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

**Estudo de fungos entomopatogênicos para o controle de ninfas do psílídeo
Diaphorina citri Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae)**

Luiz Fernando Leal Padulla

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

**Piracicaba
2007**

Luiz Fernando Leal Padulla
Biólogo

**Estudo de fungos entomopatogênicos para o controle de ninfas do psíldeo *Diaphorina citri*
Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae)**

Orientador:
Prof. Dr. **SÉRGIO BATISTA ALVES**

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

**Piracicaba
2007**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Padulla, Luiz Fernando Leal

Estudo de fungos entomopatogênicos para o controle de ninfas do psilídeo *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) / Luiz Fernando Leal Padulla. - - Piracicaba, 2007.
91 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2007.
Bibliografia.

1. Controle biológico (Fitossanidade) 2. Fungos entomopatogênicos 3. Insetos nocivos
I. Título

CDD 632.7

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

DEDICATÓRIA

Dedico primeiramente à DEUS.

Aos meus maravilhosos e exemplares pais, Adalberto e Silvia Helena, que, com muito amor, paciência e força de vontade, me educaram e me ensiaram a nunca desistir.

A minha esposa e companheira, Tathiana Lisboa Padulla, pela compreensão, carinho, amparo e por todo amor,

Às minhas irmãs, cunhados e cunhada, por tudo e mais um pouco!

A todos meus familiares, avós, sogros, tios, sobrinha, ou seja, a todos aqueles que não me escolheram, mas que tiveram que me suportar e me agüentaram da melhor e mais paciente maneira, muitíssimo obrigado!

Aos meus sogros, Neto e Lurdinha, pelo apoio, alegrias e motivação,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por tudo o que fez, pelo que faz e por tudo que está providenciando em minha vida.

Agradecimento especial aos meus pais, que em todos os momentos de minha vida, mostraram o verdadeiro significado do amor, estando presentes e me apoiando em toda e qualquer situação. Sem eles, jamais seria ou estaria onde estou.

À minha esposa Tathiana, não por fazer parte de minha vida apenas, mas por ser parte dela, sempre me suportando, me apoiando, sendo paciente em todos os momentos. Mais uma vez agradeço à DEUS por colocá-la em meu caminho. Piolhinha, meu muito obrigado!

As minhas fantásticas irmãs Andréa Regina e Patrícia Cristina, aos meus cunhados e cunhada, e a minha sobrinha Aline, que sempre me apoiaram e proporcionaram momentos de alegria e descontração,

Aos meus queridos avós, Rubens e Leonilda, e tia-avó Dorothy, que incentivaram e jamais me deixaram desistir,

Aos meus avós José (*in memorian*) e Laura (*in memorian*), que onde estão, sempre estiveram ao meu lado,

Ao Prof. Dr. Sérgio Batista Alves, pela confiança, orientação, apoio, amizade e atenção durante esta jornada,

Aos amigos: Juan, Rogério (Fito), Giuliano (Kutuk), Raquel, Gabriel (Goma), Luciana. Aos ex-colegas de laboratório Daniella Macedo, Marcelo (Circo), Daniela (Náufraga), Jean Patrick, Ricardo Polanczyk, Tatiele, Raquel Arouca, Marcel Tanzini, Elizabeth Quisberth-Ramos,

Em especial, à Solange, por todo auxílio prestado, sempre com muito carinho, competência e dedicação,

À dona Mariana e todas as outras colegas que sempre mantêm em ordem nosso ambiente de trabalho,

Aos demais colegas, funcionários do Departamento e à bibliotecária Silvia,

Aos professores do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, pelos ensinamentos transmitidos,

À CAPES, Fundecitrus e FAPESP pelo apoio financeiro,

A todos meus amigos que sempre me apoiaram e me acolheram,

E às não menos importantes figuras de minha vida, Negrita, Nina e Belinha, que mesmo não falando, transmitiram sempre muito amor e companheirismo por toda essa jornada.

“Tudo o que sei é que nada sei!”

Sócrates

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT	10
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	14
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 Características gerais e bioecologia de <i>Diaphorina citri</i>	17
2.1.1 Morfologia.....	17
2.1.2 Comportamento e desenvolvimento.....	18
2.1.2.1 Hospedeiros.....	18
2.1.2.2 Ovos.....	18
2.1.2.3 Ninfas.....	19
2.1.2.4 Adultos.....	20
2.1.3 Distribuição.....	22
2.2 Danos.....	24
2.2.1 “Greening”	24
2.2.2 Transmissão da doença.....	29
2.3 Controle.....	31
2.3.1 Controle convencional.....	31
2.3.2. Controle biológico.....	32
2.3.2.1. Parasitóides e predadores.....	32
2.3.2.2 Fungos entomopatogênicos.....	33
2.3.2.2.1 <i>Beauveria bassiana</i>	35
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	38
3.1 Criação e manutenção de <i>Diaphorina citri</i>	38
3.2 Preparo do material dos bioensaios.....	38
3.3 Seleção dos isolados para o controle de <i>Diaphorina citri</i>	41
3.4 Determinação da Concentração Letal Média (CL ₅₀) do isolado selecionado.....	42
3.5 Estudo do ciclo biológico do entomopatógeno em <i>Diaphorina citri</i>	43

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
4.1 Seleção do isolado.....	45
4.2 Determinação da Concentração Letal Média (CL ₅₀) para <i>Beauveria bassiana</i>	47
4.3 Estudo do ciclo biológico de <i>Beauveria bassiana</i> (Esalq-PL63) em ninfas de <i>Diaphorina citri</i>	49
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	75
REFERÊNCIAS.....	76

RESUMO

Estudo de fungos entomopatogênicos para o controle de ninfas do psílídeo *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae)

Avaliou-se a patogenicidade de diversas espécies de fungos entomopatogênicos a ninfas de 2^o a 4^o ínstar do psílídeo *Diaphorina citri*. Assim foram feitos bioensaios com *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Lecanicillium muscarum*, *L. longisporum*, *Paecilomyces fumosoroseus*, *P. farinosus*, *Syngliocladium* sp. na concentração de 5×10^7 conídios/mL para cada patógeno, com exceção de *Hirsutella thompsonii* que foi aplicado na concentração de $2,8 \times 10^7$ conídios/mL. Utilizou-se mudas de murta, *Murraya paniculata*, infestadas com ninfas do inseto que foram pulverizadas com as suspensões conidiais. Os fungos *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *H. thompsonii*, *L. muscarum* e *P. fumosorosus* foram patogênicos para as ninfas do psílídeo. O isolado mais promissor foi o Esalq-PL63, de *B. bassiana*, que causou mortalidade de aproximadamente 72% das ninfas, sete dias após a inoculação. Esse fungo também afetou o processo de metamorfose das ninfas. A concentração letal média (CL₅₀) foi calculada em $2,3 \times 10^7$ conídios/mL. O ciclo de infecção de *B. bassiana* sobre as ninfas do psílídeo foi estudado pulverizando-se a suspensão de 3×10^8 conídios/mL do fungo e, em seguida, observado em microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura, nos intervalos de tempo de 0, 24, 48, 72 e 168 horas após a inoculação. Constatou-se que o referido patógeno não conseguiu completar o desenvolvimento no corpo do hospedeiro, uma vez que a fase de conidiogênese é inibida, provavelmente, pela presença no interior do inseto de bactérias antagônicas ao seu desenvolvimento. O isolado Esalq-PL63 é um promissor agente de controle microbiano de ninfas de *D. citri* por afetar sua fisiologia e causar em altos índices de mortalidade.

Palavras-chave: Fungos entomopatogênicos; Psílídeo; *Beauveria bassiana*

ABSTRACT

Study of entomopathogenic fungi for the control of of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) nymphs

It was evaluated the patogenicity of several species of entomopathogenic fungi against 2nd to 4th instar of *Diaphorina citri*. For the bioassays with *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Lecanicillium muscarum*, *L. longisporum*, *Paecilomyces fumosoroseus*, *P. farinosus*, *Syngliocladium* sp. a concentration of 5×10^7 conidia.mL⁻¹ was used. For the *Hirsutella thompsonii* strain the concentration used was 2.8×10^7 conidia.mL⁻¹. Seedlings of orange jasmine, *Murraya paniculata*, infested with nymphs of the insect were sprayed with the conidia suspensions. The fungi *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *H. thompsonii*, *L. longisporum* and *P. fumosoroseus* were pathogenic to nymphs. The strain of *B. bassiana* (Esalq-PL63) was the most pathogenic causing 72% mortality after seven days of inoculation. This fungus also affected the process of nymph molting. The letal concentration (LC₅₀) calculated was 2.3×10^7 conidia.mL⁻¹. To prove mortality the pathogen was reisolated in media culture (AN, MC and BDA) and besides, observed under microscope examination. The infection cycle of *B. bassiana* in nymphs was studied after inoculation of 3×10^8 conidia.mL⁻¹. This process were evaluated with the use of a light microscope and an electron scan microscope, after 0, 24, 48, 72 and 168 hours of conidia sprayed. This strain did not complete the development in the host because the conidiogenesis was inhibited, probably because it was found antagonistic bacteria into the host. However, this isolate is a potencial microbial control agent of nymphs of *D. citri*, affecting its physiology and causing high mortality.

Key words: Entomopathogenic fungi; Psyllid; *Beauveria bassiana*

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Mortalidade média ($\pm$ EPM) das ninfas de *Diaphorina citri* causada por diferentes concentrações de conídios do isolado Esalq-PL63 de *Beauveria bassiana* após 7 dias da aplicação. Probit transformado ($\overline{x}$) em porcentagem de mortalidade.....47
- Figura 2 - Porcentagem de mortalidade acumulada de ninfas de *Diaphorina citri* infectadas pelo isolado Esalq-PL63, durante os 7 dias de avaliação.....49
- Figura 3 - Ninfas infectadas após 24 (A) e 48 horas (B), apresentando aspecto aparentemente normal.....50
- Figura 4 - Ninfas infectadas após 72 horas (A) e 96 horas (B), apresentando coloração róseo-avermelhada em função da colonização e produção de oosporina por *Beauveria bassiana*.....50
- Figura 5 - Ninfas com arqueamento dos corpos, após 96 horas, no sentido ventro-dorsal, semelhante a dessecação. Note em A ninfa sadia (S) comparada a ninfa infectada (I).....51
- Figura 6 - Ninfa infectada apresentando corpos hifais e micélio de *Beauveria bassiana* em seu interior (após 96 horas).....52
- Figura 7 - Corpos hifais e micélios de *Beauveria bassiana* presentes em ninfa de *Diaphorina citri* após 120 horas de inoculação.....52
- Figura 8 - Corpos hifais e micélios de *Beauveria bassiana* presentes em ninfa de *Diaphorina citri* após 144 horas de inoculação.....53

Figura 9 - Corpos hifais e micélio de <i>Beauveria bassiana</i> presentes em ninfa de <i>Diaphorina citri</i> após 168 horas de inoculação.....	53
Figura 10a - Adesão dos conídios de <i>Beauveria bassiana</i> (Esalq-PL63) sobre a perna da ninfa de <i>Diaphorina citri</i> (0h).....	55
Figura 10b - Adesão dos conídios de <i>Beauveria bassiana</i> (Esalq-PL63) sobre o tórax da ninfa de <i>Diaphorina citri</i> (0h).....	56
Figura 10c - Detalhe da adesão dos conídios de <i>Beauveria bassiana</i> (Esalq-PL63) sobre o abdome da ninfa de <i>Diaphorina citri</i> (0h).....	56
Figura 11 - Fases do processo incompleto de infecção e colonização de <i>Beauveria bassiana</i> em ninfas de <i>Diaphorina citri</i>	58
Figura 12a - Distribuição dos conídios de <i>Beauveria bassiana</i> (Esalq-PL63) no tegumento do abdome da ninfa de <i>Diaphorina citri</i> (48 h).....	59
Figura 12b - Penetração de <i>Beauveria bassiana</i> (Esalq-PL63) pelos orifícios do tegumento do abdome da ninfa de <i>Diaphorina citri</i> (48 h).....	59
Figura 12c - Penetração de <i>Beauveria bassiana</i> (Esalq-PL63) nos orifícios distais do tegumento do abdome da ninfa de <i>Diaphorina citri</i> (48 h).....	60
Figura 13a - Penetração de <i>Beauveria bassiana</i> (Esalq-PL63) na perna de ninfa de <i>Diaphorina citri</i> (72 h).....	60
Figura 13b - Penetração de <i>Beauveria bassiana</i> (Esalq-PL63) no tórax de ninfa de <i>Diaphorina citri</i> (72 h).....	61

Figura 13c – Detalhe do conídio de <i>Beauveria bassiana</i> (Esalq-PL63) no tórax de ninfa de <i>Diaphorina citri</i> (72 h).....	61
Figura 13d - Penetração de <i>Beauveria bassiana</i> (Esalq-PL63) na parte distal do abdome de ninfa de <i>Diaphorina citri</i> (72h).....	62
Figura 13e - Detalhe de conídios de <i>Beauveria bassiana</i> (Esalq-PL63) em processo de germinação no tórax de ninfa de <i>Diaphorina citri</i> (72h).....	62
Figura 14 - Ninfas mortas de <i>Diaphorina citri</i> infectadas por <i>Beauveria bassiana</i> (Esalq-PL63) durante processo de ecdise.....	70
Figura 15 - Reisolamento do fungo <i>Beauveria bassiana</i> em meio de cultura MC, AN e BDA, respectivamente.....	71
Figura 16a - Bactérias presentes nas amostras de ninfas de <i>Diaphorina citri</i> tratadas, maceradas e estriadas em meio de cultura MC. Em B, detalhe das colônias.....	71
Figura 16b - Bactérias presentes nas amostras de ninfas sadias, maceradas e estriadas em meio de cultura AN. Em B, detalhe das colônias.....	72
Figura 17 - Bactérias Gram negativas isoladas de ninfas de <i>Diaphorina citri</i>	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Isolados do Banco de Patógenos do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos utilizados nos testes.....	39
Tabela 2 - Porcentagem média de mortalidade total, corrigida (%MC) e esporulação das ninfas tratadas com os fungos entomopatogênicos.....	45
Tabela 3 - Valores da concentração letal média (CL ₅₀) do isolado Esalq-PL63 de <i>Beauveria bassiana</i> sobre ninfas de <i>Diaphorina citri</i>	48

1 INTRODUÇÃO

O Brasil, impulsionado pelo crescimento das exportações e pelo desenvolvimento da indústria citrícola, é atualmente o maior produtor mundial de laranjas, com 17.731,7 mil toneladas. Em 2005 o Estado de São Paulo foi responsável por 80% da produção nacional, obtida em área cultivada de 580,4 mil hectares, ou seja, uma área correspondente a 72% de toda produção citrícola nacional (INSTITUTO FNP, 2006). São cerca de 300 as pragas e doenças que atingem os citros, com destaque ao ácaro-da-leprose (*Brevipalpus phoenicis*), ácaro-da-ferrugem (*Phyllocoptruta oleivora*), larva-minadora-dos-citros (*Phyllocnistis citrella*), cigarrinhas da CVC, ortézia (*Orthezia praelonga*), bicho-furão (*Ecdytolopha aurantiana*), entre outros (USP/PENSA, 2004).

Nos últimos 60 anos, o uso constante de agrotóxicos vem causando diversos problemas, destacando-se a resistência dos artrópodos, que tem exigido um aumento na frequência das aplicações desses produtos. Concomitantemente, há o problema de contaminação dos recursos hídricos, do solo e de todo o ambiente, envolvendo os microrganismos e inimigos naturais presentes no agroecossistema.

Outro fato que chama a atenção é o alto custo financeiro dos tratamentos fitossanitários, que consomem 20% do custo total da produção (INSTITUTO FNP, 2006). O custo com agrotóxicos na citricultura paulista foi de aproximadamente R\$ 1.100,00 por hectare em 2004 (GHILARDI et al., 2004). Em 2005, só para o controle de cigarrinhas da CVC e do psíldeo transmissor do “greening”, o custo calculado foi de US\$ 0,23/caixa. Levando-se em consideração que em 2006 o Brasil produziu aproximadamente 435 milhões de caixas, pode-se estimar um gasto de 100 milhões de dólares apenas com esses dois insetos.

O emprego dos inimigos naturais das pragas vem crescendo em todos os países em virtude da procura por produtos isentos de resíduos de agrotóxicos e pela menor poluição ambiental que esses agentes provocam. Para uma melhor adequação desse método de controle biológico, há necessidade de alterações no método convencional de controle das pragas que é feito, basicamente, pela aplicação de agrotóxicos não-seletivos.

Recentemente, o interesse de pesquisadores e citricultores têm-se voltado ao psílídeo vetor do “greening”, doença causada por uma bactéria que é restrita ao floema e é transmitida pelos insetos *Trioza erytreae* e *Diaphorina citri*, sendo que o primeiro está associado à forma africana da doença e o segundo à forma asiática (CAPPOR; RAO; VISWANATH, 1967). No Brasil, a ocorrência de *D. citri* é preocupante por sua rápida disseminação nos pomares (FERNANDES, 2004). No Estado de São Paulo, de 2004 até 2006, foram erradicadas mais de 600 mil árvores de citros em decorrência desta doença (FUNDECITRUS, 2006).

As pesquisas de processos de controle que visam a maior sustentabilidade dos citros na área fitossanitária deve ser um objetivo constante dos pesquisadores.

Assim, esta pesquisa visou estudar a suscetibilidade deste psílídeo à diferentes espécies de fungos entomopatogênicos, com o objetivo de selecionar um isolado de alta patogenicidade, para possível emprego no controle do inseto.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Características gerais e bioecologia de *Diaphorina citri*

2.1.1 Morfologia

Diaphorina citri (= *Euphalarus citri* (Kuwayama 1908)) foi descrita ocorrendo em citros em Shinchiku, Taiwan em 1907. Há seis outras espécies de *Diaphorina* relatadas em citros e outras plantas: *D. amoena*, *D. auberti*, *D. communis*, *D. murrayi*, *D. punctulata* e *D. zebrana*. Além dessas, há sete psílídeos relacionados a cultura de citros: *Mesohomotoma lutheri*, *Psylla citricola*, *P. citrisuga*, *P. murrayi*, *Trioza citroimpura*, *T. erytraea* e *T. litseae* (HALBERT; MANJUNATH, 2004).

O psílídeo *D. citri* pertence à superfamília Psylloidea, família Psyllidae, que reúne mais de 1.500 espécies. São insetos sugadores dos vasos condutores das plantas, com pernas metatorácicas modificadas para saltar. Os adultos medem de 2 a 4 mm (AUBERT, 1987; GALLO et al., 2002), sendo que Tsai e Liu (2000) registraram fêmeas de 3,3 x 1mm, e machos de 2,7 x 0,8mm. Outros registros relatam que somente o corpo dos machos pode variar de 1,53 a 1,66 cm, enquanto que o das fêmeas mede entre 1,90 e 2,06 cm; por sua vez a antena mede 0,48 cm (OEPP/EPPO, 2005). Possuem o corpo manchado de marrom, cabeça marrom claro, asa dianteira alargada da metade até o ápice, antena com ápice preto e com duas pequenas manchas marrom claro no meio dos segmentos, além de apresentarem secreção cerosa sob a forma de um pó. Quando parados, apresentam a disposição de 45° em relação ao substrato que se encontram (Mead, 2002).

Os ovos medem cerca de 0,31mm de altura e 0,14mm de largura (TSAI; LIU, 2000). São alongados, engrossados na base, cônicos na parte distal e, assim que ovipositados, são de coloração pálida tornando-se amarelo-alaranjados com o tempo. A postura é feita verticalmente na superfície das folhas e/ou brotos (MEAD, 2002).

As ninfas passam por 5 ínstar, sendo que no primeiro ínstar apresentam coloração amarelo claro, tornando-se mais escuras posteriormente. Nesse mesmo ínstar, medem 0,3mm de comprimento por 0,17mm de largura. As de segundo ínstar

apresentam dimensões de 0,45 x 0,25mm, as de terceiro 0,74 x 0,43 mm, as de quarto ínstar 1,01 x 0,7mm. O quinto e último ínstar pode alcançar medidas de 1,6 x 1,02 mm.

2.1.2 Comportamento e desenvolvimento

2.1.2.1 Hospedeiros

Apesar de ser considerada uma praga de citros, sua ocorrência em murta (*Murraya paniculata*) foi descrita pela primeira vez em 1975, por Cheema e Kapur. Outras plantas da família das rutáceas são tidas como hospedeiras desse inseto, tais como *Murraya keonegii*, *Antocarpus heterophyllus*, *Aegle marmelos*, *Afraegle gabonensis*, *A. paniculata*, *Atalantia* sp., *Citropsis gilletiana*, *C. schweinfurthii*, *Clausena anisum-olens*, *C. excavata*, *Eremocitrus glauca*, *E. hybrid*, *Merrillia caloxylon*, *Microcitrus australis*, *M. papuana*, *Microcitronella* sp., *Naringi crenulata*, *Pamburus missionis*, *Toddalia asiatica*, *Vepris lanceolata*, *Zanthoxylum fagara* e *Calodendrum capense*.

