob condições de confinamento	60
4.1.6. Bioensaios de olfatometria contrastando voláteis de <i>R. graveolens</i> e <i>C. sinensis</i>	61
4.1.6.1. Adultos de <i>D. citri</i> livres de CLas, criados em <i>M. paniculata</i>	61
4.1.6.2. Adultos de <i>D. citri</i> criados em <i>C. sinensis</i> infectado por <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> (CLas).....	65
4.1.6.2.1. Insetos positivos para CLas por qPCR	65
4.1.6.2.2. Insetos negativos para CLas por qPCR.....	68
4.2. Avaliação da transmissão de <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> (CLas) para plantas de <i>R. graveolens</i> e <i>C. sinensis</i>	71
5. DISCUSSÃO.....	73
6. CONCLUSÕES.....	81
REFERÊNCIAS	83

RESUMO

Potencial de *Ruta graveolens* L. (Rutaceae) como planta-isca visando ao manejo de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) em citros

O manejo do *Greening* ou *Huanglongbing* (HLB), doença mais importante da citricultura, depende de um conjunto de medidas que inclui o controle do inseto vetor, o psíldeo-asiático-dos-citros, *Diaphorina citri* Kuwayama. Considerando-se que HLB apresenta efeito marcante de borda, em função da disseminação primária de seu agente etiológico, a bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), é necessário adotar práticas que bloqueiem a entrada de psíldeos imigrantes pela periferia de pomares cítricos, como o plantio-isca. O objetivo deste trabalho foi investigar o potencial de *Ruta graveolens* L. (Rutaceae) como planta-isca para *D. citri*. Para isso, estudou-se a resposta comportamental de *D. citri* a plantas de *R. graveolens* e *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, por meio de ensaios de: i) pouso e permanência; ii) comportamento arrestante; iii) pistas visuais; iv) oviposição; v) excreção de *honeydew*; e vi) olfatometria. Utilizaram-se psíldeos sadios criados em *Murraya paniculata* (L.) Jack, sendo que no estudo de olfatometria também foram avaliados psíldeos criados em plantas cítricas infectadas com CLas, que testaram positivamente (CLas+) e negativamente (CLas-) à bactéria por qPCR. Observou-se que adultos de *D. citri* preferem pousar e permanecer em plantas de *C. sinensis* à *R. graveolens*; porém, o psíldeo prefere sinais visuais fornecidos por folhas de *R. graveolens* (41,4%) em relação a *C. sinensis* (33,9%). Tanto *R. graveolens* quanto *C. sinensis* apresentam estímulos arrestantes à *D. citri*. A excreção de *honeydew* de *D. citri* é maior em plantas de *R. graveolens*. Fêmeas excretam mais *honeydew* que machos e não realizam postura em plantas de *R. graveolens*. Em bioensaios de olfatometria, fêmeas e machos sadios respondem positivamente aos voláteis de *R. graveolens* em comparação com ar limpo. Machos preferem voláteis de *R. graveolens* aos de *C. sinensis* e, como as fêmeas, respondem mais rapidamente aos voláteis de *R. graveolens*. Em ensaios com psíldeos CLas+, fêmeas preferem voláteis de *R. graveolens* em relação aos de *C. sinensis*, enquanto que os machos respondem de modo semelhante às duas espécies vegetais. Para insetos CLas- criados em plantas cítricas infectadas, tanto fêmeas quanto machos preferem os voláteis de *R. graveolens* em relação aos de *C. sinensis*. Em testes de transmissão por *D. citri*, CLas não infectou *R. graveolens*. O conjunto dos resultados indica que *R. graveolens* tem bom potencial como plantio-isca pela sua atratividade visual e olfativa a *D. citri*, adequação alimentar sem ser hospedeira do inseto, e aparente imunidade a CLas quando inoculada por psíldeos.

Palavras-chave: *Huanglongbing*, Psíldeo vetor, Controle cultural, Arruda

ABSTRACT

Potential of *Ruta graveolens* L. (Rutaceae) as a trap crop for the management of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) in citrus

The management of *Greening* or *Huanglongbing* (HLB), the most important citrus disease, depends on a set of measures, which includes the control of the vector insect, the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama. Considering that HLB has a remarkable edge effect due to the primary dissemination of its etiological agent, *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), it is necessary to adopt practices that block the entry of immigrant psyllids through the periphery of citrus orchards, such as trap crop. The aim of this work was to investigate the potential of *Ruta graveolens* L. (Rutaceae) as a bait plant for *D. citri*. Thus, the behavioral response of *D. citri* to plants of *R. graveolens* and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck was studied, through the following tests: i) landing and permanence; ii) arresting behavior; iii) visual cues; iv) oviposition; v) excretion of *honeydew*; and vi) olfactometry. Healthy psyllids created in *Murraya paniculata* (L.) Jack were used, and in the olfactometry study were also evaluated psyllids created in citrus plants infected with CLas, which tested positively (CLas+) and negatively (CLas-) to the bacterium by qPCR. It was observed that adults of *D. citri* prefer to land and stay on plants of *C. sinensis* to *R. graveolens*; however, the psyllid prefers visual signals provided by *R. graveolens* leaves (41.4%) over *C. sinensis* (33.9%). Both *R. graveolens* and *C. sinensis* present arresting stimuli to *D. citri*. The excretion of *D. citri* *honeydew* is higher in *R. graveolens* plants. Females excrete more *honeydew* than males and do not lay on *R. graveolens* plants. In olfactometry bioassays, healthy females and males respond positively to *R. graveolens* volatiles compared to clean air. Males prefer *R. graveolens* volatiles to *C. sinensis* and, like females, respond more quickly to *R. graveolens* volatiles. In trials with CLas+ psyllids, females prefer *R. graveolens* volatiles over those of *C. sinensis*, while males respond similarly to both plant species. For classical insects raised on infected citrus plants, both females and males prefer the *R. graveolens* volatiles over those of *C. sinensis*. In *D. citri* transmission tests, CLas did not infect *R. graveolens*. The set of results indicates that *R. graveolens* is potentially good as trap crop due to its visual and olfactory attractiveness to *D. citri*, food adequacy without being host to the insect, and apparent immunity to CLas when inoculated by psyllids.

Keywords: *Huanglongbing*, Psyllid vector, Cultural control, Rue

1. INTRODUÇÃO

Os citros são uma das principais culturas em diversos países do mundo, gerando muitos empregos diretos e indiretos no setor agrícola. O Brasil é líder mundial no setor de produção e exportação de suco de laranja, apresentando grande representatividade na economia agrícola do país (USDA, 2020). Segundo relatório do Fundo de Defesa da Citricultura, a safra de laranja 2019/2020, no cinturão citrícola de São Paulo e triângulo/sudoeste mineiro é estimada em 384,87 milhões de caixas de 40,8 kg (FUNDECITRUS, 2020).

Por trás desta posição de excelência em produção e exportação, há um grande investimento por causa dos problemas fitossanitários que acometem o cultivo. Na atualidade, o *Huanglongbing* (HLB) ou *Greening* é considerada a principal doença da citricultura no mundo, afeta todas as variedades comerciais e apresenta sintomas severos no fruto e na planta, acarretando grandes perdas para o setor (BOVÉ, 2006). O HLB deixou o setor citrícola em alerta, devido sua velocidade de disseminação ocasionando rápidas e severas perdas na produtividade e aumento nos custos de produção (BOVÉ, 2006; NEVES et al., 2012; WANG; TRIVEDI, 2013), exibindo forte impacto social e econômico (BOVÉ, 2006). De acordo com o informe do FUNDECITRUS (2020), as plantas sintomáticas de HLB incrementaram em 4,8% no ano de 2019 em relação ao ano anterior.

Não há medidas totalmente eficientes para o controle desta doença (BELASQUE JR et al., 2010). O longo e variável período de incubação do fitopatógeno, a presença de plantas assintomáticas no pomar permitindo que o patossistema se instale no agroecossistema, aumenta a dificuldade no controle e monitoramento do HLB (YAMAMOTO et al., 2008; ROGERS; STANSLY, 2012). Uma das ferramentas mais eficientes no combate desta doença, é o controle do psílídeo *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae), vetor das bactérias associadas ao HLB (COLETTA-FILHO et al., 2004a, b; TEIXEIRA et al., 2005; BELASQUE JR et al., 2010).

O inseto *D. citri* pode transmitir as duas espécies de liberibactérias associadas ao HLB, *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) e *Candidatus Liberibacter americanus* (CLam) em pomares cítricos nas Américas, Ásia e África (CAPOOR; RAO; VISWANATH, 1967; COLETTA-FILHO et al., 2004a, b; YAMAMOTO et al., 2006). O agente etiológico CLam está presente no Brasil e Texas (TEIXEIRA et al., 2005; BOVÉ

et al., 2008; GRAÇA; KUNTA, 2015), entretanto, CLas é a mais predominante em regiões citrícolas onde ocorre a doença (GOTTWALD, 2010; LOPES et al., 2010; 2013).

Há uma enorme dificuldade na implementação do manejo desse inseto vetor, sendo que a presença da praga abaixo do nível de dano econômico é suficiente para ter uma alta infectividade do pomar (YAMAMOTO et al., 2008). Além disso, o patógeno CLas manipula o comportamento de movimento e seleção de parceiros de *D. citri*, para promover a sua própria disseminação, como evidenciado por Martini et al. (2015).

Devido a essa problemática, pesquisadores tem buscado novas abordagens para reduzir infestação, migração e dispersão do psílídeo. Uma das alternativas que se mostra bastante promissora, é a estratégia cultural/comportamental, que utiliza plantas que atuam como iscas para o controle do vetor (SHELTON; BADENES-PEREZ, 2006; YAN; ZENG; ZHONG, 2015). Esta tática de utilização de planta-isca, também conhecida como cultura armadilha, visa manipular o agroecossistema, a fim de proteger a cultura alvo do ataque de pragas, atraindo, desviando e/ou interceptando-as em uma determinada parte do campo onde possam ser economicamente destruídas (SHELTON; BADENES-PEREZ, 2006; YAN; ZENG; ZHONG, 2015).

Considerando a característica de efeito de borda do HLB, onde observa-se uma maior concentração de plantas sintomáticas nas margens das propriedades e talhões em função da disseminação primária do patógeno promovida por psílídeos infectivos advindos de fontes externas de inóculo (BASSANEZI et al., 2005; GOTTWALD; IREY; GAST, 2008), essa prática cultural pode contribuir para o bloqueio ou redução da entrada de psílídeos imigrantes na periferia de pomares cítricos, reduzindo a ocorrência de infecções primária e contribuindo significativamente para o manejo da doença.

Segundo Hall e colaboradores (2008), infestações de *D. citri* foram reduzidas quando plantas de citros foram intercaladas com plantas repelentes de *Psidium guajava* L. (Myrtaceae), conhecida como goiaba. Belotti et al. (2018) verificaram que plantas de *Bergera koenigii* (L.) Sprengel (Rutaceae) são recomendadas para utilização como planta-isca para *D. citri*, pois além de serem atrativas ao psílídeo, não são reservatórios de CLas. Além destas, a utilização de *Murraya paniculata* (L.) Jack (Rutaceae) como isca diminuiu o número de psílídeos na cultura alvo e reduziu a incidência do HLB em 43% (TOMASETO et al., 2019). Cifuentes-Arenas et al. (2019)

verificaram que *M. paniculata* pode ser implementada como planta-isca “sem saída” epidemiologicamente, pois é uma planta altamente atraente para a praga e indevida ao desenvolvimento do patógeno CLas, além de possuir uma taxa de transmissão pelo psílídeo muito baixa.

A atratividade e efeito arrestante (retenção) dos insetos são importantes no sucesso da implementação de uma planta-isca (HIJE; COSTA; STANSLY, 2001). Esse comportamento é intermediado por estímulos visuais, olfativos e gustativos (TSAGKARAKIS; ROGERS, 2010; WESTBROOK et al., 2011) e representa aspectos fundamentais no processo de seleção hospedeira, o qual se baseia na escolha de locais ideais para o crescimento, sobrevivência, reprodução e desenvolvimento da progênie (PATT et al., 2011).

Segundo Gallo et al. (2002) e Picanço (2010), no processo de seleção hospedeira, inicialmente, os insetos localizam o habitat da planta hospedeira e, posteriormente, o hospedeiro. Por meio do contato através dos órgãos sensores dos insetos, há o reconhecimento e aceitação devido à adequabilidade alimentar, para assim dar início à reprodução. O olfato representa a modalidade sensorial mais importante nesse processo de localização do habitat e seleção do hospedeiro pelos insetos (TRIGO, 2000; GALLO et al., 2002; LIMA-MENDONÇA et al., 2014).

A praga *D. citri* procura uma planta baseando-se em estímulos visuais, como a presença de brotações e vigor associado ao estado nutricional da planta (PATT; SÉTAMOU, 2010), olfativos, de natureza química, e gustativos presentes nesses hospedeiros (TSAGKARAKIS; ROGERS, 2010; WESTBROOK et al., 2011). Diversos estudos têm demonstrado a influência do hospedeiro tanto em parâmetros comportamentais como no desenvolvimento do psílídeo (TSAI; LIU, 2000). Dentre esses parâmetros comportamentais, incluem-se a busca e a aceitação para a alimentação e oviposição (TSAI; LIU, 2000; NAVA et al., 2007). As fêmeas do psílídeo só realizam postura nas brotações não expandidas (CIFUENTES-ARENAS et al., 2019), o que representa um fator limitante e importante para a espécie, em razão da baixa mobilidade das ninfas (TECK et al., 2011; PARRA et al., 2017).

A planta *M. paniculata* é considerada seu hospedeiro preferencial, pois apresenta um intenso fluxo vegetativo que propicia local ótimo para abrigo, alimentação, oviposição e desenvolvimento da prole (HALBERT; MANJUNATH, 2004; ALVES; DINIZ; PARRA, 2014). O psílídeo tem como hospedeiros plantas quase que

exclusivamente da família Rutaceae, como *Citrus* spp., *B. koenigii* e *Severinia buxifolia* (Poiret) (HALBERT; MANJUNATH, 2004; MEAD; FASULO, 2010).

Outra espécie também pertencente à família Rutaceae, *Ruta graveolens* L., também conhecida como arruda (ASGARPANAH; KHOSHKAN, 2012), não é relatada na literatura como hospedeira de *D. citri*. Mann et al. (2012a) identificaram 2-undecanona presente no óleo essencial de arruda como repelente para adultos, contudo, Ferry et al. (2004) e Arimura; Matsui; Takabayashi (2009) afirmam que em meio natural, a mistura dos compostos voláteis produzidos e liberados pelas plantas podem sofrer alterações induzidas por fatores bióticos e abióticos. Além da pesquisa citada acima, não há outros trabalhos ou informações sobre a interferência desta planta no desenvolvimento e/ou comportamento do psíldeo. Porém, observou-se que o inseto procura a espécie *R. graveolens* para abrigo e alimentação (Thalita de Freitas Albuquerque, dados não publicados).

Partindo dessa análise, o objetivo geral desta pesquisa foi investigar o potencial de *R. graveolens* como plantio-isca para *D. citri*. Visto que os estímulos visuais e químicos são essenciais para atrair o inseto-praga (PATT; SÉTAMOU, 2010). Os objetivos específicos visaram avaliar os parâmetros que a identifiquem como uma planta hospedeira para o psíldeo e avaliar seu potencial como plantio-isca. Para isso, foram realizados estudos comportamentais com o inseto avaliando-se a atração visual, olfativa e gustativa e investigar se *D. citri* é capaz de transmitir CLas, associada ao HLB, para plantas de *R. graveolens*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Atual cenário da citricultura e incidência de *Huanglongbing* (HLB) no Brasil

O Brasil está no *top* cinco mundial em produção de frutas e se destaca em primeiro lugar na produção de suco e fruta *in natura* de laranja, impactando positivamente a economia do país (USDA, 2020). Segundo o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), a indústria brasileira produziu cerca de 1,23 milhão de toneladas de suco de laranja na safra de 2018/2019, 19% maior comparada à safra anterior, seguido da indústria americana com produção de quase 330 mil toneladas de suco.

O Brasil também é líder em exportação de laranja, cerca de 1,21 milhão de toneladas foram exportadas na safra de 2018/2019. O segundo colocado foi o México com 210 mil toneladas (USDA, 2020). Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, IBGE, a produção brasileira de laranja em 2019 foi de 17.614.270 t e a estimativa para 2020 é de 18.361.774 toneladas. Nesse país, destaca-se a região sudeste, com produção de 14.716.948 t em 2019 e estimativa de 15.514.456 t para 2020 (IBGE, 2020).

Segundo relatório do Fundecitrus, a safra de laranja 2019/2020 das regiões que abrangem o cinturão citrícola de São Paulo e triângulo/sudoeste mineiro, foi estimada em 384,87 milhões de caixas de 40,8 kg, tendo uma baixa de 0,11% em relação à estimativa de dez/2019 e uma redução de 1,03% em relação à safra anterior (maio de 2019) (FUNDECITRUS, 2020).

Para manutenção de excelência na produção e exportação, há uma intensa preocupação e investimento no manejo de pragas e doenças que acometem severamente a citricultura, em especial destaca-se o *Huanglongbing* (HLB), também conhecido como *Greening* (NEVES et al., 2012; FUNDECITRUS, 2020).

Devido à natureza perene das plantas cítricas, longo prazo para retorno do capital investido (aproximadamente sete anos), e a expectativa de vida econômica abaixo de 15 anos, o HLB é considerado uma grande ameaça à cadeia produtiva citrícola mundial, pois acomete a cultura de uma maneira muito rápida e severa. Por causa da natureza complexa deste patossistema, sua grande capacidade de disseminação, grandes perdas na produção e qualidade das frutas (BOVÉ, 2006;

NEVES et al., 2012; WANG; TRIVEDI, 2013; FUNDECITRUS, 2020), ocorrendo perdas na produtividade de 30 a 70%, exibindo um forte impacto social e econômico (BOVÉ, 2006).

No Brasil, desde o seu registro em 2004, no estado de São Paulo (COLETTA-FILHO et al., 2004a; TEIXEIRA et al., 2005) o HLB está presente em todas as regiões citrícolas paulistas, triângulo Mineiro e Paraná (FUNDECITRUS, 2020). No estado de São Paulo, as regiões com maiores incidências da doença são Brotas e Limeira, com 55,10% e 48,30% das árvores infectadas, respectivamente, sendo que esta última aumentou a incidência em 42% de 2018 para 2019, seguido de Duartina com 32,43%, Porto Ferreira com 26,67% e Matão com 17,29%.

Conforme dados divulgados pelo Fundecitrus (2020), a incidência média de laranjeiras sintomáticas de *Greening* no cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste de Minas Gerais do ano de 2019 aumentou 4,8% em relação ao ano anterior, apresentando 19,02%, o que corresponde a aproximadamente 37,1 milhões de árvores acometidas pela doença.

2.2. Agentes etiológicos do HLB e aspectos epidemiológicos

Os agentes etiológicos associados ao HLB são α -proteobactérias do gênero *Candidatus Liberibacter* (CL) que colonizam o floema de plantas hospedeiras. Existem três espécies relacionadas a esse patossistema: *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), *Candidatus Liberibacter africanus* (CLaf) e *Candidatus Liberibacter americanus* (CLam) (COLETTA-FILHO et al., 2004a, b; MACHADO; LOCALI-FABRIS; COLETTA-FILHO, 2017).

Dentre as três bactérias, CLam foi detectada apenas no Brasil (TEIXEIRA et al., 2005; BOVÉ et al., 2008), porém, Graça e Kunta (2015) reportaram a presença desta espécie no Texas. CLaf foi registrada no continente africano (BOVÉ, 2006), enquanto CLas é mais predominante e disseminada nos pomares citrícolas onde o fitopatógeno está presente (GOTTWALD, 2010), sendo nas Américas: Brasil, Argentina, Paraguai, Colômbia, em quase todos os países da América Central, Caribe, México, Estados Unidos, Cuba (GOTTWALD, 2010; GRAÇA et al., 2012; FUNDECITRUS, 2020), em toda a Ásia tropical e subtropical, além de alguns países do Oriente Médio e Ilhas Maurício (GRAFTON-CARDWELL; STELINSKI; STANSLY, 2013). Esses agentes etiológicos são transmitidos por duas espécies de vetores. As

espécies CLas e CLam são transmitidas pelo psílídeo-asiático-dos-citros *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) (CAPOOR; RAO; VISWANATH, 1967; COLETTA-FILHO et al., 2004a, b; YAMAMOTO et al., 2006), *Cacopsylla citrisuga* (Yang & Li) (Hemiptera: Psyllidae), enquanto que CLaf é transmitida pelo psílídeo africano *Trioza erytreae* (Del Guercio) (Hemiptera: Triozidae) (MCCLEAN; OBERHOLZER, 1965).

As bactérias associadas ao *Greening* podem ser introduzidas através do inseto vetor, representando a transmissão e disseminação natural no campo (CAPOOR; RAO; VISWANATH, 1967) ou por enxertia de tecidos infectados (COLETTA-FILHO et al., 2010; GRAÇA et al., 2016). O período de latência para esta doença pode variar de 30 a 180 dias, sendo um dos parâmetros mais importantes que influenciam a epidemia e desenvolvimento desta doença (CHIYAKA et al., 2012).

Quando a infecção ocorre por meio de enxertia, o tempo mínimo necessário para a expressão dos primeiros sintomas é de quatro a cinco meses, atingindo um pico em oito meses, continuando após um ano (HUNG; WU; SU, 2001; LOPES; FRARE, 2008). Se a infecção ocorrer através do inseto vetor, o tempo geralmente é de oito a nove meses e os sintomas mais graves aparecem em um ano (HUNG; WU; SU, 2001).

Como observado, este período de incubação é longo e variável, vindo a dificultar a detecção de plantas doentes no campo (LOPES; MARTINS; FRARE, 2006), o que pode estar relacionado com a época da infecção, idade da planta e combinação de copa e porta enxerto (MCCLEAN; OBERHOLZER, 1965; CATLING, 1970; ZHAO, 1981; AUBERT, 1987; GOTTWALD; AUBERT; ZHAO, 1989; YAMAMOTO et al., 2006).

De acordo com Chiyaka et al. (2012), o período latente termina quando a infectividade começa, esta sendo continuada até o final do período de incubação, diferentemente da maioria dos sistemas de patógenos vegetais, onde o período de incubação é mais curto que a latência. Estes dois períodos são processos temporais relacionados, ambos começando no momento da infecção (GOTTWALD, 2010).

O aumento da severidade da doença depende do porte da planta e da idade. Quando novas, sofrem queda dos frutos ou não os produzem, podendo ficar comprometidas em um ou dois anos, já as plantas velhas, após o aparecimento dos primeiros sintomas, podem levar de três a cinco anos para ficarem totalmente

comprometidas (LIN, 1963, GOTTWALD; AUBERT; ZHAO, 1989, FUNDECITRUS, 2020).

O sintoma característico do HLB é o mosqueamento (falta de delimitação clara entre a parte verde e amarela) (COLETTA-FILHO et al., 2004a; BOVÉ, 2006), além da redução no tamanho e forma das folhas, as quais se tornam curvadas, com nervuras mais grossas e escurecidas com aspecto corticoso. Pode ocorrer também intensa desfolha dos ramos afetados, seca e morte dos ponteiros e floradas fora de época (HALBERT; MANJUNATH, 2004; BOVÉ, 2006).

Os frutos geralmente ficam deformados, pequenos e assimétricos em relação a columela central, apresentando alto teor de acidez, maturação irregular e queda prematura (GRAÇA, 1991; AUBERT, 1992; WANG; TRIVEDI, 2013). Os que ficam na árvore geralmente não amadurecem, permanecendo verdes com coloração verde clara manchada, as sementes são escurecidas ou abortadas (MEAD, 2002; BOVÉ, 2006). Ao cortar os frutos, é possível verificar internamente filetes alaranjados na columela a partir da região do pedúnculo e a região do sistema vascular também se apresenta de coloração alaranjada (GRAÇA, 1991, BOVÉ, 2006; WANG; TRIVEDI, 2013).

Segundo Bassanezi et al. (2009), os sintomas visuais referentes ao HLB se expressam de maneira mais intensa entre o outono e o inverno, mas a sua incidência começa ocorrer entre o final do verão e início da primavera. Apesar de CLas ser mais resistente a altas temperaturas ambientais, o verão é desfavorável à multiplicação da bactéria nos tecidos da planta (LOPES et al., 2009b), resultando em não aparecimento dos sintomas, mas podendo servir como fonte de inóculo para novas infecções (LOPES; MARTINS; FRARE, 2006; GOTTWALD; GRAÇA; BASSANEZI, 2007; BASSANEZI et al., 2009).

