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

**Efeitos de variedades cítricas sobre o vetor das bactérias associadas ao
Huanglongbing (HLB) *Diaphorina citri* Kuwayama, 1908 (Hemiptera:
Liviidae)**

Gustavo Rodrigues Alves

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Entomologia

**Piracicaba
2017**

Gustavo Rodrigues Alves
Licenciado em Ciências Biológicas

Efeitos de variedades cítricas sobre o vetor das bactérias associadas ao Huanglongbing (HLB) *Diaphorina citri* Kuwayama, 1908 (Hemiptera: Liviidae)

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **PEDRO TAKAO YAMAMOTO**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Entomologia

Piracicaba
2017

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

Alves, Gustavo Rodrigues

Efeitos de variedades cítricas sobre o vetor das bactérias associadas ao huanglongbing (HLB) *Diaphorina citri* Kuwayama, 1908 (Hemiptera: Liviidae) / Gustavo Rodrigues Alves. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2017.

82 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Psilídeo-asiático-dos-citros 2. Interação inseto-planta 3. Plantas hospedeiras 4. Escolha hospedeira 5. Fitness I. Título

DEDICATÓRIA

A Deus pelo dom da vida.

Agradeço

A minha esposa Juliana por todo amor, paciência e companheirismo.

Dedico

Aos meus pais Adilson e Solange e demais familiares por toda alegria, amor e
carinho.

Ofereço

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Pedro pela confiança depositada em mim e por sua dedicação como orientador;

A minha esposa e melhor amiga Juliana por toda paciência, companheirismo, dedicação e amor. Com você essa trajetória foi muito mais fácil;

A todos os meus familiares em especial a meus pais, Adilson e Solange por todo apoio e amor;

Aos pequenos da família, Gean, Benício e Amora pelos momentos de alegria;

A Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” e em especial ao Departamento de Entomologia e Acarologia ESALQ/USP por toda a infraestrutura fornecida;

Aos professores do Departamento de Entomologia e Acarologia ESALQ/USP, pelos ensinamentos;

Aos funcionários do Departamento de Entomologia e Acarologia ESALQ/USP, pela dedicação aos serviços prestados. Muito obrigado, Andréa, Marta, Carol, Regina, Dino, Carlos, Willian, Chico, Neide e Arodi;

Aos colegas do laboratório MIP pelos 4 anos de convivência e amizade;

Aos estagiários, Higor, Capão, Kenya, Diosef e Rodrigo pela valorosa ajuda e pela amizade;

Aos meus amigos da pós-graduação, Aloisio, Alexandre, Vitão, Ana Clara, Nathalie, Luiz Henrique, Arthur, Diogo e Talita pela valiosa ajuda, conselhos, respeito e amizade;

Todos os meus colegas da pós-graduação em geral, pelo convívio, troca de experiências e companheirismo;

Aos meus queridos amigos do clube dos gordinhos, Paula, Tati, Bob, Andrine, Xandão e Julinha; e amigos do grupo dos Velhotes, Cardena, Paula, Lily, Sandro, Joe, Bruna, Ana Paula e John pela amizade, confiança e incentivo;

A toda equipe do Centro de Citricultura "Sylvio Moreira", em especial ao Sérgio e Everaldo pela produção das mudas utilizadas nesse trabalho;

Ao Prof. Parra e Prof. Maurício pelo uso de seus laboratórios durante a execução dos experimentos;

A Franciele Santos pela ajuda no experimento de comportamento de escolha hospedeira;

Ao Rafael Garcia e Marcelo Mirannda pela ajuda na execução do experimento de EPG;

A todos os funcionários do laboratório do Dr. Nelson Arno Wulff em especial a Daniela pela ajuda nas análises moleculares;

Ao Rafael Moral e à Prof. Clarice pela ajuda nas análises estatísticas;

As bibliotecárias Eliana e Silvia pela revisão da tese;

Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudos (Processo número: 2013/04291-0);