O número de plantas hospedeiras desse psíldeo é motivo de controvérsia entre os estudiosos. Halbert e Manjunath (2004) apresentam em seu trabalho mais de 50 espécies hospedeiras, enquanto que He (2006 apud YANG et al., 2006) calcula em 27. Shivankar et al (2000) relata *Artocarpus heterophyllus* como hospedeira de *D. citri*, enquanto que Peña et al. (2006), diz o contrário.

2.1.2.2 Ovos

O número de posturas totais das fêmeas também é bastante discutido. Para Huang (1990 apud YANG et al., 2006), esse valor é de 1900 ovos, com média entre 630 e 1230 ovos; já Tsai e Liu (2000) calculam em 800 ovos. Para esses autores, o número de ovos por fêmea aumentou com o aumento da temperatura, alcançando o máximo de 748 ovos a 28°C. O período de incubação dos ovos também variou de 3,5; 4,2 e 9,7 dias a 28°C, 25°C e 15°C, respectivamente. A postura também é influenciada pelas plantas hospedeiras. Para *C. jambhiri* o número de ovos por fêmea e o número máximo de posturas foi de 572 e 818, respectivamente. Para *C. aurantium*, *M. paniculata* e *C. paradisi*, esses valores foram de 613 e 830, 626 e 994, 858 e 1378, respectivamente.

Outros fatores importantes na determinação das posturas são a temperatura, umidade relativa e fotoperíodo. Skelley e Hoy (2004) relataram que as fêmeas, quando expostas a 34°C por 5 dias, param de ovipositar, voltando aos poucos, conforme a temperatura chegava próximo a 25°C. Sob 40% de umidade relativa a postura também era mínima. Para máxima postura o fotoperíodo recomendado é de 18:6 horas (YUBIN, 1989). Yang (1989 apud YANG et al., 2006) relatou que a intensidade e duração da luminosidade afeta significativamente o período de pré-oviposição e postura dos ovos. Quando a luminosidade era abaixo de 18 horas por dia, o número de posturas aumentava. Já o período de pré-oviposição e mortalidade das fêmeas diminuía com o aumento na intensidade luminosa. Esse efeito foi atribuído a influência que a luz tem sobre a alimentação do adulto e assim, no desenvolvimento ovariano das fêmeas.

2.1.2.3 Ninfas

As ninfas são praticamente imóveis, ficando grande parte do tempo agregadas e se alimentam na superfície das folhas, parte terminal do pecíolo e entre a gema axilar e os brotos novos (TSAI; LIU, 2000). Quando perturbadas podem se deslocar mais rapidamente. Ao se agruparem, o acúmulo da secreção adocicada (honeydew) liberada na porção terminal do abdome pode favorecer o crescimento de fungos oportunistas, formando a fumagina (MEAD, 2002).

A variação dos ínstares das ninfas está entre 16 e 18 dias em épocas quentes e até 45 dias em épocas mais frias. Não há diapausa (AUBERT, 1987).

Trabalho de Tsai e Liu (2000) relata variação no tempo de desenvolvimento das ninfas do psílídeo em diferentes hospederos. Em *Citrus paradisi* o tempo foi de 12,6 dias, enquanto que em *M. paniculata*, *C. aurantium* e *C. jambhiri* foi de 12,8; 13,1 e 13,5; respectivamente. Os mesmos autores constataram que o tempo de desenvolvimento de ovo a adulto também variou conforme o hospedeiro, sendo de 16,8; 16,9; 17,3 e 17,6 dias em *C. paradisi*, *M. paniculata*, *C. aurantium* e *C. jambhiri*, respectivamente.

Liu e Tsai (2000) descreveram a influência da temperatura na taxa de desenvolvimento, sobrevivência, reprodução e longevidade do psílídeo. No desenvolvimento das ninfas, houve uma variação de 10,6 dias a 28°C, até 39,6 dias a

15°C. Acima de 28°C, houve um declínio do desenvolvimento. Na Índia, a população de *D. citri* encontrada nos meses de outubro a janeiro foi menor do que no período de fevereiro a abril, coincidindo esse aumento com o surgimento de novos brotos (DAS; SHIVANKAR; SINGH, 2002). Yang (1989 apud YANG et al., 2006) constatou altas taxas de mortalidade de ninfas sob altas temperaturas e umidade.

Trabalho de Nakata (2006), avaliando a influência da temperatura sobre os estádios de *D. citri* em *Murraya paniculata*, mostrou que entre 15 e 32,5°C, as ninfas crescem mais rapidamente em temperaturas mais altas, exceto à 32,5°C. O 5º ínstar foi o que exigiu maior tempo de desenvolvimento comparado aos demais. O aumento da temperatura diminuiu o tempo de incubação dos ovos, porém, no desenvolvimento das ninfas, e do período de ovo até a emergência dos adultos, essa redução ocorreu apenas até 30°C, uma vez que a 32,5°C o período de duração foi maior. Nessa mesma temperatura foi observado efeito negativo também sobre as ninfas de 3º, 4º e 5º ínstar, com taxas de mortalidade de 26,7; 43,3 e 83,3%, respectivamente. A 15°C as ninfas apresentaram mortalidade total no 5º ínstar, sendo que todas sobreviveram até o 4º ínstar.

2.1.2.4 Adultos

Mudas novas com brotações estimulam a oviposição, com a postura das fêmeas a 2 cm do ápice das folhas, pecíolos ou gemas (Tsai & Liu, 2000). Adultos avaliados em *Murraya paniculata* ocuparam 95% dos brotos, ovipositando por 2-4 dias e gerando de 25 a 100 ninfas por broto (SKELLEY; HOY, 2004). Yasuda; Kawamura e Oishi (2005) demonstram que adultos de *D. citri* se encontram dispersos em todas as partes de mudas de *Citrus depressa* e *Murraya exotica*, porém, os ovos e as ninfas dos mesmos se concentram nas brotações, da parte apical. Tsai et al. (1984 apud YANG et al., 2006) encontraram maior incidência de adultos na nervura central das folhas (43%), seguida dos pecíolos (31%), borda foliar (24%) e talo (<2%).

O comportamento dos adultos varia conforme sua idade e a temperatura. Os recém-emergidos não voam ou caem rapidamente quando as folhas são tocadas, ficando concentrados na parte abaxial das folhas. As fases reprodutivas e maduras caracterizam-se por um comportamento dispersivo, saltando e voando pequenas

distâncias. No inverno os movimentos tornam-se mais lentos, com a tendência dos insetos a se agruparem na superfície adaxial das folhas. Adultos ficam inativos abaixo de 8°C, retomando as atividades por volta de 11°C, de acordo com Wu (1980) e Xie et al. (1989 apud YANG et al., 2006). Os movimentos tornam-se mais rápidos, com saltos enérgicos por parte dos adultos, quando a temperatura atinge entre 24 e 29°C. Em campo aberto, relata-se um deslocamento de aproximadamente 2.400 metros – ou 1,5 milhas (KOIZUMI et al., 1997). As fêmeas prestes a ovipositarem não voam e ficam refugiadas nas brotações (SKELLEY; HOY, 2004).

Apesar da preferência por brotações, quando submetidas à árvores mais velhas, os psílídeos acabam por se alimentar de folhas ou ramos maduros. Os adultos podem viver por 80-90 dias quando há alimento disponível (AUBERT, 1987).

As maiores longevidades de fêmeas observadas por Tsai e Liu (2000) foram de 54, 54, 60 e 66 dias em *C. paradisi*, *M. paniculata*, *C. aurantium* e *C. jambhiri*, respectivamente, sendo que a média ficou entre 39,6 e 47,5 dias. Para Liu e Tsai (2000), a longevidade das fêmeas foi de 88.3 dias a 15°C, sendo que os maiores valores foram de 117, 60, 56, 52 e 51 dias para 15°C, 20°C, 25°C, 28°C e 30°C, respectivamente. Para Yang et al. (2006), no inverno os adultos podem sobreviver muito mais, por cerca de 8 a 9 meses. Ma e Wang (2001 apud YANG et al., 2006) correlacionaram os fatores postura de ovos e longevidade, indicando que fêmeas que ovipositavam todos seus ovos em curto tempo após sua emergência, viviam menos do que as que demoravam mais tempo.

Podem ocorrer de 9 a 10 gerações ao ano, dependendo da temperatura. A duração entre gerações é de 53 a 59 dias na primavera, 18 a 22 dias no verão e de 25 a 30 dias no outono (XU; XIA; KE, 1994). Na região norte de Taiwan o número de gerações foi de 8 a 9, enquanto que na região sul foi de até 10 (LIN; KE; TAO, 1973). Xu; Xi e Ke (1994) constataram que na província de Guangdong, na China, esse número variou de 11 a 14. Em Fujian, as gerações em citros foram de 6 a 7, e em *M. paniculata*, de 9 a 11.

Nakata (2006) constatou que para ovos a exigência graus-dia foi de 46,93 enquanto que para ninfas foi de 192,27 e de ovo a adulto, atingiu 232,26. Valores muito

próximos aos obtidos por Liu e Tsai (2000), para as respectivas fases, 67,50; 185,19 e 249,88 graus-dia.

Yang (1989 apud YANG et al., 2006) concluiu que altas temperaturas e alta umidade tem impacto negativo significativo em populações de *D. citri*, ao contrário do que acontece com o psílideo *T. erytrae* que é afetado quando se tem altas temperaturas associadas a baixa umidade. Segundo Regmi e Lama (1988), altas populações foram encontradas próximo à primavera e verão com clima quente e seco, decaindo conforme ocorriam as chuvas. *D. citri* também é resistente à baixas temperaturas por curto período de tempo. Em 24 horas, 45% dos insetos sobrevivem à -3°C, enquanto que 39% à -5°C (XIA; XU; CHEN, 1987). Experimento de Ashirara (2004) mostrou que apenas 4% da população de *D. citri* sobrevive a -3,3°C em *M. paniculata* e 6% em *C. unshiu*. A temperatura é letal para ninfas e adultos quando expostos, por uma hora, a -3°C e -10°C, respectivamente. Insetos expostos a -8°C por 6 dias apresentam mortalidade de 91%, enquanto que a -10° por 3 e 5 dias, esse valor é de 55 e 89%, respectivamente.

2.1.3 Distribuição

Diaphorina citri foi relatada pela primeira vez no Brasil por Costa Lima (1942) e posteriormente, por Catling (1970). Preferencialmente, *D. citri* ocupa regiões tropicais e subtropicais da Ásia, como China, Índia, Myanma, Taiwan, Filipinas, Malásia, Indonésia, Sri Lanka, Paquistão, Tailândia, Nepal, Hong Kong, Ilhas Ryukyu, Afeganistão, Arábia Saudita, Ilhas Maurício, Ilhas Reunião (WOOLER; PADGHAM; ARAFAT, 1974).

No Brasil, apesar de ter sido relatado há mais de 60 anos, a ocorrência e distribuição desse inseto está sendo melhor estudada somente agora, devido a real importância na produção citrícola. Dados preliminares da Fundecitrus (2006), apontam 103 municípios registrados com ocorrência do psílideo e da doença (todos em São Paulo, e apenas um em Minas Gerais).

Cermeli, Morales e Godoy (2000) descreveram a ocorrência de *D. citri* pela primeira vez na Venezuela em 1999. Etienne; Burckhard e Grapin (1998) descreveram o vetor também em Honduras, Uruguai e México. De acordo com Halbert e Núñez (2004), em 1997 o psílideo foi encontrado na Argentina, em 1998 na Flórida (EUA) e em

1999 em duas ilhas das Bahamas. Em 2000 foi encontrado nas Ilhas Caimã, em 2001 na República Dominicana e Cuba, em 2002 em Porto Rico e México, e na Jamaica sua ocorrência foi notada em 2003.

D. citri é ausente em pomares acima de 1700 a 1800m de altitude, onde geralmente ocorrem geadas. Temperaturas muito elevadas também impedem o desenvolvimento do inseto (AUBERT, 1987). Para Yang et al. (2006) a topografia, em especial as grandes altitudes, tem uma maior influência na distribuição populacional do inseto. O mesmo acontecendo para fatores ambientais como a temperatura, que limita essa distribuição. Para Xie et al. (1988 apud YANG et al., 2006) as médias de temperatura dos meses mais frios e a duração desses períodos são fatores críticos para a distribuição de *D. citri*.

De acordo com Bové e Aubert (1984), em Medina, Arábia Saudita, não foram encontrados esses insetos, uma vez que as temperaturas máximas chegam de 47 a 48°C no verão e 6 a 7°C no inverno. A altitude máxima onde foi encontrado o psíldeo foi de 1350m no Nepal, 1100m em Java e 650m nas Ilhas Reunião. Na China, por exemplo, com o aquecimento das épocas frias do ano, as plantas hospedeiras são capazes de produzir mais brotações, favorecendo o desenvolvimento e o aumento do número de gerações anuais dos psíldeos em algumas regiões, além de possibilitar a ocorrência dos mesmos em locais antes inóspitos (WANG et al., 2001 apud YANG et al., 2006).

Comparado ao outro psíldeo, *Trioza erytreae*, *D. citri* é mais resistente à temperaturas extremas e mais sensível à altas umidades e precipitações (CATLING, 1972; AUBERT, 1987). Onde há a ocorrência desses dois vetores, *D. citri* e *T. erytreae*, é clara a distribuição dos mesmos em função da região. Nas Ilhas Maurício e Reunião, *T. erytreae* ocorre acima de 500m, enquanto que *D. citri* ocorre abaixo de 400m onde o clima é mais quente. Igualmente ocorre na Arábia Saudita, onde *D. citri* está presente em regiões citrícolas mais baixas (CATLING, 1973).

No Brasil, Yamamoto; Paiva e Gravena (2001) demonstraram que há uma variação significativa na dinâmica populacional de *D. citri* em pomares na região norte do Estado de São Paulo, uma vez que a densidade mais alta ocorre no final da primavera e começo do verão, enquanto que durante o outono e inverno a população

foi reduzida. Essa oscilação provavelmente está relacionada ao regime de chuvas e, conseqüentemente, ao surgimento de novas brotações no pomar de citros.

2.2 Danos

As ninfas e adultos têm importância direta por injetarem toxinas ao se alimentarem, as quais causam distorções consideráveis nas folhas e brotações, freqüentemente causando abatimento das porções terminais e abscisão das folhas e dos brotos (MEAD, 1976). Em relação aos danos indiretos, tem-se a secreção do “honeydew” por parte das ninfas, sobre o qual crescem fungos oportunistas, ocasionando a fumagina que afeta o processo fotossintético da planta hospedeira. Porém, o dano de maior expressividade causado por esse inseto é justamente por ser o vetor da bactéria do greening, doença que preocupa todo o ramo da citricultura brasileira e mundial.

2.2.1 “Greening”

Huanglongbing, nome oficial do “greening”, é uma doença severa do citros, causada pela bactéria do gênero *Candidatus Liberibacter*, restrita ao floema das árvores, possuindo dois hospedeiros nos quais ela se multiplica: a planta e o inseto vetor (BOVÉ; GARNIER, 2002; GARNIER et al., 2000). De acordo com Bové e Garnier (2002), essas bactérias são patogênicas às plantas, e causam poucos danos aos inseto hospedeiros (*D. citri* e *T. erytrae*), nos quais elas mostram-se semelhantes a bactérias simbióticas aos mesmos. Essa identificação do inseto como vetor da doença ocorreu nas Filipinas por Salibe e Cortez (1966). Hoje sabe-se que o greening é transmitido por duas espécies de psíleos, *T. erytrae* (Del Guercio) e *D. citri* (Kuwayama) (AUBERT, 1987).

Atualmente são conhecidas três raças de bactérias causadoras do greening: asiática (*Candidatus Liberibacter asiaticus*), africana (*Candidatus Liberibacter africanus*) e americana (*Candidatus Liberibacter americanus*), ocorrendo respectivamente na Ásia, África e América, sendo a última descoberta recentemente, não possuindo, assim,

estudos mais detalhados (JAGOUeix; BOVÉ; GARNIER, 1994; TEIXEIRA et al., 2005; FUNDECITRUS, 2005).

Segundo os autores Jagoueix; Bové e Garnier (1994) e Teixeira et al. (2005), *Ca. L. asiaticus* e *Ca. L. americanus* são tolerantes ao calor e transmitidas pelo psílídeo *D. citri*, enquanto que *Ca. L. africanus* é sensível ao calor e transmitida pelo *Trioza erytreae*. Teixeira et al. (2005) relataram que a raça '*Candidatus Liberibacter americanus*' provavelmente tem origem na América, podendo ser disseminada dentro do continente por *D. citri*, sendo assim, considerada um agente mais perigoso à citricultura do que as raças asiática e africana.

A classificação como *Candidatus* para essas bactérias segue as regras estabelecidas para organismos não cultiváveis em meio de cultura, de acordo com Murray e Schleifer (1994). Assim, se o termo *Candidatus* é usado, os atuais gêneros e espécies não são colocados em itálico, de acordo com o International Code of Nomenclature of Bactéria (HALBERT; MANJUNATH, 2004). O nome genérico de *Liberobacter* para *Liberibacter* foi alterado por Garnier et al. (2000) seguindo o mesmo código de nomenclatura.

A bactéria causadora do Huanglongbing pertence a subdivisão α de *Proteobacteria*, cuja característica principal consiste em ser um organismo que vive intimamente associado às células eucarióticas e, em muitos casos, adquirem a habilidade de sobreviver e crescer dentro de artrópodes hospedeiros, além do floema das plantas hospedeiras (BOVÉ; GARNIER, 2003).

Antes de ser identificada como uma doença, o "greening" era conhecido por diversos nomes, como "yellow shoot (huanglungbin)" na China, "likubin" em Taiwan, "dieback" na Índia, "leaf mottle" nas Filipinas, "vein phloem degeneration" na Indonésia, e "yellow branch", "blotchy-mottle" ou "greening" na África do Sul. Embora existam registros do século XVIII sobre a doença, pouco se pode afirmar sobre a real manifestação do greening nesse período devido a falta de informações, muitas vezes confundidas com a deficiência de zinco, falta de drenagem, doenças ocasionadas por nematóides, toxidade mineral do solo, entre outros fatores (GRAÇA, 1991).

Os danos nas árvores de citros são variáveis. Podem atingir e manifestar apenas em alguns locais causando pequenos danos; em outros casos pode atacar a planta

inteira, ocasionando a perda total da produção, inclusive com a morte da planta. Os sintomas nas folhas podem ser de dois tipos: sintomas primários, caracterizados pelo amarelecimento ao longo das nervuras e as vezes com desenvolvimento de manchas irregulares; e secundários, com o surgimento de folhas pequenas, verticais e com clorose similar à deficiência de zinco e de ferro (GRAÇA, 1991). Análises das folhas de plantas doentes mostraram alta concentração de potássio e baixa concentração de cálcio, magnésio e zinco (AUBERT, 1979; KOEN; LANGENEGER, 1970).

Os frutos são reduzidos, assimétricos e de sabor amargo, provavelmente pela alta acidez e baixa quantidade de açúcar. Apresentam queda prematura e os que continuam na árvore não desenvolvem a coloração madura, permanecendo verdes – daí o nome da doença “greening”. Outro ponto prejudicado são as raízes, que apresentam pequeno desenvolvimento.

Segundo Bové et al. (1974), os sintomas do greening asiático são mais severos que o africano, porém, os mesmos respondem diferentemente de acordo com a temperatura. Nas condições de 22°C e 24°C, com fotoperíodo de 16:8h, o greening africano é mais evidente, entretanto, de 27 a 30°C não ocorrem sintomas. Para a forma asiática, em ambas as condições, há manifestação dos sintomas, porém, temperaturas muito altas por longos períodos inativam a doença (LABUSCHAGNE; KOTZÉ, 1988). Na África do Sul os sintomas nas folhas são mais pronunciados em áreas frias do que em áreas quentes, sendo assim, mais evidentes no inverno. Em relação à altitude, o desenvolvimento mais severo dos sintomas foi encontrado em altitude de 900m, enquanto que abaixo de 360m, os sintomas foram mínimos (SCHWARZ, 1968). No Quênia, o “greening” foi encontrado apenas acima de 700m. Essa raça africana também foi relatada em áreas elevadas no Iêmen e Arábia Saudita (BOVÉ; GARNIER, 1984).