A aplicação de testes como *Polymerase Chain Reaction* (PCR) ou PCR em tempo real (qPCR) são capazes de detectar espécies de CL mesmo em tecidos assintomáticos (LOPES et al., 2009a). Essa técnica pode auxiliar a movimentação de mudas saudáveis de citros e de plantas ornamentais hospedeiras, porém a nível de campo é inviável quanto a mão de obra e custos, pois é um teste complexo e consome bastante tempo (BASSANEZI et al., 2009).

Sabe-se também que a infecção por HLB é sistêmica e a concentração bacteriana pode variar entre as partes da planta, podendo estar abaixo do limiar de detecção através dos teste moleculares, podendo assim gerar resultados falso-

negativos (GOTTWALD et al., 2008; TATINENI et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2008). Além do mais, o título bacteriano pode variar de acordo com as estações do ano (LOPES et al., 2017). Apesar disso, considera-se que em pomares apresentando algumas plantas CLas positivas sintomáticas, há um considerável número de plantas infectadas assintomáticas, como demonstraram Irey; Gast; Gottwald (2006) através de ensaios de qPCR.

Após o aparecimento das primeiras plantas sintomáticas, a incidência de HLB pode alcançar mais de 95% das plantas cultivadas em três a 13 anos (GOTTWALD; AUBERT; HUANG, 1991; BASSANEZI et al., 2006; GOTTWALD; GRAÇA; BASSANEZI, 2007; GOTTWALD; IREY; TAYLOR., 2008). A velocidade de infecção de novas plantas vai depender da quantidade de plantas infectadas num pomar, proximidade de plantas infectadas em quintais, áreas urbanas, plantios comerciais, proximidade de plantas ornamentais que servem como fonte de inóculo e abrigo para o psíldeo, idade ou porte das plantas no momento da infecção e da população de insetos vetores (BASSANEZI et al., 2009).

2.3. Interação vetor-patógeno

A interação entre *D. citri* e CLas é persistente, ou seja, após alimentação em planta infectada, permanecem infecciosos durante toda a vida (AMMAR; SHATTERS; HALL, 2011), é circulativa, pois o patógeno entra no corpo do inseto, circulando e atravessando membranas, não perdendo a transmissibilidade mesmo após a última ecdise ninfal para a fase adulta (GRAY; CILIA; GHANIM, 2014), e é propagativa, pois o vetor serve como hospedeiro alternativo para o patógeno após alimentar-se de uma planta infectada. A bactéria CLas propaga-se intracelularmente e pode ser encontrada ao longo da hemolinfa do inseto (ORLOVSKIS et al., 2015).

Ammar; Shatters; Hall (2011) demonstraram que a distribuição de CLas no corpo do psíldeo é quase sistêmica, pois a bactéria é encontrada na câmara filtro, intestino médio, túbulos de Malpighi, glândulas salivares, ovários e nos tecidos muscular e adiposo. Pelz-Stelinski et al. (2010) relataram a transmissão transovariana da bactéria, porém, com uma taxa de transmissão muito baixa, variando de 2 a 6% da progênie e segundo Mann et al. (2011), machos infectivos podem transmitir a bactéria para as fêmeas durante a cópula, o que é chamado de transmissão horizontal.

O processo de transmissão de CLas para as plantas através de *D. citri* se dá por meio da aquisição da bactéria, através da alimentação em planta hospedeira (fonte de inóculo do fitopatógeno), seguida por um período de latência para multiplicação do patógeno no corpo do inseto (onde o mesmo se acumula nas glândulas salivares) (INOUE et al., 2009), e da inoculação em uma planta sadia. Tanto a aquisição quanto inoculação ocorrem durante a alimentação do inseto a nível floemático (INOUE et al., 2009; GRAFTON-CARDWELL; STELINSKI; STANSLY, 2013).

Bactérias causadoras do HLB podem ser adquiridas por ninfas a partir do 2º instar, porém, somente a partir do 4º e 5º instar podem transmiti-las (XU et al., 1988; INOUE et al. 2009; MEAD; FASULO, 2010; PELZ-STELINSKI et al., 2010). De acordo com experimentos realizados por Inoue et al. (2009), as ninfas adquirem a bactéria com eficiência maior do que os adultos, corroborando com esse resultado, Pelz-Stelinsk et al. (2010) também relataram essa eficiência em insetos imaturos. Inoue et al. (2009) também observaram um aumento da concentração da bactéria no corpo das ninfas do psílídeo em função do PAA.

Quando a aquisição é feita por adultos, segundo Mead e Fasulo (2010), é necessário um período de alimentação por mais de uma hora para obter uma boa eficiência na infectividade e o período de latência pode variar de 10 a 18 dias (ROGERS; STANSLY, 2012). Canale e colaboradores (2017) verificaram que o tempo médio de latência para ninfas é de 16,8 dias e 17,8 para adultos, determinados num PAI de 48h, sendo que a inoculação foi mais frequente após a aquisição por ninfas. Os mesmos autores determinaram um tempo mínimo de latência de 7-10 dias e 16h, para adultos e ninfas, respectivamente.

2.4. *Diaphorina citri* e seus aspectos bioecológicos

Dentre os vetores das bactérias associadas ao HLB, *D. citri* é considerado o mais importante devido a sua ampla distribuição, estando presente em toda a Ásia, extremo Oriente e Américas (TSAI et al., 1988; YAMAMOTO et al., 2006), apresentando uma distribuição geográfica maior do que as bactérias, devido a sua ocorrência em países onde a doença ainda não foi relatada. No Brasil, por exemplo, as bactérias foram reportadas 62 anos após o primeiro relato do psílídeo (COLETTA-FILHO et al., 2004a, b; BOVÉ, 2006).

O psílídeo é um inseto hemimetabólico apresentando cinco instares ninfais (HALL; ALBRIGO, 2007). Quando ninfa, *D. citri* apresenta cerca de 0,3 a 1,6 mm de comprimento, do primeiro ao quinto instar, respectivamente (TSAI; LIU, 2000). Quando adulto, mensura aproximadamente de 2 a 3 mm apresentando coloração marrom clara, cabeça contendo três ocelos e ligeiramente mais estreita que o tórax, rostro curto, antenas filiformes, pernas posteriores saltatórias e asas membranosas (BERGMANN; FERNANDES; FARIA, 1994; GALLO et al., 2002). Em estado de repouso, flexionam o primeiro par de pernas formando um ângulo de 45° em relação à superfície em que se encontram (FERNÁNDEZ, 2003; BLACKWELL, 2005; HALL, 2008).

Seu abdômen apresenta coloração azul/esverdeada, cinza ou amarelo/alaranjado (BLACKWELL, 2005; HALL, 2008). Segundo Wenninger; Hall (2008), fêmeas de psílídeos com abdômen de coloração amarelo/alaranjado estão possivelmente acasaladas. Os adultos atingem a maturidade sexual em torno de três a cinco dias após a emergência (WENNINGER; HALL, 2007). Cada fêmea pode colocar de 500 a 800 ovos durante toda a sua vida (TSAI; LIU, 2000; NAVA et al., 2007).

O psílídeo provoca danos diretos e indiretos às plantas, os danos diretos são causados devido ao seu hábito alimentar, típico de insetos sugadores, que, ao se alimentarem, deformam as folhas jovens, causada pela sucção da seiva elaborada, tornando as brotações retorcidas e engruvinhadas (GALLO et al., 2002; HALBERT; MANJUNATH, 2004). Além disso, apresentam a característica de excretar grandes quantidades de *honeydew*, uma substância açucarada eliminada devido à alimentação, o qual favorece o aparecimento e desenvolvimento de fungos oportunistas (*Capnodium* spp.) causadores da fumagina, que em folhas prejudica a fotossíntese, transpiração e respiração e nos frutos afeta negativamente a aparência dos mesmos (TSAI; LIU, 2000).

Contudo, a maior importância desta praga se dá pelos danos indiretos provocados, que são aqueles causados pela transmissão das bactérias associadas ao HLB, pois o microrganismo precisa de um meio para propagar a doença (HALBERT; MANJUNATH, 2004).

De acordo com Tsai e Liu (2000) o desenvolvimento médio de ovo-adulto varia de 14,4 a 49,3 dias nas faixas de 28 a 15°C, respectivamente. Nava et al. (2007) relataram a duração total do ciclo de aproximadamente 17 dias a uma temperatura

média de 25°C. Segundo esses autores, as temperaturas em torno de 24 a 28°C foram as mais adequadas para o desenvolvimento do psílídeo.

Em campo, o aumento da população de psílídeos está relacionada com a temperatura, diferenças na população de *D. citri* (chamadas *strains*), fluxo vegetativo do pomar e o número de brotações disponíveis (LEÓN et al., 2011), sendo este último um fator limitante para a espécie, pois as fêmeas só ovipositam em brotações novas (PARRA et al., 2017). A contínua emissão de brotações faz com que as plantas se tornem mais atrativas ao psílídeo, já que a oviposição ocorre em brotos novos e tenros com folhas em desenvolvimento e entre as margens de folhas ainda fechadas, próximas ao meristema, além de favorecer o desenvolvimento dos ovos e ninfas (CATLING, 1970; GALLO et al., 2002; HALL, 2008). Kobori; Nakata; Ohto (2011), relataram que a presença de brotações nas plantas favorece o acasalamento dos adultos; aqueles insetos que estavam em plantas sem brotações não apresentaram comportamento de acasalamento.

Em adição, a qualidade nutricional da planta hospedeira e a umidade relativa do ar (UR) também favorecem um aumento populacional de *D. citri*, com efeitos tanto sobre as formas imaturas (ovos e ninfas) quanto sobre adultos (VENDRAMIM; GUZZO, 2012).

O psílídeo pode ocorrer em qualquer época do ano, porém entre a primavera e o verão ocorrem grandes infestações (HALL; HENTZ; ADAIR, 2008). Segundo Wenninger; Hall (2007), a movimentação do psílídeo está restrita às horas de luz do dia. Durante as estações chuvosas a população diminui, devido as chuvas eliminarem ovos e ninfas das plantas, porém os adultos se escondem em ramos posicionados na parte baixa da copa e na face abaxial das folhas (GALLO et al., 2002).

A dispersão do psílídeo para outras árvores começa em torno de quatro a cinco dias após a sua emergência (KOBORI; NAKATA; OHTO, 2011). Sakamaki (2005) estimou que *D. citri* pode se deslocar a uma distância maior que 1,5 km na ausência de hospedeiros adequados para o seu desenvolvimento. Contudo, Kobori; Nakata; Ohto (2011) observaram que o psílídeo se move muito pouco a partir do hospedeiro que está colonizando, não selecionando hospedeiros a longas distâncias, os autores acreditam que esse movimento ocorre ao acaso ou pela ação dos ventos.

Existe um número restrito de plantas que podem hospedar o psílídeo, dentre elas plantas do gênero *Citrus* spp., curry (*Bergera koenigii* (L.) Sprengel), *Severinia buxifolia* (Poiret) e falsa murta (*Murraya paniculata* (L.) Jack) (HALBERT;

MANJUNATH, 2004; MEAD; FASULO, 2010), sendo esta última considerada hospedeira principal e preferencial por proporcionar condições adequadas para o desenvolvimento do inseto, quando comparada a outras espécies (HALBERT; MANJUNATH, 2004; ALVES; DINIZ; PARRA, 2014). Segundo Patt; Sétamou (2010) esse efeito de *M. paniculata* está relacionado aos seus voláteis.

Há outros gêneros de rutáceas que permitem reprodução do psíldeo, incluindo as espécies *Choisya ternata* Kunth, *C. arizonica* Standley, *Helietta parvifolia* A. Gray (SÉTAMOU; GRAÇA; SANDOVAL, 2016) e *H. apiculata* Benthham (SERAPHIM et al., 2017).

Observa-se que as plantas hospedeiras de *D. citri* estão relacionadas exclusivamente com a família Rutaceae e Aurantioideae (AUBERT, 1990; ALBERT; MANJUNATH, 2004; YANG et al., 2006). Dentre as plantas citadas, além de *Citrus* spp., *M. paniculata* pode servir como reservatório de CLas, uma vez que pode hospedar uma grande quantidade de psíldeos atuando como hospedeiro intermediário de CLas para espécies cítricas, podendo atuar como fonte de inóculo (DAMSTEEGT et al., 2010). Porém, a taxa de transmissão dessas bactérias pelos insetos vetores é muito baixa, em torno de 1% (CIFUENTES-ARENAS et al., 2019). Com relação à *B. koenigii*, verificou-se que essa planta não é hospedeira da bactéria CLas (CIFUENTES-ARENAS et al., 2019; BELOTI et al., 2018).

2.5. Manejo cultural e de *D. citri* com reflexos sobre o controle de HLB

Não existe variedade comercial de copa e porta-enxerto imune à doença, existindo apenas diferenças de resistência e tolerância entre elas (FOLIMONOVA et al., 2009; RAMADUGU et al., 2016; BOSCARIOL-CAMARGO et al., 2017; MACHADO; LOCALI-FABRIS; COLETTA-FILHO, 2017). Ademais, pesquisas relacionadas à interação *D. citri*-hospedeiro identificaram genótipos de citros e afins que apresentam maior grau de resistência à colonização e/ou desenvolvimento desses insetos (GRAFTON-CARDWELL; STELINSKI; STANSLY, 2013). Westbrook et al. (2011) verificaram que *Poncirus trifoliata* é o genótipo de citros menos adequado ao desenvolvimento do psíldeo.

Medidas preventivas ao HLB estão baseadas na aquisição de mudas saudáveis, inspeções frequentes para identificação de plantas sintomáticas, as quais são realizadas nos pomares e plantas da região devido a fontes externas de inóculo, e

também estão baseadas no manejo do vetor (YAMAMOTO et al., 2008; FUNDECITRUS, 2020). Porém, além das plantas sintomáticas que são identificadas na inspeção, existem aquelas plantas escapes (sintomáticas não detectadas) e as assintomáticas infectadas (BELASQUE JR et al., 2010). Estas últimas são provenientes da janela temporal entre o período de latência (início da capacidade de transmissão) e de incubação (início dos sintomas visuais), permitindo que o patossistema se instale no agroecossistema e tornando difícil o monitoramento e controle da doença (YAMAMOTO et al., 2008; ROGERS; STANSLY, 2012; BASSANEZI et al., 2009). Além, Gottwald (2010) verifica que, mesmo as árvores que apresentam poucos sintomas visuais do HLB, a infecção pode ser completa ou quase completamente sistêmica.

Por não apresentar medidas totalmente efetivas para controlar o HLB, o monitoramento e controle do inseto vetor por meio de Manejo Integrado de Pragas – MIP, demonstra ser a maneira mais eficiente para conter a transmissão e disseminação da doença (BELASQUE JR et al., 2010; PARRA et al., 2017). O controle de *D. citri* deve ser feito a partir do plantio da muda e continuar durante toda a vida produtiva do pomar (YAMAMOTO et al., 2009), e é importante ser feito concomitantemente por todos os citricultores da mesma região, abrangendo todas as propriedades (BOVÉ, 2006).

O manejo integrado de pragas vetoras é difícil de ser implementado, devido às dificuldades de obter níveis de controle e estabelecer sistemas confiáveis de amostragem, pois apenas a presença do vetor no agroecossistema apresenta riscos de a doença ser introduzida de maneira eficiente, mesmo que em baixas populações (YAMAMOTO et al., 2008). A utilização de inseticidas químicos para o controle do HLB demonstrou ser uma medida cara e insustentável devido à natureza sistêmica do patógeno (TIWARI et al., 2011), além de causar sérios problemas ao ecossistema (BASSANEZI, 2013).

Devido à necessidade de reduzir os impactos negativos decorrentes da aplicação intensiva de insumos químicos, reduzir infestação e migração do psíldeo, a fim de garantir boa longevidade e produtividade do pomar, está sendo foco de pesquisas o desenvolvimento de táticas de controle ecologicamente sustentáveis e economicamente viáveis, através do MIP (NILSSON, 2010; RUSCH et al., 2010; PARRA et al., 2017).

Dentre essas táticas, destacam-se a utilização de agentes biológicos que incluem parasitoides, onde têm-se o ectoparasitoide *Tamarixia radiata* (Waterston) (Hymenoptera: Eulophidae) (HOY; JEYAPRAKASH; NGUYEN, 2001) e o endoparasitoide *Diaphorencyrtus aligarhensis* (Shafee, Alam & Agarwal) (Hymenoptera: Encyrtidae) (PARRA et al., 2017), predadores e patógenos, métodos comportamentais como utilização de plantas atraentes, repelentes e métodos culturais (PARRA et al., 2017). Outras táticas de manejo de insetos vetores vêm se aprimorando através de novas tecnologias que se mostram promissoras no combate de doenças. Podemos citar por exemplo o uso de *mulching* metalizado (CROXTON; STANSLY, 2014) e o uso de um composto a base de silicato de alumínio $[Al_2Si_2O_5(OH)_4]$, o caulim (MIRANDA et al., 2018).

A estratégia cultural/comportamental utilizando planta-isca tem chamado bastante a atenção dos pesquisadores (SHELTON; BADENES-PEREZ, 2006; HALL et al., 2008; YAN; ZENG; ZHONG, 2015; BELOTI et al., 2018; TOMASETO et al., 2019). Essas plantas utilizadas como isca apresentam características específicas, podendo ser naturalmente mais atraentes para a praga alvo na busca por alimentação e/ou oviposição do que a cultura principal (barreira), tipo “convencional” (HOKKANEN, 1991, JAVAID; JOSHI, 1995) ou podem ser “sem saída”, altamente atraentes para a praga, mas são indevidas para o crescimento e desenvolvimento da progênie, deterrente para oviposição ou ocorrer não sobrevivência dos seus descendentes (BADENES-PEREZ; SHELTON; NAULT, 2004; LU; LIU; SHELTON, 2004; SHELTON; NAULT, 2004).

SHELTON; BADENES-PEREZ (2006) definiram como planta-isca, também conhecida como cultura armadilha aquelas plantas que são utilizadas com a finalidade de atrair, desviar e/ou interceptar insetos pragas e/ou insetos vetores de fitopatógenos, concentrando-os em uma determinada parte do campo onde podem ser economicamente destruídos, reduzindo potencialmente danos importantes à culturas econômicas (CAVANAGH et al., 2009; LU et al., 2009), além de reduzir aplicações de pesticidas convencionais (RUSCH et al., 2010).

Plantas com efeito atraente ou repelente podem ser utilizadas no controle do psílídeo e aplicadas num sistema de plantio-isca (KHAN et al., 2001; SHELTON; BADENES-PEREZ, 2006; MANN et al., 2012a). Plantas repelentes podem provocar efeito no comportamento do inseto interferindo no processo de busca e seleção hospedeira, como verificado por Hall et al. (2007) e Hall et al. (2008), onde infestações

de *D. citri* foram reduzidas quando intercaladas no plantio de citros plantas de goiaba *Psidium guajava* L. (Myrtaceae), a qual é repelente ao inseto. Plantas atraentes podem ser utilizadas como cultura armadilha aplicadas na técnica de atraí-mata. Segundo Belotti et al. (2018), a espécie *B. koenigii* é atrativa para *D. citri* e pode ser recomendada como planta-isca no manejo do patossistema CLas - *D. citri* – *Citrus* spp., pois não é hospedeira da bactéria CLas.

Tomaseto et al. (2019) determinaram que *M. paniculata* é adequada para utilização como cultura armadilha para *D. citri*, visto que os psílídeos atraídos para a planta foram mortos devido ao controle químico com o neonicotinóide thiametoxam. Além disso, a presença da cultura armadilha diminuiu a incidência do HLB em 43%. Tomaseto; Krugner; Lopes (2016) relataram que plantas adequadas para a alimentação e desenvolvimento do psílídeo podem atuar como armadilha para atrair e diminuir o movimento de *D. citri* em pomares comerciais. Cifuentes-Arenas et al. (2019) mostraram que *M. paniculata* pode ser considerado um hospedeiro alternativo ao patógeno CLas “sem saída” epidemiologicamente, visto que, a taxa de transmissão por *D. citri* é muito baixa (1%) e a planta é altamente atrativa ao psílídeo vetor (HALBERT; MANJUNATH, 2004).

Considerando que a disseminação primária se dá por *D. citri* infectivo que emigra de fontes externas de inóculo, plantas-isca estabelecidas ao redor das bordaduras se mostram bastante promissoras manejo desses psílídeos emigrantes, pois a doença apresenta uma característica marcante de efeito de borda, onde a maior concentração de plantas sintomáticas estão nas margens das propriedades e talhões (BASSANEZI et al., 2005; GOTTWALD; IREY, GAST, 2008). Além, plantas sintomáticas se localizam em espaços plantação adentro criados por corredores, represas, canais, matas, etc (GOTTWALD; IREY; GAST, 2008), onde o psílídeo prefere se estabelecer (SÉTAMOU; BARTELS, 2015) e representa a disseminação secundária, o qual se dá a curtas distâncias dentro do talhão (GOTTWALD et al., 2007; GOTTWALD et al., 2008). Segundo Bassanezi et al. (2009) pomares afastados a mais de dois quilômetros de distância do foco do HLB dependem do manejo local para o controle da doença.

Plantas-iscas também podem ser implementadas combinadas com outros métodos de controle a fim de aumentar a sua atratividade e eficácia, como utilização de controle biológico, devido às interações das plantas com seus respectivos inimigos naturais, a fim de aumentar a sua população (LANDIS; WRATTEN; GURR, 2000) ou

aplicação de semioquímicos para aumentar a atratividade de uma cultura armadilha ou em uma cultura regular, a qual age como armadilha após a aplicação dos semioquímicos (FOSTER AND; HARRIS, 1997).

Além das técnicas citadas, é importante associá-la ao controle químico e ao melhoramento de plantas (SHELTON; NAULT, 2004; SHELTON; BADENES-PEREZ, 2006). Segundo Badenes-Perez; Shelton; Nault (2005) essa eficiência é fundamental para minimizar a porcentagem de terra investida na produção de uma cultura armadilha, tendo em vista que a adoção desta técnica depende também da potencialidade de retorno econômico ao produtor (SHELTON; BADENES-PEREZ, 2006).

2.6. *Ruta graveolens* e efeitos sobre biologia e comportamento de insetos.

A arruda comum (*Ruta graveolens* L.), também conhecida como arruda-dos-jardins, pertence à família Rutaceae, é uma planta herbácea perene de aproximadamente um metro e meio de altura, originária do Mediterrâneo (ASGARPANAH; KHOSHKAM, 2012). É uma planta de fácil cultivo que possui resistência à seca e se adapta a diferentes tipos de solo, preferindo aqueles expostos ao sol, arenosos e com pH alcalino (MAGHDAM et al., 2012). Suas folhas possuem um odor forte e muito característico proveniente de glândulas que possuem óleo essencial (FERREIRA et al., 2004; PREVIERO et al., 2010).

É uma planta medicinal bastante conhecida desde os tempos antigos, onde é considerada estimulante, diurética, anti-inflamatória e é utilizada no tratamento de várias doenças, como problemas oculares e pulmonares, dermatite, dores de cabeça e reumatismo (RATHEESH; SINDHU, HELEN, 2013). Além disso, atua sobre infecções (KATAKI et al., 2014) e possui propriedades antiparasitária, anti-helmíntica, anti-histamínica (RODRÍGUEZ-ECHEVERRI, 2010) e antimicrobiana (IVANOVA et al., 2005).

Os extratos e óleos de *R. graveolens* também têm aplicação na agricultura e proteção de plantas, pois exibem uma ampla gama de atividades biológicas (STASHENKO; ACOSTA; MARTINEZ, 2000). Esta atividade biológica está relacionada com a presença de cumarinas e alcaloides, e o óleo vegetal é constituído especialmente de cetonas, aminoácidos, triterpenos, taninos, flavonoides, glicosídeos e esteróis (STASHENKO; ACOSTA; MARTINEZ, 2000; HADDOUCHI et al., 2013).