E a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO GERAL	11
REFERÊNCIAS	15
2. COMPORTAMENTO DE ESCOLHA HOSPEDEIRA DE <i>Diaphorina citri</i> KUWAYAMA, 1908 (HEMIPTERA: LIVIIDAE) EM DIFERENTES VARIEDADES CÍTRICAS E IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS ENVOLVIDOS	21
RESUMO	21
ABSTRACT	21
2.1. INTRODUÇÃO	22
2.2. MATERIAL E MÉTODOS	23
2.2.1. CRIAÇÃO DE <i>Diaphorina citri</i> E MANUTENÇÃO DE PLANTAS	24
2.2.2. ATRATIVIDADE DE <i>D. citri</i> EM DIFERENTES VARIEDADES DE COPA DE CITROS E SEUS PORTA-ENXERTOS	24
2.2.3. COLETA E IDENTIFICAÇÃO DE VOLÁTIES	25
2.2.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	27
2.3. RESULTADOS	27
2.3.1. ATRATIVIDADE DE <i>D. citri</i> EM DIFERENTES VARIEDADES DE COPA DE CITROS E SEUS PORTA-ENXERTOS	27
2.3.2. COLETA E IDENTIFICAÇÃO DE VOLÁTEIS	32
2.4. DISCUSSÃO	37
2.5. CONCLUSÕES	41
REFERÊNCIAS	41
3. A COMBINAÇÃO COPA/PORTA-ENXERTO DE CITROS INFLUENCIA A ALIMENTAÇÃO E BIOLOGIA DE <i>Diaphorina citri</i> KUWAYAMA, 1908 (HEMIPTERA: LIVIIDAE)?*	47
RESUMO	47
ABSTRACT	47
3.1. INTRODUÇÃO	48
3.2. MATERIAIS E MÉTODOS	49
3.2.1. CRIAÇÃO DE <i>Diaphorina citri</i> E MANUTENÇÃO DE PLANTAS	49

3.2.2. BIOLOGIA DE <i>D. citri</i> EM DIFERENTES COMBINAÇÕES DE COPA E PORTA-ENXERTO	50
3.2.3. CONSUMO ALIMENTAR DE <i>Diaphorina citri</i> EM DIFERENTES VARIEDADES DE CITROS	50
3.2.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	51
3.3. RESULTADOS	52
3.3.1. BIOLOGIA DE <i>Diaphorina citri</i> EM DIFERENTES COMBINAÇÕES DE COPA E PORTA-ENXERTO	52
3.3.2. CONSUMO ALIMENTAR DE <i>Diaphorina citri</i> EM DIFERENTES VARIEDADES DE CITROS	55
3.4. DISCUSSÃO	57
3.5. CONCLUSÕES	59
REFERÊNCIAS	60
4. COMPORTAMENTO ALIMENTAR DE <i>Diaphorina citri</i> KUWAYAMA, 1908 (HEMIPTERA: LIVIIDAE) EM DIFERENTES ESPÉCIES CÍTRICAS UTILIZANDO A TÉCNICA DE ELECTRICAL PENETRATION GRAPH (EPG)	65
RESUMO	65
ABSTRACT	65
4.1. INTRODUÇÃO.....	66
4.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	67
4.2.1. INSETOS E PLANTAS	68
4.2.2. OBTENÇÃO E MARCAÇÃO DE GRÁFICOS DE PENETRAÇÃO ELETRÔNICA (ELECTRICAL PENETRATION GRAPH).....	68
4.2.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	70
4.3. RESULTADOS	71
4.4. DISCUSSÃO	75
4.5. CONCLUSÃO.....	77
REFERÊNCIAS	77

RESUMO

Efeitos de variedades cítricas sobre o vetor das bactérias associadas ao Huanglongbing (HLB) *Diaphorina citri* Kuwayama, 1908 (Hemiptera: Liviidae)