Martinez e Wallace (1969) e Altamirano; Gonzalez e Viñas (1976) relataram que nas Filipinas, entre 1961 e 1970 houve uma redução de mais de 60% da área cultivada de citros em função da doença, sendo que em 1962 cerca de 7 milhões de árvores foram afetadas. Na Tailândia mais de 95% das árvores das regiões norte e leste foram afetadas (Bhavakul et al., 1981). Na Indonésia 3 milhões de árvores foram mortas entre 1960 e 1970 (TIRTAWIDJAJA, 1980). Toorawa (1998) estimou em 50 milhões o número

de árvores infectadas no sul e sudeste da Ásia e 10 milhões na África. Na África do Sul a incidência da doença foi severa de 1932 a 1936, 1939 a 1946 e novamente a partir de 1958, causando perdas na produção de 30 a 100% em algumas áreas (OBERHOLZER; von STADEN; BASSON, 1965).

O primeiro relato da doença no Brasil, bem como o primeiro caso das Américas, foi feito em março de 2004, no município de Araraquara, Estado de São Paulo, sendo diagnosticada a bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus* e posteriormente, o descobrimento da nova espécie, até então desconhecida, *Candidatus Liberibacter americanus* (Coletta-Filho et al., 2004; Teixeira et al., 2005). Posteriormente, em 2005, foi confirmado o primeiro caso na Flórida pelo US Department of Agriculture's Animal and Plant Health Inspection Services e pelo Florida Department of Agriculture and Consumer Services (KNIGHTEN et al., 2005). Hoje a doença está concentrada na região central do Estado de São Paulo, correspondendo a 82,6% das plantas totais afetadas. De 2004 até 2006, somente neste Estado, foram eliminadas mais de 600 mil árvores de citros (FUNDECITRUS, 2006).

A doença ocorre principalmente em *Citrus* spp. e outras plantas da família Rutaceae. *Murraya paniculata* é tida como a melhor espécie hospedeira para o psilídeo, apresentando sintomas de raquitismo, folhas pequenas e amarelecimento; em *Atalantia missionis* e *Swinglea glutinosa* é notado o raquitismo (OEPP/EPPO, 2005; McCLEAN; SCHWARZ, 1970; van LEBYVELD; van VUUREN, 1988; SURYANARAYANA; UPADHYAY; CHONA, 1968; AUBERT, 1987). A detecção da doença de maneira direta, com uso de técnicas específicas, também é difícil, provavelmente por sua baixa concentração inicial e pela distribuição de maneira desigual pela planta (McCLEAN, 1970; SU; CHANG, 1974).

Tirtawidjaja (1981) mostrou que o greening pode ser transmitido também para *Cuscuta* sp., *Catharanthus roseus* e *Nicotina tabacum*. Em *Cuscuta campestris* o patógeno adquirido de *Citrus sinensis*, é capaz de se multiplicar e ser transmitido para *Vinca rosea* através dessa planta (Garnier; Bové, 1983).

Salibe e Cortez (1966) também demonstraram que a transmissão do greening via enxerto é possível, porém, segundo Halbert e Manjunath (2004), que também relatam

ampla gama de hospedeiros dessa bactéria, a infecção depende da parte enxertada, da quantidade de tecido utilizada e da presença do patógeno nessas regiões.

De acordo com van den Berg et al. (1989) outras plantas, além das rutáceas, podem ser hospedeiras do patógeno, desde que o vetor seja capaz de se alimentar das mesmas. Outras espécies de rutáceas como *Balsamocitrus indica*, *Citrus grandis*, *C. hystrix*, *C. jambhiri*, *Citrus x nobilis*, *Clausena indica*, *Cl. lansium*, *Microcitrus australisica*, *Triphasia trifolia* e *Limonia acidissima* (= *Feronia limonia*) são relatadas pelos autores Hung; Wu e Su (2000), Hung; Wu e Su (2001) e Halbert e Manjunath (2004) como hospedeiras tanto do psíldeo como da bactéria.

A planta *Severinia buxifolia* é hospedeira alternativa à bactéria, uma vez que o patógeno pode existir e se replicar na mesma, servindo como fonte do patógeno por enxertia ou via transmissão para o psíldeo (HUNG; WU; SU, 2001). De acordo com Hung, Wu e Su (2000) a bactéria pode se replicar em *Severinia buxifolia* tão bem quanto em plantas de citros. Já em *Limonia acidissima* a bactéria usa a planta como um hospedeiro transitório, uma vez que permanece neste temporariamente, desaparecendo poucos meses depois.

Para Floyd e Krass (2006), as espécies *Aeglopsis chevalieri*, *Balsamocitrus dawei*, *Citrofortunella microcarpa*, *Citroncirus webberi*, *Calodendrum capensis*, *Fortunella* spp., *Poncirus trifoliata*, *Toddalia lanceolata* também são espécies hospedeiras do patógeno.

Na África do Sul a maior ocorrência é em *Citrus sinensis*, mas também pode afetar *C. reticulata*. Em Taiwan, Índia e Filipinas as mesmas espécies manifestam-se mais suscetíveis à doença (OBERHOLZER; von STADEN; BASSON, 1965; NARIANI; RAYCHAUDHURI; VISWANATH, 1973; MIYAKAWA, 1980; GONZÁLES; VIÑAS; VERGARA, 1972; DAS; SHIVANKAR; SINGH, 2002).

O período de latência do patógeno em citros é variável, podendo o mesmo expressar os sintomas de 4 meses a 1 ano após a infecção. Uma vez infectadas, as plantas jovens morrem em 2 a 4 anos (HUANG et al., 1990). A taxa de transmissão do greening é alta. Em Taiwan, por exemplo, testes de campo mostraram que de 30 plantas sadias, 57% apresentaram infecção após 6 meses, 73% após um ano e, em 3 anos, esse valor era de 100% (CHEN, 2001).

Na Flórida, estudos mostraram que a hipótese da doença ter sido introduzida via parasitóide é válida, porém, com probabilidade mínima (HOY; NGUYEN; JEYPRAKASH, 2001).

De acordo com Halbert e Manjunath (2004), a transmissão pelas sementes é desconhecida, principalmente pelos frutos serem perdidos e suas sementes quase sempre abortadas. Em um primeiro experimento Tirtawidjaja (1981) não observou sintomas da doença nas mudas provenientes de sementes de plantas doentes.

Embora não haja uma real resistência do citros ao “greening”, algumas espécies e cultivares são relativamente tolerantes, podendo ser utilizadas (KOIZUMI et al., 1993). De acordo com Garnier e Bové (1983), *Citrus aurantifolia*, mesmo sendo a variedade preferida pelo inseto, é menos suscetível que *C. sinensis* e *C. reticulata*. Manicon e van Vuuren (1990) agruparam as variedades de citros de acordo com o dano: severo (*C. sinensis*, *C. sinensis* x *C. reticulata*, *C. reticulata*), moderado (*C. paradisi*, *C. limon*, *C. aurantium*) e tolerante (*C. aurantifolia*, *C. maxima*, *Poncirus trifoliata*).

2.2.2 Transmissão da doença

De 1972 a 1987, sete espécies de Psylloidea foram identificadas como transmissoras de organismos procariontes causadores de doenças em plantas, entre elas, *T. erytraeae* e *D. citri*. Embora se tenha pouca informação da relação vetor-patógeno, sabe-se que os psílídeos adultos adquirem o patógeno a partir de plantas infectadas e esse se multiplica no corpo do inseto (AUBERT, 1987).

De acordo com Aubert (1987), *D. citri* é capaz de explorar o ambiente em um período de tempo relativamente curto devido a extrema fecundidade das fêmeas, capacidade de voo e habilidade de adaptação a outras plantas hospedeiras. Tolley (1990) estimou que *D. citri* pode se deslocar, na ausência de hospedeiros adequados para seu desenvolvimento, cerca de 1,5 km. Sakamaki (2005) acredita que *D. citri* seja capaz de se deslocar por várias centenas de quilômetros, uma vez que possui asas e musculatura muito similares a algumas cigarrinhas que dispersam ativamente por grandes distâncias.

O número de adultos desse psílídeo, em uma população, capazes de transmitir a doença é relativamente pequeno. Todavia, em condições favoráveis, um único inseto

pode transmiti-la (McCLEAN, 1974; ZHAO, 1981; CATLING; ATKISON, 1974; RAYCHANDHURI, 1972). Yang et al. (2006) relataram na China a incidência da doença associada a presença do inseto nas regiões sudeste do país, tais como Guangxi, Guangdong, Fujian e Taiwan.

A capacidade de transmissão da doença e a população desses psílídeos é variável. Níveis altamente uniformes de transmissão podem ser obtidos pela alimentação de planta contaminada (McCLEAL; OBERHOLZER, 1965). Abaixo das condições naturais, a expansão da doença depende da quantidade do patógeno no ambiente e da densidade populacional do vetor.

O agente causador do “greening” se concentra nas glândulas salivares, fato esse que leva a suspeitar da transmissão pelas secreções do ducto salivar (CHEN; MIYAKAWA; MATSUI, 1972; MOLL; MARTIN, 1973). Bové e Garnier (2002) especulam que o patógeno causador da doença vive associado ao inseto de maneira comensal ou simbiótica, migrando e invadindo posteriormente as glândulas salivares de onde são transmitidos para as plantas.

Segundo Oberholzer e Hofneyr (1955) o patógeno pode ser adquirido pelo psílídeo *D. citri* em 15-30 minutos, com um período de latência de 8 a 12 dias. Longos períodos de alimentação conferem ao inseto alta infectividade. As ninfas podem adquirir a bactéria a partir do 2º ínstar, mas apenas as do 4º e 5º ínstar, bem como os adultos, são capazes de transmitir a doença (FLOYD; KRASS, 2006; RAYCHAUDHURI, 1972; ZHAO, 1981). Uma hora ou mais de alimentação do inseto é necessária para se ter 100% de transmissão. Para Raychaudhuri et al. (1972), em menos de uma hora o inseto já é capaz de transmitir a doença.

Ainda não se sabe ao certo se o patógeno pode ser transmitido de uma geração para outra via ovos. Hung et al. (2004) constataram por meio de testes de detecção da bactéria no psílídeo, via PCR, que o patógeno persiste no mesmo, mas não é transmitido transovarianamente. Xu; Xia e Ke et al. (1994) também relatam não haver evidência desse tipo de transmissão. Para o inseto *T. erytraea*, os autores van den Berg et al.(1992), com base em seus experimentos, levantam a hipótese de ocorrer a transmissão da bactéria, presente na planta hospedeira, para seus ovos através de absorção.

2.3 Controle

Para o controle da doença, o que mais tem sido recomendado é a destruição das plantas infectadas. Porém, a injeção de antibióticos pode proporcionar a diminuição temporária dos sintomas (SU; CHEON; TSAI, 1986). Além disso, técnicas de controle convencional, bem com o manejo integrado e a associação de métodos biológicos, têm resultado em um controle satisfatório. No Estado de São Paulo, a Coordenadoria de Defesa Agropecuária do Estado, publicou em 2006 a Instrução Normativa – 32, de 29/09/2006, que traz alguns requisitos em relação a medidas de segurança e o controle dessa doença.

2.3.1 Controle convecional

O controle convecional dos vetores do “greening” é feito por meio de agrotóxicos, geralmente com inseticidas sistêmicos e de contato. Os sistêmicos são mais eficazes no controle de *D. citri*, sendo a aplicação no tronco, solo ou via “drench” (TOLLEY, 1990). Para os inseticidas de contato, recomendando-se os neonicotinoides (tiamectoxan, imidacloprido, acetamiprido, tiacloprido), organofosforados (Acefato, dimetoato, etiona, malationa, clorpirifós, metidationa), piretróides (deltametrina, lambda-cialotrina, fenpropatrina, esfenvalerato, gama-cialotrina) e carbamatos (carbosulfano, indoxacarbe) (YAMAMOTO, 2006).

Deacon; van den Berg e Sutherland (1989) estudaram certos inibidores de quitina que se mostraram promissores no controle do psíldeo na fase de ovo e ninfas de primeiro ínstar. Rae et al. (1997) avaliaram o efeito do óleo mineral sobre *D. citri* e constataram que a resposta nos estágios imaturos é similar aos agrotóxicos convencionais, além do que a oviposição dos adultos era impedida devido a presença do óleo nos ramos.

Em relação ao controle alternativo com extratos vegetais, Shivankar; Rao e Singh (2000) obtiveram 90% de controle do psíldeo com extratos botânicos, inclusive com formulações à base de neem. Trabalho de Weathersbee e McKenzie (2005) com produto à base de neem (azadirachtina) mostrou que, apesar de não diferir a oviposição dos adultos em plantas tratadas e não tratadas, a repelência dos mesmos foi

significativa nas plantas tratadas. Sobre as ninfas houve efeito negativo do neem na sobrevivência e ecdise das mesmas. O neem, nas concentrações de 10 a 90 ppm proporcionou redução de 74 a 92% nas populações de ninfas após 7 dias de aplicação.

2.3.2 Controle Biológico

2.3.2.1 Parasitóides e predadores

O controle biológico com parasitóides, de acordo com Catling (1969), é feito com a vespa do gênero *Tamarixia*, que oviposita nas ninfas do psílideo limitando o crescimento da população desse. Gómez-Torres et al. (2006) relatam eficiência de controle de *D. citri* com *T. radiata* entre 14 e 33%. Outras vespas parasitas também são relatadas, como *Diaphorencyrtus aligarhensis*, *Psyllaephagus* sp., *Chartocerus walkeri*, *Encarsia* sp., *Aphidencyrtus cassatus*, *Cheiloneurus cyanonotus* e *Pachyneuron* sp. (AUBERT et al., 1985; CHIU; AUBERT; CHIN, 1988; McDANIEL; MORAN, 1972; TANAKA; DOI, 1976).

O ectoparasita *Tetrastichus radiatus* já foi constatado em 60 a 80% de ninfas de *D. citri*, de acordo com Husain e Nath (1927). Chien (1995) observou que um único macho de *D. aligarhensis* foi capaz de matar 280 ninfas do psílideo.

Em relação aos predadores têm-se sirfídeos do gênero *Allographa* nas Ilhas Reunião e no Nepal, os coccinelídeos *Chilocorus nigritus*, *Cheilomenes quadriplagiata*, *Coelophora biplagiata*, *Leis axyridis*, *Synharmonia octomaculata* e os crisopídeos *Chrysopa boninensis* e *C. septempunctata* (ZHAO et al., 1979). Segundo Michaud (2001) há um grande número de predadores de *D. citri*, com destaque para os coleópteros, crisopídeos, aranhas e sirfídeos. Dentre os coleópteros destacam-se *Curinus coeruleus*, *Exochomus childreni*, *Harmonia axyridis*, *Olla v-nigrum*, *Cycloneda sanguinea* e *Coelophora inaequalis*.

Estudos de González et al. (2007) mostram que os seis predadores diagnosticados para *D. citri* (*C. sanguinea*, *Chilocorus cacti*, *Exochomus cubensis*, *Scymnus distinctus*, *Ocyptamus* sp. e *T. radiata*) atacam preferencialmente ovos e os estágios ninfais 1 e 2. No caso de *E. cubensis* a predação de ovos atingiu de 33,3% a 41,5%, e em ninfas de 1º instar, até 40%. Para *T. radiata* a efetividade variou de 30,7%

a 97,3% em ninfas de 3^o, 4^o e 5^o íntares. Observou-se ainda que *C. sanguinea*, *C. cacti* e *E. cubensis* predaram os psilídeos com maior frequência que os demais.

Já as espécies *H. axyridis* e *O. v-nigrum* são capazes de completar seu desenvolvimento tendo *D. citri* como fonte única de dieta. Esse mesmo autor relata que algumas famílias de aranhas (Anyphaenidae, Clubionidae, Oxyopidae e Salticidae), de neurópteros (Chrysopidae e Hemerobiidae), de dípteros (Syrphidae) e de hemípteros (Anthocoridae) também podem preda *D. citri* (MICHAUD, 2002).

Pluke et al. (2005) relataram em pomares de citros, a predação natural de *D. citri* pelos cocinelídeos *C. inaequalis*, *C. sanguinea limbifer*, *Cladis nitidula*, *Coleomegilla innotata*, *C. cacti*, *Scymnus* sp., *Hippodamia convergens* e *Cryptolaemus montrouzieri*. Michaud e Olsen (2004) também observaram diferentes respostas para cada uma das espécies de coleópteros alimentadas com o psilídeo.

Hoy; Nguyen e Jeyaprakash (2004) descreveram que na Flórida o controle do psilídeo é feito principalmente usando *T. radiata*, obtido de Taiwan e Vietnã, e de *Chrysopa boninensis*. Aranhas e outros seres generalistas auxiliam no controle da população do inseto.

McFarland e Hoy (2001) avaliaram a influência da temperatura e umidade na sobrevivência de *D. citri* e de seus parasitóides, *T. radiata* e *D. aligarhensis*, concluindo que por mais que a população de psilídeo e de seus parasitóides aumentasse conforme se aumentava a umidade, o psilídeo não foi dependente de altas umidades, podendo sobreviver em temperaturas elevadas, ao contrário de seus parasitóides.

2.3.2.2 Fungos entomopatogênicos

Apesar de *Diaphorina citri* ter sido constatada há mais de meio século nos pomares de citros do Brasil, trabalhos de controle dessa praga com fungos entomopatogênicos são escassos, devido a importância da praga ser ressaltada apenas nos últimos anos. De modo geral, esses fungos incluem os gêneros que estão associados a insetos e outros artrópodes, como ácaros e aranhas. Para Gustafsson (1971), insetos sugadores, como este psilídeo, são mais propensos ao ataque de fungos por serem, estes patógenos, capazes de produzir enzimas necessárias para

penetrar a cutícula. Mesmo assim, de acordo com o catálogo da micoteca da USDA-ARS (Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures - ARSEF), até setembro de 2005, foram registrados apenas 17 isolados de fungos provenientes de insetos da família Psyllidae, dos quais cerca de 65% são do gênero *Fusarium*.

Poucos trabalhos tratam esses microrganismos atacando este psílideo, tais como *Paecilomyces fumosoroseus* (SUBANDIYAH et al., 2000), *Hirsutella citriformis* (SUBANDIYAH et al., 2000; ÉTIENNE et al., 2001), *Cephalosporium lecanii* (*Verticillium lecanii*) (XIE; SU; LIN, 1988), *Beauveria bassiana* (RIVEIRO-ARAGON; GRILLO-RAVELO, 2000 apud YANG et al., 2006), *Cladosporium* sp. nr. *oxysporum* (Aubert, 1987) e *Capnodium citri* (Aubert, 1987). Na China são relatados quatro entomopatógenos associados ao controle do psílideo: *Acrostalagmus aphidium*, (atual *Lecanicillium lecanii*), *Paecilomyces javanicus*, *V. lecanii* e *B. bassiana* (Xie et al., 1988).

P. fumosoroseus e *H. citriformis* foram isolados por Subandiyah et al. (2000) de adultos infectados e mortos em dois pomares de *Citrus nobilis* na Indonésia, apresentando níveis máximos de infecção de 52,2% e 82,9%. A patogenicidade de *P. fumosoroseus* foi confirmada pelos autores por meio de bioensaios utilizando concentrações de 10^7 a 10^9 conídios/mL em adultos do psílideo.

Infecções por *Beauveria* e *C. lecanii* também foram encontradas, sendo o último mais eficaz em altas densidades do inseto (GAVARRA; MERCADO, 1988; XIE; SU; LIN, 1988). Padulla et al. (2005), em testes com *B. bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Lecanicillium longisporum*, observaram índices de mortalidade de 53 a 100% em ninfas e de 13 a 100% em adultos.

Níveis de mortalidade de 60 a 70% de ninfas foram obtidos nas Ilhas Reunião, onde a umidade relativa era superior a 88%. Umidades relativas perto do ponto de saturação estão invariavelmente associadas a severas epizootias de fungos em ninfas de 2º a 5º ínstar, segundo Aubert (1987). Étienne et al. (2001) encontraram *H. citriformis* colonizando *D. citri* em locais com umidade superior a 80%. Rosas (2003) relatou que a cutícula grossa e cerosa de adultos de *D. citri* é uma efetiva barreira contra a atividade biológica dos exudatos produzidas por *H. citriformis*, impedindo a infecção dos insetos por esse patógeno.

Os fungos *C. sp. nr. oxysporum* e *C. citri* são relatados como patogênicos a este inseto, apesar de não serem classificados como entomopatogênicos (AUBERT, 1987).

Doenças fúngicas nos insetos produzem uma grande variedade de sinais e sintomas, tais como o crescimento superficial nas cutículas, melanização em pontos da cutícula onde as hifas penetram, comportamento alterado (redução de alimentação, desorientação, agitação excessiva, paralisia parcial, fraqueza, mudança de coloração). No caso de fraqueza, possivelmente ocorre em função da produção de toxinas pelo fungo, interferindo tanto no desenvolvimento do hospedeiro como no mecanismo de defesa contra microrganismos, incluindo os fungos (ALVES, 1998; BOUCIAS; PENDLAND, 1998).