Alguns autores verificaram atividade fitotóxica (HALE et al., 2004), ação fungicida (OLIVA et al., 2003; MEEPAGALA et al., 2005), nematicida (SASANELLI et al., 2007), acaricida (POTENZA et al., 2006), piolhcida (YANG et al., 2009; BAGAVAN et al., 2011), repelente (INNOCENT; GIKONYO; NKUNYA, 2008) e inseticida de *R. graveolens* (FRANCO; FONTANA, 2005), onde plantas da família Rutaceae é considerada promissora nesta ação (JACOBSON, 1989).

O efeito inseticida de plantas de arruda tem se mostrado uma ferramenta promissora no controle de insetos. Os efeitos sobre coleópteros foram observados por diversos autores. Barbosa et al. (2009) verificou mortalidade de adultos *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae) por meio de ingestão e contato, a uma concentração de 5% de extrato aquoso de folhas. Já Marcomini (2009) verificou a mortalidade através do extrato sobre adultos de *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). A espécie *R. graveolens* apresenta também bioatividade sobre o gorgulho do milho *Sitophilus zeamais* (Motschulsky) (Coleoptera: Curculionidae), apresentando propriedades inseticidas e repelentes (PERERA; KARUNARATNE; CHINTHAKA, 2017). A repelência também foi observada para o gorgulho do arroz *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae), através da utilização de óleo essencial (PERERA; KARUNARATNE, 2016).

Sobre lepidópteros, vários estudos já foram realizados. Barbosa et al. (2011) verificaram efeito inseticida sobre adultos de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) em parcelas tratadas com extrato de *R. graveolens*, além de observarem da mesma forma um menor número do parasitoide desta espécie, pertencente à família Eulophidae (Hymenoptera). Santiago et al. (2008) verificaram efeito do extrato aquoso de folhas de arruda a 10% sobre a biologia de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), reduzindo o peso das pupas e em um outro estudo com a mesma praga, Ayil-Gutiérrez et al. (2015) obtiveram mortalidade de 94% e 74% das lagartas quando expostas ao extrato com acetato de etila e com etanol, respectivamente. Knaak et al. (2012) também verificaram efeito inseticida do extrato obtido por maceração e infusão de arruda sobre *S. frugiperda*.

Na ordem Diptera, o extrato de arruda foi observado com efeito inseticida sobre larvas do quarto instar de *Anopheles albimanus* (Wiedemann) (Diptera: Culicidae) (CASTRO; VARGAS; BAUTISTA, 2011), e com atividade repelente sobre *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) (TABANCA et al., 2012).

Para insetos sugadores da ordem Hemiptera, já foram observados efeitos inseticidas do extrato de arruda sobre adultos de mosca-branca *Bemisia tabaci* biótipo B (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) (ROMERO et al., 2015; GHABBARI, 2018). Carvalho, Bortolotto; Ventura (2017) verificaram que o consórcio entre tomate e *R. graveolens* reduz infestações de *B. tabaci* e Silva; Toscano; Sales (2018) determinaram atividade repelente a esta praga após 6, 24 e 48h de exposição. Pascal et al. (2003) verificaram que *R. graveolens* é um hospedeiro apropriado para *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Hemiptera: Aleyrodidae), apresentando maior densidade de ovos e ninfas. Santos et al. (2017) relataram o primeiro registro de ocorrência de *Gargaphia lunulata* (Mayr) (Hemiptera: Tingidae) em arruda no Estado do Acre.

Mann et al. (2012a) verificaram que 2-undecanona, um dos principais constituintes do óleo de arruda, repeliram os psílídeos *D. citri* adultos, contudo, afirmaram que a bioatividade dessas moléculas químicas com efeitos de atração e/ou repelência vai depender da dose testada. Outros pesquisadores afirmam que os compostos orgânicos voláteis produzidos e liberados pelas plantas podem sofrer alterações com a mistura dos mesmos, induzidas por influência de fatores abióticos e bióticos (FERRY et al., 2004; ARIMURA; MATSUI; TAKABAYASHI, 2009). Essa alteração no efeito sobre o inseto pode ser verificada através de observações preliminares de adultos de *D. citri* procurando esta planta para abrigo e alimentação (Thalita de Freitas Albuquerque, comunicação pessoal), efeito contrário ao observado por Mann et al. (2012a). Apesar dessa observação, não há informações sobre a interferência desta planta no desenvolvimento e comportamento de *D. citri*.

O conhecimento sobre plantas atraentes ou repelentes ao psílídeo é importante para manipulação do comportamento da praga, podendo ser compatível com outras técnicas no MIP e uma opção eficaz a fim de diminuir os efeitos negativos que são causados pela utilização dos inseticidas químicos (SHIN-FOON; YU-TONG, 1993).

2.7. Mecanismo de seleção hospedeira de insetos fitófagos, principalmente *Diaphorina citri*

É fundamental conhecer os aspectos de seleção hospedeira para determinar as táticas de manejo das pragas visadas e o papel ou potencial de determinadas espécies vegetais como candidatas a plantio-isca ou como fontes de semioquímicos (SHELTON; BADENES-PEREZ, 2006).

A seleção de plantas hospedeiras pelos insetos é baseada na escolha de locais com melhores recursos para o crescimento, sobrevivência, reprodução e desenvolvimento da progênie, além da busca por refúgio ou abrigo (PATT et al., 2011). Neste processo, o inseto escolhe seu hospedeiro à distância com base em estímulos visuais e olfativos (químicos) e após, reconhece-o pelo contato, através de recursos gustativos (BERNAYS; CHAPMAN, 2007; TSAGKARAKIS; ROGERS, 2010; WESTBROOK et al., 2011).

Segundo Picanço (2010), esse processo de seleção hospedeira ocorre por meio de uma cadeia de eventos definidos por uma sequência de comportamentos a partir da resposta dos insetos fitófagos aos estímulos advindos do hospedeiro, os quais acontecem no tempo e no espaço. Os principais estímulos estão relacionados primeiramente à localização e ao reconhecimento do habitat da planta hospedeira, através de recursos visuais e olfativos, acarretando num movimento orientado em direção à fonte e após, em movimentação arrestante na planta, o qual leva o inseto a cessar o movimento, caso seja repelente, o inseto irá orientar-se em direção contrária à planta (PICANÇO, 2010).

O próximo passo está relacionado ao reconhecimento da planta hospedeira através do contato (BERNAYS; CHAPMAN, 2007; PICANÇO, 2010). Esta é uma etapa fundamental para a sobrevivência e o desenvolvimento da prole, principalmente para aquelas espécies cuja fase imatura é imóvel (TSAI; LIU, 2000; STAMPS, 2009; PICANÇO, 2010).

O olfato dos insetos destaca-se como a modalidade sensorial mais importante no processo de localização do habitat e seleção do hospedeiro. A partir de coevolução, os aleloquímicos cairomônios liberados pelas plantas orientam os insetos de encontro com as mesmas (TRIGO, 2000; LIMA-MENDONÇA et al., 2014).

Segundo Picanço (2010), os estímulos visuais como a forma e a cor do hospedeiro são estímulos de atração dos insetos, sendo a última influenciada pela idade das folhas e plantas, senescência e presença de patógenos.

Mauck; Moraes; Mescher (2010) evidenciaram que a emissão de voláteis por plantas infectadas por fitopatógenos podem aumentar a atratividade dos insetos vetores, o que propicia a disseminação do patógeno. Em trabalhos de preferência hospedeira, Wu et al. (2015) evidenciaram que plantas de citros infectadas com CLas foram mais atrativas ao psílideo *D. citri*, além de se alimentarem mais, comparativamente a plantas saudáveis, porém, após 38h voltaram a se alimentar em plantas saudáveis. Os mesmos autores também verificaram que plantas com folhas amarelas, tanto infectadas como aquelas saudáveis, mas fisiologicamente amarelas, foram mais atraídas do que plantas com folhas verdes, infectadas e saudáveis.

O estudo de Martini e colaboradores (2015) evidencia que a infecção de *D. citri* pelo patógeno bacteriano da planta é um possível mecanismo evolutivo para promover a sua própria disseminação.

No processo de escolha hospedeira, após a localização do mesmo pelo inseto, ocorre uma etapa de reconhecimento caracterizada pelo contato do inseto com a planta (PICANÇO, 2010). Nesta etapa, os insetos exploram o possível hospedeiro através de pouso, contato superficial através dos tarsos, antenas, aparelho ovipositor e bucal (BENTO; NARDI, 2009). Através da superfície identificam semioquímicos presentes na superfície foliar através de órgãos sensoriais (DETHIER, 1982).

O processo de aceitação alimentar em uma planta hospedeira é definido após o contato do inseto fitófago, através de estímulos “iniciantes ou excitantes”, levando o inseto a iniciar e manter a alimentação ou oviposição (TSAI; LIU, 2000; NAVA et al., 2007). A preferência por esses locais ótimos para alimentação e oviposição é fator importante para insetos sugadores como o psílideo *D. citri* em razão da baixa mobilidade das ninfas (TECK et al., 2011). Estudos de desenvolvimento (ovo-adulto) de *D. citri* em diversas plantas hospedeiras, revelaram maior número e viabilidade de ovos e menor período ovo-adulto em plantas de falsa murta (NAVA et al., 2007; TECK et al., 2011). Segundo Halbert e Manjunath (2004), Patt e Sétamou (2010) e León et al. (2011), esta planta proporciona condições mais adequadas para o desenvolvimento do psílideo devido ao intenso fluxo vegetativo combinados com aceitação visual, olfativa e gustativa.

A determinação da preferência hospedeira, movimentação na planta (comportamento arrestante ou repelente) e oviposição, pode ser feita através de testes de livre escolha ou confinamento, e a preferência para alimentação pode ser avaliada com base na atratividade ou consumo nos cultivares teste, sob condição de confinamento ou não GALLO et al., 2002). Os testes de preferência visual podem ser feitos através de testes de pistas visuais (FERERES et al., 2016) e a determinação da preferência olfativa pode ser feita através de ensaios utilizando olfatômetro, os quais podem determinar atratividade ou repelência aos compostos liberados pelas plantas (WENNINGER; STELINSKI; HALL, 2009; PATT; SÉTAMOU 2010; PATT et al., 2011; MANN et al. 2012a).

Sendo assim, o estudo do comportamento de insetos vetores de fitopatógenos frente a uma planta hospedeira ou possivelmente hospedeira pode contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias de manejo da praga, com reflexos sobre a taxa de transmissão da doença (TSAI; LIU, 2000; YAMAMOTO et al., 2008).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos deste trabalho foram conduzidos no Departamento de Entomologia e Acarologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (Esalq) – Universidade de São Paulo (USP).

3.1. Obtenção e manutenção de plantas

Plantas sadias

As plantas sadias de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck ‘Pineapple’ (Rutaceae) e de *Ruta graveolens* L. (Rutaceae) obtidas através de sementes foram mantidas em casa de vegetação com tela antiafídeos, para os experimentos de respostas comportamentais e de transmissão. Após a obtenção dos *seedlings* em tubetes, os mesmos foram transplantados para vasos de 800 ml com 9,7 cm de altura e 13 cm de diâmetro. As plantas utilizadas nos experimentos apresentaram 25-30 cm de altura e rotineiramente foram realizadas podas para padronizar o tamanho das plantas e brotos. As plantas foram fertilizadas através de irrigação com 0,08 g/L de nitrato de amônia (33% N, 1% K) e 0,91 g/L de nitrato de cálcio (15,5% N, 18% Ca), e uma vez por semana com 0,33 g/L de sulfato de magnésio (1% K₂O, 11,8% S, 9% Mg), 0,36 g/L de nitrato de potássio (12% N, 43% K₂O, 1% S, 1% Mg), 0,14 g/L de fosfato monoamônico (12%N, 61% P₂O₅), 0,09 g/L de ferro (5% Fe orto-orto, 6% quelato de Fe EDTA), 0,03% g/L de sulfato de cobre (24% Cu, 11% S) e 0,02 g/L de sulfato de zinco (20% Zn, 10% S).

Plantas-fonte de HLB

Plantas de laranja doce, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck ‘Pera’ (Rutaceae), enxertada em limoeiro, *Citrus limon* (L.) Osbeck ‘Cravo’ (Rutaceae), foram inoculadas por enxertia com borbulhas de planta infectada por *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) e mantidas no Departamento de Entomologia e Acarologia da Esalq/USP. Para confirmação da presença de CLas, as plantas-fonte foram submetidas a testes de PCR quantitativos. De acordo com o protocolo e metodologia descrita no item 3.5, sendo selecionadas para aquisição do patógeno pelo psíldeo *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) apenas aquelas que mostraram maiores concentrações de CLas, indicadas no qPCR por um limiar de ciclos (*Cycle threshold*) entre 20 e 24 (Tabela 1).

Tabela 1. Valores de ciclos (Cycle threshold – Ct) em protocolo de PCR quantitativo de plantas de laranja doce, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck ‘Pera’ (Rutaceae), enxertada em limoeiro, *Citrus limon* (L.) Osbeck ‘Cravo’ (Rutaceae), usadas como fonte de *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) para aquisição por *Diaphorina citri* em experimentos de transmissão e olfatometria

Plantas-fonte	Valor de Ct	
	I e II*	Experimento III, IV e V* e Bioensaios de Olfatometria
1	<u>22,58</u>	<u>22,33</u>
2	24,75	<u>21,99</u>
3	24,55	<u>22,42</u>
4	<u>20,06</u>	<u>20,67</u>
5	<u>20,37</u>	23,89
6	<u>21,61</u>	24,03
7	19,89	30,72
8	34,41	<u>23,38</u>
9	33,81	28,48
10	28,07	<u>23,81</u>
Média	25,01 ± 1,34	24,17 ± 0,68

Plantas-fonte com valores de *Cycle threshold* (Ct) sublinhados foram selecionadas para PAA de CLas através de *D. citri*.

*Os algarismos romanos referem-se às repetições do experimento de transmissão de CLas por *D. citri*.

3.2. Criação de *D. citri*

A criação de *D. citri* foi realizada em sala climatizada, temperatura (T) de 26 ± 2° C, fotoperíodo 14:10 h e umidade relativa (UR) de 60 ± 10%, com o objetivo de prover insetos em quantidade suficiente para a realização dos experimentos e obtê-los de forma a atender às necessidades biológicas e comportamentais das etapas subsequentes, além da manutenção da colônia.

3.2.1 Insetos sadios

Para a produção de insetos sadios, plantas sadias de falsa murta, *Murraya paniculata* (L.) Jack (Rutaceae), considerada hospedeiro preferencial de *D. citri* (HALBERT; MANJUNATH, 2004, ALVES; DINIZ; PARRA, 2014), com brotações novas (ainda não expandidas) e livres de outras pragas foram utilizadas como substrato de oviposição e desenvolvimento de ninfas. As plantas de murta foram obtidas a partir de sementes, transferidas para sacos plásticos de 2L contendo substrato comercial da marca Tropstrato HT (Vida Verde; Mogi Mirim, SP), constituído a base de casca de pinus, vermiculita, superfosfato simples e nitrato de potássio, e mantidas em estufas com tela antiafídeo, sendo podadas cerca de 2 semanas antes de sua utilização na criação, para emissão de novos brotos.

Utilizaram-se de gaiolas construídas com cantoneiras de alumínio, com dimensões de 40 x 33 x 33 cm (altura x largura x profundidade) com porta de acrílico, fundo metálico e laterais e teto cobertos com tela antiafídeo. Para oviposição foram ofertadas quatro mudas de murta, por gaiola, a 200 psílídeos livres de CLas e, após um período de 7 dias, os adultos foram removidos, permanecendo apenas as plantas contendo ovos e ninfas de *D. citri*. Entre 7 e 14 dias após a emergência, os adultos foram confinados sobre novas mudas de murta para um novo período de oviposição, visando à manutenção da colônia sadia (Fig. 1).

Figura 1. Criação de *Diaphorina citri* mantida sobre plantas de murta *Murraya paniculata* no Laboratório de Insetos Vetores de Fitopatógenos no Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ/USP (T $26 \pm 2^\circ$ C, fotoperíodo 14:10 e $60 \pm 10\%$ UR).

3.2.2. Insetos infectados com CLas

Fêmeas de *D. citri* apresentando abdômen laranja e robusto (Fig. 2b), entre 7 e 14 dias (para propiciar acesso a cópula com machos da criação), provenientes da criação livre de CLas, foram confinadas sobre brotos de plantas-fonte de HLB em gaiolas de copo plástico de 500 ml (Fig. 3a) ou em gaiolas de *voil* (Fig. 3b). Foram utilizadas cinco fêmeas por brotação não expandida de planta-fonte com menor valor de *Ct* (vide tabela 1, item 3.1) e mantidas por 4-7 dias nesses ramos.

Após este período, as fêmeas foram retiradas e descartadas, permanecendo os ovos e ninfas até a emergência, cerca de 16 dias. Após a emergência, os adultos foram mantidos na planta-fonte por um período de 7 a 14 dias (finalizando então o período de acesso à aquisição – PAA), para posteriormente serem utilizados nos experimentos de olfatometria e no período de acesso à inoculação (PAI) do experimento de transmissão.

Figura 2. Vista ventral de fêmeas adultas de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) apresentando abdômen com diferentes colorações. **(A)** Adulta de *D. citri* com abdômen de coloração azul esverdeado; **(B)** Adulta de *D. citri* copulada, apresentando abdômen de coloração laranja, à qual está associada à produção de ovos; **(C)** Adulta de *D. citri* com abdômen de coloração cinza.

Figura 3. Gaiolas utilizadas em planta de laranja doce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck 'Pera') enxertada em limoeiro *Citrus Limon* 'Cravo', fonte de *Candidatus Liberibacter asiaticus* para o Período de Acesso à Aquisição (PAA) por *Diaphorina citri*. **(a)** Gaiola de copo plástico (500 ml) com *voil* na tampa e nas laterais para promover aeração utilizada em planta com uma única brotação lateral e **(b)** Gaiolas de *voil* utilizada em planta com várias brotações.

3.3. Comportamento de escolha hospedeira de *D. citri* frente a plantas de *R. graveolens* e *C. sinensis*

3.3.1. Teste de pouso e permanência sob condições de livre escolha

Esse teste teve o objetivo de avaliar a preferência hospedeira de *D. citri*, ao longo do tempo, em plantas de *R. graveolens* e *C. sinensis*. Duas plantas de cada tratamento foram introduzidas em gaiolas confeccionadas com tela antiafídeo (57 x 46,5 x 46,5 cm), dispostas de maneira alternada dentro da gaiola e espaçadas a aproximadamente 30 cm umas das outras. A fim de evitar interferência de luz lateral, as mesmas foram posicionadas em estantes sob luz (Fig. 4).

Para a condução deste experimento, foram utilizados adultos de *D. citri* não sexados provenientes da criação livre de CLas, apresentando 7 a 14 dias de idade. Em cada gaiola, foram liberados 60 psílídeos não sexados (proporção de 15 insetos por planta). Os adultos foram introduzidos em um tubo de vidro (2,5 cm de diâmetro e 8,5 cm de altura) revestidos com fita isolante preta, o qual foi colocado no centro da gaiola.

Para a avaliação deste experimento, foi contado o número de insetos pousados nas folhas e ramos das respectivas plantas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 24, 36, 48 e 72 horas após a liberação. O experimento foi conduzido com delineamento inteiramente casualizado e com 10 repetições.

O teste foi conduzido em sala climatizada (temperatura $26 \pm 2^\circ \text{C}$, fotoperíodo de 14:10 e umidade relativa de $60 \pm 10\%$).

Figura 4. Gaiola confeccionada com tela antiafídica (57 cm de altura, 46,5 cm de largura e 46,5 cm de profundidade) utilizada no teste de pouso e permanência de *D. citri* sob condição de livre escolha, contendo duas plantas de *Citrus sinensis* 'Pineapple' e duas plantas de *Ruta graveolens* dispostas de maneira alternada e distantes, aproximadamente, a 30 cm umas das outras.

3.3.2. Teste de comportamento arrestante

Esse teste teve a finalidade de avaliar, ao longo do tempo, as chances de *D. citri* permanecer em *R. graveolens* sem migrar para *C. sinensis* e vice-versa.

Para a execução do mesmo, foram confinados 30 psílídeos/planta previamente sexados conforme formato do último esternito abdominal (Fig. 5), utilizando-se machos e fêmeas, separadamente, em *C. sinensis* e *R. graveolens* 24 horas antes da montagem efetiva do experimento. Para confinamento dos insetos, utilizou-se de gaiolas de acetato com 21 cm x 9 cm de altura e diâmetro, respectivamente, com *voil* na tampa e nas laterais a fim de promover aeração (Fig. 6).

Após o período proposto, as gaiolas de acetato foram retiradas cuidadosamente das plantas para os psílídeos não voarem, foram contabilizados os insetos pousados nas plantas e após, inseridas em gaiolas com tela antiafídeo (57 x 46,5 x 46,5 cm) e posicionada sob luz, sem interferência de luz lateral, juntamente com mais uma planta contrastante não infestada, estas posicionadas a aproximadamente 30 cm umas das outras (Fig. 7). Foi feita a análise do comportamento arrestante contabilizando os insetos nas duas plantas por um período de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 24, 36, 48 e 72 horas. O delineamento foi inteiramente casualizado, contendo 10 repetições com infestação de *D. citri* em *C. sinensis* e 10 repetições com infestação de *D. citri* em *R. graveolens*, para ambos os sexos.

O experimento foi conduzido em sala climatizada (temperatura $26 \pm 2^\circ \text{C}$, fotoperíodo de 14:10 e UR $60 \pm 10\%$).

Figura 5. Vista ventral de macho e fêmea de *Diaphorina citri* para auxiliar na separação dos sexos, em (A) Vista ventral do adulto macho de *D. citri* apresentando o último esternito abdominal com formato arredondado; (B) Vista ventral do adulto fêmea de *D. citri* apresentando o último esternito abdominal com formato pontiagudo.

Figura 6. Gaiolas de acetato (21 cm de altura e 9 cm de diâmetro) utilizadas para confinar os psíldeos nas plantas-teste 24 horas antes da montagem efetiva do experimento de comportamento arrestante. **(A)** 50 insetos/planta confinados em *Citrus sinensis* 'Pineapple' e **(B)** 50 insetos /planta confinados em *Ruta graveolens*.

Figura 7. Gaiola utilizada nos experimentos de comportamento arrestante, confeccionada com tela antiáfídica, dimensões: 57 cm de altura, 46,5 cm de largura e 46,5 cm de profundidade e posicionadas sob luz. **(A)** *Citrus sinensis* 'Pineapple' infestada com *Diaphorina citri* e uma planta de *Ruta graveolens* não infestada. Em **(B)** consta uma planta de *R. graveolens* infestada com *D. citri* e uma planta de *C. sinensis* não infestada.

3.3.3. Teste de pista visuais

O objetivo deste teste foi determinar a preferência de *D. citri* através de sinais visuais de *R. graveolens* e *C. sinensis*. Para execução utilizou-se de folhas de ambas as plantas e foi conduzido de acordo com método adaptado de Fereres; Kampmeier; Irwin (1999), onde, a base das gaiolas foram compostas de uma plataforma de aterrisagem, feita com cartolina cor terra apresentando as mesmas dimensões de largura e profundidade da gaiola, a qual foi dividida ao meio para que houvesse quatro sessões independentes, cada uma com 9 quadrados latinos com 10 x 10 cm de base (Fig. 8).

As gaiolas utilizadas foram confeccionadas com malha de plástico e tela antiafídeo, modelo BugDorm 2400F (MegaView Science Co., Taichung 40762, Taiwan) (115 x 75 x 75 cm – altura x largura x profundidade, respectivamente).

Folhas de *R. graveolens* e *C. sinensis* oriundas de plantas sadias foram distribuídas nos quadrados latinos e acima delas foi colocada uma placa de acrílico de apenas 0,3 cm de altura revestida com óleo mineral de maneira uniforme, a fim de fixar o inseto na placa, evitando a sua movimentação. Cerca de 140 psílídeos não sexados e livres de CLas foram liberados numa plataforma de vôo situada no topo da gaiola, distribuídos em cinco tubos falcon de 14 ml com 1,5 cm de diâmetro e revestidos com fita isolante preta, à proporção de 28 psílídeos por tubo (Fig. 9). Esta plataforma de vôo estava situada a uma distância de aproximadamente 84 cm da plataforma de aterrissagem.

Este experimento foi montado em horário compreendido entre 11 e 12 h e permaneceu por um período de 48 h. Após este período, foram contabilizados os insetos aterrissados na placa de acrílico em cada quadrado latino. O experimento foi conduzido com delineamento em quadrado latino e com 10 repetições.