O Huanglongbing (HLB) ou “greening” é considerada, atualmente, a mais séria doença da citricultura no mundo, cujos sintomas estão associados às bactérias “*Candidatus Liberibacter* spp.”. Uma vez que não há medidas curativas para a doença, o manejo baseia-se em medidas curativas como o controle de *Diaphorina citri*, vetor do patógeno. Esse inseto apresenta uma gama de hospedeiros de mais de 50 espécies da família Rutaceae, incluído as espécies e variedades do gênero *Citrus*, porém, nem todos os hospedeiros permitem o completo desenvolvimento do inseto. Dessa forma, objetivou-se com este trabalho verificar a existência de características de variedades cítricas de copa e porta-enxerto, mais utilizadas na citricultura, que afetam os aspectos bioecológicos de *D. citri*, bem como caracterizá-las, de modo que possam servir de base para desenvolvimento de estratégias de manejo do inseto vetor. Para isso, foram estudados: 1) comportamento de escolha hospedeira de *D. citri* em diferentes combinações de variedades de copa e porta-enxerto e a identificação dos voláteis envolvidos; 2) os efeitos das combinações copa e porta-enxerto na biologia de *D. citri* e 3) estudos sobre o comportamento alimentar de *D. citri* por meio da técnica de *Electrical Penetration Graph* em diferentes variedades de copa de citros. Verificou-se comportamento de escolha diferenciado entre fêmeas e machos de *D. citri* em função do hospedeiro. O porta-enxerto não influenciou o comportamento de escolha de *D. citri*. Foram observadas diferenças significativas na qualidade e quantidade nos perfis de voláteis liberados pelos diferentes hospedeiros, com a predominância de terpenoides. As variáveis biológicas de *D. citri* foram afetadas pelos hospedeiros. A variedade ‘Hamlin’ foi classificada como a menos adequada ao psílideo independentemente do porta-enxerto utilizado. Houve influência da variedade de copa de citros no consumo alimentar de *D. citri*. Utilizando-se a técnica de EPG não é possível observar diferenças no comportamento alimentar de *D. citri* entre os hospedeiros testados.

Palavras-chave: Psílideo-asiático-dos-citros; Interação inseto-planta; Escolha hospedeira; Biologia; Comportamento alimentar

ABSTRACT

Effects of citrus varieties on the vector of the bacteria associated with the Huanglongbing (HLB) *Diaphorina citri* Kuwayama, 1908 (Hemiptera: Liviidae)

Huanglongbing (HLB) or "greening" is currently considered the most serious citrus disease worldwide, whose symptoms are associated with the bacteria "*Candidatus Liberibacter* spp.". Since there are no curative measures for the disease, management is based on curative measures like control of the pathogen vector, *Diaphorina citri*. This insect has a range host of more than 50 species of the family Rutaceae, including species and varieties of the genus *Citrus*, but not all hosts allow the complete development of the insect. Thus, the objective of this study was to verify the existence of characteristics of citrus scion and rootstock varieties, more used in the citriculture, that affect the bioecological aspects of *D. citri*, as well as characterize them, serving as basis for development of management strategies for this insect vector. For this, were studied: 1) host choice behavior of *D. citri* in different combinations of scion and rootstock varieties and the identification of the volatiles involved; 2) the effects of scion and rootstock combinations on the biology of *D. citri* and 3) studies on the feeding behavior of *D. citri* using the Electrical Penetration Graph technique in different varieties of citrus scion. There was a differentiated choice behavior between males and females of *D. citri* depending on the host. The rootstock did not influence the choice behavior of *D. citri*. Significant differences were observed in the quality and quantity of the volatiles released by the different hosts, with the predominance of terpenoids. The biological variables of *D. citri* were affected by the hosts. The 'Hamlin' variety was classified as less suitable to the psyllid independently of the rootstock used. There was influence of the citrus scion variety on the food intake of *D. citri*. Through EPG technique it is not possible to observe differences in the feeding behavior of *D. citri* among the hosts tested.

Keywords: Asian citrus psyllid; Insect-plant interaction; Host choice; Biology; Feeding behavior

1. INTRODUÇÃO GERAL

A citricultura brasileira ocupa posição de destaque no cenário mundial como maior produtor de suco de laranja, sendo que, o montante gerado pela exportação do produto tem grande importância na balança comercial brasileira (FAOSTAT, 2016), com uma participação de 53% da produção mundial de suco concentrado (BARROS; BARROS; CYPRIANO, 2016).