2.3.2.2.1 *Beauveria bassiana*

O fungo *Beauveria bassiana* foi estudado com detalhes pela primeira vez pelo italiano Agostino Bassi em 1835, quando descobriu que este patógeno era responsável por uma doença de larvas de bicho-da-seda. Bing e Lewis (1992) relataram *B. bassiana* sendo um entomopatógeno presente no solo e também endofítico, colonizando tecidos de plantas.

Vários fatores influenciam o sucesso de sua patogenicidade. Por exemplo, o tipo de planta na qual o inseto se alimenta é importante, pois algumas podem produzir compostos inibidores de crescimento do fungo. A germinação dos conídios em contato com os insetos também requer ótima temperatura e umidade (acima de 75%) (FARGUES et al., 1997). Sosa-Gómez e Alves (2000) constataram que a conidiogênese desse fungo foi possível com umidade relativa entre 75 e 100% sobre diferentes hospedeiros. Além disso, sabe-se que insetos mais jovens são mais suscetíveis à infecção do que ninfas e/ou larvas mais velhas, principalmente pelo fato de ninfas mais jovens apresentarem cutículas mais hidrofóbicas do que as mais velhas, o que favorece a adesão dos conídios (BOUCIAS; PENDLAND; LATGE, 1998; BOUCIAS; PENDLAND, 1998).

De maneira geral, os conídios penetram nos insetos nas regiões membranosas e intersegmentais, podendo também penetrar diretamente na cutícula, órgãos sensoriais e traquéias (HENDLAND; PASS, 1968; MOHAMED; SIKOROWSKI; BELL, 1978;

SOSA-GÓMEZ; BOUCIAS; NATION, 1997). O processo de germinação e de penetração de um entomopatógeno à cutícula do inseto ocorre devido as propriedades físico-químicas existentes entre os conídios e a cutícula, ou seja, tanto a membrana dos conídios como a cutícula dos insetos são hidrofóbicas, possibilitando esses processos (BOUCIAS et al., 1996). O aumento do volume do conídio e a formação do tubo germinativo em *B. bassiana* requerem apenas uma fonte de carbono, mas o nitrogênio é necessário para suportar o desenvolvimento hifal após o início do processo de infecção. Além disso, a hidrofobicidade previne a perda de água pelo conídio e ajuda sua dispersão. Enzimas secretadas por *B. bassiana* também auxiliam no processo de adesão à cutícula. A quantidade de enzimas que degradam a cutícula está relacionada diretamente as diferentes raças de *B. bassiana*, sendo determinantes na variação da virulência das mesmas. Há uma variada classe de enzimas produzidas por *B. bassiana* durante a germinação, incluindo proteases, quitinases e lipases que agem na cutícula.

De acordo com Alves (1998), a infecção ocorre via tegumento, onde este fungo germina entre 12 a 18 horas após sua aplicação. A penetração de *B. bassiana* na cutícula do inseto através dos tubos germinativos geralmente não envolvem a formação de apressório. Uma vez que estes penetram as regiões cuticular e epidermal, o fungo cresce em direção à hemocèle, onde os blastósporos tornam-se evidentes cerca de 48 horas após a infecção. A morte se dá pela inanição, desidratação e/ou efeito de toxinas do fungo.

A habilidade de hifas de *B. bassiana* em superar a rápida nodulação ou encapsulação do sistema de defesa dos insetos é devido a diferentes mecanismos usados pelos blastósporos parasíticos intracelulares. As células hifais devem superar as barreiras do tegumento e ter força mecânica para crescer fora das células hospedeiras que se agregam em nódulos ou cápsulas. Após a penetração, com a chegada do fungo à hemocèle, ocorre a imunorreação dos hemócitos dos insetos ao redor da extremidade das hifas, bem como posterior melanização. Se as células de *B. bassiana* forem rodeadas pelos hemócitos via ação fagocítica ou nodulação, elas ainda podem permanecer viáveis, como um parasita intracelular, emergindo posteriormente das células sanguíneas para continuar crescendo e replicando na hemocèle e nos tecidos. Assim, *B. bassiana* pode superar as respostas de defesa mesmo que estas sejam

iniciadas pelo hospedeiro (BOUCIAS; PENDLAND, 1998). Essa relação será melhor discutida no item 4.3.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da ESALQ-USP (Piracicaba-SP).

3.1 Criação e manutenção de *D. citri*

Adultos de *Diaphorina citri*, provenientes dos laboratórios de Biologia de Insetos e Insetos Vetores de Patógenos (Esalq/USP), foram liberados em gaiolas de acrílico (40 x 33 x 33 cm), com laterais teladas, sendo um dos lados formado por uma porta de acrílico. Cada gaiola continha 8 mudas de murta (*Murraya paniculata*), provenientes da casa de vegetação, em ambiente livre de insetos, dispostas em vasos plásticos e com substrato composto de terra argilosa, areia e matéria orgânica (3:1:1). Uma dessas gaiolas foi mantida como matriz, enquanto as demais eram utilizadas constantemente para o fornecimento de ninfas para os testes. Para o desenvolvimento dos insetos, as gaiolas foram mantidas em sala climatizada a $26\pm 1^{\circ}\text{C}$, 60% UR e fotoperíodo de 16:8h.

Em períodos de quinze dias, toda a criação dos insetos era renovada, fazendo-se a transferências destes para gaiolas contendo mudas de murta com brotações. Para se conseguir essas brotações, semanalmente as mudas da casa de vegetação eram podadas e adubadas com nitrogênio, visando estimular a formação das brotações.

Devido à preferência dos insetos por mudas de murta, as de citros (*Citrus* spp.) foram descartadas durante a criação, bem como durante os bioensaios.

3.2 Preparo do material dos bioensaios

O uso de ninfas nos bioensaios ao invés de adultos, foi motivado pelo fato destas serem de fácil manipulação, além da importância que têm por hospedarem a bactéria que persiste até o estágio adulto. Esta fase também é a mais suscetível a entomopatógenos por apresentar o corpo mais exposto, ausência de esclerotização e pouca movimentação. Além disso, durante a ecdise, ocorre uma queda no número de

oenócitos, o que torna o inseto mais suscetível à ação dos fungos, uma vez que debilita seu sistema imunológico de defesa celular (HEMING, 2003).

Nesse trabalho, optou-se pela escolha de diferentes espécies de fungos, com o objetivo de selecionar um patógeno promissor e com um modo de ação mais generalista em relação às pragas da citricultura.

Os isolados escolhidos para os bioensaios foram os padrões do Banco de Patógenos do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos, uma vez que já foram testados em muitos hospedeiros de diferentes ordens, apresentando patogenicidade relativamente alta e boa produção em meios artificiais. O único isolado desconhecido é o do fungo *Syngliocladium* spp., recentemente isolado de *Orthezia praelonga* (ALVES et al., 2004) que foi testado pela primeira vez (Tabela 1).

Tabela 1 - Isolados do Banco de Patógenos do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos utilizados nos testes

Isolado	Fungo	Hospedeiro
Esalq-447	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Solenopsis invicta</i>
Esalq-PL63	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Atta</i> sp.
Esalq-1379	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Diaphorina citri</i>
Esalq-1037	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>Solenopsis</i> sp.
Esalq-E9	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>Mahanarva posticata</i>
Esalq-1269	<i>Hirsutella thompsonii</i>	<i>Calacarus heveae</i>
Esalq-1380	<i>Hirsutella thompsonii</i>	<i>Calacarus heveae</i>
Esalq-972	<i>Lecanicillium muscarum</i>	<i>Coccus viridis</i>
Esalq-1300	<i>Lecanicillium longisporum</i>	<i>Orthezia praelonga</i>
Esalq-1205	<i>Paecilomyces farinosus</i>	<i>Bemisia tabaci</i>
Esalq-1296	<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	<i>Bemisia tabaci</i>
Esalq-1361	<i>Syngliocladium</i> spp.	<i>Orthezia praelonga</i>

Os isolados encontram-se armazenados em freezer (-12°C) na forma de conídios puros, em geladeira (4°C) sob óleo mineral e em freezer (-40°C) na forma liofilizada.

Para os bioensaios, uma amostra de cada isolado armazenado foi transferida para placas de Petri esterilizadas contendo meio de cultura completo - MC (0,36 g fosfato de potássio; 1,05 g fosfato de sódio; 0,6 g sulfato de magnésio; 1g cloreto de potássio; 10g glucose; 1,58g nitrato de sódio; 5g extrato de levedura; 20g agar; 1000 mL de H₂O destilada) previamente autoclavado à 120°C por 20 minutos. Após a inoculação, as placas foram mantidas por sete dias em câmara climatizada tipo B.O.D. (26±0,5°C; 12 horas de fotofase e 70±10% UR) para o crescimento e esporulação do patógeno.

Os isolados de *B. bassiana* podem ocorrer sobre um grande número de hospedeiros, inclusive outros insetos da subordem Sternorrhyncha, como é o caso da mosca-branca (*Bemisia tabaci*), que apresentou altos níveis de mortalidade de acordo com trabalho de Ramos (2001). No Brasil, segundo Alves (1998), são mais de 30 espécies de insetos suscetíveis a esse entomopatógeno.

Assim como *B. bassiana*, *M. anisopliae* é um fungo de amplo espectro hospedeiro e pouco específico, causando doença em espécies de insetos e ácaros de diversas ordens e famílias. Além disso, são conhecido por produzirem exotoxinas e enzimas com propriedades tóxicas aos insetos (ROBERTS; KRASNOFF, 1998). *M. anisopliae* vem sendo usado no Brasil, com grande sucesso, no controle das cigarrinhas-das-pastagens e da cana-de-açúcar.

A espécie *H. thompsonii*, além de ter sido relatada ocorrendo em *D. citri*, é comum em várias culturas de citros da América do Sul, atacando diversas pragas, incluindo ácaros (TAMAI, 2001). Já os isolados do fungo *Lecanicillium* são conhecidos no Brasil por infectar diversos insetos considerados pragas na citricultura, como pulgões, cochonilhas, moscas-brancas e ácaro-da-leprose. Alves (1998) relatou que é comum a ocorrência desses fungos sobre pulgões e cochonilhas em regiões tropicais e subtropicais.

Paecilomyces é um gênero que reúne diversas espécies entomopatogênicas, relacionadas principalmente à doença chamada “muscardine amarela” que ataca insetos e nematóides de plantas (ALVES, 1998). Wraight et al. (1998) constataram grande virulência de isolados de *P. fumosoroseus* sobre a mosca-branca *Bemisia argentifolii*. Diversos estudos relataram que em casa de vegetação, esses

entomopatógenos ocasionaram mortalidade desse inseto em até 70% (VIDAL et al., 1998).

Recentemente, epizootias naturais de *Syngliocladium* sp. foram diagnosticadas em ortézia. Alves et al. (2004) relataram que em levantamentos iniciais, a prevalência dessa doença em campo foi de 12%, com algumas plantas apresentando até 80% a população de ortézia infectada, caracterizando esse isolado como um promissor agente de controle microbiano de pragas de citros.

3.3 Seleção dos isolados para o controle de *Diaphorina citri*

Inicialmente foram previstos bioensaios com ninfas em mudas de citros, mas não foi possível obter um grande número de posturas nessas mudas devido à preferência dos insetos pelas plantas de murta.

A transferência de ninfas, das mudas de murta para mudas de citros também foi tentada com o auxílio de um pincel de seta única. Nesse caso, ramos de plantas infestadas foram podados e separados por 1 hora. Nesse intervalo de tempo, o fluxo de seiva dos ramos cessa, fazendo com que as ninfas retirem o aparato bucal dos mesmos. Essa retirada evita a ruptura e conseqüentes danos ao inseto durante sua manipulação. Mesmo assim, essa tentativa não foi bem sucedida, pois as ninfas transferidas apresentaram-se muito suscetíveis a essa manipulação, resultando em grande porcentual de mortalidade nesse processo.

Com isso, optou-se pela montagem dos ensaios usando as próprias mudas de murta.

Assim, mudas infestadas com as ninfas de 2^o ao 4^o instares foram pulverizadas, com uma mesma concentração, com 3 mL da suspensão de conídios dos respectivos fungos, com o auxílio de pulverizador manual tipo Air Brush, cerca de 15 cm distanciadas do bico do mesmo.

O primeiro bioensaio foi realizado usando a concentração de 1×10^7 conídios/mL, enquanto que no segundo, a concentração dos isolados foi de 5×10^7 conídios/mL, com exceção dos isolados Esalq-1380 e Esalq-1269, cujas concentrações foram de $4,3 \times 10^7$ e $2,8 \times 10^7$ conídios/mL, respectivamente.

Para o preparo das suspensões, as placas de Petri contendo os respectivos patógenos, foram raspadas com o auxílio de uma espátula metálica esterilizada. Em seguida, os conídios foram transferidos para um tubo de dieta contendo 10 mL de água estéril mais espalhante adesivo a 0,01% (Tween® 40). Três diluições em série foram feitas para possibilitar a contagem dos mesmos em câmara de Neubauer. A partir dessa contagem, convertida à suspensão original, foram preparadas as suspensões para a pulverização.

Para cada isolado de fungo foram utilizadas 2 mudas de murta, cada uma contendo 2 repetições (parte superior e parte inferior), em um total de 4 repetições/tratamento. Cada repetição era composta de aproximadamente 50 ninfas, totalizando cerca de 200 ninfas por tratamento.

A avaliação da mortalidade foi feita ao 7^o dia após a pulverização, sendo corrigida pela fórmula de Scheinder-Orelli, disponível em programa desenvolvido por Haddad et al. (2004) no endereço <http://www.lef.esalq.usp.br/cm/>.

Um grupo de 30 ninfas mortas de cada tratamento foi plaqueado em meio de cultura completo (MC) e batata-dextrose-ágar (BDA) (20g agar; 15g dextrosol; 200g batata; 0,5g antibiótico; 1000 mL de H₂O destilada) para a confirmação da mortalidade (Tabela 2). Para isso, foram previamente lavadas em hipoclorito de sódio (2,5%) com duplo enxágüe em água estéril. As placas de Petri contendo os meios de cultura e as ninfas foram mantidas em B.O.D. a $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, $70 \pm 10\%$ UR e fotoperíodo de 12:12 h.

3.4 Determinação da Concentração Letal Média (CL₅₀) para o isolado selecionado

Uma vez selecionado o fungo com maior potencial infectivo às ninfas de *Diaphorina citri*, o cálculo de sua CL₅₀ foi realizado fazendo-se aplicações de diferentes concentrações do mesmo sobre ninfas de 2^o ao 4^o ínstar.

Foi realizada uma seleção de concentrações para determinação dos limites inferior e superior do teste de CL₅₀. Após a determinação desses limites, foram selecionadas as concentrações intermediárias, espaçadas em progressão aritmética para a realização do Probit. Assim, as concentrações utilizadas foram, em ordem crescente, 10^5 , 5×10^5 , 10^6 , 5×10^6 , 10^7 , 5×10^7 , 10^8 e 5×10^8 conídios/mL. Para cada

concentração, foram utilizadas 2 mudas de murta, divididas em repetições e avaliadas conforme o item 3.3. Além dessas confirmações, lâminas foram preparadas com corante azul láctico para a visualização do fungo.

Obtidas as porcentagens de mortalidade, esses dados foram submetidos à análise de Probit usando o programa Polo-PC, bem como o teste de Tukey (5%) com o programa SANEST, para comparação das médias dos tratamentos.

3.5 Estudo do ciclo biológico de *Beauveria bassiana* em *Diaphorina citri*

Etapas do desenvolvimento da infecção de *Beauveria bassiana* selecionado no item anterior foram estudadas em laboratório com o auxílio de microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura (NAP/MEPA - Microscopia Eletrônica Aplicada a Pesquisa Agropecuária, da ESALQ/USP).

Para isso, mudas infestadas foram submetidas à pulverização (item 3.3) do fungo na concentração de 5×10^8 conídios/mL e mantidas em sala climatizada. ($26 \pm 0,5^\circ\text{C}$; 14 horas de fotofase e $70 \pm 10\%$ UR), avaliando-se todo o processo nos intervalos de tempo de 0, 24, 48, 72 e 168 horas após a inoculação. No caso da microscopia eletrônica de varredura, foram preparadas ninfas sadias (testemunha) e ninfas pulverizadas com a suspensão de 3×10^8 conídios/mL.

Após os respectivos intervalos de tempo, um grupo de 10 ninfas foi retirado das plantas e colocado em freezer a -40°C por 5 minutos para causar sua morte, preservando-se o material. Em seguida, essas ninfas foram preparadas sobre “stubs”, sendo coladas em fita de carbono e posteriormente fixadas em vapor de ósmio (OsO_4) por 48 horas. Em seguida foi feita a metalização das amostras com ouro no Evaporador Balzers, modelo MED 010, por 180 segundos. Após esse procedimento, as amostras foram dispostas no interior do microscópio eletrônico de varredura da marca Zeis, modelo LEO 435 VP, no NAP/MEPA (Microscopia Eletrônica Aplicada à Pesquisa Agropecuária), da Esalq/USP para observação dos espécimes.

Para completar o postulado de Koch, o reisolamento do fungo foi feito utilizando-se três meios de cultura (MC, BDA e AN). Para isso, parte das ninfas mortas foi lavada em hipoclorito de sódio (2,5%), com duplo enxágue em água estéril e posteriormente

plaqueadas em meios de cultura, de acordo com protocolo de Alves (1998). A outra parte das ninfas foi submetida ao mesmo processo de desinfestação, porém, foram maceradas em água estéril mais espalhante adesivo a 0,01% (Tween® 40). Essa suspensão foi estriada nos respectivos meios de cultura, com o auxílio de uma alça de platina esterilizada. Para ambos os tratamentos, todas as placas foram mantidas em B.O.D. a $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, $70 \pm 10\%$ UR e fotoperíodo de 12:12 h, para confirmação do agente etiológico da doença.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Seleção do isolado

O primeiro bioensaio com a concentração de 10^7 conídios/mL não foi satisfatório, uma vez que apresentou problemas com as mudas de murta. As mudas ressecaram em alguns tratamentos e em outros, a mortalidade foi muito abaixo do esperado, não sendo possível a seleção do isolado.

Assim, no segundo bioensaio foi utilizado a concentração de 5×10^7 conídios/mL, já descartando os isolados cuja mortalidade foi muito abaixo do esperado (abaixo de 20%). Este bioensaio possibilitou discriminar o isolado mais promissor (Tabela 2).

Tabela 2 - Porcentagem média de mortalidade total, corrigida (%MC) e esporulação das ninfas tratadas com os fungos entomopatogênicos

Espécies	Tratamento	Mortalidade (%)	MC* (%)	Esporulação (%)
<i>Beauveria bassiana</i>	Esalq-PL63	72,94	71,89 a	0
<i>Beauveria bassiana</i>	Esalq-1379	62,5	61,04 b	0
<i>Hirsutella thompsonii</i>	Esalq-1380	59,70	58,09 bc	69,3
<i>Beauveria bassiana</i>	Esalq-447	54,71	54,48 cd	0
<i>Lecanicillium muscarum</i>	Esalq-972	52,63	51,28 cd	94,6
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	Esalq-1296	48,42	46,62 d	81,2
<i>Paecilomyces farinosus</i>	Esalq-1205	35,71	33,19 e	78,9
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Esalq-E9	30	27,87 e	92,1
<i>Hirsutella thompsonii</i>	Esalq-1269	29,72	27,04 e	77,9
<i>Syngliocladium</i> spp.	Esalq-1361	22	3,17 f	23,6
<i>Lecanicillium longisporum</i>	Esalq-1300	6,45	0 f	93,6
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Esalq-1037	0	0 f	0

* médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

A manutenção dos cadáveres em câmara úmida propiciou a esporulação de todos os isolados, confirmando a mortalidade por esses patógenos. Apenas *B. bassiana* não apresentou crescimento e esporulação sobre os cadáveres. Mesmo não

apresentando conidiogênese o isolado Esalq-PL63, foi o que causou maior mortalidade das ninfas, mostrando boa virulência e comportamento generalista, já que essa espécie já foi relatada infectando diversas espécies e ordens de insetos (Alves, 1998). Esse comportamento será melhor discutido no item 4.3.

Comparando-se a mortalidade causada pelos isolados padrões testados, optou-se pela seleção do fungo *B. bassiana*, isolado Esalq-PL63, que diferiu estatisticamente dos demais, causando cerca de 72% de mortalidade após 7 dias da inoculação.

Para o entomopatógeno selecionado, Alves (1998) relatou como condições ótimas umidade relativa de 90% e temperatura entre 23 e 28°C, sendo que temperaturas muito baixas e muito altas retardam o crescimento e desenvolvimento da doença.