Este bioensaio foi conduzido em casa de vegetação com sistema de arrefecimento tipo *pad-fan*, com controle de temperatura através de aquecedor ativado por termostato ($25 \pm 5^{\circ}\text{C}$) e ventilação, apresentando fotoperíodo de 12h.

C	B	T	C	B	T
B	T	C	B	T	C
T	C	B	T	C	B
C	B	T	C	B	T
B	T	C	B	T	C
T	C	B	T	C	B

Figura 8. Disposição dos tratamentos no quadrado latino. B: Branco (cor terra); C: Controle (*Citrus sinensis* 'Pineapple'); T: Tratamento (*Ruta graveolens*)

Figura 9. Gaiolas BugDorm situadas em casa de vegetação (T: $25 \pm 5^{\circ}\text{C}$; Fotoperíodo: 12h) utilizadas nos experimentos de pistas visuais. No círculo vermelho está a plataforma de voo com cinco tubos falcon, onde os adultos de *Diaphorina citri* foram liberados a uma proporção de 28 insetos/tubo, distante 84 cm da plataforma de aterrissagem.

3.3.4. Teste de oviposição sob condições de confinamento

Esse teste objetivou determinar, comparativamente, a quantidade de ovos e preferência para oviposição de *D. citri* em plantas de *R. graveolens* e *C. sinensis*, sob condições de confinamento. Para a condução, foram utilizados *seedlings* de *C. sinensis* e de *R. graveolens*, ambas com brotações não expandidas para serem usadas como substrato para oviposição de *D. citri*.

Cada muda foi inserida em gaiola de acetato (21 cm x 9 cm Ø) com *voil* na tampa e nas laterais a fim de promover aeração (Fig. 10). Psílídeos provenientes da criação, livres de CLas e previamente sexados conforme formato do último esternito abdominal (vide Fig. 5, item 3.2.2.) foram inseridos, a uma proporção de 10 casais/gaiola, mantidos em confinamento por 48 horas. A variável analisada e contabilizada foi o número de ovos. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado e com 10 repetições para ambas as plantas.

Esse ensaio foi realizado em sala climatizada, T 26 $\pm$ 2° C, fotoperíodo de 14:10 e UR 60 $\pm$ 10%.

Figura 10. Gaiolas de acetato (21 cm de altura e 9 cm de diâmetro) com *voil* na parte superior e nas laterais para promover aeração utilizadas nos experimentos de oviposição. (a) Experimento com *Citrus sinensis* 'Pineapple' e (b) experimento com *Ruta graveolens*. Contêm 10 casais de *D. citri* por gaiola.

3.3.5. Teste de excreção de *honeydew* de adultos de *D. citri* sob condições de confinamento

O experimento teve por objetivo determinar a taxa de excreção de *honeydew* de machos e fêmeas de *D. citri* em plantas de *R. graveolens* e *C. sinensis*, como parâmetro indireto para comparar a ingestão de seiva de floema nas duas espécies vegetais. Foram utilizados insetos com idade de 7 a 14 dias após emergência e os mesmos foram confinados em gaiolas do tipo *clip cage* nas folhas das respectivas plantas (uma gaiola por planta). A base da gaiola foi forrada por um papel filtro com as mesmas dimensões da gaiola, para absorção do *honeydew* excretado.

As gaiolas foram montadas paralelas ao chão, com auxílio de palitos de bambu, para que o *honeydew* fosse depositado no papel filtro e não nas paredes das placas (Fig. 11). Com o auxílio de um sugador manual, foram introduzidos em cada gaiola 10 psílídeos adultos livres de CLas anteriormente, sexados conforme formato do último esternito abdominal (vide Fig. 5, item 3.2.2.) e previamente submetidos a um jejum de 2 h.

Os insetos foram mantidos sob alimentação por um período de 48 h e em seguida os papéis filtro contendo *honeydew* foram transferidos para placas de petri de vidro e tratados com acetona a 2% de ninidrina, a fim de corar os aminoácidos presentes na excreção. Os papéis filtro foram digitalizados a 600 dpi e com o auxílio do *software* Quant v 1.0.0.22 foi determinada a área correspondente ao *honeydew* excretado pelos adultos de *D. citri* (Fig. 12).

O experimento foi conduzido com delineamento em blocos casualizados e com 10 repetições por espécie vegetal e sexo. Esse ensaio foi realizado em sala climatizada (temperatura $26 \pm 2^\circ \text{C}$, fotoperíodo de 14:10 e umidade relativa $60 \pm 10\%$).

Figura 11. Gaiola do tipo *clip cage* utilizada no experimento de avaliação de *honeydew* de adultos machos e fêmeas de *Diaphorina citri*, dispostas paralelamente ao nível do solo. (a) e (b) Experimento montado em *Citrus sinensis* 'Pineapple', (c) e (d) Experimento montado em *Ruta graveolens*.

Figura 12. Demonstração de área do *honeydew* de adultos de *Diaphorina citri* corada através do software Quant v 1.0.0.22 (*Honeydew* de fêmeas de *D. citri* após alimentação em *Ruta graveolens* – amostra 3, repetição 1). (a) Papel filtro tratado com acetona a 2% de ninidrina; (b) Papel filtro após medir área no programa Quant v 1.0.0.22.

3.3.6. Bioensaios de olfatometria contrastando voláteis de *R. graveolens* e *C. sinensis*

Os bioensaios de olfatometria tiveram a finalidade de caracterizar o comportamento de seleção hospedeira de *D. citri* sadio, infectivo (infectado com CLas) e de psíldeos criados em planta-fonte, porém, qPCR negativo, frente a voláteis de *R. graveolens* e *C. sinensis*, com intuito de identificar respostas de atratividade e preferência.

Dois estudos distintos foram conduzidos por olfatometria: a) insetos criados em planta de murta e livres da bactéria, e b) insetos criados em plantas cítricas infectadas por CLas, infectados ou não. Ambos seguiram o método proposto por Beloti et al. (2017) e foram conduzidos no horário compreendido entre 10 e 17 horas.

As variáveis analisadas foram a porcentagem de resposta e o tempo (s) que adultos de ambos os sexos levaram para escolher um campo volátil.

Os bioensaios foram realizados em sala climatizada (temperatura $26 \pm 2^\circ \text{C}$, fotoperíodo de 14:10 e umidade relativa $60 \pm 10\%$).

a) Bioensaios de olfatometria com insetos criados em planta de murta e livres da bactéria

Machos e fêmeas de *D. citri* CLas-free provenientes da criação (Item 3.2.1.) de 7 a 14 dias após a emergência foram utilizados nos bioensaios de olfatometria. Antes de iniciar o ensaio, os insetos foram sexados conforme formato do último esternito abdominal (vide Fig. 5, Item 3.2.2.) e mantidos em jejum durante 2 horas e após este período foram liberados individualmente na base do olfatômetro (braço principal).

Os bioensaios foram realizados em arena de Y tendo 10 cm de comprimento cada braço e os orifícios de entrada e saída de ar com 3 cm de diâmetro. A razão de entrada de ar previamente filtrado no sistema foi de 1,3 L/min. O mesmo foi drenado pelo braço principal, pelo qual também foi feita a introdução do inseto. Para isolamento dos campos voláteis, as plantas *R. graveolens* e *C. sinensis* foram armazenadas em cubetas de vidro de 45 cm de altura e 18 cm de diâmetro. Foram posicionadas luzes sob a arena de ensaio.

Cada bioensaio teve duração máxima de 10 min, contabilizou-se 5 min (300 s) para o inseto entrar no sistema (quando o inseto cruzou uma linha marcada no braço principal do olfatômetro, denominada por Beloti et al. (2017) como linha de seleção) (Fig. 13). Os psílídeos que não ultrapassaram esta linha foram descartados, apenas os que responderam ultrapassando a linha de seleção dos braços laterais foram incluídos na análise de dados. Aqueles que ultrapassaram a linha de seleção do braço principal, mas não escolheram nenhum braço lateral do olfatômetro após o tempo estipulado, foram incluídos como não respondentes (NR). Após o inseto entrar no sistema, contabilizou-se 5 min (300s) para mostrar resposta comportamental aos braços laterais do olfatômetro.

Figura 13. Arena de Y utilizada no experimento de olfatometria (A) e diagrama de representação do processo (B). Após introduzir o psílídeo no local indicado na figura B, contabilizou-se 300 s até o inseto passar da linha de seleção para dentro do sistema. Após ultrapassar a linha, contabilizou-se 300s até o inseto escolher um campo volátil e ultrapassar a linha de seleção do campo indicado. Os insetos que não passaram da linha de seleção do braço principal foram descartados e aqueles permanecendo dentro do sistema (após ultrapassar a linha de seleção do braço principal), porém, não escolhendo um campo volátil lateral, foram considerados não respondentes (NR).

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado e os insetos foram expostos a *R. graveolens* versus ar limpo (30 repetições para fêmeas e 30 para machos), *C. sinensis* versus ar limpo (30 repetições para fêmeas e 30 para machos) e por fim *R. graveolens* versus *C. sinensis* (40 repetições para fêmeas e 40 para machos). Durante os experimentos, foi inserida uma placa preta entre as cubetas com os tratamentos e/ou controles e a arena de Y a fim de evitar contato visual do inseto (Fig. 14).

Em cada repetição utilizou-se de um novo inseto com a arena de Y alternada entre direita e esquerda, a fim de minimizar o desvio posicional e a cada 10 repetições foram trocadas as plantas das cubetas por outras do mesmo tratamento.

b) Bioensaios de olfatometria com insetos criados em plantas cítricas infectadas por CLas

A aquisição da bactéria pelo inseto foi feita de acordo com método descrito no item 3.2.2. e os bioensaios seguiram o mesmo procedimento proposto no estudo 'a' deste item.

Foram avaliados 30 machos e 30 fêmeas em bioensaios contrastando voláteis de *R. graveolens* versus ar limpo e *C. sinensis* versus ar limpo, e 40 machos e fêmeas em contraste de *R. graveolens* versus *C. sinensis*. Após a realização deste experimento utilizando insetos infectivos, os mesmos foram separados a cada repetição em microtubos de 1,5 ml e submetidos a extração de DNA e posteriormente PCR quantitativo para confirmar a presença de CLas nas amostras (vide item 3.5.).

Para análise de efeito direto da bactéria sobre o comportamento do psílídeo foram consideradas válidas as repetições em que os insetos apresentaram *Ct* positivo para a presença de CLas. Indivíduos testados negativamente quanto à presença da bactéria por PCR foram segregados e analisados como um tratamento distinto (efeito indireto de CLas).

Figura 14. Sistema do bioensaio de olfatometria contrastando **A)** *Ruta graveolens* versus ar limpo; **B)** *Citrus sinensis* 'Pineapple' versus ar limpo; **C)** *Ruta graveolens* versus *Citrus sinensis* 'Pineapple'; **D)** Placa preta utilizada nos bioensaios de olfatometria entre as cubetas e a arena de Y a fim de evitar possíveis interferências visuais.

3.4. Avaliação da transmissão de CLas para plantas de *R. graveolens* e *C. sinensis*

Este experimento teve a finalidade de verificar se *R. graveolens* é uma hospedeira de CLas e se *D. citri* é capaz de transmitir o patógeno para as mesmas.

Após 7 a 14 dias da emergência de adultos que se desenvolveram em plantas fonte (vide item 3.2.2.), os indivíduos foram coletados através de sugador manual e transferidos para as plantas-teste em gaiolas de copo plástico de 300 ml a uma proporção de 20 insetos não sexados por planta (Fig. 15), permanecendo cerca de 7-10 dias, cumprindo-se o PAI. Após o período de inoculação, foram selecionados aleatoriamente 30 insetos de ambas as espécies, armazenados em microtubos de 1,5 ml e mantidos a -20° para mortalidade por congelamento até realização das análises moleculares para confirmação de infectividade, os quais foram testados individualmente, de acordo com a metodologia descrita no item 3.5. Realizaram-se cinco repetições do experimento em datas distintas no período de julho/2018 a

julho/2019, inoculando-se 6-9 plantas-teste de arruda e citros por repetição. Duas plantas de ambas as espécies não foram expostas a insetos e mantidas com controle negativo.

Esta etapa foi realizada em sala climatizada (temperatura $26 \pm 2^\circ \text{C}$, fotoperíodo de 14:10 e umidade relativa $60 \pm 10\%$).

Após o PAI, as plantas testadas foram mantidas em casa de vegetação, T: $25 \pm 5^\circ \text{C}$ e fotoperíodo de 12h, para incubação da bactéria e foram avaliadas quanto à infecção por CLas de duas a três vezes entre 6 e 21 meses após inoculação pelos insetos. Cerca de 8-10 folhas de ramos sintomáticos das mesmas foram retiradas para extrair DNA e detectar a presença de CLas através de qPCR (vide item 3.5.).

Figura 15. Gaiolas de copo plástico de 300 ml utilizadas para o Período de Acesso à Inoculação (PAI). (a) Experimento montado em plantas de *Citrus sinensis* 'Pinneapple', (b) detalhe de uma gaiola individual em planta de *C. sinensis*, (c) experimento montado em plantas de *Ruta graveolens* (d) detalhe de uma gaiola individual em planta de *R. graveolens*.

3.5. Detecção molecular de CLas em insetos e plantas

3.5.1. Extração de DNA dos insetos e das plantas

A extração de DNA dos psilídeos foi feita individualmente, de acordo com o método CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) adaptado de Murray e Thompson (1980). Cada inseto foi macerado utilizando pistilo em microtubo de 1,5 mL contendo

400 µL de tampão de extração (Tris HCl pH 7,5 1M, EDTA 0,5M, NaCl 5M, CTAB 5%, PVP 10%, β-mercaptoetanol), posteriormente, as amostras foram mantidas em banho maria por 30 min e depois centrifugadas por 1 min a 12000 rpm, a 24°C. Seguiu-se a adição de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1) e centrifugou-se a 12000 rpm por 10 min a 24°C.

O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL e precipitado com 0,6 µL do volume de isopropanol. As amostras foram mantidas overnight a -20°C. Seguindo-se a extração, as amostras foram centrifugadas a 12000 rpm por 20 min a 4°C, em seguida, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com 700 µL de álcool 70%; e centrifugou-se a 12000 rpm por 10 min a 4°C (procedimento repetido 2 x). Em seguida, o álcool 70% foi descartado, e o *pellet* resultante foi seco a 37°C, sendo posteriormente ressuscitado em 25 µL de água milliQ autoclavada.

O DNA de *R. graveolens* e *C. sinensis* também foi extraído usando o método CTAB adaptado de Murray e Thompson (1980). Folhas de ramos utilizados no PAI foram coletadas, retirando-se o pecíolo e nervura central para extração de DNA. Esse mesmo procedimento foi feito com plantas-fonte de CLas. Os tecidos vegetais foram picados utilizando-se lâminas, sendo utilizado 0,3 g da amostra para extração. Os tecidos vegetais foram então colocados em microtubos de 2 mL com fundo arredondado contendo *beads* (esfera metálica) e armazenados em freezer a -20°C até a extração.

Para extração, as amostras foram trituradas usando o TissueLyser LT (QIAGEN Hilden, Germany) a 50 Hz por 360 s previamente refrigeradas com Nitrogênio líquido para minimizar a oxidação, então, adicionou-se tampão de extração (Tris HCl pH 7,5 1M, EDTA 0,5M, NaCl 5M, CTAB 5%, PVP 10%, β-mercaptoetanol) até completar o volume de 2 mL. As amostras foram homogeneizadas utilizando vórtex a 30 s e em seguida mantidas em banho maria por 30 min a 65°C e depois centrifugadas a 13000 rpm por 5 min a 24°C.

Posteriormente, foi retirado 900 µL do sobrenadante, que foi transferido para um novo microtubo de 2 mL, com adição de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1) volume/volume. A mistura foi homogeneizada em vórtex por 30 s e em seguida, centrifugada a 13000 rpm por 5 min a 24°C. 800 µL do sobrenadante foi transferido para um novo microtubo, precipitando-o com 480 µL do volume de isopropanol. As amostras foram armazenadas overnight a -20°C. Seguindo-se à extração, as amostras foram centrifugadas a 13000 rpm por 20 min a 4°C, em seguida o sobrenadante foi

descartado. Adicionou-se ao pellet 1 mL de álcool 70% e centrifugou-se a 13000 rpm por 10 min (este procedimento repetiu-se 2x). Em seguida, o álcool 70% foi descartado e as amostras foram mantidas a 37°C para a secagem do *pellet*, após o DNA foi ressuspendido em 50 µL de água milliQ autoclavada.

3.5.2. Detecção de CLas por PCR em tempo real (qPCR)

Após a extração dos ácidos nucleicos, a detecção da presença de CLas em *D. citri* foi feita através da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) utilizando *primers* e sondas obtidos a partir da sequência do 16S rDNA de CLas por Lin et al. (2010).

As amplificações foram realizadas utilizando o termociclador ABI PRISM 7500 Fast Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e conduzidas com 0,5 µL de água miliQ autoclavada, 1,08 µL do *primer forward*, 1,08 µL do *primer reverse*, 1,08 µL da sonda (2X TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix- Life Technologies) e 6,75 µL do master mix 2x (master mix Maxima SYBR green/ROX qPCR (2x) (Thermo Fisher Scientific, SP)), tendo volume final de 10,49 µL por amostra com adicional de 3 µL de DNA dos psílídeos.

Para amplificação, o termociclador foi programado com as seguintes condições de acordo com método adaptado de Li, Hartung, Levy (2006) e Li, Levy, Hartung (2009): ciclo inicial de 50°C por 2 min, seguido da desnaturação a 95°C por 12 min, acompanhado de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 s e anelamento/extensão a 60°C por 60 s.

Cada reação teve dois controles negativos, sendo um representado por insetos livres de CLas provenientes da criação, e o outro por água milliQ autoclavada, e um controle positivo, que foi constituído do DNA de insetos CLas +.

Para detecção da presença de CLas em plantas-fonte de CLas, plantas-teste de *C. sinensis* e *R. graveolens* utilizaram-se os mesmos *primers*, sondas e as amostras foram amplificadas no mesmo termociclador, porém, com volumes diferentes da reação: foram conduzidas com 3,32 µL de água miliQ autoclavada, 0,6 µL dos *primers forward e reverse*, 0,48 µL da sonda (2X TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix- Life Technologies) e 6 µL do master mix 2x, tendo volume final de 11 µL por amostra com adicional de 1 µL de DNA das plantas.

Para amplificação, o termociclador foi programado com as seguintes condições de acordo com método adaptado de Li, Hartung, Levy (2006) e Li, Levy, Hartung (2009): ciclo inicial de 52°C por 2 min, seguido por desnaturação a 95°C por 12 min, acompanhado de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 s e anelamento/extensão a 58°C por 45 s.

Cada reação teve dois controles negativos, sendo um representado por plantas livres de CLas e o outro por água milliQ autoclavada, e um controle positivo, que foi constituído do DNA de plantas-fonte de CLas.

Para psilídeos e plantas, apenas as amostras com valores de *Ct* (*Cycle threshold*) menores que 36 foram consideradas positivas para a presença de CLas (AMMAR et al., 2011; COLETTA-FILHO et al., 2014).

3.6. Análise dos dados

Modelos lineares generalizados foram adotados para os dados de todos os experimentos. A confirmação da distribuição dos dados para todos os modelos foi dada por um envelope simulado meio normal, utilizando o pacote hnp (MORAL; HINDE; DEMÉTRIO, 2017).

Para os resultados do teste de pouso e permanência sob condições de livre escolha, um modelo linear generalizado com distribuição do tipo binomial foi adotado para comparar as curvas de regressão logística relativas ao comportamento de preferência dos insetos. Foram considerados na análise somente os insetos que escolheram um hospedeiro.

Para a análises dos dados do ensaio que trata do comportamento arrestante, um modelo linear generalizado com distribuição do tipo binomial foi adotado para comparar as curvas de regressão logística relativas ao comportamento de preferência dos insetos ao longo do tempo.

Um teste de ajuste multinomial Monte Carlo com medida de distância qui-quadrado foi utilizado para os dados de pistas visuais, seguido de comparações dos intervalos de confiança gerados pelo método “sisonglaz” para proporções multinomiais função MultinomCI do pacote DescTools (SIGNORELL et al., 2019).

Os dados relacionados à quantidade de honeydew foram analisados com um modelo gaussiano (distribuição normal). As pressuposições do modelo (normalidade e homocedasticidade) foram testadas, e os resultados de produção de honeydew

foram comparados entre tratamentos com plantas arruda e citros, e entre machos e fêmeas pelo teste F ($P = 0,05$), porque a interação envolvendo esses fatores não foi significativa.

Os dados de todos os estudos que envolvem olfatometria (3.3.6a e b) foram analisados com estrutura de tratamentos fatorial e delineamento experimental em blocos. A interação envolvendo os fatores foi evidenciada por meio de uma análise de deviance. Os fatores tratamentos (branco, arruda e/ou citros) versus sexo (macho e fêmea) foram considerados como fixos. Os dados de proporção de escolha foram analisados com um modelo do tipo binomial, enquanto o tempo de resposta foi analisado com o modelo gama para os contrastes arruda *versus* branco, citros *versus* branco e gaussiano para o contraste citros *versus* arruda, a qualidade do ajuste do modelo foi confirmada com um envelope simulado meio normal, utilizando o pacote hnp (MORAL; HINDE; DEMÉTRIO, 2017). As comparações entre os tratamentos foram conduzidas por meio da função glht do pacote multcomp (TORSTEN; FRANK; PETER, 2008). Todas as análises foram realizadas no software R (R CORE TEAM, 2019).

4. RESULTADOS

4.1. Comportamento de escolha hospedeira de *D. citri* frente a plantas de *R. graveolens* e *C. sinensis*

4.1.1. Teste de pouso e permanência sob condições de livre escolha

As curvas de regressão logística indicam que citros é preferido para pouso e permanência por adultos não sexados de *D. citri* em relação à arruda ($P < 0.05$), pois observa-se que em nenhum momento após a liberação dos insetos houve sobreposição das curvas de preferência (Fig. 16). Essa preferência está expressa como probabilidade, sendo que na primeira hora de avaliação a preferência por plantas de *C. sinensis* foi de aproximadamente 0.75, o que corresponde a 75% dos indivíduos pousados nas plantas (Fig. 16).

4.1.2. Teste de comportamento arrestante

As curvas de comportamento arrestante de *D. citri* em função do tempo mostraram que não houve diferença significativa para machos (Fig. 17) e fêmeas (Fig. 18) com relação à taxa de movimentação para plantas de arruda, quando confinados previamente em citros por um período de 24 h. Nas primeiras 24 h após o término do confinamento, houve baixa movimentação dos indivíduos. De 48 a 72h, 25% dos insetos migraram de plantas de citros para arruda.

Para a condição de insetos confinados previamente em *R. graveolens*, as curvas de comportamento arrestante de *D. citri* em função do tempo mostraram que não houve diferença significativa entre os sexos quanto à taxa de movimentação em direção a plantas de citros (Fig. 19 e 20). Porém, há uma tendência crescente de saída de fêmeas e machos das plantas de arruda, comportamento esse que se intensifica a partir de 48 h, envolvendo em torno de 20% e 30% dos indivíduos após 72h.

Figura 16. Curvas de regressão logística do comportamento de preferência para pouso e permanência de adultos de *Diaphorina citri* sob condição de livre escolha entre plantas de *Ruta graveolens* (arruda) e *Citrus sinensis* 'Pineapple' (citros), geradas pelos modelos $y = \frac{\exp(0.9360 + 0.3874 \cdot \text{Tempo})}{1 + \exp(0.9360 + 0.3874 \cdot \text{Tempo})}$ e $y = \frac{\exp(-1.6009 + 0.1095 \cdot \text{Tempo})}{1 + \exp(-1.6009 + 0.1095 \cdot \text{Tempo})}$, respectivamente. As áreas acinzentadas no contorno das curvas indicam o intervalo de confiança (probabilidade de 95%). Os dados médios observados estão indicados por pontos circulares ao redor das curvas, sendo que as barras representam o erro padrão da média.