A cultura apresenta características que a torna vulnerável à ocorrência de um grande número de pragas e doenças, as quais incluem, grandes extensões do cultivo e perenidade da planta, que facilitam a proliferação de pragas e as expõe a ataques por um longo período; além de possuir uma estreita base genética dos pomares comerciais (SPÓSITO; BASSANEZI, 2008).

Dentre as doenças que ocorrem em citros, o huanglongbing (HLB) ou “greening” é considerado, atualmente, o mais sério problema da citricultura no Brasil e no mundo, representando um enorme risco à sustentabilidade do agronegócio citrícola (BOVÉ, 2006; HALL et al., 2012; GRAFTON-CARDWELL et al., 2013). O HLB avança de maneira muito rápida, reduzindo a produção, e, conseqüentemente, elevando os custos (PALMIERI et al., 2016). Desde seu primeiro registro em 2004 até o primeiro semestre de 2016, aproximadamente 44 milhões de plantas foram eliminadas apenas no estado de São Paulo (CDA, 2016).

Segundo Belasque Jr et al. (2009), pomares de diferentes regiões do mundo podem se tornar economicamente inviáveis em até dez anos após a detecção da primeira planta sintomática se medidas de controle não forem tomadas. Perda total de produção pode ocorrer em até quatro anos e plantas novas infectadas podem não atingir o período produtivo (BELASQUE JR et al., 2010).

A doença está associada as bactérias “*Candidatus Liberibacter asiaticus*”, “*Ca. L. africanus*” e “*Ca. L. americanus*” e a um fitoplasma (GOTTWALD, 2010). No Brasil ocorre somente “*Ca. L. asiaticus*” e “*Ca. L. americanus*”, com predominância da primeira espécie (LOPES et al., 2007). Um quinto agente causal, “*Ca. L. caribbeanus*”, foi recentemente identificado na Colômbia (região do Caribe) (ICA, 2015). São bactérias gram-negativas de colonização restrita ao floema e não cultiváveis em meio de cultura, pois, são parasitas obrigatórios de seus hospedeiros (plantas ou psilídeos); aspecto que dificulta o estudo desse grupo de bactérias (BELASQUE JR et al., 2009; HAAPALAINEN, 2014).

Segundo Graça et al. (2016), as bactérias associadas ao HLB podem ser transmitidas por meio de enxertia com material contaminado, por plantas parasitas do gênero *Cuscuta* e por insetos vetores. Dentre os vetores primários destacam-se *Trioza erytreae* (Del Guercio, 1918)

(Hemiptera: Triozidae), e *Diaphorina citri* Kuwayama, 1908 (Hemiptera: Liviidae). O primeiro é responsável pela disseminação da doença no continente africano (“*Ca. L. africanus*”), enquanto *D. citri* nas demais regiões afetadas pela doença no mundo (“*Ca. L. asiaticus*” e “*Ca. L. americanus*”) (HALBERT; MANJUNATH, 2004; BOVÉ, 2006).

Além dos referidos vetores, “*Ca. L. asiaticus*” foi detectado em duas outras espécies de psíldeo, *Cacopsylla citrisuga* (Yang e Li, 1984) (Hemiptera: Psyllidae) na China (CEN et al., 2012) e em *Diaphorina communis* Mathur, 1975 (Hemiptera: Liviidae) no Butão (DONOVAN et al., 2012), porém, a importância desses insetos como potenciais vetores da bactéria precisa ser melhor explorada.

O HLB inicialmente manifesta-se de forma setorizada na planta, em determinado ramo ou galho, e seu principal sintoma é o surgimento de um mosqueado irregular entre os lados do limbo foliar. Com a evolução dos sintomas na planta, pode ocorrer desfolha das partes afetadas e morte do ponteiro. Os frutos de plantas afetadas apresentam maturação irregular, são menores, assimétricos e deformados, podendo ainda, ocorrer aborto de sementes (GRAÇA et al., 2016). Os frutos apresentam também menor teor de sólidos solúveis e maior acidez, comprometendo a qualidade do produto destinado a indústria (PLOTTO et al., 2010).