Apesar de serem patógenos da mesma espécie, observou-se comportamento totalmente diferente entre os isolados de *B. bassiana* (Esalq-447, Esalq-PL63 e Esalq-1379), bem como entre os isolados de *M. anisopliae* (Esalq-E9 e Esalq-1037). Essa diferença em relação a patogenicidade pode estar relacionada também a virulência e, consequentemente, a produção de metabólitos secundários que influenciam na capacidade do patógeno em causar a doença. Além das qualidades intrínsecas do patógeno, a suscetibilidade e/ou resistência natural do próprio inseto hospedeiro, é outro fator a ser considerado para a patogenicidade de um isolado (ALVES, 1998).

Em bioensaios de seleção, essa variação da patogenicidade tem sido observada com certa frequência e pode estar associada a fatores como baixa virulência do isolado, especificidade e tolerância do hospedeiro, além da variabilidade genética de cada um desses isolados (VESTERGAARD et al., 1995; ALVES, 1998). Moino Junior (1993), ao avaliar a patogenicidade de 72 isolados de *B. bassiana* para pragas de grãos armazenados, constatou uma grande variação nas mortalidades entre esses isolados. Dados semelhantes foram apresentados por Ramos (2001), Rossi (2002) e Tamai (2002), na seleção de fungos entomopatogênicos para mosca-branca (*B. tabaci*), ácaro-da-leprose (*B. phoenicis*) e ácaro-rajado (*T. urticae*), respectivamente.

4.2 Determinação da Concentração Letal Média (CL₅₀) para *B. bassiana*

Com a seleção do isolado Esalq-PL63, de *B. bassiana*, calculou-se a Concentração Letal Média (CL₅₀) aplicando-se diferentes concentrações de conídios do fungo sobre ninfas de *D. citri* de 2^o a 4^o ínstaes.

Foi possível observar a relação crescente da concentração x mortalidade obtida na média dos dois bioensaios (Figura 1).

Figura 1 - Mortalidade média (±EPM) das ninfas de *Diaphorina citri* causada por diferentes concentrações de conídios do isolado Esalq-PL63 de *Beauveria bassiana* após 7 dias da aplicação. Probit transformado ($\frac{\cdot}{\cdot}$) em porcentagem de mortalidade

Uma vez corrigida a mortalidade, foi feito o teste de Probit para se obter a concentração letal média (CL₅₀). De acordo com essa análise, a CL₅₀ obtida foi de $2,3 \times 10^7$, com intervalo entre $1,7 \times 10^7$ e $3,2 \times 10^7$ conídios/mL (Tabela 3).

Tabela 3 - Valores da concentração letal média (CL₅₀) do isolado Esalq-PL63 de *Beauveria bassiana* sobre ninfas de *Diaphorina citri*

Tratamento	n	SLOPE±SE	CL ₅₀	I.C. (95%) ^a	χ ²
Mortalidade	1002	0,245±0,173	2,3 x 10 ⁷	1,7 x 10 ⁷ - 3,2 x 10 ⁷	23,370 n.s.

^a significativo quando não houver sobreposição do intervalo de confiança (I.C.)

De acordo com as avaliações, picos de mortalidade foram observados a partir do 4º dia.

O tempo médio de mortalidade é consistente com os dados de outros trabalhos, uma vez que foi calculado em 4,71 dias (Figura 2), semelhante ao obtido por Boucias¹ (informação pessoal) que relata 7,4±0,7 dias para adultos e, 5.3±0.6 dias para ninfas a 25°C com 100% de umidade relativa para *Hirsutella* sp.. Favaro (2006), em seu estudo com *Beauveria* sp. sobre o psilídeo-de-concha *Glycaspis brimblecombei*, calculou o tempo médio em 4,86 dias, com picos de mortalidade a partir do 2º dia, enquanto que Puterka; Humber e Poprawski (1994) relataram o tempo médio de mortalidade por volta do 3º dia. Os isolados de Favaro e Puterka mostraram-se, portanto, mais virulentos.

Nota-se que 85% das mortes ocorreram entre o 4º e o 6º dia após a aplicação do fungo, corroborando com dados apresentados por Ramos (2001) para esse fungo sobre ninfas de *Bemisia tabaci*. Tanzini (2002), Lopes (1999) e Neves (1998) também constataram que os maiores índices de mortalidade com *B. bassiana* ocorrem após o 3º dia de inoculação.

¹BOUCIAS, D.G. Mensagem recebida por <lpadulla@esalq.usp.br> em 17 nov. 2006

Figura 2 - Porcentagem de mortalidade acumulada de ninfas de *Diaphorina citri* infectadas pelo isolado Esalq-PL63, durante os 7 dias de avaliação

4.3 Estudo do ciclo biológico de *Beauveria bassiana* (Esalq-PL63) em ninfas de *Diaphorina citri*

Ninfas pulverizadas apresentaram comportamento semelhante às ninfas sadias até a 72^a horas após aplicação. Decorridas 72 horas, as ninfas se tornaram mais lentas em seus movimentos e reflexos, quando tocadas levemente com a ponta de uma agulha. Com 96 horas, não apresentavam mais nenhuma mobilidade ou característica de inseto vivo, caracterizando, portanto, o início do processo de morte. Outro fato que levou a essa conclusão foi a alteração na coloração das mesmas, variando de amarelo para avermelhado, resultado da ação da micotoxina oosporina (ALVES, 1998). A mortalidade foi confirmada pela visualização dos tegumentos encurvados, bem como a não fixação das pernas e aparato bucal na planta hospedeira.

Nos dias posteriores, notou-se que as ninfas apresentaram sintomas semelhantes a uma desidratação, comprovados pelo arqueamento ventro-dorsal e visível perda de volume de seus corpos, sem qualquer indício de esporulação do fungo.

A comprovação do potencial de infectividade do isolado foi possível em microscopia de luz, pois houve a formação de corpos hifais e micélio no interior das ninfas, de acordo com o tempo decorrido da aplicação do patógeno (Figuras 3 a 5).

Figura 3 - Ninfas infectadas após 24 (A) e 48 horas (B), apresentando aspecto aparentemente normal

Figura 4 - Ninfas infectadas após 72 horas (A) e 96 horas (B), apresentando coloração róseo-avermelhada em função da colonização e produção de oosporina por *Beauveria bassiana*

Figura 5 - Ninfas com arqueamento dos corpos, após 96 horas, no sentido ventro-dorsal, semelhante a dessecação. Note em A ninfa sadia (S) comparada a ninfa infectada (I)

O fungo *B. bassiana* conseguiu desenvolver e colonizar apenas internamente *D. citri*. Assim, com 96 horas já foi possível a visualização de diversos corpos hifais crescendo no inseto, incluindo uma fase leveduriforme (Figura 6 a 9). Essa fase já foi descrita em meio artificial por Alves et al. (2002), comprovando sua patogenicidade para *Diatraea saccharalis* e *Tetranychus urticae*. Os corpos hifais permitem que os entomopatógenos persistam dentro de seus hospedeiros, de maneira livre na hemocele. Isto é possível, pois tais formas desenvolveram um mecanismo de interação com o hospedeiro, que altera a composição de sua parede celular (carboidratos e proteínas) para disfarçarem sua presença, evitando a resposta defensiva das células do sistema imunológico do inseto (BROWN; GORDON, 2005; GILLESPIE et al., 2000; PENDLAND; HUNG; BOUCIAS, 1993).

Figura 6 - Ninfã infectada apresentando corpos hifais e micélio de *Beauveria bassiana* em seu interior (após 96 horas)

Figura 7 - Corpos hifais e micélios de *Beauveria bassiana* presentes em ninfã de *Diaphorina citri* após 120 horas de inoculação

Figura 8 - Corpos hifais e micélios de *Beauveria bassiana* presentes em ninfa de *Diaphorina citri* após 144 horas de inoculação

Figura 9 - Corpos hifais e micélio de *Beauveria bassiana* presentes em ninfa de *Diaphorina citri* após 168 horas de inoculação

Em microscopia eletrônica de varredura foi possível visualizar algumas fases do processo de infecção de maneira mais detalhada, desde a adesão do patógeno até a sua penetração. O exoesqueleto do inseto atua como uma barreira físico-química contra organismos oportunistas e predadores. Fungos entomopatogênicos por sua vez, desenvolveram processos ou estratégias para superar essa barreira, como é o caso de *B. bassiana* que produz diversas enzimas para degradar a cutícula, possibilitando sua penetração. Dentre essas enzimas, destacam-se as proteolíticas e quitinolíticas, que ajudam o patógeno a penetrar e aceleram o processo de infecção (CHARNLEY; ST. LEGER, 1991; ST. LEGER; COOPER; CHARNLEY, 1986; 1991). Segundo esses autores, quando *B. bassiana* cresce sobre a cutícula de um inseto, há produção de quitinases e de β -N-acetilglucosamidase. Os fungos entomopatogênicos matam seu hospedeiro depois de um desenvolvimento limitado sobre o tegumento ou trato digestório, induzindo-o a toxemias, antes de uma invasão massiva aos órgãos internos (ROBERTS, 1966).

A união do patógeno à cutícula de um inseto hospedeiro pode ocasionar uma série de respostas em relação aos conídios, podendo não germinar; produzir tubo germinativo que não penetra o inseto; ocorrer a produção de conidióforos que produzem microconídios, conídios secundários e conídios adesivos; ou endurecimento de suas paredes para o surgimento de esporos de resistência (QUINTELA; MCCOY, 1998). Já o desenvolvimento de tubos germinativos e estruturas como os apressórios, produzidas pelos entomopatógenos de insetos terrestres, são formadas de acordo com a especificidade do hospedeiro, sendo influenciados pela superfície cuticular (BOUCIAS; PENDLAND, 1991).

Alguns estudos sugerem que os conídios que caem sobre regiões dos insetos muito esclerotizadas produzem tubos germinativos que crescem até encontrar regiões intersegmentares menos quitinizadas (SCHABEL, 1978; ROSAS; ALATORRE; VALDEZ, 1996). Segundo Wraight et al. (1990) os estímulos físico-químicos responsáveis por essa busca ainda são desconhecidos.

Para alguns hospedeiros, tem sido relatado que alguns entomopatógenos, incluindo *B. bassiana*, podem conter uma camada externa à parede celular dos conídios, denominada de "rodlet". Essa camada apresenta como principal função a

capacidade de interação e adesão do patógeno à cutícula do inseto, um processo passivo, mediado por interações eletrostáticas e hidrofóbicas (BOUCIAS; PENDLAND, 1991). Além disso, também confere certa resistência a enzimas e proteção contra a desidratação (BOUCIAS; PENDLAND; LATGE, 1988; BOUCIAS; PENDLAND, 1998). David (1967) sugeriu que essas modificações e interações ocorrem na epicutícula antes mesmo da formação do tudo germinativo.

A composição dessa camada, no entanto, é desconhecida, sendo provavelmente composta de moléculas de proteínas semelhantes às hidrofobinas (BOUCIAS; PENDLAND, 1991).

Logo após a aplicação do fungo, no início das observações (0h), notou-se a dispersão dos conídios sobre o tegumento das ninfas de maneira relativamente homogênea, principalmente em locais do exoesqueleto com a presença de orifícios naturais (Figura 10).

Figura 10a - Adesão dos conídios de *Beauveria bassiana* (Esalq-PL63) sobre a perna da ninfa de *Diaphorina citri* (0h)

Figura 10b - Adesão dos conídios de *Beauveria bassiana* (Esalq-PL63) sobre o tórax da ninfa de *Diaphorina citri* (0h)

Figura 10c - Detalhe da adesão dos conídios de *Beauveria bassiana* (Esalq-PL63) sobre o abdome da ninfa de *Diaphorina citri* (0h)

Depois de 48 horas da aplicação do fungo, ocorreu a penetração do tubo germinativo, perpendicularmente à superfície do tegumento (Figuras 12) e 13). Essa etapa do ciclo foi relativamente curta, pois os conídios se aderiram facilmente ao tegumento da ninfa, uma vez que a disposição do exoesqueleto favoreceu essa adesão e, conseqüentemente, a penetração do tubo germinativo através dessas aberturas naturais. Boucias; Pendland e Latge (1998) descreveram que os conídios tendem a penetrar locais da cutícula dos insetos onde existem pequenas setas do próprio tegumento, devido a maior hidrofobicidade e conseqüentemente, maior adesão desses conídios, também hidrofóbicos. A respeito disso, Boucias e Pendland (1991) afirmaram que a topografia e as propriedades químicas da epicutícula podem incrementar a adesão dos conídios e, conseqüentemente, a orientação do tubo germinativo.

Para Fargues (1984) o processo de adesão do conídio na cutícula do hospedeiro pode ser dividido em 3 etapas: a) adsorção, b) consolidação da adesão, e c) germinação do conídio e crescimento do tubo germinativo sobre a superfície cuticular até a penetração, podendo envolver mecanismos de reconhecimento específicos (como por exemplo, as glicoproteínas) e não-específicos (como forças eletrostáticas e hidrofobicidade).

A função primária de muitas enzimas associadas aos conídios, é de hidrolizar a camada cerosa da cutícula do hospedeiro, proporcionando acesso aos nutrientes necessários para a formação do tubo germinativo, além da penetração no inseto (BOUCIAS; PENDLAND, 1991).

No caso específico da penetração de *B. bassiana* no tegumento de *D. citri* não foi observada qualquer formação lateral do tubo germinativo, inferindo-se que a atividade metabólica foi muito intensa abaixo do conídio, com penetração vertical do tubo germinativo (Figura 11).

Figura 11 - Fases do processo incompleto de infecção e colonização de *Beauveria bassiana* em ninfas de *Diaphorina citri*

Figura 12a - Distribuição dos conídios de *Beauveria bassiana* (Esalq-PL63) no tegumento do abdome da ninfa de *Diaphorina citri* (48 h)

Figura 12b - Penetração de *Beauveria bassiana* (Esalq-PL63) pelos orifícios do tegumento do abdome da ninfa de *Diaphorina citri* (48 h)

Figura 12c - Penetração de *Beauveria bassiana* (Esalq-PL63) nos orifícios distais do tegumento do abdome da ninfa de *Diaphorina citri* (48 h)

Figura 13a - Penetração de *Beauveria bassiana* (Esalq-PL63) na perna de ninfa de *Diaphorina citri* (72 h)

Figura 13b - Penetração de *Beauveria bassiana* (Esalq-PL63) no tórax de ninfa de *Diaphorina citri* (72 h)

Figura 13c - Detalhe do conídio de *Beauveria bassiana* (Esalq-PL63) no tórax de ninfa de *Diaphorina citri* (72 h)

Figura 13d - Penetração de *Beauveria bassiana* (Esalq-PL63) na parte distal do abdome de ninfa de *Diaphorina citri* (72h)

Figura 13e - Detalhe de conídios de *Beauveria bassiana* (Esalq-PL63) em processo de germinação no tórax de ninfa de *Diaphorina citri* (72h)

Diferentemente do que acontece com a maioria dos insetos, *B. bassiana* não consegue esporular sobre o tegumento de ninfas de *D. citri*, mas sua conidiogênese pode ocorrer sobre adultos (PADULLA et al., 2005). Comportamento semelhante nas ninfas deste inseto também foi citado por Subandiyah et al. (2000) com os fungos *Hirsutella citriformis* e *Paecilomyces fumosoroseus*, na Indonésia. De acordo com Boucias (1998), pouco se sabe sobre a dispersão dos patógenos dentro dos insetos hospedeiros. De maneira geral, patógenos que causam infecções localizadas provocam doença crônica nos hospedeiros. Durante o processo de infecção, os patógenos têm a capacidade de evitar e/ou suprimir os mecanismos de defesa celular e humoral do inseto infectado.

Boucias² (informação pessoal) analisando infecção de adultos do psíldeo por *H. citriformis*, constatou a existência de corpos hifais septados na hemolinfa dos mesmos, além de observar comportamento típico da doença, como falta de movimentação e letargia. Durante suas coletas na Flórida, encontrou apenas adultos colonizados pelo fungo *H. citriformis*. Porém, em testes de laboratório, observou que hifas brancas emergiam inicialmente de regiões intersegmentais das pernas das ninfas, cobrindo posteriormente toda a superfície dorsal do inseto. A capacidade de penetração desse patógeno por inúmeros locais do corpo do inseto sugere que ele se utiliza da hemolinfa como fonte nutritiva durante seu crescimento vegetativo. Tal trabalho foi consistente com os dados de Étienne et al. (2001) em relação ao mesmo patógeno.

Segundo Boucias e Pendland (1998), a patogenicidade de um fungo varia, dependendo de uma série de fatores que podem ditar o sucesso no desenvolvimento da doença dentro do hospedeiro. Ainda que o conídio do fungo seja capaz de aderir à cutícula do inseto, ele pode não germinar por alguns motivos, incluindo condições ambientais de baixa umidade ou a presença de fatores na cutícula que inibem a ação desse patógeno. Segundo Alves (1998), *B. bassiana* apresenta infecção via tegumento, com germinação entre 12 a 18 horas após aplicação, podendo ser também via oral e sistema respiratório. Se germinar, a penetração pode não ocorrer se, por exemplo, faltarem enzimas necessárias para romper a cutícula. Na seqüência, o crescimento do tubo germinativo pode ser inibido por compostos produzidos pelo hospedeiro.

---

²BOUCIAS, D.G. Mensagem recebida por <lpadulla@esalq.usp.br> em 17 nov. 2006

A etapa inicial do processo de infecção do inseto pelo fungo envolve a interação entre o propágulo infectivo (conídio) e a cutícula, que é uma barreira que constitui o primeiro fator de resistência à invasão, sendo significativamente determinante à patogenicidade.

A pressão mecânica exercida pela extremidade da hifa pode superar essa resistência da cutícula e é essencial para a penetração na ausência de enzimas ou em locais mais esclerotizados da cutícula, ou seja, menos suscetíveis à atividade enzimática. Para *B. bassiana*, a penetração via tegumento ocorre devido à ação mecânica e enzimática (ALVES, 1998). Essa pressão ocorre, provavelmente, por um ganho de água, que é gerado pelo turgor osmótico das células, responsável também pela força produzida pela extremidade da hifa. Existem algumas explicações sobre o efeito da ruptura cuticular e a patogenicidade dos fungos. O rompimento dessa barreira causa uma desidratação crônica do inseto, uma vez que uma das principais funções dessa cutícula é evitar a perda de água. Além disso, favorece os fungos de várias maneiras, como por exemplo, debilitando o inseto ou até mesmo aumentando a umidade ao redor do conídio aderido, favorecendo sua fisiologia (CHARNLEY, 1997).

A cutícula do inseto também pode ter substâncias que são importantes para a adesão e germinação do fungo, podendo agir de maneira tóxica, fungistática ou estimulante (GILLESPIE et al., 2000). Aminoácidos, peptídeos e vários açúcares (manose, glucose, glucosamina) podem cobrir a superfície da epicutícula e servir de local de recolhimento ou adesão para propágulos infectivos ou podem estimular o crescimento do tubo germinativo. Compostos encontrados na superfície da cutícula dos insetos, como os ácidos graxos de cadeia longa, lanolina e hidrocarbonetos podem ser utilizados por *B. bassiana* como fontes energéticas para a germinação do conídio (SMITH; GRULA, 1981).

De maneira oposta, outras substâncias como os exudatos microbianos na epicutícula e compostos aromáticos endógenos da cutícula, podem agir como agentes anti-fúngicos e inibirem a germinação. Assim, tanto a cutícula pode influenciar negativamente o crescimento do fungo, inviabilizando a expressão da doença, como algumas características do patógeno são igualmente importantes para iniciar a infecção do hospedeiro. Evlakhova e Shekhurina (1963) relataram que extratos de éter da

cutícula do hemíptero *Eurygaster integriceps* diminuem a germinação dos conídios e o crescimento micelial de *B. bassiana*. O ácido caprílico, principal ácido graxo livre da superfície cuticular de *Heliothis zea* e *Spodoptera frugiperda*, também tem uma ação fungistática, podendo inibir a germinação dos conídios (SMITH; GRULA, 1982).

Após a adesão e penetração do tubo germinativo, o fungo cresce diretamente na cutícula e nas regiões epidérmicas em sentido à hemocèle. Em *B. bassiana* o inseto encontra-se totalmente colonizado após 72 horas da inoculação, sendo o tecido gorduroso bastante atacado, seguido do tecido intestinal e tubos de Malpighi (ALVES, 1998). Antes mesmo que o fungo atinja a hemocèle, ocorre a ativação das respostas imunológicas do inseto, podendo ser tanto celular como humoral. No primeiro caso pode ocorrer a fagocitose dos microrganismos pelos hemócitos, bem como a formação de nódulos e encapsulação. Já a resposta humoral corresponde à produção de anticorpos e respostas específicas, como o sistema de ativação da phenoloxidase, liberação de proteínas imunológicas e antifúngicas. Sua existência, no entanto, ainda é muito discutida nos insetos, sendo aceita como um fator complementar da defesa celular (ALVES, 1998).