Figura 17. Comportamento arrestante de machos de *Diaphorina citri*, quando confinados previamente por 24 h em plantas de *Citrus sinensis* 'Pineapple' (citros) e posteriormente expostos a plantas de *Ruta graveolens* (arruda). As curvas de regressão logística de proporção de machos sobre plantas de citros e arruda ao longo do tempo são descritas pelas equações $y = \exp(3.7150 - 0.0363 \cdot \text{Tempo}) / 1 + \exp(3.7150 - 0.0363 \cdot \text{Tempo})$ e $y = \exp(-3.7200 + 0.0400 \cdot \text{Tempo}) / 1 + \exp(-3.7200 + 0.0400 \cdot \text{Tempo})$, respectivamente. As áreas coloridas (tons de cinza) adjacentes às curvas indicam o intervalo de confiança (probabilidade de 95%). Os dados médios observados estão indicados por pontos circulares ao redor das curvas, sendo que as barras representam o erro padrão da média.

Figura 18. Comportamento arrestante de fêmeas de *Diaphorina citri*, quando confinadas previamente por 24 h em plantas de *Citrus sinensis* 'Pineapple' (citros) e posteriormente expostas a plantas de *Ruta graveolens* (arruda). As curvas de regressão logística para a proporção de fêmeas sobre as plantas de citros e arruda ao longo do tempo são descritas pelas equações: $y = \exp(3.3880 - 0.0287 \cdot \text{Tempo}) / 1 + \exp(3.3880 - 0.0287 \cdot \text{Tempo})$ e $y = \exp(-3.3900 + 0.0300 \cdot \text{Tempo}) / 1 + \exp(-3.3900 + 0.0300 \cdot \text{Tempo})$, respectivamente. As áreas coloridas (tons de cinza) adjacentes às curvas indicam o intervalo de confiança (probabilidade de 95%). Os dados médios observados estão indicados por pontos circulares ao redor das curvas, sendo que as barras representam o erro padrão da média.

Figura 19. Comportamento arrestante de machos de *Diaphorina citri*, quando confinados previamente por 24 h em plantas de *Ruta graveolens* (arruda) e posteriormente expostos a plantas de *Citrus sinensis* 'Pineapple' (citros). As curvas de regressão logística para a proporção de machos sobre as plantas de arruda e citros ao longo do tempo são descritas pelas equações: $y = \exp(3.1740 - 0.0300 \cdot \text{Tempo}) / 1 + \exp(3.30000 - 0.0300 \cdot \text{Tempo})$ e $y = \exp(-3.1740 + 0.0346 \cdot \text{Tempo}) / 1 + \exp(-3.1740 + 0.0346 \cdot \text{Tempo})$, respectivamente. As áreas coloridas (tons de cinza) adjacentes às curvas indicam região de confiança (probabilidade de 95%). Os dados médios observados estão indicados por pontos circulares ao redor das curvas, sendo que as barras representam o erro padrão da média.

Figura 20. Comportamento arrestante de fêmeas de *Diaphorina citri*, quando confinadas previamente por 24 h em plantas de *Ruta graveolens* (arruda) e posteriormente expostas a plantas de *Citrus sinensis* 'Pineapple' (citros). As curvas de regressão logística para a proporção de fêmeas sobre as plantas de arruda e citros ao longo do tempo são descritas pelas equações: $y = \exp(3.2900 - 0.0400 \cdot \text{Tempo}) / 1 + \exp(3.2900 - 0.0400 \cdot \text{Tempo})$ e $y = \exp(-3.2931 + 0.0358 \cdot \text{Tempo}) / 1 + \exp(-3.2931 + 0.0358 \cdot \text{Tempo})$, respectivamente. As áreas coloridas (tons de cinza) adjacentes às curvas indicam região de confiança (probabilidade de 95%). Os dados médios observados estão indicados por pontos circulares ao redor das curvas, sendo que as barras representam o erro padrão da média.

4.1.3. Teste de pistas visuais em quadrado latino

A distribuição de ocorrência de adultos de *D. citri* (não sexados) em relação a pistas visuais diferiu significativamente entre os tratamentos avaliados ($\chi^2 = 33.7$; $p < 0.0001$). Uma maior proporção de insetos pousou sobre áreas do quadrado latino correspondentes a folhas de *R. graveolens* (41,40%), seguido de folhas de *C. sinensis* (33,9%) e áreas sem folhas (branco) (26,3%) (Fig. 21).

Figura 21. Distribuição da ocorrência de adultos de *Diaphorina citri* em relação a estímulos visuais de folhas de *Ruta graveolens* (arruda), *Citrus sinensis* 'Pineapple' (citros) e espaços sem folhas (branco), em teste de livre escolha com delineamento em quadrado latino. Médias ($\pm$ EPM) com mesma letra diferem estatisticamente entre si pelo teste de ajuste multinomial Monte Carlo com medida de distância qui-quadrado, seguido de comparações dos intervalos de confiança gerados pelo método "sisonglaz" para proporções multinomiais.

4.1.4. Teste de oviposição sob condições de confinamento

Fêmeas de *D. citri* não realizaram postura em plantas de *R. graveolens*, mas ovipositaram em plantas de *C. sinensis*, nas quais registrou-se uma média de $49,9 \pm 6,1$ ovos por planta, em 10 plantas avaliadas (Fig. 22).

Figura 22. Brotos de plantas de *Citrus sinensis* 'Pineapple' e *Ruta graveolens*. Houve deposição de ovos por fêmeas de *Diaphorina citri* apenas em plantas cítricas. (A) planta de *C. sinensis* (repetição quatro – aproximadamente 58 ovos nos brotos), (B) planta de *R. graveolens* com brotos sem ovos.

4.1.5. Teste de excreção de *honeydew* de adultos machos e fêmeas de *D. citri* sob condições de confinamento

O teste F da análise de variância para dados de *honeydew* (cm²) com machos e fêmeas revelou que não houve interação significativa ($F=3,5$; $gl=1$; $p=0,07$) entre sexos e planta hospedeira. Analisando os efeitos simples a partir do Teste F e agrupando-se os dados de machos e fêmeas, a produção média de *honeydew* foi maior em plantas de *R. graveolens* do que em citros ($F=43,22$; $gl=1$; $p=0,000001$) (Tabela 2). Comparando-se os dois sexos, as fêmeas produziram mais *honeydew* do que os machos ($F=25,40$; $gl= 1$; $p=0,000027$) (Tabela 2).

Tabela 2. Área média de excreção de *honeydew* (cm²) de machos e fêmeas de *Diaphorina citri* em plantas de *Ruta graveolens* e *Citrus sinensis* 'Pineapple', após confinamento de 48 h

Planta	Sexo		Total (cm ²)
	Fêmea	Macho	
<i>R. graveolens</i>	0,27 ± 0,03	0,12 ± 0,03	0,20 ± 0,03 a
<i>C. sinensis</i>	0,09 ± 0,02	0,02 ± 0,006	0,06 ± 0,01 b
Total (cm ²)	0,18 ± 0,03 a	0,08 ± 0,02 b	

Médias totais seguidas de letras distintas diferem estatisticamente entre si pelo teste de Shapiro-wilk ($p < 0,05$).

4.1.6. Bioensaios de olfatometria contrastando voláteis de *R. graveolens* e *C. sinensis*

4.1.6.1. Adultos de *D. citri* livres de CLas, criados em *M. paniculata*

Nos ensaios em olfatômetro Y utilizando insetos sadios (livres de CLas), criados em plantas de *M. paniculata*, avaliou-se a atratividade de fêmeas de *D. citri* por voláteis constitutivos de *R. graveolens* (arruda) e *C. sinensis* (citros). A maioria das fêmeas orientaram-se para as plantas de arruda, em ensaio com a opção de orientação para o ar limpo (branco) ($gl=1$, $p=0,000371$) (Fig. 23). No ensaio contrastando-se citros com o branco, a maioria das fêmeas orientaram-se para voláteis de citros ($gl=1$, $p=0,0000477$) (Fig. 23). Quando as fêmeas de *D. citri* foram expostas aos voláteis de *R. graveolens* e *C. sinensis* simultaneamente, não houve diferença estatística no percentual de resposta em relação às duas espécies vegetais ($gl=1$, $p=0,1058$) (Fig. 23).

Nos ensaios utilizando machos sadios, a maioria dos insetos orientou-se para o braço do olfatômetro Y com voláteis de arruda, em contraste com o branco ($gl=1$, $p=0,0000662$) (Fig. 23). Nos ensaios contrastando-se citros com o branco, observou-se maior orientação para voláteis de plantas de citros ($gl=1$, $p=0,0000339$) (Fig. 24). Contrastando arruda e citros, a maioria orientou-se para os voláteis de arruda ($gl=1$, $p=0,0000255$) (Fig. 23).

Figura 23. Porcentagem de resposta (%) de fêmeas e machos adultos de *Diaphorina citri* criados em *Murraya paniculata* e livres de *Candidatus Liberibacter asiaticus*, a voláteis de plantas de *Ruta graveolens* (arruda), *Citrus sinensis* 'Pineapple' (citros) e ar limpo (branco), em bioensaios com olfatômetro Y, contrastando-se branco (B) versus arruda (A), branco versus citros (C) e arruda versus citros. O número de repetições (N) e de fêmeas não responsivas (NR) estão indicados no lado direito da figura. *** diferença significativa de acordo com o modelo do tipo binomial ($p < 0,001$); ns diferença não significativa.

Avaliando-se o tempo de resposta (s) de adultos de *D. citri* criados em *M. paniculata* e livres de CLas a voláteis nos bioensaios de olfatometria, verificou-se que as fêmeas orientaram-se mais rapidamente para o campo contendo voláteis de plantas de arruda em contraste com ar limpo (branco) ($gl=1$, $p=0,0000124$) (Fig. 24). Não houve diferença significativa em tempo de resposta de fêmeas para voláteis de plantas de citros em contraste com o branco ($gl=1$, $p=0,499$) (Fig. 24). Fêmeas de *D. citri* expostas simultaneamente aos voláteis de citros e arruda responderam mais rapidamente aos de arruda ($gl=1$, $p=0,00148$) (Fig. 24). Para machos, não houve diferença significativa no tempo de resposta comparando-se voláteis de arruda *versus* branco ($gl=1$, $p=0,06078$) e citros *versus* branco ($gl=1$, $p=0,460$) (Fig. 24). Contrastando-se arruda e citros, os machos de *D. citri* responderam mais rapidamente aos voláteis de arruda ($gl=1$, $p=0,01943$) (Fig. 24).

Figura 24. Tempo de resposta (s) de fêmeas e machos adultos de *Diaphorina citri* criados em *Murraya paniculata* e livres de *Candidatus Liberibacter asiaticus*, a voláteis de plantas de *Ruta graveolens* (arruda), *Citrus sinensis* 'Pineapple' (citros) e ar limpo (branco), em bioensaios com olfatômetro Y, contrastando-se branco (B) *versus* arruda (A), branco *versus* citros (C) e arruda *versus* citros. O número de repetições (n) e o número de insetos não responsivos (NR) estão indicados no lado direito da figura. ***diferença significativa em $p < 0.001$; **diferença significativa em $p < 0.01$; *diferença significativa em $p < 0.05$; ns: diferença não significativa, de acordo com o modelo gama para arruda *versus* branco e citros *versus* branco, e modelo Gaussiano para citros *versus* arruda.

4.1.6.2. Adultos de *D. citri* criados em *C. sinensis* infectado por *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas)

4.1.6.2.1. Insetos positivos para CLas por qPCR

Nos bioensaios de olfatometria, fêmeas positivas para *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas+) pelo teste de qPCR orientaram-se mais para o ar limpo (branco) do que para voláteis de *R. graveolens* (arruda) (gl=1, p=0,029) (Fig. 25). Não houve diferença significativa entre a porcentagem de resposta das fêmeas CLas+ no contraste branco *versus* citros (gl=1, p = 0,75) (Fig. 25). Entretanto, contrastando-se arruda *versus* *C. sinensis* (citros), houve maior preferência das fêmeas por voláteis de arruda (gl=1, p=0,0091) (Fig. 25). No caso de machos testados positivos para a bactéria (bacteriíferos) por qPCR (CLas+), não houve diferença significativa para os bioensaios contrastando-se arruda *versus* branco (gl=1, p=0,3147), citros *versus* branco (gl=1, p=0,5923) e arruda *versus* citros (gl=1, p=0,4131) (Fig. 25).

Em relação ao tempo de resposta às fontes de voláteis nos bioensaios, não houve diferença significativa utilizando fêmeas CLas+, nos contrastes branco *versus* arruda (gl=1, p=0,7145), branco *versus* citros (gl=1; p=0,8956) e arruda *versus* citros (gl=1 p=0,5775) (Fig. 26). Para machos bacteriíferos, também não houve diferença significativa nos contrastes branco *versus* arruda (gl=1, p=0,3351), branco *versus* citros (gl=1, p=0,3106) e arruda *versus* citros (gl=1, p=0,4454) (Fig. 26).

Figura 25. Porcentagem de resposta (%) de fêmeas e machos de *Diaphorina citri* criados em planta cítrica infectada por *Candidatus Liberibacter asiaticus* e que testaram positivo para a bactéria por qPCR (CLas+), a voláteis de plantas de *Ruta graveolens* (Arruda), *Citrus sinensis* 'Pineapple' (Citros) e ar limpo (Branco), em bioensaios com olfatômetro Y, contrastando-se Branco (B) versus Arruda (A), Branco versus Citros (C) e Arruda versus Citros. O número de repetições (n CLas+) e o número de insetos CLas+ não responsivos (NR CLas+) estão indicados no lado direito da figura. ** diferença significativa em $p < 0,01$ de acordo com o modelo do tipo binomial; * diferença significativa em $p < 0,05$ de acordo com o modelo do tipo binomial; ns: diferença não significativa.

Figura 26. Tempo de resposta (s) de fêmeas e machos de *Diaprorina citri* criados em planta cítrica infectada por *Candidatus Liberibacter asiaticus* e que testaram positivo para a bactéria por qPCR (CLas+), a voláteis de plantas de *Ruta graveolens* (arruda), *Citrus sinensis* 'Pineapple' (citros) e ar limpo (branco), em bioensaios com olfatômetro Y, contrastando-se branco (B) versus arruda (A), branco versus citros (C) e arruda versus citros. O número de repetições (n CLas+) e o número de insetos CLas+ não responsivos (NR CLas+) estão indicados no lado direito da figura. ns: diferença não significativa de acordo com o modelo gama para arruda versus branco e citros versus branco, e modelo Gaussiano para citros versus arruda.

4.1.6.2.2. Insetos negativos para CLas por qPCR

Nos bioensaios de olfatometria com adultos de *D. citri* criados em planta cítrica infectado por CLas, porém negativos para a bactéria por qPCR (CLas-), não houve diferença significativa no percentual de resposta das fêmeas entre ar limpo (branco) e voláteis de *R. graveolens* (arruda) (gl=1, p=0,2661) ou *C. sinensis* (citros) (gl=1, p=0,684) (Fig. 27). Entretanto, em contraste de arruda *versus* citros mais de 80% das fêmeas CLas- dirigiram-se a voláteis de arruda (gl=1, p=0,0000954) (Fig. 27). De modo semelhante, a maioria machos CLas- dirigiram-se a voláteis de arruda do que a voláteis de citros (gl=1, p=0,000366) (Fig. 27). Os machos não discriminaram entre branco e citros (gl=1, p=0,756), mas preferiram o branco no contraste com voláteis de arruda (gl=1, p=0,0176) (Fig. 27).

Não houve diferença em tempo de resposta (s) de fêmeas CLas- entre branco (ar limpo) *versus* arruda (gl=1, p= 0,1673), branco *versus* citros (gl=1, p=0,05638) e arruda *versus* citros (gl=1, p=0,2096) (Fig. 28). Os machos CLas- também não diferiram quanto ao tempo de resposta entre branco *versus* arruda (gl=1, p=0,1142) e arruda *versus* citros (gl=1, p=0,0738), mas reagiram mais rapidamente a voláteis de citros em relação ao branco (gl=1, p=0,01113) (Fig. 28).

Figura 27. Porcentagem de resposta (%) de fêmeas e machos de *Diaphorina citri* criados em citros infectado por *Candidatus Liberibacter asiaticus*, porém negativos para a bactéria por qPCR (CLas-), a voláteis de plantas de *Ruta graveolens* (arruda), *Citrus sinensis* 'Pineapple' (citros) e ar limpo (branco), em bioensaios com olfatômetro Y, contrastando-se branco (B) versus arruda (A), branco versus citros (C) e arruda versus citros. O número de repetições (n CLas-) e o número de insetos CLas negativos não responsivos (NR CLas-) estão apresentados no lado direito da figura. ***diferença significativa em $p < 0,001$ de acordo com o modelo do tipo binomial; * diferença significativa em $p < 0,05$ de acordo com o modelo do tipo binomial; ns: diferença não significativa.

Figura 28. Tempo de resposta (s) de fêmeas e machos de *Diaphorina citri* criados em citros infectado por *Candidatus Liberibacter asiaticus*, porém negativos para a bactéria por qPCR (CLas-), a voláteis de plantas de *Ruta graveolens* (arruda), *Citrus sinensis* 'Pineapple' (citros) e ar limpo (branco), em bioensaios com olfâmetro Y, contrastando-se branco (B) versus arruda (A), branco versus citros (C) e arruda versus citros. O número de repetições (n CLas-) e o número de insetos CLas negativos não responsivos (NR CLas-) estão indicados no lado direito da figura. *diferença significativa em $p < 0,05$; ns: diferença não significativa, de acordo com o modelo gama para arruda versus branco e citros versus branco, e modelo Gaussiano para citros versus arruda.

4.2. Avaliação da transmissão de *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) para plantas de *R. graveolens* e *C. sinensis*

Realizaram-se cinco tentativas de transmissão de CLas para plantas de *R. graveolens* e *C. sinensis* por *D. citri*, usando-se plantas-fonte do patógeno distintas em cada repetição do experimento. Não foi detectada a transmissão de CLas para *R. graveolens* por *D. citri* em nenhuma das repetições, em um total de 40 plantas-teste inoculadas com 800 psíldeos (20 insetos por planta). Verificou-se, no entanto, transmissão de CLas para plantas-teste de *C. sinensis* (controle positivo) em quatro de cinco repetições do experimento, indicando que as condições experimentais foram adequadas para avaliar a capacidade de transmissão pelo inseto. O patógeno não foi detectado em plantas-teste não inoculadas (controle negativo), evidenciando que as infecções observadas em plantas do controle positivo foram decorrentes da transmissão pelos insetos durante o PAI de 7 dias.

A porcentagem dos psíldeos que adquiriram CLas após o desenvolvimento em plantas-fonte de citros variou de 6,7 a 76,7% entre as repetições do experimento, sendo baixa nas duas primeiras repetições (Tabela 3), o que pode explicar a não transmissão para citros na 2ª. repetição. Houve também variação na concentração bacteriana nos insetos, que foi medida indiretamente pelo valor de *Ct* (*cycle threshold*) do qPCR. Quanto menor o valor de *Ct*, maior a concentração bacteriana, adotando-se o $Ct < 36$ como parâmetro para considerar um inseto positivo para CLas. Os valores de *Ct* dos insetos que foram positivos por qPCR variaram de 18 a 35, mas não houve uma relação clara entre ocorrência de transmissão e valores de *Ct* dos insetos nas diferentes repetições do experimento (Tabela 3).

A não transmissão de CLas por *D. citri* para *Ruta graveolens* em experimentos cujas condições permitiram a transmissão para *C. sinensis* (controle positivo) constitui forte evidência de que *R. graveolens* é imune a bacteria CLas.

Tabela 3. Transmissão de *Candidatus Liberibacter asiaticus* para plantas de *Ruta graveolens* e *Citrus sinensis* 'Pineapple' por *Diaphorina citri*.

Repetição	Tratamento de inoculação ^a	% de insetos infectados ^b (Ct min-max)	Proporção de plantas infectadas/total de plantas inoculadas ^c	
			<i>R. graveolens</i>	<i>C. sinensis</i>
I	20 insetos por planta	6,7 (25-30)	0/9	1/7
	Controle (sem inoculação)		0/2	0/2
II	20 insetos por planta	13,3 (22-29)	0/8	0/7
	Controle (sem inoculação)		0/2	0/2
III	20 insetos por planta	76,7 (18-34)	0/9	1/7
	Controle (sem inoculação)		0/2	0/2
IV	20 insetos por planta	70 (18-35)	0/8	1/7
	Controle (sem inoculação)		0/2	0/2
V	20 insetos por planta	33,3 (19-35)	0/6	5/7
	Controle (sem inoculação)		0/2	0/2

^aPlantas-teste sadias foram submetidas a um período de acesso à inoculação (PAI) de 7 dias por adultos de *D. citri* que se desenvolveram desde a fase de ovo em plantas cítricas infectadas por CLAs, as quais apresentaram valores de *Cycle threshold* (Ct) de 20 a 24 em testes de qPCR.

^bPorcentagem de indivíduos que testaram positivos para CLAs por qPCR em amostras de 30 indivíduos avaliados após o PAI. Valores entre parênteses indicam o intervalo de variação de Cts.

^cNúmero de plantas positivas para CLAs por qPCR sobre o total de plantas avaliadas. Consideram-se positivas as plantas com Ct < 36 em testes realizados entre 6 e 12 meses após a inoculação.

5. DISCUSSÃO

No processo de seleção hospedeira, o inseto escolhe a planta adequada à distância, sendo intermediado por recursos visuais, olfativos e, posteriormente, através do contato reconhece o seu hospedeiro, quando, nessa ocasião, são empregados os recursos gustativos (BERNAYS; CHAPMAN, 1994; TSAGKARAKIS; ROGERS, 2010; WESTBROOK et al., 2011), além do impulso por respostas inatas (PATT et al., 2014).

Para utilização de uma planta como armadilha, empregada num sistema de manejo integrado de pragas (MIP), devem ser estudados os padrões comportamentais em relação à planta a ser implementada, diante de todos os estímulos que envolvem o processo de escolha hospedeira (SHELTON; BADENES-PEREZ, 2006). Por meio de diferentes experimentos na presente pesquisa, investigou-se a interferência de *Ruta graveolens* L. (Rutaceae) sobre os aspectos comportamentais relacionados à escolha hospedeira do psílideo-asiático-dos-citros, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae), vetor da bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), agente etiológico do Huanglongbing (HLB)

No teste de escolha para pouso e permanência sobre plantas, que envolve todos os estímulos referentes ao processo de seleção hospedeira, plantas de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck 'Pineapple' (Rutaceae) foram mais atrativas a *D. citri* do que plantas de *R. graveolens*. Segundo a literatura, *D. citri* tem íntima associação com rutáceas dos gêneros *Citrus* e *Murraya*, sendo que *M. paniculata* (L.) Jack (Rutaceae) apresenta-se como hospedeiro preferencial para *D. citri* (HALBERT; MANJUNATH, 2004). Ensaio de preferência realizados na Flórida, EUA, mostraram que, dentre 87 rutáceas avaliadas quanto à atratividade e estabelecimento de *D. citri*, *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. foi a menos atrativa e apenas *Casimiroa edulis* (Ce) La Llave ex Lex. (Rutaceae) foi considerada totalmente inadequada ao inseto (Westbrook et al. 2011).

Sétamou et al. (2016) mostraram forte preferência de *D. citri* por plantas de *M. paniculata* e *Bergera koenigii* (L.) Sprengel (Rutaceae) em relação a outras espécies de Rutaceae, na América do Norte. A seleção do hospedeiro sob condição de livre escolha por adultos de *D. citri* medida por George e Lapoint (2018) 6 dias após a infestação, mostrou que o número de psíldeos foi maior em *Citrus macrophylla* W. (Rutaceae), comparado a citrange 'Troyer' [*C. sinensis* x *P. trifoliata*] (Rutaceae) e quatro variedades de *P. trifoliata*.

Na avaliação do efeito de estímulos visuais de folhas de *C. sinensis* e *R. graveolens* sobre *D. citri*, observou-se que uma maior proporção de psílídeos pousados sobre imagens de folhas de *R. graveolens*, as quais apresentam coloração verde clara, quando novas e acinzentada, quando maduras. No presente trabalho, a maioria dos quadrados latinos correspondentes a *R. graveolens* foram preenchidos com folhas maduras, predominando assim a coloração acinzentada. Segundo Wenninger, Stelinsk; Hall (2009) e Sétamou et al. (2014), *D. citri* é atraído para pistas visuais amarelo-verde e verde, que são indicativas de planta vigorosa e associadas a folhagem jovem. Assim, ensaios visuais foram importantes na definição da cor de armadilhas adesivas para monitorar os psílídeos em estudos de dinâmica populacional (SÉTAMOU et al., 2008; HALL, 2009; GODFREY et al., 2013; BELOTI et al., 2013; SÉTAMOU et al., 2014). Ademais, Mann et al. (2012b); Zhao et al. (2013) relataram que um dos fatores que atraem *D. citri* às plantas infectadas com CLas é a coloração amarela das folhas, sintoma típico de HLB.