O período entre a infecção e o aparecimento de sintomas característicos da doença é variável e influenciado por diversos fatores, como temperatura, título bacteriano de “*Ca. Liberibacter*”, idade da planta e espécie ou variedades hospedeiras envolvidas (período de latência) (BOVÉ, 2006; BELASQUE JR et al., 2009; HAAPALAINEN, 2014). De acordo com Bové (2006), a duração do período de latência pode variar de 6 a 12 meses; no entanto, a erradicação de plantas sintomáticas não garante a eliminação da doença nos pomares, uma vez que plantas assintomáticas atuam como fonte de inóculo para plantas sadias em todo o pomar (BASSANEZI et al., 2010).

Uma vez que não existem medidas curativas para o controle do HLB, seu manejo baseia-se em ações preventivas e consta de três táticas principais: a utilização de mudas sadias ; a eliminação de plantas sintomáticas dos pomares comerciais; e, sobretudo, o controle do inseto vetor (GOTTWALD, 2010).

Embora *D. citri* provoque danos diretos às plantas pela sucção de seiva, apenas após a detecção do HLB em 2004 na região central do estado de São Paulo (TEIXEIRA et al., 2005) é que o inseto passou a ser considerado praga-chave em citros (PARRA et al., 2010).

D. citri apresenta uma gama de hospedeiros que incluem mais de 50 espécies da família Rutaceae, principalmente espécies do gênero *Citrus* (laranjas, limões, limas) e afins. Entretanto, nem todos os hospedeiros permitem o completo desenvolvimento do inseto, sendo

que em alguns hospedeiros apenas alimentação por adultos é registrada (AUBERT 1987; HALBERT; MANJUNATH, 2004). No caso da citricultura, o número de hospedeiros disponíveis para *D. citri* pode ser ainda maior se considerarmos as combinações de copas e seus porta-enxertos.

A escolha por hospedeiros adequados para alimentação e oviposição é um fator importante para insetos sugadores como os psíldeos, principalmente devido à baixa mobilidade da fase jovem (TECK et al., 2011); no entanto, a escolha do hospedeiro não necessariamente está associada a um melhor desenvolvimento do inseto, podendo apresentar uma correlação negativa entre a oviposição e o 'fitness' da prole (MAYHEW, 2001; WISE et al., 2008).

A capacidade dos insetos em utilizar determinados hospedeiros envolve além da adequação nutricional, uma série de fatores como a localização, a escolha e superação de defesas da planta (VENDRAMIM; GUZZO, 2012; SIMON et al., 2015), sendo seu desempenho (biológico e comportamental) diretamente afetado pelas características físicas e químicas do hospedeiro em potencial (AWMACK; LEATHER, 2002; HODKINSON, 2009).

Dentre os aspectos que afetam o inseto, um dos primeiros é o processo de busca e aceitação do hospedeiro para alimentação e oviposição, no qual o inseto procura a planta mais adequada, baseando-se em sinais visuais e químicos presentes nas plantas (VET; DICKE, 1992; MORAES; LEWIS; TUMLINSON, 2000; BALLHORN et al., 2008). Dessa forma, o conhecimento a respeito da variabilidade na composição de voláteis encontrados nos diferentes hospedeiros ou cultivares são importantes, pois, podem auxiliar o entendimento sobre a atratividade de *D. citri* em função de diferentes variedades cítricas.

Assim como para atratividade, os hospedeiros podem influenciar a alimentação e desenvolvimento de *D. citri*.

Um grande número de trabalhos relata o desenvolvimento diferencial de *D. citri* em função de diferentes hospedeiros/espécies (TSAI; LIU, 2000; NEHRU et al., 2004; NAVA et al., 2007; TSAGKARAKIS; ROGERS, 2010; WESTBROOK et al., 2011; TECK et al., 2011; BORGONI et al., 2014; SETÁMOU; GRAÇA; SANDOVAL II, 2016), e também sobre variedades de uma mesma espécie de citros (ALVES et al., 2014). Tal fato pode ser utilizado no desenvolvimento de estratégias de manejo de insetos praga.