Patógenos intracelulares precisam crescer dentro do hospedeiro para causar a doença. O potencial de replicação está na habilidade do entomopatógeno em encobrir os vários mecanismos de defesas do hospedeiro, além da capacidade de extrair os nutrientes essenciais para seu desenvolvimento (GILLESPIE et al., 2000). É nessa etapa que o entomopatógeno forma os blastósporos e corpos hifais, em resposta ao sistema de defesa do inseto. Atividades de respostas imunológicas do hospedeiro podem limitar o crescimento fúngico. Porém, a capacidade de se evitar essas respostas tornam tais fungos efetivos patógenos, possibilitando que esses completem seu desenvolvimento dentro do inseto.

Para Gunnarsson (1988) é possível que a penetração do fungo seja acompanhada pela produção de compostos solúveis do hospedeiro que estimulariam a migração e adesão dos hemócitos em direção a este patógeno, devido ao quimiotactismo positivo. Esses mesmos compostos também são responsáveis pela redução do número de hemócitos circulantes, pois permitem a constante entrada de microrganismos (bactérias, por exemplo) pelas aberturas proporcionadas pelo fungo.

Assim, a constante replicação do entomopatógeno junto a presença dessas bactérias pode exigir uma maior mobilização dos hemócitos circulantes (HUNG; BOUCIAS, 1992).

A imunidade dos entomopatógenos requer que sejam reconhecidos pelo hospedeiro como não-alvos. Para isso, esse processo envolve a ligação de moléculas da parede celular. De acordo com Pendland e Boucias (1996) a ligação específica de carboidratos-lectina aos oligossacarídeos da cadeia das glicoproteínas nos hemócitos e superfícies dos fungos é importante na projeção da imunidade do inseto. A suscetibilidade à fagocitose, aglutinação e encapsulação dependerá da presença de receptores específicos de lectina na parede celular do fungo, os quais são ausentes nas formas iniciais dos mesmos (formas leveduriformes). Pendland, Hung e Boucias (1993) relatam que em muitos estudos, blastósporos e conídios produzidos *in vitro* são ingeridos e encapsulados pelos hemócitos, enquanto que os corpos hifais não são reconhecidos. Para Vilcinkas, Matha e Gotz (1997) a fagocitose de corpos hifais de *M. anisopliae* pode ocorrer na hemocela de *Galleria mellonella*. Esse fungo, no entanto, consegue crescer dentro deste plasmócito deformando sua membrana celular e, posteriormente, favorecendo a inibição fagocítica, permitindo a ocorrência livre desses corpos hifais.

Para *B. bassiana* os blastósporos são fagocitados inicialmente, mas conseguem emergir dessas células hospedeiras e continuar sua propagação devido a eliminação de moléculas da parede celular que estão associadas ao reconhecimento por parte do hospedeiro, o que evita a ativação imunológica (MAZET; BOUCIAS, 1996). Pendland, Hung e Boucias (1993) concluíram que, no caso de *B. bassiana*, a ausência de alguns elementos importantes (como proteínas) faz com que essas células fúngicas escapem do reconhecimento hospedeiro e, conseqüentemente, da fagocitose. Fragmentos de hifas e blastósporos, que possuem em suas paredes celulares mais carboidratos, favorecem o reconhecimento pelo sistema de defesa do hospedeiro, enquanto que as fases leveduriformes, possuidoras de menos carboidratos nessa superfície, não são reconhecidas.

Acredita-se que isso seja possível pela ação concomitante de metabólitos secundários, como as beauverolidas, ciclosporinas e destruxinas. No caso de *B.*

bassiana o crescimento na hemolinfa de *Spodoptera exigua* é associado à secreção de toxinas, que inibem a dispersão dos hemócitos, diminuindo o número de granulócitos e plasmócitos circulantes na hemolinfa (HUNG, BOUCIAS, 1992).

Paralelamente, o sistema imunológico secreta substâncias antibióticas que impedem a desintegração do tecido pelo patógeno (BOUCIAS; PENDLAND, 1998). Os mesmo autores relataram que o grande crescimento vegetativo do fungo, geralmente por replicações de corpos hifais ou blastósporos, ocorre na hemocele. Nutrientes da hemolinfa e corpos gordurosos são consumidos e esgotados pelo excessivo crescimento fúngico, podendo nesta etapa causar a morte do inseto pela falta de alimento. Além disso, os fungos produzem metabólitos (micotoxinas) que podem debilitar e matar o inseto.

Essas toxinas são produzidas por uma série de fatores, podendo ser determinadas pelos nutrientes e interações do fungo, o clima, a resistência do hospedeiro e disponibilidade do substrato e também em resposta ao uso de agentes antifúngicos (LACEY, 1985).

A morte do inseto pode ocorrer tanto pela ação de micotoxinas que podem, por exemplo, reduzir a atividade dos hemócitos, como por mudanças patológicas na hemocele, ação histolítica, bloqueio mecânico do aparelho digestório devido ao crescimento vegetativo e outros danos físicos em decorrência do crescimento de micélio e do início do processo de esporulação pelo fungo, que, entrando em contato com novos insetos, iniciam um novo ciclo. Sabe-se, por exemplo, que a destruxina, toxina produzida pelo fungo *M. anisopliae* inibe a resposta celular do sistema imunológico dos insetos, atuando diretamente nos processos de fagocitose e nodulação (VILCINSKAS; MATHA; GOETZ, 1997). Sob condições adversas, pode não ocorrer a formação de micélios e esporulação após a morte do hospedeiro, originando estruturas de resistência como os clamidósporos dentro do cadáver (ALVES, 1998).

Dentre essas toxinas, a mais conhecida em *B. bassiana* é a oosporina, responsável pela coloração rosa-avermelhada em insetos infectados (ALVES, 1998). Destacam-se também a beauvericina, bassionolida e ciclosporina-A, que agem com agentes antimicrobianos, podendo prevenir o crescimento bacteriano e putrefação do inseto atacado, o que permite que o fungo complete seu ciclo no cadáver do

hospedeiro. De acordo com Strasser (2000) a quantidade de metabólitos produzidos *in vivo* é muito menor do que a produção em meio de cultura.

A oosporina é uma dibenzoquinona produzida por fungos de solos e entomopatógenos do gênero *Beauveria* (VINING; KELLER; SCHWARTING, 1962; STRASSER, 2000). Essa toxina atua com as proteínas e aminoácidos por reações do tipo redox, oxidando os mesmos, o que resulta no mal funcionamento enzimático do inseto (WILSON, 1971). Essa micotoxina inibe mais de 50% das membranas dos eritócitos e a atividade da ATPase, enzima responsável pela liberação de energia. A inibição da atividade dessa enzima não é específica, sendo provavelmente uma consequência da ruptura da membrana, quando este pigmento causa alterações na morfologia dos eritrócitos, originando várias lises celulares (JEFFS; KHACHATOURIANS, 1997).

Uma outra toxina de *B. bassiana* é a beauvericina, que é uma hexadepsíptida que forma complexos de íons Na⁺ e K⁺, o que permite o aumento da permeabilidade natural e artificial das membranas. Também mostra atividade antibiótica contra algumas bactérias como *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium phlei*, *Sarcinea lútea*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus faecalis* (OVCHINNIKOV; IVANOV; MIKHALEVA, 1971). Alguns trabalhos registram que essa toxina não possui toxicidade à insetos, enquanto outros afirmam que a propriedade inseticida é moderada (CHAMPLIN; GRULA, 1979; GUPTA; MONTILLOR; HWANG, 1995).

Bassianolida, um ciclo-octapsíptido, também atua como um ionóforo, com atividade antibiótica (SUSUKI et al., 1977). As outras toxinas de *B. bassiana* são a bassianina e tenellina, ambas não peptídicas, que também atuam inibindo a ATPase das membranas dos eritócitos (JEFFS; KHACHATOURIANS, 1997).

Um outro metabólito secundário denominado ciclosporina-A, mesmo que sem uma ação direta conhecida sobre os insetos, também tem uma importante atividade na patogenicidade. Essa substância pode reduzir o número de filopódios produzidos pelos hemócitos e assim, suprimir a defesa de imunidade, que rompe a metamorfose (MAZET; HUNG; BOUCIAS, 1994).

Além dessas toxinas, cristais de oxalato de magnésio e cálcio têm sido relatados em insetos infectados por *B. bassiana*, provavelmente relacionados à atividade de toxicidade do fungo (AMARAL; ALVES, 1979; TAMAI, 2002).

Segundo Alves (1998), a relação fungo-hospedeiro depende das condições ambientais, tais como temperatura, umidade, luz, radiação ultravioleta, bem como condições nutricionais e suscetibilidade do hospedeiro. Os locais preferenciais de penetração dos fungos entomopatogênicos são o aparelho bucal, espiráculos, ânus, sistema respiratório e tarsos, bem como as membranas intersegmentais do abdome.

O fungo *B. bassiana* causou cerca de 72% mortalidade em ninfas de *D. citri* depois de 7 dias de inoculação, sendo assim um importante agente para o controle deste inseto. Esse mesmo isolado (Esalq-PL63) foi testado por Ramos (2000) em ninfas de *B. tabaci*, cuja eficiência foi de 78,2% em seu controle.

Favaro (2006) obteve em sua pesquisa mortalidade corrigida de 69,3% ao 10º dia após inoculação de $1,5 \times 10^7$ conídios/mL de *Beauveria* sp. sobre ninfas de 5º instar e adultos do psilídeo-de-concha, *Glycaspis brimblecombei*. Aplicando dois isolados de *B. bassiana* sobre o psilídeo-da-pêra, *Cacopsylla pyricola*, na concentração de 1×10^7 conídios/mL, Puterka, Humber e Poprawski (1994) relataram mortalidades superiores a 90% após 7 dias de inoculação.

Mesmo não apresentando conidiogênese sobre as ninfas, esse entomopatógeno mostrou-se como um potencial agente de controle biológico para ninfas de *D. citri* pois, além de causar mortalidade considerável, afetou a fisiologia do inseto, impedindo a metamorfose entre os estágios (Figura 14). Cerca de 11,6% das ninfas apresentaram mortalidade durante o processo de ecdise.

Figura 14 - Ninfas mortas de *Diaphorina citri* infectadas por *Beauveria bassiana* (Esalq-PL63) durante processo de ecdise

Além da comprovação visual, o reisolamento desse fungo, comprovado por meio de observações em microscopia, foi possível utilizando-se meio completo (MC), batata-dextrose-água (BDA) e ágar nutritivo (AN) (Figura 15). Com 72 horas de incubação em B.O.D., as placas que tiveram os insetos plaqueados diretamente apresentaram o crescimento do fungo. Para as placas estriadas com a suspensão de ninfas maceradas em água estéril mais espalhante adesivo, o crescimento também ocorreu, porém em menor intensidade.

Figura 15 - Reisolamento do fungo *Beauveria bassiana* em meio de cultura MC, AN e BDA, respectivamente

Com exceção do meio de cultura BDA, para todos os outros, foi possível a visualização de colônias uniformes de bactérias do tipo *coccus* crescendo concomitantemente ao fungo quando o material reisolado partiu de ninfas maceradas (Figura 16a). Essa bactéria também foi isolada a partir de ninfas sadias (Figura 16b).

Figura 16a - Bactérias presentes nas amostras de ninfas de *Diaphorina citri* tratadas, maceradas e estriadas em meio de cultura MC. Em B, detalhe das colônias

Figura 16b - Bactérias presentes nas amostras de ninfas sadias, maceradas e estriadas em meio de cultura AN. Em B, detalhe das colônias

Essas bactérias podem ser tanto simbioses presentes no interior dos insetos como agentes saprófagos e/ou oportunistas que se aproveitam da ruptura do tegumento proporcionada pelo fungo, ou até mesmo do direcionamento das células de defesa do corpo do inseto para esse microrganismo. Com isso e com baixa suscetibilidade aos antibióticos produzidos pelo fungo, as ninfas tornam-se colonizadas por essas bactérias. A não proliferação de um entomopatógeno na hemocela de um inseto é rara, podendo ocorrer por algumas razões, mas a ocorrência de contaminantes, como bactérias entéricas, pode ocorrer mesmo se o hospedeiro morrer pela ação do fungo (SHIMAZU, 1994).

As avaliações sobre as bactérias encontradas nas ninfas, através de coloração de Gram, mostraram que essas apresentaram a coloração avermelhada, caracterizando bactérias gram-negativas (Figura 17). Tanigushi et al. (1984) relataram que a oosporina produzida pelo fungo age como um antibiótico potente contra bactérias gram positivas, tendo pouco efeito sobre as bactérias gram negativas. Assim, mesmo que o isolado Esalq-PL63 tenha produzido oosporina, esta não exerceu função inibitória do crescimento das mesmas.

Testes de inibição da bactéria sobre fungo por meio da formação de halos em meio de cultura AN e MC, não comprovaram esse efeito negativo. Além de outros fatores, isso pode estar relacionado à solubilidade dessas toxinas nos componentes do meio de cultura.

Por algum motivo, o crescimento desses microrganismos inibe parte do processo de colonização, crescimento e esporulação do fungo sobre o inseto. Ainda que o fungo se faça presente, a presença da bactéria afeta seu crescimento, o que pode ser observado pela não esporulação do mesmo. O isolamento em meio de cultura (AN) e quantificação dessas bactérias mostrou que elas estão presentes em cerca de 95% de ninfas sadias.

Figura 17 - Bactérias Gram negativas isoladas de ninfas de *Diaphorina citri*

A camada de “rodlet” do fungo *B. bassiana*, difícil de ser visualizada, além da importante função na ligação do conídio ao tegumento do hospedeiro, permite a proteção contra a desidratação e ataque de outros microrganismos (BOUCIAS; PENDLAND; LATGE, 1988). Assim, as bactérias isoladas provavelmente sejam do próprio inseto, ocorrendo normalmente em seu interior.

Outro aspecto favorável para essa hipótese é o fato de o fungo *B. bassiana* ser resistente às diferentes respostas do sistema de defesa de seus hospedeiros, conforme foi observado por Hung, Boucias e Vey (1993), estudando o efeito deste entomopatógeno sobre larvas de *S. exigua*. Por mais que os blastósporos tenham sido envolvidos pelos granulócitos via fagocitose, o fungo conseguiu superar essa barreira, crescendo rapidamente fora desses nódulos e produzindo novas células que, por sua vez, não são reconhecidas pelas defesas do inseto, permitindo a completa dispersão e

infecção do patógeno pela supressão de todo o processo complementar de defesa celular do hospedeiro. Hung e Boucias (1992) sugeriram que esta inibição do sistema de defesa ocorre em virtude dos metabólitos citotóxicos do fungo, tais como a oosporina, produzidos na fase inicial do crescimento vegetativo de *B. bassiana*. Assim, a não esporulação de *B. bassiana* nas ninfas de *D. citri* seria em função de uma competição direta deste fungo com microrganismos oportunistas dessa imunossupressão.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O isolado Esalq-PL63 de *Beauveria bassiana* é promissor para o controle microbiano de ninfas de *D. citri*;
- *B. bassiana* (Esalq-PL63) afeta a fisiologia das ninfas, impossibilitando a metamorfose;
- Apesar de não causar mortalidade muito rápida, ficou evidente a ação concomitante do fungo entomopatogênico com algumas bactérias na mortalidade das ninfas;
- A capacidade do fungo *B. bassiana* em superar as defesas naturais dos hospedeiros pode fazer com que este patógeno deprime o sistema imunológico, possibilitando a entrada de microrganismos oportunistas, que colonizam o inseto, não permitindo o desenvolvimento completo do patógeno;
- Faz-se necessário novos estudos, mais aprofundados, dessa relação do fungo com outros microrganismos, presentes no inseto ou não, de maneira a possibilitar um maior entendimento para a aplicação de produtos microbianos de maneira mais eficiente.

REFERÊNCIAS

- ALTAMIRANO, D. M.; GONZALES, C. I.; VIÑAS, R. C. Analysis of the devastation of leaf-mottling (greening) disease of citrus and its control program in the Philippines. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS, 7., 1976, Riverside. **Proceedings...** Riverside, 1976, p. 22-26.
- ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. 1163p.
- ALVES, S.B.; HUMBER, R.; LOPES, R.B.; TERSI, F.E.; PADULLA, L.F.L. Ocorrência da doença salmão-da-ortézia causada por um hifomiceto entomopatogênico. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 2004, Gramado. **Anais...** Gramado, 2004, p. 279.
- ALVES, S.B.; ROSSI, L.S.; LOPES, R.B.; TAMAI, M.A.; PEREIRA, R.M. *Beauveria bassiana* yeast phase on agar medium and its pathogenicity against *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) and *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, Riverside, v.81, p. 70-77, 2002.
- AMARAL, E.; ALVES, S.B. **Insetos úteis**. Piracicaba: Livrocere. 1979. 192p.
- ASHIRARA, W. Survival os Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama adults under winter temperature conditions in central and South Kyushu. **Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology**, Tokyo, v.48, n.3, p.207-211, 2004.
- AUBERT, B. Progrés accomplis dans la lutte contre le greening des citrus à la Réunion. **Revue Agricole et Sucrière de l'île Maurice**, Montpellier, n.58, p. 53-56, 1979.
- AUBERT, B. *Trioza erytreae* Del Guercio and *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae), the two vectors of citrus greening disease: biological aspects and possible control strategies. **Fruits**, Montpellier, n.42, p. 149-62, 1987.
- AUBERT, B. **Le greening, une maladie infectieuse des agrumes d'origine bactérienne, transmise par des Homoptères psyllides**, St. Pierre: IRFA/CIRAD 1987. 185p.
- AUBERT, B.; GARNIER, M.; GUILLAUMIN, D.; HERBAGYANDODO, B.; SETIOBUDI, L.; NURHADI, F. Greening, a serious threat for the citrus production of the Indonesian archipelago. Future prospects of integrated control. **Fruits**, Montpellier, n.40, p.549-563, 1985.
- AUBERT, B.; SABINE, A.; GESLIN, P.; PICARD, L. Epidemiology of the greening disease in Reunion Island before and after the biological control of the African and Asian citrus psyllas. In: INTERNATIONAL SOCIETY OF CITRICULTURE, 1., 1984, São Paulo. **Proceedings...** São Paulo, 1984. p. 440-442.
- BHAVAKUL, K.; INTAVIMOLSRI, S.; VICHITRANANDA, S.; KRATUREUK, C.; PROMMINTARA, M. 1981. The current citrus disease situation in Thailand with emphasis on citrus greening. In: INTERNATIONAL SOCIETY OF CITRICULTURE, 1., 1981, São Paulo. **Proceedings...** São Paulo, 1981. p. 464-466.
- BING, L.A; LEWIS, L.C. Endophytic *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin in corn: the influence of the plant growth stage and *Ostrinia nubilalis* (Hubner). **Biocontrol Science and Technology**, London, n.2, p.39-47, 1992.

BOUCIAS, D.G.; PENDLAND, J.C. Attachment of mycopathogens to cuticle. The initial event of mycoses in arthropod hosts. In: COLE, G.T.; HOCH, H.C. (Ed.). **The fungal spore and disease initiation in plants and animals**. New York: Plenum Press, 1991. p.101-127.

BOUCIAS, D.G.; PENDLAND, J.C. **Principles of insect pathology**. Massachusetts: Kluwer Academic, 1998. 550p.

BOUCIAS, D.G.; STOKES, C.; STOREY, G.; PENDLAND, J. Effect of imidacloprid on both the termite, *Reticulitermes flavipes* and its interaction with insect pathogens. **Pflanzenhutz-Natuchten Bayer**, Berlin, n.49, p.103-144, 1996.

BOUCIAS, D.G.; PENDLAND, J.C.; LATGE, J.P. Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic Deuteromycetes to host insect cuticle. **Applied and Environmental Microbiology**, Birmingham, v.54, n.7, p.1795-1805, 1988.

BOVÉ, J. M. ; AUBERT, B. Report on virus and virus-like diseases of Citrus in Saudi Arabia, with special reference to Citrus greening. Rome: FAO, 1984. 33p.

BOVÉ, J. M.; GARNIER, M. Citrus greening and psylla vectors of the disease in the Arabian Peninsula. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 9., 1984, Riverside. **Proceedings**...Riverside, 1984. p. 109-114.

BOVÉ, J. M.; GARNIER, M. Phloem-and xylem-restricted plant pathogenic bacteria. **Plant Science**, Amsterdam, n.164, p. 423-438, 2002.

BOVÉ, J. M.; CALAVAN, E. C.; CAPOOR, S. P.; CORTEZ, R.E.; SCHWARZ, R. E. Influence of temperature on symptoms of California stubborn, South Africa greening, India citrus decline, and Philippines leaf mottling diseases. In: WEATHERS, L. G.; COHEN, M. (Ed.). In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 6., 1974, Richmond. **Proceedings**...Richmond, 1974. p. 12-15.

BROWN, G.D.; GORDON, S. Immune recognition of fungal β -glucans. **Cellular Microbiology**, London, n.7, p.471-479. 2005.