Wenninger, Stelinsk; Hall (2009) sugeriram que apenas os estímulos visuais seriam suficientes para provocar atração de *D. citri* no processo de seleção hospedeira. Entretanto, os mesmos autores afirmam que apenas esses estímulos podem não ser confiáveis devido à similaridade em aspectos visuais de folhas em diversas espécies de plantas. Além disso, vários fatores podem influenciar a coloração foliar, como, por exemplo, a idade das folhas e das plantas, a senescência e a infecção por patógenos (DIAS et al., 2016). Em resposta aos estímulos visuais de coloração cinza, Patt et al. (2011) evidenciaram maior atração de *D. citri* em relação à coloração amarela na presença de compostos voláteis foliares, sendo que, a atração de fêmeas para a coloração cinza foi significativamente maior do que a de machos. Em seus estudos, Wenninger; Stelinski; Hall (2009) mostraram forte evidência de atração de *D. citri* somente quando estímulos olfativos e visuais coexistiram. Os presentes ensaios demonstraram que a coloração acinzentada de folhas de *R. graveolens* podem interferir no processo de aceitação pelos psílídeos.

Nos ensaios de comportamento arrestante, verificou-se que tanto machos quanto fêmeas de *D. citri* têm uma forte tendência a permanecerem em plantas de *C. sinensis* e *R. graveolens*, sem migrar para outra planta, quando em contato com as mesmas inicialmente. Essa menor locomoção para plantas de citros pode ter reflexos drásticos na taxa de transmissão da bactéria, visto que a eficiência na transmissão está relacionada à duração dos períodos de acesso à aquisição e de inoculação (XU

et al., 1988; INOUE et al., 2009; PELZ-STELINSKI et al., 2010). Ademais, essa exposição contínua dos insetos a plantas de *R. graveolens* pode contribuir ainda mais para reduzir o número de visitas do vetor à cultura alvo, quando implementadas num sistema de plantio-isca nas bordaduras dos talhões a fim de evitar infecção primária do patógeno. Em geral, o comportamento de atratividade e o comportamento arrestante (retenção) são vitais para que haja sucesso na implementação de uma planta-isca (HIJE; COSTA; STANSLY, 2001). Holden et al. (2012) desenvolveram um modelo matemático que prevê que essa característica arrestante (retenção) em plantas armadilhas/iscas é mais importante do que a atratividade, o qual diminui drasticamente a densidade de pragas na cultura principal.

Segundo Berlinger (1986), quando um inseto pousa no hospedeiro, tende a permanecer nele, visando à alimentação e oviposição; porém, se o hospedeiro for inadequado, o inseto não se desenvolverá ou não se reproduzirá bem. Os resultados do teste de oviposição do presente trabalho mostraram que não houve deposição de ovos de *D. citri* em plantas de *R. graveolens*, diferentemente de plantas de *C. sinensis*, nas quais observou-se uma média de 49,9 ovos. Teck et al. (2011) avaliando a oviposição de *D. citri* em *M. paniculata* (murta), *B. koenigii* (curry) e *Citrus reticulata* (L.) (Rutaceae) (tangerina), relataram um maior número médio de ovos por planta em murta (77,4), seguido de tangerina (48,8) e curry (26,4).

A não oviposição de *D. citri* em *R. graveolens* pode estar relacionada a fatores morfológicos ou químicos das plantas (GALLO et al., 2002), e ainda por inadequação alimentar (DIAS et al., 2016). No processo de seleção de locais para oviposição, as fêmeas consideram a qualidade do local, aspectos nutricionais quantitativos e qualitativos (OSSES et al., 2008; RESH; CARDÉ, 2009), devido à baixa mobilidade das ninfas, pois tem implicação direta tanto na aptidão dos parentais quanto da prole (ROFF, 1993; KREBS, 1994). Em alguns casos, pode-se observar se houve aceitação da planta hospedeira pelo inseto por meio da observação do início da reprodução, como é o caso dos afídeos, cuja deposição da prole indica a aceitação da planta por eles. Ressalta-se que os afídeos que se alimentam de hospedeiros com baixa qualidade nutricional não se reproduzem (MINKS; HARREWIJN, 1987; DIAS et al., 2016).

Alves; Diniz; Parra (2014) estudando a influência de cinco variedades de citros comerciais e afins, verificaram que 'Valência' e *M. paniculata* foram os hospedeiros mais adequados e preferidos no desenvolvimento de *D. citri*. Tsai; Liu (2000) testando

quatro plantas cítricas e afins [limão áspero, *Citrus jambhiri* Lush (Rutaceae); laranja azeda, *Citrus aurantium* L. (Rutaceae); toranja, *Citrus paradisi* Macfadyen (Rutaceae); e murta, *M. paniculata*], verificaram que *D. citri* ovipositaram em maior número em plantas de toranja. Em um estudo recentemente realizado no Texas, o inseto ovipositou em 10 das 11 espécies de rutáceas estudadas, mas o ciclo de vida foi concluído em apenas cinco hospedeiros: *B. koenigii*, *Choisya arizonica* Standl., *Choisya ternata* Kunth, *Helietta parvifolia* (Gray) Benth e *M. paniculata*. O maior número de adultos por planta foi obtido em *B. koenigii* (561) e *M. paniculata* (231) (SÉTAMOU et al., 2016). Avaliando-se a resistência a genótipos de citros, Borgoni et al. (2014) concluíram que as cultivares de laranja doce são os genótipos mais suscetíveis a oviposição e desenvolvimento de *D. citri*, sendo que *P. trifoliata* mostrou uma resistência à oviposição do tipo antixenose. Gerorge e Lapoint (2018) corroboraram com esses resultados.

No experimento para avaliar a taxa de excreção de *D. citri* como medida indireta de atividade alimentar, houve uma maior excreção de *honeydew* por fêmeas e machos em plantas de *R. graveolens* do que em *C. sinensis*, demonstrando que *R. graveolens* é uma planta aceitável à alimentação de *D. citri*. Alves et al. (2018) avaliaram a alimentação em diversas variedades cítricas por *D. citri*, observando uma maior excreção de *honeydew* em laranja doce, que são hospedeiros adequados aos psíldeos. A qualidade nutricional da planta, especialmente a presença de aminoácidos livres, determina a adequação do hospedeiro a insetos sugadores e, portanto, a abundância de ninfas, além de aspectos relacionados a teor de água e de clorofila (STEINBAUER, 2013; DOUGLAS, 2006). Para obter os aminoácidos essenciais, os insetos que se alimentam no floema precisam ingerir grandes quantidades de seiva, pois tais aminoácidos encontram-se em baixas concentrações (DOUGLAS, 2006), o que pode estar acontecendo com *R. graveolens*.

Segundo Dias et al. (2016), durante o processo de seleção hospedeira, se o alimento não for adequado, pode haver redução da fecundidade e do tamanho dos insetos, mortalidade elevada ou não oviposição. Portanto, além de baixas concentrações de aminoácidos livres na planta, esta alta taxa de alimentação em *R. graveolens* pode estar associada à presença de fagoestimulantes, maior proporção de componentes arrestantes em relação a estimulantes de locomoção, além de estruturas morfológicas e fisiológicas da planta favorecer a penetração estiletar de *D.*

citri rumo ao floema. Porém, uma inadequação alimentar pode afetar o *fitness* do inseto, podendo resultar na não oviposição em plantas de *R. graveolens*.

Além da prova de consumo, o odor também interfere no processo de aceitação da planta hospedeira (DIAS et al., 2016). Em certos casos, é considerada a principal modalidade sensorial (LIMA-MENDONÇA et al., 2014). Nos bioensaios de olfatometria do presente estudo, voláteis de *R. graveolens* mostraram ser atrativos para fêmeas e machos sadios quando contrastados com ar limpo. Os insetos responderam mais rapidamente aos campos contendo os voláteis constitutivos desta planta, sugerindo a presença de atraentes à *D. citri*. Machos preferiram voláteis de *R. graveolens* à *C. sinensis*, não havendo diferença significativa em testes com as fêmeas. O tempo de resposta foi mais rápido em direção a *R. graveolens* em relação a *C. sinensis* para ambos os sexos, podendo ter reflexos drásticos no encontro dos insetos para acasalamento, diminuindo assim as gerações subsequentes, além da diminuição da colonização em *C. sinensis*.

Wenninger, Stelinski; Hall (2009) verificaram que machos e fêmeas de *D. citri* respondem de maneira diferente diante dos mesmos estímulos olfativos, variando entre diferentes espécies de plantas hospedeiras, além de insetos acasalados apresentarem uma melhor resposta aos estímulos olfativos. Wenninger e Hall, 2007 constataram a importância de separar os sexos para estudos comportamentais, pois em seus estudos apenas as fêmeas foram atraídas aos voláteis de plantas cítricas testadas, segundo o autor, machos demonstram um interesse maior nos estímulos promovidos pelas fêmeas, do que pelos voláteis constitutivos das plantas. Posteriormente, corroborando com esses resultados, Wenninger; Stelinski; Hall, 2008 também verificaram que as fêmeas são mais responsivas e não são afetadas pela escolha prévia do outro inseto (seja fêmea ou macho), diferentemente dos machos.

Diversas pesquisas utilizando cultivares de citros e afins tem buscado compreender o comportamento de *D. citri* em relação à escolha hospedeira através de resposta aos estímulos olfativos (WENNINGER; STELINSKI; HALL, 2009, PATT; SÉTAMOU 2010). Em testes conduzidos em olfatômetro de tubo “Y”, voláteis de citros *Citrus suhuiensis* Tan. (Rutaceae) (SULE et al., 2012), citros comerciais (YANG et al., 2006), *C. paradisi* (TSAI; LIU, 2000) foram hospedeiros preferenciais de adultos de *D. citri* em relação a *M. paniculata*. Beloti et al. (2017) verificaram que em torno de 85% dos adultos de *D. citri* responderam aos voláteis de *C. sinensis* e *B. koenigii* em testes no aparelho de olfatômetro “Y”, sendo que, para a atração de machos não foi

verificado diferença significativa, entretanto, as fêmeas demonstraram preferência para os voláteis de *B. koenigii*.

Estímulos olfativos podem melhorar a resposta dos psíldeos aos sinais visuais (PATT; SÉTAMOU, 2010; PATT et al., 2011; PATT et al., 2014) e no presente estudo, *D. citri* sadios responderam significativamente a pistas visuais de *R. graveolens*, o que pode favorecer a sua atratividade ao psíldeo. Wenninger; Stelinski; Hall (2009) estudando respostas olfativas de laranja doce (*C. sinensis*), laranja azeda (*C. aurantium*), toranja (*C. paradisi* 'Duncan') e murta (*M. paniculata*), *D. citri* respondeu positivamente aos voláteis de todas as plantas, havendo uma maior atratividade a esses compostos quando a planta estava visualmente disponível.

Testes do presente estudo conduzidos com *D. citri* criados em plantas cítricas fonte de CLas e testados positivos para a bactéria através de qPCR (CLas+), mostraram que as fêmeas não foram atrativas aos voláteis constitutivos de arruda quando no outro braço do olfatômetro corria o ar limpo, entretanto, quando expostos aos voláteis de *C. sinensis*, simultaneamente, as fêmeas preferiram voláteis de *R. graveolens*.

Apesar do percentual de resposta dos machos serem iguais para todos os contrastes e no tempo de resposta para ambos os sexos, esses resultados são satisfatórios. De acordo com Stockton et al. (2016); Patt et al. (2014) o psíldeo desenvolve as suas preferências hospedeiras nas espécies em que foram criadas, através da resposta inata podendo aprender a reconhecer estímulos emitidos por esses hospedeiros, e mesmo as fêmeas CLas+ criadas em plantas de citros, foram mais atrativas a plantas de arruda. A presença da fêmea CLas+ resulta em maior atração para os machos para acasalamento (MARTINI et al., 2015), o que poderia resultar em menor oviposição em plantas de *C. sinensis*, pois os casais seriam atraídos para as plantas de *R. graveolens*.

Esse fato pode contribuir para diminuição da infecção primária do patógeno em plantas cítricas através de insetos infectados, quando utilizadas *R. graveolens* como isca nas margens do pomar, além da possibilidade de associação das mesmas com outros métodos de controle, como por exemplo o microbiano, pois segundo Orduño-Cruz; Guzmán-Franco; Rodríguez-Leyva (2016), a presença de CLas em adultos de *D. citri* se apresentam mais suscetíveis a infecção pelas espécies de fungos: *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Isaria fumosorosea*.

Em ensaios de olfatometria testando insetos criados em planta fonte de CLas e qPCR negativo (CLas-), fêmeas e machos foram mais atraídos a voláteis de *R. graveolens* quando expostos simultaneamente a voláteis de *C. sinensis*, mesmo os machos respondendo mais rapidamente aos voláteis desta última.

Os testes olfativos demonstraram que nas comparações entre *R. graveolens* contra *C. sinensis* os voláteis da primeira planta foram sempre ou mais atraentes ou iguais a segunda, mostrando que compostos orgânicos voláteis emitidos por *R. graveolens* podem ter impacto diferencial sobre o comportamento de *D. citri*, nos dando brechas para a utilização destes semioquímicos no controle da doença.

O efeito desses compostos voláteis sobre o comportamento de *D. citri* é relevante tanto no ponto de vista do ecossistema, como do agroecossistema, uma vez que cria novas perspectivas de utilização dessas substâncias (SCHOONHOVEN et al., 2005) e dessas plantas como armadilha em estratégias de manejo de pragas.

Diante de todos esses fatores discutidos, o que pode oferecer suporte na utilização de *R. graveolens* em sistemas de MIP é que esta planta possui características agrônômicas favoráveis, é uma planta herbácea de fácil cultivo e manutenção, se adequa a diferentes tipos de solo, possui baixo custo de implementação e não abriga outras pragas que acometem a citricultura, além de *D. citri* não realizar postura nessa planta e também não se mostrou capaz de transmitir CLas para as mesmas. A planta *B. koenigii*, ou *curry*, por exemplo, tem sido estudada e se mostrado promissora para uso em plantio isca, com a vantagem sobre *M. paniculata* (murta) de não ser hospedeira do patógeno CLas (BELOTI et al., 2018). Mas apesar dos resultados de laboratório e campo serem animadores nesse sentido, deve-se salientar que *curry* é um excelente hospedeiro para a reprodução do psílideo (SÉTAMOU et al., 2016), podendo atuar como foco do vetor se não for feito um controle químico permanente sobre as mesmas.

As plantas utilizadas como cultura armadilha devem apresentar características específicas, podendo ser naturalmente mais atraentes para a praga alvo na busca por alimentação e/ou oviposição do que a cultura principal (HOKKANEN, 1991, JAVAID; JOSHI, 1995) ou podem ser altamente atraentes para a praga, mas são indevidas para o crescimento e desenvolvimento da progênie, deterrente para oviposição ou ocorrer não sobrevivência dos seus descendentes (BADENES-PEREZ; SHELTON; NAULT, 2004; LU; LIU; SHELTON, 2004; SHELTON; NAULT, 2004).

Um exemplo notável e clássico do sucesso da implementação de cultura armadilha utilizada até os dias atuais é a utilização de alfafa como armadilha para *Lygus* (Hemiptera: Miridae), protegendo a cultura do algodão (GODFREY; LEIGH, 1994). Também para a cultura do algodão, Tillman et al. (2015) evidenciaram que o plantio de soja reduz a densidade de espécies de percevejos em algodão.

No entanto, é necessária essa combinação com outras táticas de manejo de pragas para aumentar o êxito da implementação de uma cultura armadilha. É importante associá-la ao controle químico, biológico, cultural, melhoramento de plantas (SHELTON; NAULT, 2004; SHELTON; BADENES-PEREZ, 2006). Segundo Badenes-Perez; Shelton; Nault (2005) essa eficiência é fundamental para minimizar a porcentagem de terra investida na produção de uma cultura armadilha, tendo em vista que a adoção desta técnica depende também da potencialidade de retorno econômico ao produtor (SHELTON; BADENES-PEREZ, 2006).

Assim, diante de todos os dados apresentados, postula-se que *R. graveolens* seja uma espécie vegetal potencial para uso em sistema de plantio-isca nas bordas dos talhões, em função da disseminação primária do patógeno promovida por adultos infectivos do psíldeo vetor, *D. citri*, provenientes de fontes de inóculo externas. Práticas culturais que bloqueiem ou reduzam a entrada de psíldeos imigrantes na periferia de pomares cítricos podem reduzir a ocorrência de infecções primárias, se utilizadas em conjunto com demais práticas, contribuindo significativamente para o manejo da doença.

6. CONCLUSÕES

- Adultos de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) preferem *Citrus sinensis* (L.) Osbeck 'Pineapple' (Rutaceae) à *Ruta graveolens* L. (Rutaceae) em ensaios de livre escolha para pouso e permanência;
- *D. citri* prefere sinais visuais de folhas de *R. graveolens* aos de *C. sinensis*;
- Tanto *R. graveolens* quanto *C. sinensis* apresentam estímulos arrestantes à *D. citri*;
- Fêmeas de *D. citri* não realizam postura em plantas de *R. graveolens*;
- A excreção de *honeydew* por fêmeas e machos de *D. citri* é maior em plantas de *R. graveolens* do que em *C. sinensis*. Fêmeas excretam mais *honeydew* que machos.
- Fêmeas e machos sadios criados em *Murraya paniculata* (L.) Jack respondem positivamente a estímulos olfativos de *R. graveolens* e *C. sinensis* em contraste com ar limpo. Machos preferem voláteis de *R. graveolens* aos de *C. sinensis*. Fêmeas e machos respondem mais rapidamente aos voláteis de *R. graveolens* em comparação com *C. sinensis*.
- Fêmeas criadas em plantas cítricas infectadas por *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) e positivas para a bactéria por qPCR preferem voláteis de *R. graveolens* aos de *C. sinensis*, enquanto que os machos respondem de modo semelhante às duas espécies vegetais.
- Fêmeas e machos criados em plantas cítricas infectadas por CLas, porém negativas para a bactéria por qPCR preferem voláteis de *R. graveolens* aos de *C. sinensis*.
- *D. citri* não transmite CLas para plantas de *R. graveolens*.

REFERÊNCIAS

ALVES, G. R.; DINIZ, A. J. F.; PARRA, J. R. P. Biology of the *huanglongbing* vector *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) on different host plants. **Journal of economic entomology**, v. 107, n. 2, p. 691-696, 2014.

ALVES, G. R.; BELOTI, V. H.; FAGGIONI-FLORIANO, K. M.; DE CARVALHO, S. A.; DE ANDRADE MORAL, R.; DEMÉTRIO, C. G. B.; ... YAMAMOTO, P. T. Does the scion or rootstock of *Citrus* sp. affect the feeding and biology of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae)? **Arthropod-Plant Interactions**, v. 12, n. 1, p. 77-84, 2018.

AMMAR, E.; SHATTERS, R. G.; LYNCH, C.; HALL, D. G. Detection and relative titer of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in the salivary glands and alimentary canal of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) vector of citrus *huanglongbing* disease. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 104, n. 3, p. 526-533, 2011.

AMMAR, E. D.; SHATTERS, R. G.; HALL, D. G. Localization of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, associated with citrus *huanglongbing* disease, in its psyllid vector using fluorescence in situ hybridization. **Journal of Phytopathology**, v. 159, n. 11-12, p. 726-734, 2011.

AMMAR, E. D.; SHATTERS, R. G.; HALL, D. G. Behavioral, ultrastructural and chemical studies on the honeydew and waxy secretions by nymphs and adults of the Asian citrus psyllid *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). **PLoS One**, v. 8, n. 6, 2013.

ARIMURA, G. I.; MATSUI, K.; TAKABAYASHI, J. Chemical and molecular ecology of herbivore-induced plant volatiles: proximate factors and their ultimate functions. **Plant and Cell Physiology**, v. 50, n. 5, p. 911-923, 2009.

ASGARPAHAH, J.; KHOSHAKAM, R. Phytochemistry and pharmacological properties of *Ruta graveolens* L. **Journal of medicinal plants research**, v. 6, n. 23, p. 3942-3949, 2012.

AUBERT, B. *Trioza erytreae* Del Guercio and *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psylloidea), the two vectors of citrus *greening* disease: Biological aspects and possible control strategies. **Fruits**, v. 42, n. 3, p. 149-162, 1987.

AUBERT, B. Citrus *greening* disease, a serious limiting factor for citriculture in Asia and Africa. **Proceedings - International Society of Citriculture**, v. 1, p. 817-820, 1992.

AUBERT, B. Integrated activities for the control of *huanglongbing greening* and its vector *Diaphorina citri* Kuwayama in Asia. In Proceedings of the Fourth FAO-UNDP International Asia Pacific Conference on Citrus Rehabilitation, Chiang Mai, Thailand, 4-10 February 1990; Aubert, B., Tontyaporn, S., Buangsuwon, D., Eds.; FAO-UNDP: Chiang Mai, Thailand, pp. 133-144. 1990.

AYIL-GUTIÉRREZ, B. A.; VILLEGAS-MENDOZA, J. M.; SANTES-HERNÁNDEZ, Z.; PAZ-GONZÁLEZ, A. D.; MIRELES-MARTÍNEZ, M.; ROSAS-GARCÍA, N. M.; RIVERA, G. *Ruta graveolens* extracts and metabolites against *Spodoptera frugiperda*. **Natural product**

BADENES-PEREZ, F. R.; SHELTON, A. M.; NAULT, B. A. Evaluating trap crops for diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). **Journal of economic entomology**, v. 97, n. 4, p. 1365-1372, 2004.

BADENES-PEREZ, F. R.; SHELTON, A. M.; NAULT, B. A. Using yellow rocket as a trap crop for diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 98, n. 3, p. 884-890, 2005.

BAGAVAN, A.; RAHUMAN, A. A.; KAMARAJ, C.; ELANGO, G.; ZAHIR, A. A.; JAYASEELAN, C.; ... MARIMUTHU, S. Contact and fumigant toxicity of hexane flower bud extract of *Syzygium aromaticum* and its compounds against *Pediculus humanus capitis* (Phthiraptera: Pediculidae). **Parasitology research**, v. 109, n. 5, p. 1329, 2011.

BARBOSA, F. S.; LEITE, G. L. D.; MARTINS, E. R.; GUANABENS, R. E. M.; SILVA, F. W. S. Métodos de extração e concentrações no efeito inseticida de *Ruta graveolens* L., *Artemisia verlotorum* Lamotte e *Petiveria alliacea* L. a *Diabrotica speciosa* Germar. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 11, n. 3, p. 221-229, 2009.

BARBOSA, F. S.; LEITE, G. L. D.; ALVES, S. M.; NASCIMENTO, A. F.; D'ÁVILA, V. D. A.; COSTA, C. A. D. Insecticide effects of *Ruta graveolens*, *Copaifera langsdorffii* and *Chenopodium ambrosioides* against pests and natural enemies in commercial tomato plantation. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 33, n. 1, p. 37-43, 2011.

BASSANEZI, R. B.; BUSATO, L. A.; AMORIM, L.; GOTTWALD, T. R. Preliminary spatial pattern analysis of *Huanglongbing* in São Paulo, Brazil. In: **International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings (1957-2010)**. 2005.

BASSANEZI, R. B.; BERGAMIN FILHP, A.; AMORIM, L.; GOTTWALD, T. R. Epidemiology of *huanglongbing* in São Paulo. In: **Proceedings of Huanglongbing Greening International Workshop, Ribeirão Preto**. p. 37. 2006.

BASSANEZI, R. B.; MONTESINO, L. H.; GIMENES-FERNANDES, N.; YAMAMOTO, P. T.; GOTTWALD, T. R.; AMORIM, L.; FILHO, A. B. Efficacy of area-wide inoculum reduction and vector control on temporal progress of *huanglongbing* in young sweet orange plantings. **Plant Disease**, v. 97, n. 6, p. 789-796, 2013.

BASSANEZI, R. B.; LOPES, S. A.; JÚNIOR, J. B.; SPÓSITO, M. B.; YAMAMOTO, P. T.; MIRANDA, M. P.; ... WULFF, N. A. Epidemiologia do *huanglongbing* e suas implicações para o manejo da doença. **Citrus Research & Technology**, v. 31, n. 1, p. 11-23, 2009.