Segundo Hodkinson (2009), hospedeiros apresentam suscetibilidade variável a psíldeos e, muitas vezes, essas diferenças podem ser mais facilmente perceptíveis dentro de uma mesma espécie (variedade) do que entre espécies vegetais. Variações na qualidade nutricional dos diferentes hospedeiros, principalmente relacionados à disponibilidade de

aminoácidos livres, podem determinar o desempenho de insetos sugadores (STEINBAUER, 2013).

Ainda, outro aspecto importante relacionado a insetos vetores, como *D. citri*, é o conhecimento sobre o comportamento alimentar desses insetos. Uma vez que a capacidade de um inseto se alimentar depende de características químicas e morfológicas da planta, diferenças nos tecidos vegetais podem afetar a capacidade de alimentação entre diferentes espécies ou variedades. Segundo Bonani et al. (2010), informações mais detalhadas sobre tal comportamento são fundamentais para compreensão dos mecanismos envolvidos na transmissão da bactéria por *D. citri*.

Embora muitos estudos relatem um comportamento e desenvolvimento diferenciado em função de diferentes espécies vegetais, pouco se sabe sobre a influência de diferentes variedades de copa de uma mesma espécie vegetal e a combinação com seus porta-enxertos nos parâmetros bioecológicos de *D. citri*. Uma vez que, variedades comerciais são geralmente fruto de cruzamento de diferentes espécies, e as características que afetam o inseto presentes nos parentais podem também estar presentes nestas variedades, estas podem afetar os aspectos biológicos desses insetos.

Em função do apresentado, objetivou-se com este trabalho verificar a existência de características de variedades cítricas de copa e porta-enxerto, mais utilizadas na citricultura, que afetam os aspectos bioecológicos do inseto vetor *D. citri*, bem como caracterizá-las, de modo que possam servir de base para desenvolvimento de estratégias de manejo do inseto vetor e da doença.

REFERÊNCIAS

- ALVES, G.R.; DINIZ, A.J.F.; PARRA, J.R.P. Biology of the Huanglongbing Vector *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) on Different Host Plants. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 107, p. 691-696, 2014.
- AUBERT, B. *Trioza erytrae* Del Guercio and *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae), the two vectors of citrus greening disease: biological aspects and possible control strategies. **Fruits**, Paris, v. 42, p. 149-162, 1987.
- AWMACK, C.S.; LEATHER, S.R. Host plant quality and fecundity in herbivorous insects. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 47, p. 817-844, 2002.
- BALLHORN, D.J.; KAUTZ, S.; LION, U.; HEIL, M. Trade-offs between direct and indirect defences of lima bean (*Phaseolus lunatus*). **Journal of Ecology**, Oxford, v. 96, p. 971-980, 2008.
- BARROS, J.R.M.; BARROS, A.L.M.; CYPRIANO, M.P. **O mercado da citricultura no Brasil e as suas novas perspectivas**. São Paulo: CitrusBr, 2016. 63p.
- BASSANEZI, R B.; LOPES, S.A.; BELASQUE Jr. J.; SPÓSITO, M.B.; YAMAMOTO, P.T.; MIRANDA, M.P.; TEIXEIRA, D.C.; WULFF, N.A. Epidemiologia do Huanglongbing e suas implicações para o manejo da doença. **Citrus Research and Technology**, Cordeirópolis, v. 31, n. 1, p. 11-23, 2010.
- BELASQUE JR, J.; BASSANEZI, R.B.; YAMAMOTO, P.T.; AYRES, A.J.; TACHIBANA, A.; VIOLANTE, A.R.; TANK JR, A.; DI GIORGI, F.; TERSI, F.E.A.; MENEZES, G.M.; DRAGONE, J. JANK JR, R.H.; BOVÉ, J.M. Lessons from huanglongbing management in São Paulo state, Brazil. **Journal of Plant Pathology**, Pisa, v. 92, p. 285-302, 2010.
- BELASQUE Jr. J.; BERGAMIN FILHO, A.; BASSANEZI, R.B.; BARBOSA, J.C.; GIMENES FERNANDES, N.; YAMAMOTO, P.T.; LOPES, S.A. MACHADO, M.A.