BUTT, T.M.; WRAIGHT, S.P.; GALAINI-WRAIGHT, S.; HUMBER, R.A.; ROBERTS, D.W.; SOPER, R.S. Humoral encapsulation of the fungus *Erynia radicans* (Entomophthorales) by the potato leafhopper, *Empoasca fabae* (Homoptera: Cicadellidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, Riverside, n.52, p.49-56, 1988.

CAPPOR, S. P., RAO, D. B.; VISWANATH, S. M. *Diaphorina citri*, a vector of the greening disease of citrus in India. **Indian Journal of Agricultural Science**, Nova Delhi, n.37, p. 572-576, 1967.

CATLING H. D. Factors regulating populations of psyllid vectors of greening. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 5., 1972, Riverside. **Proceedings**...Riverside, 1972. p. 51-57.

CATLING H. D. Results of a survey for psyllid vectors of citrus greening disease in Reunion. **FAO Plant Protection Bulletin**, Rome, n.21, p.78-82, 1973.

CATLING, H. D.; ATKINSON, P. R. Spread of greening by *Trioza erytreae* (Del Guercio) in Swaziland. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 6., 1974, Richmond. **Proceedings...**Richmond, 1974. p. 33-39.

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**, Rome, n.18, p.8-15, 1970.

CATLING, H. D. The bionomics of the South African citrus psylla, *Trioza erytreae* (Del Guercio) (Homoptera: Psyllidae) 3. The influence of extremes of weather on survival. **Journal of the Entomological Society of Southern Africa**, Pretoria, n.32, p.273-90, 1969.

CERMELI M, MORALES P, GODOY F. Presencia del psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) en Venezuela. **Boletín de Entomología Venezolana**, Maracay, n.15, v.2, p.235-243, 2000.

CHAMPLIN, F.R.; GRULA, E.A. Noninvolvement of beauvericin in the entomopathogenicity of *Beauveria bassiana*. **Applied and Environmental Microbiology**, Herndon, n.37, p.1122-1125, 1979.

CHARNLEY, A.K. Physiological aspects of destructive pathogenesis in insects by fungi. In: Anderson, J.M.; Rayner, A.D.M.; Walton, D.W.H. (Ed.). **Invertebrate microbial interactions**. Cambridge: Cambridge University Press, 1997. p.229-270.

CHARNLEY, A.K.; ST. LEGER, R.J. The role of cuticle-degrading enzymes in fungal pathogenesis in insects. In: COLE, G.T.; HOCH, H.C. (Ed.). **The fungal spore and disease initiation in plants and animals**. New York: Plenum Press, 1991. p.267-286.

CHEMMA, S.S.; KAPUR, S.P. *Murraya paniculata* Linn. – a new host for *Diaphorina citri* Kuwayama. Short Scientific Notes. 1975. **Current Science**, v.44, n.7, p.249. Disponível em <http://www.ias.ac.in/j_archive/currsci/44/vol44contents.html>. Acesso em: 22 jan. 2007.

CHEN, C. N. Ecology of the insect vectors of citrus systemic diseases and their control in Taiwan, 2001. Disponível em <www.fftc.agnet.org/library/article/eb459a.html>. Acesso em: 22 jan. 2007.

CHEN, M. S.; MIYAKAWA, T.; MATSUI. Citrus likubin pathogens in the salivary glands of *Diaphorina citri* Kuw. **Phytopathology**, New York, v.63, n.9, p.194-195, 1972.

CHIEN, C. C. The role of parasitoids in the pest management of citrus psyllid. In: SYMPOSIUM ON RESEARCH AND DEVELOPMENT OF CITRUS IN TAIWAN, 1995, Taiwan. **Proceedings...**Taiwan, 1995. p. 245-261.

CHIU, S. C.; AUBERT, B.; CHIN, C. C. Attempts to establish *Tetrastichus radiatus* Waterson (Hymenoptera, Chalcidoidea), a primary parasite of *Diaphorina citri* Kuwayama, in Taiwan. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 10., 1988, Richmond. **Proceedings...**Richmond, 1988. p. 265-268.

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

COORDENADORIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Instrução Normativa-32**. São Paulo, 29 set. 2006

COSTA LIMA, A. M. **Homopteros. Insetos do Brasil** 3: 1-327, 1942. Esc. Na. Agron. Min.

DAS, A.K.; SHIVANKAR, V.J.; SINGH, S. Presence of citrus (citrus species) greening disease (*Candidatus Liberibacter asiaticum*) and its psyllid vector (*Diaphorina citri*) in Maharashtra. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, Nova Delhi, v.72, n.3, p. 188-191, 2002.

DAVID, W.A.L. The physiology of insect integument in relation to the invasion of pathogens. In: Beament, S.W.L.; Treherne, S.E. (Ed.). **Insects and physiology**. Edinburg: Oliver and Boyd, 1967. p.17-35

DEACON, V. E.; van den BERG; SUTHERLAND, B. A further comparison of chitin synthesis inhibitors for the control of Trioza erytreae (Hemiptera: Triozidae) in South Africa. **Tests of Agrichemicals and Cultivars**, London, v.10, p.6-7, 1989.

ÉTIENNE, J.; BURCKHARD, D.; GRAPIN, C. *Diaphorina citri* (Kuwayama) em Guadalupe, premier signalement pour les Caraïbes (Hem: Psyllidae). **Bulletin de la Société Entomologique de France**, Paris, v. 103, n.1, p. 32, 1998.

ÉTIENNE, J.; QUILICI, S.; MARIVAL, D.; FRANCK, A. Biological control of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in Guadeloupe by imported *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae). **Fruits**, Montpellier, n.56, p. 307-315, 2001.

EVLAKHOVA, A.A.; SHEKHURINA, T.A. Antifungal action of the cuticle of *Eurygaster integriceps*. **Academy URSS**, Moscow, n.148, p. 977-978.

FARGUES, J. Adhesion of the fungal spore to the insect cuticle in relation to pathogenicity. In: Roberts, D.W.; Aist, J.R. (Ed.). **Infection process of fungi**. Rockefeller Foundation Conference Report, p. 90-100, 1984.

FARGUES, J.; GOETTEL, M.S.; SMITS, N.; QUEDRAOGO, A.; ROUGICI, M. Effect of temperature on vegetative growth of *Beauveria bassiana* isolates from different origins. **Mycologia**. Albuquerque, n.89, p. 383-392, 1997.

FAVARO, R.M. **Aspectos bionômicos de *Glycaspis (Glycaspis) brimblecombei* (Moore, 1964) (Hemiptera: Psyllidae) e seu controle com fungos entomopatogênicos**. 2006. 53p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

FERNANDES, N. G. Combate ao greening em citros necessita de legislação específica. **Visão Agrícola**, Piracicaba, n.1, p.2, p.40-42, 2004.

FISHER, R.A.; YATES, F. **Tabelas estatísticas para biologia, medicina e agricultura**. São Paulo:Ed. da Universidade de São Paulo/Ed. Polígono. 1971. 150p.

FLOYD, J.; KRASS, C. **Huanglongbing citrus greening disease. New pest response guidelines**. USDA, APHIS, PPQ, 2006. 84p. Disponível em: <www.aphis.usda.gov/plant_health/plant_pest_info/citrus_greening/downloads/pdf_files/hlb-pubversion.pdf>. Acesso em: 24 nov. 2006.

FNPC CONSULTORIA & COMÉRCIO. **Agrianual 2006 – anuário da agricultura brasileira**. São Paulo, 2006. p.257-270.

FUNDECITRUS. 2005. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br>>. Acesso em: 15 maio 2006.

FUNDECITRUS. **Revista do Fundecitrus** - Edição 134 - junho/agosto de 2006. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/revista.html>>. Acesso em: 25 jan. 2007.

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

GARNIER, M.; BOVÉ, J.M. Transmission of the organism associated with citrus greening disease from sweet orange to periwinkle by dodder. **Phytopathology**, New York, v.73, n.10, p.1358-1363, 1983.

GARNIER, M.; JAGOUÉIX-EVEILLARD, S.; CRONJE, P. R.; ROUX, H.F.; BOVÉ, J. M. Genomic characterization of a *Liberibacter* present in an ornamental rutaceous tree, *Calodendrum capense*, in the Western Cape Province of South Africa. Proposal of '*Candidatus Liberibacter africanus* subsp. *capensis*'. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, n.50, p. 2119-25, 2000.

GAVARRA, M. R.; MERCADO, B. G. Progress report on studies dealing with the psyllid vector (*Diaphorina citri* Kuwayama) of greening disease in the Philippines. In: FAO-UNDP GREENING WORKSHOP, 2., 1988, Lipa. **Proceedings...** Lipa, 1988. p. 23-28.

GHILARDI, A.; MAIA, M. L.; DE NEGRI, J. D. **Laranja Para Indústria: Custo (básico) De Produção Na Safra Agrícola 2003/04**. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br/out/verTexto.php?codTexto=1385>>. Acesso em: 26 jun. 2005.

GILLESPIE, J.P.; BAILEY, A.M.; COBB, B.; VILCINSKAS, A. Fungi as elicitors of insect immune responses. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, n.44, p.49-68. 2000.

GÓMEZ-TORRES, M. L.; NAVA, D. E.; PARRA, J. R. P.; CÔNSOLI, F. L. Porcentagem de parasitismo sobre *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) e detecção de *Wolbachia* em populações de *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, XXI., 2006, Recife. **Anais...** Recife, 2006. p. 82-82.

GONZALES, C. I.; VIÑAS, R. C.; VERGARA, L. A. Observations on 110 citrus cultivars planted in an area severely infested by leaf mottling. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 5., 1972, Richmond. **Proceedings...** Richmond, 1972. p. 38-40.

- GONZÁLEZ, C.; HERNÁNDEZ, D.; CABRERA, R.I.; TAPIA, J.R. *Diaphorina citri* Kuw., inventario y comportamiento de los enemigos naturales en la citricultura cubana. Disponível em: <<http://www.fao.org/docs/eims/upload/cuba/5279/FAODiaphorina.pdf>>. Acessado em: 11 de jan. 2007.
- GOTZ, P.; BOMAN, H. Insect immunity. In: Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology. G.A. KERKUT; L.I. GILBERT (Ed.). New York: Pergamon Press. 1986, 711P.
- GRAÇA, J. V., 1991. Citrus greening disease. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, n.29, p.109-36, 1985.
- GUNNARSSON, S.G.S. Infection of *Schistocerca gregaria* by the fungus, *Metarhizium anisopliae*: cellular reactions in the integument studied by scanning electron and light microscopy. **Journal of Invertebrate Pathology**, Riverside, n.52, p. 9-17, 1988.
- GUPTA, S.; MONTILLOR, C.; HWANG, Y.S. Isolation of novel beauvericin analogues from the fungus *Beauveria bassiana*. **Journal of Natural Products**, Ohio, n.58, p.733-738, 1995.
- GUSTAFSSON, M. Microbial control of aphids and scale insects. pp. 375-384. In: H.D. BURGESS; N.W. HUSSEY (Ed.). **Microbial control of insect and mites**. New York: Academic Press, 1971, 861p.
- HADDAD, M. L.; ALVES, S.B.; SILVEIRA NETO, S.; MORAES, R.C.B.; REYES, A.E.L. Utilização de fórmulas para correção de mortalidade no controle microbiano de *Mahanarva fimbriolata*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, XX., 2004, Gramado. **Anais...** Gramado, 2004. p.425.
- HALBERT, S. E.; MANJUNATH, K. L. Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: a literature review and assesment of risk in Florida. **Florida Entomologist**, Florida, v.87, n.3, p. 330-353, 2004.
- HALBERT, S. E.; NÚÑEZ, C. A. Distribution of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Rhynchota: Psyllidae) in the Caribbean Basin. **Florida Entomologist**, Florida, v.87, n.3, p.401-402, 2004.
- HEMING, B. S. (Ed.). **Insect development and evolution**, Ithaca: Comstock Publishing Associates, 2003. 444p.
- HENDLAND, R.C.; PASS, B.C. Infections of the alfalfa weevil *Hypera postica* by the fungus *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology**, Riverside, California, n.11, p.25-34, 1968.
- HOY, M. A.; JEYAPRAKASH, A.; NGUYEN, R. Long PCR is a sensitive method for detecting *Liberibacter asiaticum* in parasitoid undergoing risk assessment in quarantine. **Biological Control**, New York, n.22, p. 278-287, 2001.
- HOY, M. A.; NGUYEN, R.; JEYAPRAKASH, A. 2004. Classical biological control of Asian citrus psyllid in Florida. Disponível em: <http://www.ipm.ifas.ufl.edu/agricultural/fruit/citrus/citrus_psyllid.htm>. Acessado em: 19 jan. 2007.

- HUANG, C. H.; LIAW, C. F.; CHANG, L.; LAN, T. Incidence and spread of citrus likubin in relation to the population fluctuation of *Diaphorina citri*. **Plant Protection Bulletin**, Taiwan, n.32, p. 167-176, 1990.
- HUNG, S.H.; BOUCIAS, D.G. Influence of *Beauveria bassiana* on the cellular defense response of the beet army worm, *Spodoptera exigua*. **Journal of Invertebrate Pathology**, Riverside, California, n.60, p. 152-158, 1992.
- HUNG, S.Y.; BOUCIAS, D.G.; VEY, A.J. Effect of *Beauveria bassiana* and *Candida albicans* on the cellular defense response of *Spodoptera exigua*. **Journal of Invertebrate Pathology**. Riverside, California, v.61, n.2, p.179-187, 1993.
- HUNG, T. H.; WU, M. L.; SU, H. J. Identification of alternative hosts of the fastidious bacterium causing citrus greening disease. **Journal of Phytopathology**, Oxford, n.148, p.321-326, 2000.
- 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**, Amsterdam: Kluwer Academic Publishers, n.107, p.183-189, 2001.
- HUNG, T.H.; HUNG, S. C.; CHEN, C. N.; HSU, M.H.; SU, H. J. Detection by PCR of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the bacterium causing citrus huanglogbing in vector psyllids: application to the study of vector-pathogen relationships. **Plant Pathology**, Oxford: Blackwell Publishing, n.53, p.96-102, 2004.
- HUSAIN, M. A.; NATH, D. The citrus psylla (*Diaphorina citri*, Kuw.) (Psyllidae: Homoptera). Memoirs of the Department of Agriculture in India, Agricultural research Institute, Central Publication Branch, Govt. of India. **Indian Entomological Service**, Pusa, v.10, n.2, p.2-27, 1927.
- JAGOEIX, S.; BOVÉ, J.M.; GARNIER, M. The Phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the alpha subdivision of the *Proteobacteria*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Giessen, n.44, p.379-386, 1994.
- JEFFS, L.B.; KHACHATOURIANS, G.G. Toxic properties of *Beauveria* pigments on erythrocyte membranes. **Toxicon**, Amsterdam: Elsevier, n.35, p. 1351-1356, 1997.
- KITAJIMA, E. W.; LEITE, B. **Curso introdutório de microscopia eletrônica de varredura**. 2.ed., Piracicaba: ESALQ/USP, 1999. 48p.
- KNIGHTEN, C.; REDDING, J.; FEIBER, D.; COMPTON, L. 2005. U.S. **Department of Agriculture and Florida Department of Agriculture Confirm Detection of Citrus Greening**. Department Press Release. Disponível em: <http://doacs.fl.us/press/2005/0902205_2.html>. Acessado em: 09 fev. 2005.
- KOEN, T. J.; LANGENEGGER, W. Effect of greening virus on the macroelement content of citrus leaves. **Farming South Africa**, Pretoria, v.45, n.12, p.65, 1970.
- KOIZUMI, M.; PROMMINTARA, M.; LINWATTANA, G.; KAISUWAN, T. Epidemiological aspects of citrus huanglongbing (greening) disease in Thailand. **Japan Agricultural Research Quarterly**, Ibaraki, n.31, p.205-211, 1997.

- KOIZUMI, M.; PROMMINTARA, M.; LINWATTANA, G.; KAISUWAN, T. Field evaluation of citrus cultivars for greening resistance in Thailand, In: MORENO, P.; GRAÇA, J. V.; TIMMER, L. W. (Ed.), In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 12., 1993, Riverside. **Proceedings**...Riverside, 1993. p.274-279.
- LABUSCHANGE, N.; KOTZÉ, J. M. Effect of temperature on expression of greening disease symptoms and possible inactivation of the pathogen in Eureka lemon. **Phytophylactica**, Pretoria, n.20, p.177-78, 1988.
- LACEY, J. Factors affecting mycotoxin production. In: **Mycotoxins and phycotoxins**. STEYN, P.S.; VLEGGAAR, R. (Ed.), Amsterdam: Elsevier, 1986. p 65-76.
- LIN, S. J.; KE, Y. F.; TAO, C. C. Bionomics observation and integrated control of citrus psylla, *Diaphorina citri* Kuwayama. **Journal Horticultural Society of China**, Beijing, v.19, n.4, p. 234-242, 1973.
- LIU, Y. H.; TSAI, J. H. Effects of temperature on biology and life table parameters of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Homóptera: Psyllidae). **Annual Applied Biology**. London, n.137, p. 201-206, 2000.
- LOPES, R.B. **Seleção de fungos entomopatogênicos e controle de *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae)**. 1999. 72p. Dissertação (Mestrado na área de Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 1999.
- MANICON, B. Q.; van VUUREN, S. P. Symptoms of greening disease with special emphasis on African greening. In: INTERNATIONAL ASIA-PACIFIC CONFERENCE OF CITRUS REHABILITY, 4., 1990, Sigapore. **Proceedings**... Singapore, 1990, p.127-131.
- MARTINEZ, A. L.; WALLACE, J. M. Citrus greening disease in Philippines. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 1., 1969, Riverside. **Proceedings**...Riverside, 1969. p.1427-1431.
- MAZET, I.; HUNG, S.Y.; BOUCIAIS, D.G. Detection of toxic metabolites in the hemolymph of *Beauveria bassiana* infected *Spodoptera exigua* larvae. **Experientia**, Basel, n.40, p. 385-391, 1994.
- MAZET, I.; BOUCIAIS, D.G. Effects of the fungal pathogen, *Beauveria bassiana*, on the protein synthesis of infected *Spodoptera exigua* larvae. **Journal of Insect Physiology**, Amsterdam: Pergamon, n.42, p.91-99, 1996.
- McCLEAN, A. P. D.; OBERHOLZER, P. C. J. Citrus psilla, a vector of the greening disease of sweet orange. **South African Journal of Agricultural Science**, Pretoria, v.8, p.297-298, 1965.
- McCLEAN, A. P. D.; SCHWARZ, R. E. Greening of blotchy-mottle disease of citrus. **Phytophylactica**, Pretoria, n.2, p.177-194, 1970.
- McCLEAN, A. P. D. Greening disease of sweet orange: its transmission in propagative parts and distribution in partially diseased trees. **Phytophalactica**, Pretoria, n.2, p. 263-268, 1970.

- McCLEAN, A. P. D. The efficiency of citrus psylla, *Trioza erytreae* (del G.) as a vector of greening disease of citrus. **Phytophylactica**, Pretoria, n.6, p.45-54, 1974.
- McDANIEL, J. R.; MORAN, V. C. The parasitoid complex of the citrus psylla *Trioza erytreae* (Del Guercio) (Homoptera: Psyllidae). **Entomophaga**, Amsterdam, n.17, p.297-317, 1972.
- McFARLAND, C. D.; HOY, M. A. Survival of *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae), and its two parasitoids, *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae) and *Diaphorencyrtus aligarhensis* (Hymenoptera: Encyrtidae), under different relative humidities and temperature regimes. **Florida Entomologist**, Florida, v.84, n.2, p.227-233, 2001.
- MEAD, F. W. 2002. Feature names. Disponível em: <<http://creatures.ifas.ufl.edu/citrus/acpsyllid.htm>>. Acessado em: 17 jan. 2007.
- MEAD, M. A. The South African citrus psyllid, *Trioza erytreae* (Del Guercio) (Homoptera: Psyllidae). **Entomology Circular**, Florida, n.168, 1976. p.4.
- MICHAUD, J. P.; OLSEN, L. E. Suitability of Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, as prey for ladybeetles. **BioControl**, Amsterdam, n.49, p.417-431, 2004.
- MICHAUD, J. P. Numerical response of *Olla v-nigrum* (Coleoptera: Coccinellidae) to infestations of Asian citrus psyllid (Hemiptera: Psyllidae) in Florida. **Florida Entomologist**, Florida, v. 84, n.4, p.608-612, 2001.
- MICHAUD, J.P. Biological control of Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) in Florida: a preliminary report. **Entomological News**, Philadelphia, v.113, n.3, p.216-222, 2002.
- MIYAKAWA, T. Experimentally induced symptoms and host range of citrus likubin (greening disease). **Annals of the Phytopathology Society of Japan**, Tokyo, n.46, p.224-30, 1980.
- MOHAMED, A.K.; SIKOROWSKI, P.P.; BELL, J.V. Histopathology of *Nomurarrileyi* in larvae of *Heliothis zea* and *in vitro* enzymatic activity. **Journal of Invertebrate Pathology**, Riverside, n.31, p.345-352, 1978.
- MOINO JÚNIOR, A. **Utilização de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. para o controle de pragas de grãos armazenados.** 1993. 100p. Dissertação (Mestrado na área de Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1993.
- MOLL, J. N.; MARTIN, M. N. Electron microscopy evidence that Citrus psylla *Trioza erytreae* (Del Guercio), is a vector of greening disease in South Africa. **Phytophylactica**, Petroria, n.5, p.41-44, 1973.
- MURRAY, R. G. E.; SCHLEIFER, K. H. Taxonomic notes: a proposal for recording the properties of putative taxa of prokaryotes. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Giessen n. 44, p.174-176, 1994.
- NAKATA, T. Temperature-dependent development of the citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Homoptera: Psylloidea), and the predicted limit of its spread based on overwintering in the nymphal stage in temperate regions of Japan. **Applied Entomology and Zoology**, Tokyo, v.41, n.3, p.383-387, 2006.