BELASQUE JR, J.; BASSANEZI, R. B.; YAMAMOTO, P. T.; AYRES, A. J.; TACHIBANA, A.; VIOLANTE, A. R.; ... DRAGONE, J. Lessons from *huanglongbing* management in São Paulo state, Brazil. **Journal of Plant Pathology**, p. 285-302, 2010.

BELOTI, V. H.; RUGNO, G. R.; FELIPPE, M. R.; CARMO-UEHARA, A.; GARBIM, L. F.; GODOY, W. A.; YAMAMOTO, P. T. Population dynamics of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) in orchards of 'Valencia' orange, 'Ponkan' mandarin and 'Murcott' Tangor trees. **Florida Entomologist**, v. 96, n. 1, p. 173-179, 2013.

BELOTI, V. H.; SANTOS, F.; ALVES, G. R.; BENTO, J. M. S.; YAMAMOTO, P. T. Curry leaf smells better than citrus to females of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). **Arthropod-Plant Interactions**, v. 11, n. 5, p. 709-716, 2017.

BELOTI, V. H.; ALVES, G. R.; COLETTA-FILHO, H. D.; YAMAMOTO, P. T. The Asian citrus psyllid host *Murraya koenigii* is immune to citrus *huanglongbing* pathogen '*Candidatus Liberibacter asiaticus*'. **Phytopathology**, v. 108, n. 9, p. 1089-1094, 2018.

BENTO, J. M. S.; NARDI, C. Bioecologia e nutrição vs ecologia química: as interações multitróficas mediadas por sinais químicos. **Bioecologia e nutrição de insetos: base para o manejo integrado de pragas**, 2009.

BERGMANN, E. C.; FERNANDES, S. C. S.; FARIA, A. M. Surto de *Diahorina citri* Kuwayama, 1908 (Hemiptera: Psyllidae), em pomares cítricos do estado de São Paulo. **Biológico**, São Paulo. n. 1, p. 22-25, 1994.

- BERLINGER, M. J. Host plant resistance to *Bemisia tabaci*. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 17, p. 69-82, 1986.
- BERNAYS, E. A.; CHAPMAN, R. F. **Host-plant selection by phytophagous insects**. Springer Science & Business Media, 2007.
- BLACKWELL, P. *Diaphorina citri* PM7/52 (1). **Bulletin**, v. 35, p. 271-333, 2005.
- BORGONI, P. C.; VENDRAMIM, J. D.; LOURENÇÃO, A. L.; MACHADO, M. A. Resistance of Citrus and related genera to *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae). **Neotropical entomology**, v. 43, n. 5, p. 465-469, 2014.
- BOSCARIOL-CAMARGO, R. L.; CRISTOFANI-YALY, M.; MALOSSO, A.; COLETTA-FILHO, H. D.; MACHADO, M. A. Evaluation of different genotypes of citrus to *Candidatus Liberibacter asiaticus* infection. **Citrus Research & Technology**, v. 31, n. 1, p. 85-90, 2017.
- BOVÉ, J. M. *Huanglongbing*: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. **Journal of plant pathology**, p. 7-37, 2006.
- BOVÉ, J. M.; TEIXEIRA, D. C.; WULFF, N. A.; EVEILLARD, S.; SAILLARD, C.; BASSANEZI, R. B.; LOPES, S.; YAMAMOTO, P.T.; AYRES, A. J. Several *Liberibacter* and *Phytoplasma* species are individually associated with HLB. **Proceedings of the International Research Conference on Huanglongbing**, Orlando, p.152-155, 2008.
- CANALE, M. C.; TOMASETO, A. F.; HADDAD, M. D. L.; COLETTA-FILHO, H. D.; LOPES, J. R. S. Latency and persistence of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' in its psyllid vector, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). **Phytopathology**, v. 107, n. 3, p. 264-272, 2017.
- CAPOOR, S. P.; RAO, D. G.; VISWANATH, S. M. *Diaphorina citri* Kuwayama, a vector of *greening* disease of citrus in India. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, v.37, p.572-576, 1967.
- CARVALHO, M. G.; BORTOLOTO, O. C.; VENTURA, M. U. Aromatic plants affect the selection of host tomato plants by *Bemisia tabaci* biotype B. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 162, n. 1, p. 86-92, 2017.
- CASTRO, E. C.; VARGAS, L. L.; BAUTISTA, A. R. Efecto toxico del extracto acuoso de *Ruta graveolens* L. (Rutaceae) sobre larvas de *Anopheles albimanus* Wiedemann, 1820 y *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 (Diptera: Culicidae), en condiciones experimentales. **Entomotropica**, v. 25, n. 1, p. 11-18, 2011.
- CATLING, H. D. Distribution of the psyllid vectors of citrus *greening* disease, with notes on the biology and bionomics of *Diaphorina citri*. **FAO Plant Protection Bulletin**, v. 18, n. 1, p. 8-15, 1970.
- CAVANAGH, A.; HAZZARD, R.; ADLER, L. S.; BOUCHER, J. Using trap crops for control of *Acalymma vittatum* (Coleoptera: Chrysomelidae) reduces insecticide use in butternut squash. **Journal of economic entomology**, v. 102, n. 3, p. 1101-1107, 2009.
- CHIYAKA, C.; SINGER, B. H.; HALBERT, S. E.; MORRIS, J. G.; VAN BRUGGEN, A. H. Modeling *huanglongbing* transmission within a citrus tree. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 30, p. 12213-12218, 2012.
- CIFUENTES-ARENAS, J. C.; BEATTIE, G. A. C.; PEÑA, L.; LOPES, S. A. *Murraya paniculata* and *Swinglea glutinosa* as Short-Term Transient Hosts of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' and Implications for the Spread of *Huanglongbing*. **Phytopathology**, v. 109, n. 12, p. 2064-2073, 2019.

COLETTA-FILHO, H. D.; TARGON, M. L. P. N.; TAKITA, M. A.; NEGRI, J. D.; POMPEU JR, J.; MACHADO, M. A.; ... MULLER, G. W. First report of the causal agent of *Huanglongbing* ("Candidatus Liberibacter asiaticus") in Brazil. **Plant Disease**, v. 88, n. 12, p. 1382-1382, 2004a.

COLETTA-FILHO, H. D.; TAKITA, M.; TARGON, M.; CARLOS, E.; MACHADO, M. A. bactéria *Candidatus Liberibacter* em plantas com *huanglongbing* (ex-greening) no Estado de São Paulo. **Laranja, Cordeirópolis**, v. 25, n. 2, p. 367-374, 2004b.

COLETTA-FILHO, H. D.; CARLOS, E. F.; ALVES, K. C. S.; PEREIRA, M. A. R.; BOSCARIOL-CAMARGO, R. L.; SOUZA, A. A.; MACHADO, M. A. In planta multiplication and graft transmission of 'Candidatus Liberibacter asiaticus' revealed by Real-Time PCR. **European Journal of Plant Pathology**, v. 126, n. 1, p. 53-60, 2010.

COLETTA-FILHO, H. D.; DAUGHERTY, M. P.; FERREIRA, C.; LOPES, J. R. S. Temporal progression of 'Candidatus Liberibacter asiaticus' infection in citrus and acquisition efficiency by *Diaphorina citri*. **Phytopathology**, v. 104, n. 4, p. 416-421, 2014.

CROXTON, S. D.; STANSLY, P. A. Metalized polyethylene mulch to repel Asian citrus psyllid, slow spread of *huanglongbing* and improve growth of new citrus plantings. **Pest management science**, v. 70, n. 2, p. 318-323, 2014.

DAMSTEEGT, V. D.; POSTNIKOVA, E. N.; STONE, A. L.; KUHLMANN, M.; WILSON, C.; SECHLER, A.; ... SCHNEIDER, W. L. *Murraya paniculata* and related species as potential hosts and inoculum reservoirs of 'Candidatus Liberibacter asiaticus', causal agent of *huanglongbing*. **Plant Disease**, v. 94, n. 5, p. 528-533, 2010.

DETHIER, V. G. Mechanism of host-plant recognition. **Entomologia experimentalis et applicata**, v. 31, n. 1, p. 49-56, 1982.

DIAS, N. S.; COUTINHO, C.; PASTORI, P.; GUZZO, E. Seleção hospedeira por insetos fitófagos. **Embrapa Tabuleiros Costeiros-Documents (INFOTECA-E)**, 2016.

DOUGLAS, A. E. Phloem-sap feeding by animals: problems and solutions. **Journal of experimental botany**, v. 57, n. 4, p. 747-754, 2006.

FERERES, A.; KAMPMEIER, G. E.; IRWIN, M. E. Aphid attraction and preference for soybean and pepper plants infected with Potyviridae. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 92, n. 4, p. 542-548, 1999.

FERERES, A.; PEÑAFLO, M. F. G.; FAVARO, C. F.; AZEVEDO, K. E., LANDI, C. H., MALUTA, N. K.; ... LOPES, J. R. Tomato infection by whitefly-transmitted circulative and non-circulative viruses induce contrasting changes in plant volatiles and vector behaviour. **Viruses**, v. 8, n. 8, p. 225, 2016.

FERNÁNDEZ, C. G. *Diaphorina citri* (Kuw.) (Homoptera, Psyllidae) in the Cuban citriculture. **RIAC-IACNET, La Habana**, n. 21/22, p. 56, 2003.

FERREIRA, M.P.; FERREIRA, R.; WINCKLER, V.G.; FREITAS, F. Tônico capilar para tratamento da pediculose. **Cosmetics and Toiletries**, v 16, n. 3, p 126-32, 2004.

FERRY, N.; EDWARDS, M. G.; GATEHOUSE, J. A.; GATEHOUSE, A. M. Plant-insect interactions: molecular approaches to insect resistance. **Current opinion in Biotechnology**, v. 15, n. 2, p. 155-161, 2004.

FOLIMONOVA, S. Y.; Robertson, C. J.; GARNSEY, S. M.; GOWDA, S.; DAWSON, W. O. Examination of the responses of different genotypes of citrus to *huanglongbing* (citrus greening) under different conditions. **Phytopathology**, v. 99, n. 12, p. 1346-1354, 2009.

FOSTER AND, S. P.; HARRIS, M. O. Behavioral manipulation methods for insect pest-management. **Annual review of entomology**, v. 42, n. 1, p. 123-146, 1997.

FRANCO, I. J.; FONTANA, V. L. **Ervas & Plantas: A medicina dos simples**. Livraria Vida, 2005.

FUNDECITRUS. **Fundo de Defesa da Citricultura**. Pesquisa – Levantamentos. Disponível em: <<https://www.fundecitrus.com.br/pdf/levantamentos/levantamento-doencas-2019.pdf>>. Consulta em: 12 abril 2020.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P.; BAPTISTA, G. C. D.; BERTI FILHO, E.; ... MARCHINI, L. C. Entomologia agrícola. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920p.

GEORGE, J.; LAPOINTE, S. L. Host-plant resistance associated with *Poncirus trifoliata* influence oviposition, development and adult emergence of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). **Pest management science**, v. 75, n. 1, p. 279-285, 2019.

GHABBARI, M.; GUARINO, S.; CALECA, V.; SAIANO, F.; SINACORI, M.; BASER, N.; ... VERDE, G. L. Behavior-modifying and insecticidal effects of plant extracts on adults of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera Tephritidae). **Journal of Pest Science**, v. 91, n. 2, p. 907-917, 2018.

GODFREY, L. D.; LEIGH, T. F. Alfalfa harvest strategy effect on Lygus bug (Hemiptera: Miridae) and insect predator population density: implications for use as trap crop in cotton. **Environmental Entomology**, v. 23, n. 5, p. 1106-1118, 1994.

GODFREY, K. E.; GALINDO, C.; PATT, J. M.; LUQUE-WILLIAMS, M. Evaluation of color and scent attractants used to trap and detect asian citrus psyllid (Hemiptera: Liviidae) in urban environments. **Florida Entomologist**, v. 96, n. 4, p. 1406-1416, 2013.

GOTTWALD, T. R.; AUBERT, B.; HUANG, K. L. Spatial pattern analysis of citrus greening in Shantou, China. In: **International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings (1957-2010)**. 1991.

GOTTWALD, T. R.; AUBERT, B.; ZHAO, X. Y. Preliminary analysis of Citrus greening (huanglongbing) epidemics in the People's Republic of China and French Reunion Island. **Phytopathology**, v. 79, n. 6, p. 687-693, 1989.

GOTTWALD, T. R.; GRAÇA, J. V.; BASSANEZI, R. B. **Citrus huanglongbing: the pathogen, its epidemiology, and impact**. Plant Healthy Progress doi: 10.1094. PHP-2007-0906-01-RV, 2007.

GOTTWALD, T. R.; IREY, M.; GAST, T.; PARNELL, S.; TAYLOR, E.; HILF, M. E. Spatio-temporal analysis of na HLB epidemic in Florida and implications for future spread. In: Proceedings of the 17th Conference of the International Organization Citrus Virologists, Univ. California, Riverside (in press). 2007.

GOTTWALD, T. R.; PARNELL, S.; TAYLOR, E.; POOLE, K.; HODGE, J.; FORD, A.; ... IREY, M. Within-tree distribution of *Candidatus Liberibacter asiaticus*. In: **Proceedings of the International Research Conference on Huanglongbing, Orlando**. p. 310-313. 2008.

GOTTWALD, T. R.; IREY, M.; TAYLOR, E. HLB survival analysis—A spatiotemporal assessment of the threat of an HLB-positive tree to its neighbors. In: **Proceedings of the International Research Conference on Huanglongbing, Orlando**. p. 291-295. 2008.

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

GOTTWALD, T. R. Current epidemiological understanding of citrus *huanglongbing*. **Annual review of phytopathology**, v. 48, p. 119-139, 2010.

GRACA, J.V. Citrus *greening* disease. **Annual review of phytopathology**, v. 29, n. 1, p. 109-136, 1991.

GRAÇA, J. V.; SÉTAMOU, M.; SKARIA, M.; KUNTA, M. Citrus *Greening* Disease (HLB) confirmed in Texas. **Citrus Center Newsletter**, Welasco, p.1-3. 2012.

GRAÇA, J.V., KUNTA, M. Detection of *Ca. Liberibacter americanus* variant in Asian citrus psyllids, *Diaphorina citri*, in Texas. In: American Phytopathological Society Annual Meeting, Anais. Pasadena, California, USA. p. 32. 2015.

GRAÇA, J. V.; DOUHAN, G. W.; HALBERT, S. E.; KEREMANE, M. L.; LEE, R. F.; VIDALAKIS, G.; ZHAO, H. *Huanglongbing*: An overview of a complex pathosystem ravaging the world's citrus. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 58, n. 4, p. 373-387, 2016.

GRAFTON-CARDWELL, E. E.; STELINSKI, L. L.; STANSLY, P. A. Biology and management of Asian citrus psyllid, vector of the *huanglongbing* pathogens. **Annual Review of Entomology**, v. 58, p. 413-432, 2013.

GRAY, S.; CILIA, M.; GHANIM, M. Circulative, "nonpropagative" virus transmission: an orchestra of virus-, insect-, and plant-derived instruments. In: **Advances in Virus Research**. Academic Press. p. 141-199. 2014.

HADDOUCHI, F.; CHAOUICHE, T. M.; ZAOUALI, Y.; KSOURI, R.; ATTOU, A.; BENMANSOUR, A. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from four *Ruta* species growing in Algeria. **Food Chemistry**, v. 141, n. 1, p. 253-258, 2013.

HALBERT, S. E.; MANJUNATH, K. L. Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and *greening* disease of citrus: a literature review and assessment of risk in Florida. **Florida entomologist**, v. 87, n. 3, p. 330-353, 2004.

HALE, A. L.; MEEPAGALA, K. M.; OLIVA, A.; ALIOTTA, G.; DUKE, S. O. Et al. Phytotoxins from the leaves of *Ruta graveolens*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 52, n. 11, p. 3345-3349, 2004.

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

HALL, D. G.; GOTTWALD, T. R.; CHAU, N. M.; ICHINOSE, K.; DIEN, L. Q.; BEATTIE, G. A. C. Intercropping of citrus and guava trees for management of *huanglongbing*. In: **Florida Entomological Society Annual Meeting**. 2007.

HALL, D. G.; ALBRIGO, L. G. Estimating the relative abundance of flush shoots in citrus with implications on monitoring insects associated with flush. **HortScience**, v. 42, n. 2, p. 364-368, 2007.

HALL, D. G.; HENTZ, M. G.; ADAIR, R. C. Population ecology and phenology of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in two Florida citrus groves. **Environmental Entomology**, v. 37, n. 4, p. 914-924, 2008.

HALL, D. G.; GOTTWALD, T. R.; NGUYEN, N. C.; ICHINOSE, K.; LE, Q. D.; BEATTIE, G. A. C.; ... HAUSER, S. Greenhouse investigations on the effect of guava on infestations of Asian citrus psyllid in grapefruit. In: **Proceedings of the... annual meeting of the Florida State Horticultural Society**. v. 121. p. 104-109, 2008.

HALL, D. G. An assessment of yellow sticky card traps as indicators of the abundance of adult *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in citrus. **Journal of Economic Entomology**, v. 102, n. 1, p. 446-452, 2009.

HILJE, L.; COSTA, H. S.; STANSLY, P. A. Cultural practices for managing *Bemisia tabaci* and associated viral diseases. **Crop protection**, v. 20, n. 9, p. 801-812, 2001.

HOKKANEN, H. M. T. Trap cropping in pest management. **Annual Review of Entomology**, v. 36, n. 1, p. 119-138, 1991.

HOLDEN, M. H.; ELLNER, S. P.; LEE, D. H.; NYROP, J. P.; SANDERSON, J. P. Designing an effective trap cropping strategy: the effects of attraction, retention and plant spatial distribution. **Journal of Applied Ecology**, v. 49, n. 3, p. 715-722, 2012.

HOY, M. A.; JEYAPRAKASH, A.; NGUYEN, R. Long PCR is a sensitive method for detecting *Liberobacter asiaticum* in parasitoids undergoing risk assessment in quarantine. **Biological Control**, v. 22, n. 3, p. 278-287, 2001.

HUNG, T.H.; WU, M. L.; SU, H. J. Identification of the Chinese box orange (*Severinia buxifolia*) as an alternative host of the bacterium causing citrus *huanglongbing*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 107, n. 2, p. 183-189, 2001.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Levantamento Sistemático de Produção Agrícola. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1618#resultado>>. Consulta em: 20 de março de 2020.

INNOCENT, E.; GIKONYO, N. K.; NKUNYA, M. H. Repellency property of long chain aliphatic methyl ketones against *Anopheles gambiae* ss. **Tanzania journal of health research**, v. 10, n. 1, p. 50-54, 2008.

INOUE, H.; OHNISHI, J.; ITO, T.; TOMIMURA, K.; MIYATA, S.; IWANAMI, T.; ASHIHARA, W. Enhanced proliferation and efficient transmission of *Candidatus Liberibacter asiaticus* by adult *Diaphorina citri* after acquisition feeding in the nymphal stage. **Annals of Applied Biology**, v. 155, n. 1, p. 29-36, 2009.

IREY, M. S.; GAST, T.; GOTTWALD, T. R. Comparison of visual assessment and polymerase chain reaction assay testing to estimate the incidence of the *Huanglongbing* pathogen in commercial Florida citrus. **Proceedings of Florida State Horticultural Society**. 119: 89-93, 2006.

IVANOVA, A.; MIKHOVA, B.; NAJDENSKI, H.; TSVETKOVA, I.; KOSTOVA, I. Antimicrobial and cytotoxic activity of *Ruta graveolens*. **Fitoterapia**, v. 76, n. 3-4, p. 344-347, 2005.

JACOBSON, M. Botanical pesticides: past, present and future. In: ARNASON, J.T.; PHILOGÈNE, B.J.R.; MORAND, P. Insecticide of plant origin. Washington, DC, American Chemical Society. v. 387, p.69-77. 1989.

JAVAID, I.; JOSHI, J. M. Trap cropping in insect pest management. **Journal of sustainable agriculture**, v. 5, n. 1-2, p. 117-136, 1995.

KATAKI, M. S.; KAKOTI, B. B.; BHUYAN, B.; RAJKUMARI, A.; RAJAK, P. Garden rue inhibits the arachidonic acid pathway, scavenges free radicals, and elevates FRAP: role in inflammation. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 12, n. 3, p. 172-179, 2014.

KHAN, Z. R.; PICKETT, J. A.; WADHAMS, L.; MUYEKHO, F. Habitat management strategies for the control of cereal stemborers and striga in maize in Kenya. **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 21, n. 4, p. 375-380, 2001.

KNAAK, N.; TAGLIARI, M. S.; MACHADO, V.; FIUZA, L. M. Atividade inseticida de extratos de plantas medicinais sobre *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **BioAssay**, v. 7, 2012.

KOBORI, Y.; NAKATA, T.; OHTO. Estimation of dispersal pattern of adult Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). **Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology**, v. 55, n. 3, p. 177-181, 2011.

KREBS, C. J. Ecology: the experimental analysis of distribution and abundance. **Addison-Wesley Educational Publishers**, California. 1994.

LANDIS, D. A.; WRATTEN, S. D.; GURR, G. M. Habitat management to conserve natural enemies of arthropod pests in agriculture. **Annual review of entomology**, v. 45, n. 1, p. 175-201, 2000.

LEÓN, J. H.; SÉTAMOU, M.; GASTAMINZA, G. A.; BUENAHORA, J.; CÁCERES, S.; YAMAMOTO, P. T.; ... LOGARZO, G. A. Two separate introductions of Asian citrus psyllid populations found in the American continents. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 104, n. 6, p. 1392-1398, 2011.

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**, 66: 104-115. 2006.

LI, W., LEVY, L., HARTUNG, J.S. Quantitative distribution of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' in citrus plants with citrus *huanglongbing*. **Phytopathology**, 99: 139-144. 2009.

LIMA-MENDONÇA, A.; ADL, M.; SANTANA, A. E. G.; DO NASCIMENTO, R. R. Semioquímicos de moscas das frutas do genero Anastrepha. **Química Nova**, v. 37, n. 2, p. 293-301, 2014.

LIN, H.; CHEN, C.; DODDAPANENI, H.; DUAN, Y.; CIVEROLO, E. L.; BAI, X.; ZHAO, X. A new diagnostic system for ultra-sensitive and specific detection and quantification of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the bacterium associated with citrus *Huanglongbing*. **Journal of microbiological methods**, v. 81, n. 1, p. 17-25, 2010.

LIN, C. K. Notes on citrus yellow shoot disease. **Acta Phytophylact Sin**, v. 2, p. 243-251, 1963.

LOPES, S. A.; MARTINS, E. C.; FRARE, G. F. Plantas hospedeiras de liberibacter no Brasil. In: **Proceedings of Huanglongbing-Greening International Workshop**. 2006.

LOPES, S. A.; FRARE, G. F. Graft transmission and cultivar reaction of citrus to '*Candidatus Liberibacter americanus*'. **Plant Disease**, v. 92, n. 1, p. 21-24, 2008.

LOPES, S. A.; BERTOLINI, E.; FRARE, G. F.; MARTINS, E. C.; WULFF, N. A.; TEIXEIRA, D. C.; ... CAMBRA, M. Graft transmission efficiencies and multiplication of '*Candidatus Liberibacter americanus*' and '*Ca. Liberibacter asiaticus*' in citrus plants. **Phytopathology**, v. 99, n. 3, p. 301-306, 2009a.

LOPES, S. A.; FRARE, G. F.; BERTOLINI, E.; CAMBRA, M.; FERNANDES, N. G.; AYRES, A. J.; ... BOVÉ, J. M. Liberibacters associated with citrus *huanglongbing* in Brazil: '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' is heat tolerant, '*Ca. L. americanus*' is heat sensitive. **Plant Disease**, v. 93, n. 3, p. 257-262, 2009b.

LOPES, S. A.; FRARE, G. F.; CAMARGO, L. E. A.; WULFF, N. A.; TEIXEIRA, D. C.; BASSANEZI, R. B.; ... AYRES, A. J. Liberibacters associated with orange jasmine in Brazil: incidence in urban areas and relatedness to citrus liberibacters. **Plant Pathology**, v. 59, n. 6, p. 1044-1053, 2010.