LEITE Jr. R P.; AYRES, J.A. MASSARI, C.A. Base científica para erradicação de plantas sintomáticas de assintomáticas de Huanlongbing (HLB, greening) visando o controle efetivo da doença. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 34, p. 137-145, 2009.

BONANI, J.P.; FERERES, A.; GARZO, E.; MIRANDA, M.P.; APPEZZATO-DA-GLORIA, B.; LOPES, J.R.S. Characterization of electrical penetration graphs of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, in sweet orange seedlings. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Lanham, v. 134, p. 35-49, 2010.

BORGONI, P.C.; VENDRAMIM, J.D.; LOURENÇÃO, A.L.; MACHADO, M.A. Resistance of *Citrus* and Related Genera to *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 43, p. 465-469, 2014.

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

CEN, Y.; ZHANG, L.; XIA, Y.; GUO, J.; DENG, X.; ZHOU, W.; SEQUEIRA, R.; GAO, J.; WANG, Z.; YUE, J.; GAO, Y. Detection of “*Candidatus Liberibacter Asiaticus*” in *Cacopsylla (Psylla) citrisuga* (Hemiptera: Psyllidae). **Florida Entomologist**, Lutz, v. 95, n. 2, p. 304-311, 2012.

COORDENADORIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA (CDA). Disponível em: <<http://www.defesaagropecuaria.sp.gov.br/www/gdsv/index?action=dadosCitriculturaPaulista>>. Acesso em: 15 out. 2016.

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

DONOVAN, N.J.; BEATTIE, G.A.C.; CHAMBERS, G.A.; HOLFORD, P.; ENGLEZOU, A.; HARDY, S.; DORJEE.; WANGDI, P.; THINLAY.; OM, N. First report of “*Candidatus*

Liberibacter asiaticus” in *Diaphorina communis*. **Australas Plant Disease Notes**, cidade v. 7, p. 1-4, 2012.

FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/faostat/en/#home>. Acesso em: 18 Nov 2016.

GOTTWALD, T.R. Current Epidemiological Understanding of Citrus Huanglongbing. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 48, p. 119-139, 2010.

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

HAAPALAINEN, M. Biology and epidemics of *Candidatus* Liberibacter species, psyllid-transmitted plant-pathogenic bacteria. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 165, 172-198, 2014.

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

HALL, D.G.; RICHARDSON, M.L.; AMMAR, E.; HALBERT, S.E. Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, vector of citrus huanglongbing disease. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 146, p. 207-223, 2012.

HODKINSON, I.D. Life cycle variation and adaptation in jumping plant lice (Insecta: Hemiptera: Psylloidea): a global synthesis. **Journal of Natural History**, London, v. 43, p. 65-179, 2009.

INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUÁRIO (ICA). Disponível em: <[http://www.ica.gov.co/Noticias/Agricola/2013-\(1\)/El-ICAjunto-con-ARS-USDA-y-la-Universidad-de-Cali.aspx](http://www.ica.gov.co/Noticias/Agricola/2013-(1)/El-ICAjunto-con-ARS-USDA-y-la-Universidad-de-Cali.aspx)>. Acesso em: 01 jul. 2015.