- NARIANI, T. K.; RAYCHAUDHURI, S. P.; VISWANATH, S. M. Tolerance to greening disease in certain citrus species. **Current Science**, Bangalore, n.42, p.513-14, 1973.
- NEVES, P.O.M.J. **Controle associado de *Cornitermes cumulans* (Kollar, 1832) (Isoptera: Termitidae) com fungos entomopatogênicos e o inseticida imidacloprid**. 1998. 111p. Tese (Doutorado na área de Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998.
- OBERHOLZER, P. C. J.; HOFMEYER, J. D. J. The nature and control of clonal senility in commercial varieties of citrus in South Africa. **Bulletin**, Pretoria, p.46, 1955.
- OBERHOLZER, P. C. J.; von STADEN, D. F. A.; BASSON, W. J. Greening disease of sweet orange in South Africa. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 3., 1993, Riverside. **Proceedings**...Riverside, 1993. p.274-279.
- OEPP/EPPO. **Bulletin**, Paris, n.35, p. 331-333, 2005.
- OVCHINNIKOV, Y.A.; IVANOV, V.T.; MIKHALEVA, I.I. The synthesis and some properties of beauvericin. **Tetrahedron Letters**, Amsterdam, n.2, p.159-162, 1971.
- PADULLA, L. F. L.; ALVES, S. B.; PAULI, G.; MARINHEIRO, D. Q. Controle de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) com fungos entomopatogênicos. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 9., 2005, Recife. **Anais...** Recife, 2005, p. 94.
- PEÑA, J.E.; MANNION, C.M.; ULMER, B.J.; HALBERT, S.E. Jackfruit, *Artocarpus heterophyllus*, is not a host of *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) in Florida. **Florida Entomologist**, Florida, v.89, n.3, p.412-413, 2006.
- PENDLAND, J.C.; BOUCIAS, D.G. Phagocytosis of lectin-opsonized fungal cells and endocytosis of the ligand by insect *Spodoptera exigua* granular hemocytes: an ultrastructural and immunocytochemical study. **Cell and Tissue Research**, Berlin, n.285, p.57-67, 1996.
- PENDLAND, J.C.; HUNG, S.Y.; BOUCIAS, D.G. Evasion of host defense by *in vivo*-produced protoplast-like cells of the insect mycopathogen *Beauveria bassiana*. **Journal of Bacteriology**, Washington, n.175, p. 5962-5969, 1993.
- PLUKE, R.W.H.; ESCRIBIANO, A.; MICHAUD, J.P.; STANLEY, P.A. Potencial impact of lady beetles on *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) in Puerto Rico. **Florida Entomologist**, Florida, v.88, n.2, p.123-128, 2005.
- PUTERKA, G.J.; HUMBER, R.A.; POPRAWSKI, T.J. Virulence of fungal pathogens (Imperfect fungi: Hyphomycetes) to pear psylla (Homoptera: Psyllidae). **Environmental Entomology**, Washington, v.22, n.2, p.514-520, 1994.
- QUINTELA, E.D.; MCCOY, C.W. Conidial attachment of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* to the larval cuticle of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) treated with imidacloprid. **Journal of Invertebrate Pathology**, Riverside, n.72, p.220-230, 1998.
- RAE, D. J.; LIANG, W. G.; WATSON, D. M.; BEATTIE, G. A. C.; HUANG, M. D. Evaluation of petroleum spray oils for control of the Asian citrus psylla, *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera: Psyllidae), in China. **International Journal of Pest Management**, London, v.43, n.1, p.71-75, 1997.

- RAMOS, E.Q. **Seleção de isolados de fungos entomopatogênicos para o controle de *Bemisia tabaci* biótipo B**. 2001. 57p. Dissertação (Mestrado na área de Entomologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.
- RAMOS, E. Q. ; ALVES, S. B. ; TANZINI, M. R. ; LOPES, Rogerio B . Suscetibilidad de Bemisia tabaci a Beauveria bassiana em condiciones de laboratorio. **Manejo Integrado de Plagas y Agroecología**, Costa Rica, v. 56, p. 65-69, 2000.
- RATCLIFFE, N.A.; WALTERS, J.B. Studies on the *in vivo* cellular reactions of insects: clearance of pathogenic and non-pathogenic bacteria in *Galleria mellonella* larvae. **Journal of Invertebrate Physiology**, Riverside, n.29, p.407-415, 1983.
- RAYCHAUDHURI, S. P.; NARIANI, T. K.; LELE, V. C.; SINGH, G. R. Greening and citrus decline in India. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 5., 1972, Swaziland. **Proceedings...** Swaziland, 1972. p.35-37.
- REGMI, C.; LAMA, T. K. Greening incidence and greening vector population dynamics in Pokhara. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 10., 1988, Riverside. **Proceedings...** Riverside, 1988. p.238-242.
- ROBERTS, D.W. Toxins from entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, Riverside, n.8, p.212-221, 1966.
- ROBERTS, D.W.; KRASNOFF, S. B. Toxinas e enzimas de fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. cap. 32 , p. 967-985.
- ROSAS, J.L. **Actividad biológica de los exudados y filtrado crudo de *Hirsutella thompsonii* Fisher (Cepa HtM120I) sobre *Tetranychus urticae* Koch y otros artrópodos**. Tecmán, Colima – México, 2003. 223p. Tese (Doutorado na área de Entomologia) – Universidad de Colima, México, 2003.
- ROSAS, J.L.; ALATORRE, R.; VALDEZ, J. Pathogenicity bioassays of *Hirsutella thompsonii* Fisher and *H. nodulosa* Petch strains facing up to *Tetranychus urticae*. **Revista Latino-Americana de Microbiología**, Ciudad del Mexico, n.38, p.177-184, 1996.
- SAKAMAKI, Y. **Occasional Papers of the Kagoshima University Research Center**, Lake Alfred, Florida, n.42, p.121-125. Disponível em: <www.doacs.state.fl.us/pi/chrp/greening/hlpsciscencereport1-31-06.pdf>-. Acessado em: 05 maio 2006.
- SALIBE, A. A.; CORTEZ, R. E. Studies on the leaf mottling disease of citrus in the Philippines. **FAO Plant Protection Bulletin**, Rome, n.14, p.141-44, 1966.
- SCHABEL, H.G. Percutaneous infection of *Hylobius pales* by *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, Riverside, n.27, p.377-383, 1978.
- SCHWARZ, R. E. The distribution of greening in citrus areas of South Africa. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 4., 1968, Riverside. **Proceedings...** Riverside, 1968. p.124-127.

SHIMAZU, M. Potential of the cerambycid-parasitic type of *Beauveria brogniartii* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) for microbial control of *Monochamus alternatus* Hope (Coleoptera: Cerambycidae). **Applied Entomology and Zoology**, Tokyo, n.29, p.127-130, 1994.

SHIVANKAR, V. J.; RAO, C. N.; SINGH, S. Studies on citrus Psylla, *Diaphorina citri* Kuwayama: a review. **Agricultural Reviews**, Karnal, India, n.21, p.199-204, 2000.

SKELLEY, L. H.; HOY, M. A. A synchronous rearing method for the Asian citrus psyllid and its parasitoids in quarantine. **Biological Control**, Amsterdam, n.29, p.14-23, 2004.

SMITH, R.J.; GRULA, E.A. Nutritional requeriments for conidial germination and hyphal growth of *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology**, Riverside, n.37, p.222-230, 1981.

SMITH, R.J.; GRULA, E.A. Toxical components of the larval surface of the corn earworm (*Heliothis zea*) and their effects on germination and growth of *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology**, Riverside, n.39, p.15-22, 1982.

SOSA-GÓMEZ, D.R.; ALVES, S.B. Temperature and relative humidity requirements for conidiogenesis of *Beauveria bassiana* (Deuteromycetes: Moniliaceae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v.29, n.3, p.515-521, 2000.

SOSA-GÓMEZ, D.R.; BOUCIAS, D.G.; NATION, J.L. Attachment of *Metarhizium anisopliae* to the southern green stick bug *Nezara viridula* cuticle and fungistatic effect of cuticular lipids and aldehydes. **Journal of Invertebrate Pathology**, Riverside, n.69, p.31-39, 1997.

ST. LEGER, R.J.; COOPER, R.M.; CHARNLEY, A.K. Characterization of chitinase and chitobiose produced by entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, Riverside, n.58, p.415-426, 1991.

ST. LEGER, R.J.; COOPER, R.M.; CHARNLEY, A.K. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: regulation of production of chitinolytic enzymes. **Journal of General Microbiology**, Reading, n.132, p.1509-1517, 1986.

STRASSER, H. A researches obstacle race: reporta of a registration of a new bioinsecticide. In: Insect Pathogens and Insect Parasitic Nematodes. SMITH, P.H. (Ed.). **IOBC Bulletin**, v.22, n.3, p.9-13, 2000.

STRASSER, H.; VEY, A.; BUTT, T. Are there any risks in using entomopathogenic fungi for pest control, with particular reference to the bioactive metabolites of *Metarhizium*, *Tolypocladium* and *Beauveria* species? **Biocontrole Science and Technology**, Amsterdam, n.10, p.717-735, 2000.

SU, H.J.; CHANG, S.C. Eletron microscopical study on the heat and tetracycline response, and ultra-structure of the pathogen complex causing citrus likibin disease. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ELECTRON MICROSCOPY, 8., 1974, Camberra. **Proceedings...** Camberra, 1974. p.628-629.

SU, H.J.; CHEON, J. U.; TSAI, M.J. Citrus greening (Likubin) and some viruses and their control trials. **Plant virus diseases of horticultural crops in the tropics and subtropics**. Taipei: FFTC Book Series, 1986. 193p.

- SUBANDIYAH, S.; NIKOH, N.; SATO, H.; WAGIMAN, F.; TSUYUMU, S.; FUKATSU, T. Isolation and characterization of two entomopathogenic fungi attacking *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) in Indonesia. **Mycoscience**, New York, v.41, n.5, p.509-513, 2000.
- SURYANARAYANA, D.; UPADHYAY, R.; CHONA, B. L. Studies on the amino acid status of dieback-affected citrus trees in India. **Indian Phytopathology**, Nova Delhi, n.21, p.118-120, 1968.
- SUSUKI, A.; KANAOKA, M.; ISOGAI, A.; MURAKOSHI, S.; ICHINOE, M.; TAMURA, S. Bassianolide, a new insecticidal cyclodepsipeptide from *Beauveria bassiana* and *Verticillium lecanii*. **Tetrahedron Letters**, Amsterdam, n.25, p.2167-2170, 1977.
- TAMAI, M.A. **Controle de *Tetranychus urticae* com fungos entomopatogênicos**. 2002. 144p. Tese (Doutorado na área de Entomologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.
- TANAKA, S.; DOI, Y. Further investigations of likubin of Ponkan mandarin. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 7., 1976, Riverside. **Proceedings...** Riverside, 1976. p.35-37.
- TANIGUSHI, M.; KAWAGUCHI, T.; TANAKA, T.; OI, S. Antimicrobial and respiration inhibitory activities of oosporein. **Agricultural and Biological Chemistry**, Pennsylvania, n.48, p.1065-1067, 1984.
- TANZINI, M.R. **Controle do percevejo-de-renda-da-seringueira (*Leptopharsa heveae*) com fungos entomopatogênicos**. 2002. 140p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.
- TEIXEIRA, D.C.; AYRES, J. First report of a Huanglongbing-like disease of citrus in São Paulo State, Brazil and association of a new *Liberibacter* species, '*Canidatus Liberibacter americanus*', with the disease. **Plant Disease**, Minnesota, v.89, n.1, p.107, 2000.
- TEIXEIRA, D.C.; SAILLARD, C.; EVEILLARD, S.; DANED, J.L.; COSTA, P.I.; AYRES, A.J.; BOVÉ, J. '*Canidatus Liberibacter americanus*', associated with citrus huanglongbing (greening disease) in São Paulo State, Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, n.55, p.1857-1862, 2005.
- TIRTAWIDJAJA, S. Citrus virus research in Indonesia. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 8., 1980, Riverside. **Proceedings...** Riverside, 1980. p.129-132.
- TIRTAWIDJAJA, S. Insect, dodder and seed transmissions of citrus vein phloem degeneration (CVPD). In: INTERNATIONAL SOCIETY OF CITRICULTURE, 1., 1981, Tokyo. **Proceedings...** Tokyo, 1981, p.469-471.
- TOLLEY, I. S. The relation of nursery production with orchard planning and management. In: AUBERT, B.; TONTYAPOM, S.; BUANGSUWON, D. (Ed.). In: REHABILITATION OF CITRUS INDUSTRY IN THE ASIA PACIFIC REGION, 1990, Chiang Mai. **Proceedings...** Chiang Mai, 1990, p.77-82.

TOORAWA, P. **La maladie du huanglongbing (greening) des agrumes a L'île Maurice. Detection de "Candidatus Liberibacter asiaticum" et agrumes et les insectes vecteurs.** 1998. 186p. Tese (Doutorado na area de Entomologia), L'University de Bordeaux, Bordeaux, 1998.

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

USP/Pensa. Citros colorem sudeste brasileiro de verde e laranja, **Visão Agrícola**, Piracicaba, v.1, n.2, p.90-92, 2004.

VAN DEN BERG, M. A.; DEACON, V. E. Flight activities of the citrus psylla, *Trioza erytreae* (Hemiptera: Triozidae). **Phytophylactica**, Pretoria, n.21, p.391-95, 1989.

VAN DEN BERG, M. A. et al. Studies on greening disease transmission by the Psylla, *Trioza erytreae* (Hemiptera: Triozidae). **Israel Journal of Entomology**, Tel Aviv, n.25, p.51-56, 1992

VAN LELYVELD, L. J.; van VUUREN, S. P. The effect of gentisic acid on activity of peroxidases from *Citrus aurantifolia*. **Journal of Phytopathology**, Oxford, n.121, p.363-65, 1988.

VESTERGAARD, S.; GILLESPIE, A.T.; BUTT, T.M.; SCHREITER, G.; EILENBERG, J. Pathogenicity of the Hyphomycete fungi *Verticillium lecanii* and *Metarhizium anisopliae* to the western thrips, *Frankliniella occidentalis*. **Biocontrol Science and Technology**, London, v.5, p.185-192, 1995.

VIDAL, C.; OSBORNE, L.S.; LACEY, L.A.; FARGUES, J. Effect of the host plant on the potencial of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) for controlling the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) in greenhouses. **Biological Control**, Amsterdam, v.12, n.3, p.191-199, 1998.

VILCINSKAS, A.; MATHA, V.; GOETZ, P. Inhibition of phagocytic activity of plasmatocytes isolated from *Galleria mellonella* by entomopathogenus fungi and their metabolites. **Journal of Insect Physiology**, New York, n.43, p.475-483, 1997.

VINING, L.C.; KELLEHER, W.J.; SCHWARTING, A.E. Oosporein production by a strain of *Beauveria bassiana* originally identified as *Amanita muscaria*. **Canadian Journal of Microbiology**, Toronto, v.8, p.931-933, 1962.

WEATHERSBEE, A.A.; MCKENZIE, C.L. Effect of neem biopesticide on repellency, mortality, oviposition and development of *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae). **Florida Entomologist**, Florida, v.88, n.4, p. 401-407, 2005.

WILSON, B.J. Miscellaneous *Aspergillus* toxin. CIEGLES, A.; KADIS, S.; AJE, S.J. (Ed.). In: **Microbial toxins: a comprehensive treatise**, New York: Academic Press, 1971. p.207-295,

WOOLER, A.; PADGHAM, D.; ARAFAT, A. Outbreaks and new records. Saudi Arabia. *Diaphorina citri* on citrus. **FAO Plant Protection Bulletin**, Rome, n.22, p.93-94, 1974.

- WRAIGHT, S.P.; BUTT, T.M.; GALANI-WRIGHT, S.; ALLE, L.L.; ROBERTS, D.W. Germination and infection process of the entomophthoralean fungus, *Erynia radicans*, on the potato leafhopper, *Empoasca fabae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, Riverside, n.56, p.157-174, 1990.
- WRAIGHT, S.P.; CARRUTHERS, R.I.; BRADLEY, C.A.; JARONSKI, S.T.; LACEY, L.A.; WOOD, P.; WRAIGHT, S. Pathogenicity of the entomopathogenic fungi *Paecilomyces* spp. And *Beauveria bassiana* against the silverleaf whitefly *Bemisia argentifolii*. **Journal of Invertebrate Pathology**, Riverside, v.71, n.3, p.217-226. 1998.
- XIA, Y.; XU, C.; CHEN, J. Population dynamics of *D. citri* in Fuzhou on *Murraya paniculata*. In: WORKSHOP CITRUS GREENING DISEASE, 1987, Fuzhou. **Proceedings...** Fuzhou, 1987. p.2.
- XIE, P.; SU, C.; LIN, Z. A preliminary study on the parasite fungus of citrus psyllid *Cephalosporium lecanii* Zimm. In: FAO-UNDP GREENING WORKSHOP, 1988, Lipa. **Proceedings...** Lipa, 1988. p.18-22.
- XU, C. F.; XIA, Y. H.; LI, K. B.; KE, C. Further study on the transmission of Citrus Huanglungbing by a psyllid *Diaphorina citri* Kuwayama. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 10., 1988, Riverside. **Proceedings...** Riverside, 1988. p.178-181.
- XU, C. F.; XIA, Y. H.; LI, K. B.; KE, C. Further study of the transmtion of citrus huanglungbin by a psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama. In: TIMMER, L. W.; GARENSEY, S. M.; NAVARRO, L. (Ed.). In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 10., 1988, Riverside. **Proceedings...** Riverside, 1988. p.243-248.
- XU, C.; XIA, Y.; KE, C. Study on the biology and control of citrus psylla. **Acta Phytophylacica Sinica**, Beijing, v.21, n.1, p.53-56, 1994.
- YAMAMOTO, P. T.; PAIVA, P. E. B.; GRAVENA, S. Flutuação populacional de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) em pomares de citros na região norte do estado de São Paulo. **Neotropical Entomology**, Londrina, v.30, n.1, p.165-170, 2001.
- YAMAMOTO, P.T. **Estratégias de controle químico de *Diaphorina citri***. In: SIMPÓSIO HUANGLONGBING (HLB, EX- GREENING) NO ESTADO DE SÃO PAULO, Semana da Citricultura, 28., Centro APTA Citros 'Sylvio Moreira' do IAC, 2006, Cordeirópolis/SP.
- YANG, Y.; HUANG, M.; BEATTIE, G. A. C.; XIA, Y.; OUYANG, G.; XIONG, J. Distribution, biology, ecology and controlo f the psyllid *Diaphorina citri* Kuwayama, a major pest of citrus: A status report for China. **International Journal of Pest Management**, London, v.52, n.4, p.343-352, 2006.
- YASUDA, K.; KAWAMURA, F.; OISHI, T. Location and preference of adult asian psyllid, *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) on Chinese box orange jasmine, *Murraya exotica* L. and flat lemon, *Citrus depressa*. **Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology**, Tokyo, n.49, p.146-149, 2005.

YUBIN, Y. Influence of light, temperature, and humidity on the development, reproduction and survival of citrus psylla. **Studies on the integrated management of citrus insect pests**. China: Academic Book and Periodical Press, 1989. p.126-133.

ZHAO, BARKLEY, P.; BENTIE, G. A. C.; van VELSEN, R. J.; FREEMAN, B. Report on the visit to the People's of China. **Citrus Research Group N. S. W. Dr of Agriculture**, 1979. 41p.

ZHAO, X. Y. Citrus yellow shoot disease (huanglongbin) – a review. In: INTERNATIONAL SOCIETY OF CITRICULTURE, 1., 1981, Tokyo. **Proceedings...** Tokyo, 1981. p.466-469.