LOPES, S. A.; LUIZ, F. Q. B. F.; MARTINS, E. C.; FASSINI, C. G.; SOUSA, M. C.; BARBOSA, J. C.; BEATTIE, G. A. C. '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' titers in citrus and acquisition rates by *Diaphorina citri* are decreased by higher temperature. **Plant disease**, v. 97, n. 12, p. 1563-1570, 2013.

LOPES, S. A.; LUIZ, F. Q.; OLIVEIRA, H. T.; CIFUENTES-ARENAS, J. C.; RAIOL-JUNIOR, L. L. Seasonal variation of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' titers in

new shoots of citrus in distinct environments. **Plant disease**, v. 101, n. 4, p. 583-590, 2017.

LU, J.; LIU, S.; SHELTON, A. M. Laboratory evaluations of a wild crucifer *Barbarea vulgaris* as a management tool for the diamondback moth *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). **Bulletin of Entomological Research**, v. 94, n. 6, p. 509-516, 2004.

LU, Y. H.; WU, K. M.; WYCKHUYS, K. A. G.; GUO, Y. Y. Potential of mungbean, *Vigna radiatus* as a trap crop for managing *Apolygus lucorum* (Hemiptera: Miridae) on Bt cotton. **Crop Protection**, v. 28, n. 1, p. 77-81, 2009.

MACHADO, M. A.; LOCALI-FABRIS, E. C.; COLETTA-FILHO, H. D. *Candidatus* Liberibacter spp., citrus *huanglongbing* agents. **Citrus Research & Technology**, v. 31, n. 1, p. 25-35, 2017.

MANN, R. S.; PELZ-STELINSKI, K.; HERMANN, S. L.; TIWARI, S.; STELINSKI, L. L. Sexual Transmission of a Plant Pathogenic Bacterium, *Candidatus* Liberibacter asiaticus, between Conspecific Insect Vectors during Mating. **PLoS ONE**, v. 6, n. 12, p e29197, 2011.

MANN, R. S.; TIWARI, S.; SMOOT, J. M.; ROUSEFF, R. L.; STELINSKI, L. L. Repellency and toxicity of plant-based essential oils and their constituents against *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). **Journal of applied entomology**, v. 136, n. 1-2, p. 87-96, 2012a.

MANN, R. S.; ALI, J. G.; HERMANN, S. L.; TIWARI, S.; PELZ-STELINSKI, K. S.; ALBORN, H. T.; STELINSKI, L. L. Induced release of a plant-defense volatile 'deceptively' attracts insect vectors to plants infected with a bacterial pathogen. **PLoS pathogens**, v. 8, n. 3, 2012b.

MARCOMINI, A. M.; ALVES, L. F. A.; BONINI, A. K.; MERTZ, N. R.; SANTOS, J. D. Atividade Inseticida de extratos vegetais e do óleo de nim sobre adultos de *Alphitobius diaperinus* Panzer (Coleoptera: Tenebrionidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, n. 3, p. 409-416, 2009.

MARTINI, X.; HOFFMANN, M.; COY, M. R.; STELINSKI, L. L.; PELZ-STELINSKI, K. S. Infection of an insect vector with a bacterial plant pathogen increases its propensity for dispersal. **PLoS One**, v. 10, n. 6, 2015.

MAUCK, K. E.; MORAES, C. M.; MESCHER, M. C. Deceptive chemical signals induced by a plant virus attract insect vectors to inferior hosts. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 8, p. 3600-3605, 2010.

MCCLEAN, A. P. D.; OBERHOLZER, P. C. J. Citrus psylla, a vector of the greening disease of sweet orange. **South African Journal of Agricultural Science**, v. 8, n. 1, p. 297-298, 1965.

MEAD, F. W.; FASULO, T. R. Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Insecta: Hemiptera: Psyllidae). **FDACS/DPI Entomology. Circular**, v. 180, p. 1-8, 2010.

MEAD, F. W. **Asiatic citrus psyllid** – *Diaphorina citri* Kuwayama. Disponível em: <<http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/IN/IN16000.pdf>>. Acesso em: 20 de março de 2020.

MEEPAGALA, K. M.; SCHRADER, K. K.; WEDGE, D. E.; DUKE, S. O. Algicidal and antifungal compounds from the roots of *Ruta graveolens* and synthesis of their analogs. **Phytochemistry**, v. 66, n. 22, p. 2689-2695, 2005.

MINKS, A. K.; HARREWIJN, P. **Aphids: their biology, natural enemies, and control**. New York: Elsevier, 1987. 450 p.

MIRANDA, M. P.; ZANARDI, O. Z.; TOMASETO, A. F.; VOLPE, H. X.; GARCIA, R. B.; PRADO, E. Processed kaolin affects the probing and settling behavior of

Diaphorina citri (Hemiptera: Liviidae). **Pest management science**, v. 74, n. 8, p. 1964-1972, 2018.

MORAL, R. A.; HINDE, J.; DEMÉTRIO, C. G. B. Half-normal plots and overdispersed models in R: The hnp package. **Journal of Statistical Software**, v. 81, n. 10, 2017.

MURRAY, M. G.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic acids research**, v. 8, n. 19, p. 4321-4326, 1980.

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

NEVES, M. F., TROMBIN, V. G., LOPES, F. F., KALAKI, R. B. A laranja do campo ao copo. *São Paulo: Atlas*, 2012.

NILSSON, C. Farming systems, integrated crop management and winter oilseed rape production. In: **Biocontrol-Based Integrated Management of Oilseed Rape Pests**. Springer, Dordrecht, p. 405-414. 2010.

OLIVA, A.; MEEPAGALA, K. M.; WEDGE, D. E.; HARRIES, D.; HALE, A. L.; ALIOTTA, G.; DUKE, S. O. Natural fungicides from *Ruta graveolens* L. leaves, including a new quinolone alkaloid. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, n. 4, p. 890-896, 2003.

ORDUÑO-CRUZ, N.; GUZMÁN-FRANCO, A. W.; RODRÍGUEZ-LEYVA, E. *Diaphorina citri* populations carrying the bacterial plant pathogen *Candidatus Liberibacter asiaticus* are more susceptible to infection by entomopathogenic fungi than bacteria-free populations. **Agricultural and Forest Entomology**, v. 18, n. 1, p. 95-98, 2016.

ORLOVSKIS, Z.; CANALE, M. C.; THOLE, V.; PECHER, P.; LOPES, J. R.; HOGENHOUT, S. A. Insect-borne plant pathogenic bacteria: getting a ride goes beyond physical contact. **Current Opinion in Insect Science**, v. 9, p. 16-23, 2015.

OSSES, F.; MARTINS, E. G.; MACHADO, G. Oviposition site selection by the bromeliad-dweller harvestman *Bourguyiahama* (Arachnida: Opiliones). **Journal of Ethology**, v. 26, n. 2, p. 233-241, 2008.

PARRA, J. R. P.; LOPES, J. R. S.; TORRES, M. L. G.; NAVA, D. E.; PAIVA, P. E. B. Biology and ecology of the vector *Diaphorina citri* and transmission of bacteria associated with *huanglongbing*. **Citrus Research & Technology**, v. 31, n. 1, p. 37-51, 2017.

PASCAL, C.; BASSO, C.; GRILLE, G.; FRANCO, J. Evaluación del tabaco, *Nicotiana tabacum* L., falsa Mandioca, *Manihot grahamii* H., ruda, *Ruta graveolens* L., estrella federa, *Euphorbia pulcherrima* W. y berenjena, *Solanum melongena* L., como plantas hospederas para la cría de *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood)(Homoptera: Aleyrodidae). **Revista Chilena de Entomología**, v. 29, p. 81-88, 2003.

PATT, J. M.; SÉTAMOU, Mamoudou. Responses of the Asian citrus psyllid to volatiles emitted by the flushing shoots of its rutaceous host plants. **Environmental entomology**, v. 39, n. 2, p. 618-624, 2010.

PATT, J. M.; MEIKLE, W. G.; MAFRA-NETO, A.; SÉTAMOU, M.; MANGAN, R.; YANG, C.; ... ADAMCZYK, J. J. Multimodal cues drive host-plant assessment in Asian citrus psyllid (*Diaphorina citri*). **Environmental entomology**, v. 40, n. 6, p. 1494-1502, 2011.

PATT, J. M.; STOCKTON, D.; MEIKLE, W. G.; SÉTAMOU, M.; MAFRA-NETO, A.; ADAMCZYK, J. J. Innate and conditioned responses to chemosensory and visual

cues in Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae), vector of *Huanglongbing* pathogens. **Insects**, v. 5, n. 4, p. 921-941, 2014.

PELZ-STELINSKI, K. S.; BRLANSKY, R. H.; EBERT, T. A.; ROGERS, M. E. Transmission parameters for *Candidatus Liberibacter asiaticus* by Asian citrus psyllid (Hemiptera: Psyllidae). **Journal of economic entomology**, v. 103, n. 5, p. 1531-1541, 2010.

PERERA, A. G. W. U.; KARUNARATNE, M. M. S. C. Efficacy of essential oil of *Ruta Graveolens* leaves against *Sitophilus Oryzae* (Linnaeus) as a biorational pesticide in post-harvest pest management. 2016.

PERERA, A. G. W. U.; KARUNARATNE, M. M. S. C.; CHINTHAKA, S. D. M. Biological activity and secondary metabolite profile of *Ruta graveolens* leaves against maize weevil infestations. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, p. 233-241, 2017.

PICANÇO, M. C. Apostila de Entomologia Agrícola. 2010. Disponível em: <<http://pt.scribd.com/doc/203394883/Apostila-Entomologia-Agricola#scribd>>. Acesso em: 16 fev. 2020.

POTENZA, M. R.; GOMES, R. C. O.; JOCYS, T.; TAKEMATSU, A. P.; RAMOS, A. C. O. Avaliação de produtos naturais para o controle do ácaro rajado *Tetranychus urticae* (Koch, 1836) (Acari: Tetranychidae) em casa de vegetação. **Arquivos do instituto Biológico**, v. 73, n. 4, p. 455-459, 2006.

PREVIERO, C. A., LIMA JR., B.C.; FLORENCIO, L.K.; SANTOS, D.L. Receita de plantas com atividade inseticida no controle de pragas. Palmas: CEULP/UBRA, 32 p., 2010.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria**. URL <https://www.R-project.org/>. 2019.

RAMADUGU, C.; KEREMANE, M. L.; HALBERT, S. E.; DUAN, Y. P.; ROOSE, M. L.; STOVER, E.; LEE, R. F. Long-term field evaluation reveals *Huanglongbing* resistance in Citrus relatives. **Plant Disease**, v. 100, n. 9, p. 1858-1869, 2016.

RATHEESH, M.; SINDHU, G.; HELEN, A. Anti-inflammatory effect of quinoline alkaloid skimmianine isolated from *Ruta graveolens* L. **Inflammation research**, v. 62, n. 4, p. 367-376, 2013.

RESH, V. H.; CARDÉ, R. T. (Ed.). **Encyclopedia of insects**. Academic Press, 2009.

RODRÍGUEZ-ECHEVERRY, J. J. Uso y manejo tradicional de plantas medicinales y mágicas en el Valle de Sibundoy, Alto Putumayo, y su relación con procesos locales de construcción ambiental. **Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas Físicas y Naturales**, v. 34, n. 132, p. 309-326, 2010.

ROFF, D. (Ed.). **Evolution of life histories: theory and analysis**. Springer Science & Business Media, 1993.

ROGERS, M. E.; STANSLY, P. A. Biology and Management of the Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama, in Florida Citrus1. 2012.

ROMERO, R.; MORALES, P.; PINO, O.; CERMELI, M.; GONZÁLEZ, E. Actividad insecticida de seis extractos etanólicos de plantas sobre mosca blanca. **Revista de Protección Vegetal**, v. 30, p. 23-28, 2015.

RUSCH, A.; VALANTIN-MORISON, M.; SARTHOU, J. P.; ROGER-ESTRADE, J. Integrating crop and landscape management into new crop protection strategies to enhance biological control of oilseed rape insect pests. In: **Biocontrol-Based Integrated Management of Oilseed Rape Pests**. Springer, Dordrecht, p. 415-448. 2010.

SAKAMAKI, Y. Occasional Papers of the Kagoshima University Research Center, Lake Alfred, Florida, n.42, p.121-125, 2005.

SANTIAGO, G. P.; PÁDUA, L. E. D. M.; SILVA, P. R. R.; CARVALHO, E. M. S.; MAIA, C. B. Efeitos de extratos de plantas na biologia de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) mantida em dieta artificial. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 3, p. 792-796, 2008.

SANTOS, R. S.; HATA, F. T.; COELHO, L. B. N.; URSI, M. Registros de ocorrência e novos hospedeiros de *Gargaphia lunulata* (Mayr) (Hemiptera: Tingidae) nos estados do Acre e Paraná. **Embrapa Acre-Nota Técnica/Nota Científica (ALICE)**, 2017.

SASANELLI, N.; ANTON, A.; D'ADDABBO, T.; TAKACS, T. Nematicidal properties of leaf extracts of *Ruta graveolens* inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi. **Russian Journal of Nematology**, v. 15, n. 1, p. 65-73, 2007.

SCHOONHOVEN, L. M.; VAN LOON, B.; VAN LOON, J. J.; DICKE, M. **Insect-plant biology**. Oxford University Press on Demand, 2005.

SERAPHIM, H.A.; RODRIGUES G.; YAMAMOTO, P. T. Feeding and Oviposition of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) on *Helietta apiculata* (Sapindales: Rutaceae): a Potential Host? *Florida Entomologist* 100: 476-477, 2017.

SÉTAMOU, M.; FLORES, D.; VICTOR FRENCH, J.; HALL, D. G. Dispersion patterns and sampling plans for *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in citrus. **Journal of Economic Entomology**, v. 101, n. 4, p. 1478-1487, 2008.

SÉTAMOU, M.; SANCHEZ, A.; SALDAÑA, R. R.; PATT, J. M.; SUMMY, R. Visual responses of adult Asian citrus psyllid (Hemiptera: Liviidae) to colored sticky traps on citrus trees. **Journal of insect behavior**, v. 27, n. 4, p. 540-553, 2014.

SÉTAMOU, M.; BARTELS, D. W. Living on the edges: spatial niche occupation of Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae), in citrus groves. **PloS one**, v. 10, n. 7, 2015.

SÉTAMOU, M.; GRAÇA, J. V.; SANDOVAL, J. L. Suitability of native North American Rutaceae to serve as host plants for the Asian citrus psyllid (Hemiptera: Liviidae). **Journal of Applied Entomology**, v. 140, n. 9, p. 645-654, 2016.

SHELTON, A. M.; NAULT, B. A. Dead-end trap cropping: a technique to improve management of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). **Crop Protection**, v. 23, n. 6, p. 497-503, 2004.

SHELTON, A. M.; BADENES-PEREZ, F. R. Concepts and applications of trap cropping in pest management. **Annual Review of Entomology**, v. 51, p. 285-308, 2006.

SHIN-FOON, C.; YU-TONG, Q. Experiments on the application of botanical insecticides for the control of diamondback moth in South China. **Journal of Applied Entomology**, v. 116, n. 1-5, p. 479-486, 1993.

SIGNORELL, A. et al. DescTools: Tools for descriptive statistics. R package version 0.99. 28. **R Foundation Statistical Computing, Vienna, Austria**, 2019.

SILVA, E. M.; TOSCANO, L. C.; SALES, A. C. Atividade Inseticida de Extratos de Plantas sobre *Brevicoryne brassicae* (L.) (Homoptera: Aphididae) em Couve-Manteiga. **Cadernos de Agroecologia**, v. 13, n. 2, p. 8-8, 2018.

STAMPS, J. The Princeton Gguide of ecology. Princeton University Press, Princeton. 2009.

STASHENKO, E. E.; ACOSTA, R.; MARTÍNEZ, J. R. High-resolution gas-chromatographic analysis of the secondary metabolites obtained by subcritical-fluid extraction from Colombian rue (*Ruta graveolens* L.). **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 43, n. 1-3, p. 379-390, 2000.

STEINBAUER, M. J. Shoot feeding as a nutrient acquisition strategy in free-living psyllids. **PloS one**, v. 8, n. 10, 2013.

STOCKTON, D. G.; MARTINI, X.; PATT, J. M.; STELINSKI, L. L. The influence of learning on host plant preference in a significant phytopathogen vector, *Diaphorina citri*. **PLoS One**, v. 11, n. 3, 2016.

SULE, H.; MUHAMAD, R.; OMAR, D.; HEE, A. K. W. Response of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) to volatiles emitted from leaves of two rutaceous plants. **Journal of Agricultural Science**, v. 4, n. 6, p. 152, 2012.

TABANCA, N.; DEMIRCI, B.; KIYAN, H. T.; ALI, A.; BERNIER, U. R.; WEDGE, D. E. ... BAŞER, K. H. C. Repellent and larvicidal activity of *Ruta graveolens* essential oil and its major individual constituents against *Aedes aegypti*. **Planta Medica**, v. 78, n. 05, p. P_90, 2012.

TATINENI, S.; SAGARAM, U. S.; GOWDA, S.; ROBERTSON, C. J.; DAWSON, W. O.; IWANAMI, T.; WANG, N. In planta distribution of 'Candidatus Liberibacter asiaticus' as revealed by polymerase chain reaction (PCR) and real-time PCR. **Phytopathology**, v. 98, n. 5, p. 592-599, 2008.

TECK, L.; ABANG, F.; BEATTIE, A.; HENG, K.; KING, W. Influence of host plant species and flush growth stage on the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama. **American Journal of Agricultural and Biological Sciences**, v. 6, n. 4, p. 536-543, 2011.

TEIXEIRA, D. C.; DANET, J. L.; EVEILLARD, S.; MARTINS, E. C.; JESUS JUNIOR, W. C.; YAMAMOTO, P. T.; ... BOVÉ, J. M. *Citrus huanglongbing* in Sao Paulo State, Brazil: PCR detection of the 'Candidatus' Liberibacter species associated with the disease. **Molecular and cellular probes**, v. 19, n. 3, p. 173-179, 2005.

TEIXEIRA, D. C.; SAILLARD, C.; COUTURE, C.; MARTINS, E. C.; WULFF, N. A.; EVEILLARD-JAGOEIX, S.; ... BOVÉ, J. M. Distribution and quantification of *Candidatus Liberibacter americanus*, agent of *huanglongbing* disease of citrus in São Paulo State, Brasil, in leaves of an affected sweet orange tree as determined by PCR. **Molecular and cellular probes**, v. 22, n. 3, p. 139-150, 2008.

TILLMAN, P. G.; KHRIMIAN, A.; COTTRELL, T. E.; LOU, X.; MIZELL III, R. F.; JOHNSON, C. J. Trap cropping systems and a physical barrier for suppression of stink bugs (Hemiptera: Pentatomidae) in cotton. **Journal of Economic Entomology**, v. 108, n. 5, p. 2324-2334, 2015.

TIWARI, S.; MANN, R. S.; ROGERS, M. E.; STELINSKI, L. L. Insecticide resistance in field populations of Asian citrus psyllid in Florida. **Pest management science**, v. 67, n. 10, p. 1258-1268, 2011.

TOMASETO, A. F.; MARQUES, R. N.; FERERES, A.; ZANARDI, O. Z.; VOLPE, H. X.; ALQUÉZAR, B.; ... MIRANDA, M. P. Orange jasmine as a trap crop to control *Diaphorina citri*. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2019.

TOMASETO, A. F.; KRUGNER, R.; LOPES, J. R. S. Effect of plant barriers and citrus leaf age on dispersal of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). **Journal of Applied Entomology**, v. 140, n. 1-2, p. 91-102, 2016.

TORSTEN, H.; FRANK B.; PETER, W. Simultaneous Interference in General Parametric Models. **Biometrical Journal** 50 v. 3, p. 346-363. 2008. TRIGO, J. R.; BITTRICH, V.; AMARAL, M. C.; MARSAIOLI, A. J. Ecologia química. **Revista Chemkeys**, n. 3, p. 1-9, 2000.

TSAGKARAKIS, A. E.; ROGERS, M. E. Suitability of 'Cleopatra' mandarin as a host plant for *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). **Florida Entomologist**, v. 93, n. 3, p. 451-453, 2010.

TSAI, J. H.; CHEN, Z. Y.; SHEN, C. Y.; JIN, K. X. Mycoplasmas and fastidious vascular prokaryotes associated with tree diseases in China. **Tree mycoplasmas and mycoplasma diseases**, p. 69-77, 1988.

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

USDA – United States Department of Agriculture. Citrus: World Markets and Trade. Disponível em: <<https://www.fas.usda.gov/data/citrus-world-markets-and-trade>>. Consulta em: 23 jan. 2020.

VENDRAMIM, J. D.; GUZZO, E. C. Plant resistance and insect bioecology and nutrition. **Insect bioecology and nutrition for integrated pest management**, p. 657-685, 2012.

WANG, N.; TRIVEDI, P. Citrus *huanglongbing*: a newly relevant disease presents unprecedented challenges. **Phytopathology**, v. 103, n. 7, p. 652-665, 2013.

WENNINGER, E. J.; HALL, D. G. Daily timing of mating and age at reproductive maturity in *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). **Florida entomologist**, p. 715-722, 2007.

WENNINGER, E. J.; STELINSKI, L. L.; HALL, D. G. Roles of olfactory cues, visual cues, and mating status in orientation of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) to four different host plants. **Environmental entomology**, v. 38, n. 1, p. 225-234, 2009.

WENNINGER, E. J.; HALL, D. G. Daily and seasonal patterns in abdominal color in *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 101, n. 3, p. 585-592, 2008.

WESTBROOK, C. J.; HALL, D. G.; STOVER, E.; DUAN, Y. P.; LEE, R. F. Colonization of Citrus and Citrus-related germplasm by *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). **HortScience**, v. 46, n. 7, p. 997-1005, 2011.

WU, F.; CEN, Y.; DENG, X.; CHEN, J.; XIA, Y.; LIANG, G. Movement of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) adults between *huanglongbing*-infected and healthy citrus. **Florida Entomologist**, v. 98, n. 2, p. 410-416, 2015.

XU, C. F.; XIA, Y. H.; LI, K. B.; KE, C. Further study of the transmission of citrus huanglungbin by a psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama. In: **International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings (1957-2010)**. 1988.

YAMAMOTO, P. T.; FELIPPE, M. R.; GARBIM, L. F.; COELHO, J. H. C.; XIMENES, N. L.; MARTINS, E. C.; ... BRAZ, J. D. *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera: Psyllidae): vector of the bacterium *Candidatus Liberibacter americanus*. In: **Proceedings of the Huanglongbing-Greening International Workshop, Ribeirão Preto, Brazil**. p. 96. 2006.

YAMAMOTO, P. T.; PINTO, A. S.; PARRA-PEDRAZZOLI, A. L.; OLIVEIRA, C. A. L.; OMOTO, C.; FRANCO, C. R. ... BENVENGA, S. R. **Manejo integrado de Pragas dos Citros**. Piracicaba: CP 2, p. 209-236, 2008.

YAMAMOTO, P. T.; FELLIPE, M. R.; SANCHES, A. L.; COELHO, J. H.; GARBIM, L. F.; XIMENES, N. L. Eficácia de inseticidas para o manejo de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) em citros. **BioAssay**, v. 4, 2009.

YAN, H.; ZENG, J.; ZHONG, G. The push-pull strategy for citrus psyllid control. **Pest management science**, v. 71, n. 7, p. 893-896, 2015.

YANG, Y.; HUANG, M.; BEATTIE, G.A.C.; XIA, Y.; OUYANG, G.; XIONG, J. Distribution, biology, ecology, and control of the psyllid *Diaphorina citri* Kuwayama, a major pest of citrus: A status report for China. **International Journal Pest Managment**. 2, 343-352. 2006.

YANG, Y. C.; LEE, S. H.; CLARK, J. M.; AHN, Y. J. Ovicidal and adulticidal activities of *Origanum majorana* essential oil constituents against insecticide-susceptible and pyrethroid/malathion-resistant *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n. 6, p. 2282-2287, 2009.

ZHAO, X. Y. Citrus yellow shoot (*Huanglongbing*) in China: a review. *Proceedings of the International Society of Citriculture* v. 1, p. 466-469. 1981.

ZHAO, J. P.; WANG, H. T.; ZENG, X. N.; XUE, P. P. Differences in preference selection behaviors and chemical cues of adult Asian citrus psyllids, *Diaphorina citri*, on healthy and *huanglongbing*-infected young shoots of citrus plants. **Journal of Agricultural Science**, v. 5, n. 9, p. 83, 2013.