- LOPES, S.A.; FRARE, G.F.; YAMAMOTO, P.T.; AYRES, A.J.; BARBOSA, J.C. Ineffectiveness of pruning to control citrus huanglongbing caused by *Candidatus Liberibacter americanus*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 119, p. 463-468, 2007.
- MAYHEW, P.J. Herbivore host choice and optimal bad motherhood. **Trends in Ecology & Evolution**, London, v. 16, n. 4, p. 165-167, 2001.
- MORAES, C.M.; LEWIS, W.J.; TUMLINSON, J.H. Examining plant-parasitoid interactions in thritrophic systems. **Anais da Sociedade Brasileira de Entomologia**, Londrina, v. 29, n. 2, p. 189-203. 2000.
- NAVA, D.E.; TORRES, M.L.G.; RODRIGUES, M.D.L.; BENTO, J.M.S.; PARRA, J.R.P. Biology of *Diaphorina citri* (Hem., Psyllidae) on different hosts and different temperatures. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 131, p. 9-10, 2007.
- NEHRU, R.K.; BHAGAT, K.C.; KOUL, V.K. Influence of citrus species on the development of *Diaphorina citri*. **Annals of Plant Protect Science**, cidade v. 12, p. 436-438, 2004.
- NEVES, M.F. **O Retrato da Citricultura Brasileira**. Ribeirão Preto: Markestrat, 2010. 71p.
- PALMIERI, F.G.; CAPPELLO, F.P.; BOTEON, M.; PAGLIUCA, L.G. Caminhos da citricultura no pós-crise. **Hortifrut Brasil**, Piracicaba, n. 14, p. 10-19, 2016.
- PARRA, J.R.P.; LOPES, J.R.S.; GOMEZ-TORRES, M.L.; NAVA, D.E.; PAIVA, P.E.B. Bioecologia do vetor *Diaphorina citri* e transmissão de bactérias associadas ao Huanglongbing. **Citrus Research and Technology**, Cordeirópolis, v. 31, n. 1, p. 37-51, 2010.
- PLOTTO, A.; BALDWIN, E.; MCCOLLUM, G.; MANTHEY, J.; NARCISO, J.; IREY, M. Effect of *Liberibacter* Infection (Huanglongbing or “Greening” Disease) of Citrus on Orange Juice Flavor Quality by Sensory Evaluation. **Journal of Food Science**, Hoboken, v. 75, n. 4, p. 220-230, 2010.

- SETÁMOU, M.; GRAÇA, J.V.; SANDOVAL II, J.L. Suitability of native North American Rutaceae to serve as host plants for the Asian citrus psyllid (Hemiptera: Liviidae). **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v 140, n. 9, pag. 645-654, 2016.
- SIMON, J.C.; D'ALENÇON, E.; GUY, E.; JACQUIN-JOLY, E.; JAQUIÉRY, J.; NOUHAUD, P.; PECCOUD, J.; SUGIO, A.; STREIFF, R. Genomics of adaptation to host-plants in herbivorous insects. **Briefings in Functional Genomics**, cidade v. 14, p. 413-423, 2015.
- SPÓSITO, M.B.; BASSANEZI, R.B. Manejo de doenças dos citros. In: PINTO, A.S.; ZACCARO, R.P. **Produção de mudas e manejo fitossanitário dos citros**. Piracicaba: CP2, 2008. p. 87-108.
- STEINBAUER, M.J. Shoot Feeding as a Nutrient Acquisition Strategy in Free-Living Psyllids. **PLoS ONE**. doi:10.1371/journal.pone.0077990, 2013.
- TECK, S.L.C.; FATIMAH, A.; BEATTIE, A.; HENG, R.K.J.; KING, W.S. Influence of Host Plant Species and Flush Growth Stage on the Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama. **American journal of Agricultural and Biological Sciences**, New York, v. 6, n. 4, p. 536-543, 2011.
- TEIXEIRA, D.C.; SAILLARD, C.; EVEILLARD, S.; DANET, J.L.; da COSTA, P.I.; AYRES, A.J.; BOVÉ, J.M. *Candidatus* Liberibacter americanus associated with citrus huanglongbing (greening disease) in São Paulo State, Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 55, p. 1857-1862, 2005.
- TSAGKARAKIS, A.E.; ROGERS, M.E. Suitability of 'Cleopatra' Mandarin as a host plant for *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). **Florida Entomologist**, Lutz, v. 93, v. 3, p. 451-453, 2010.
- TSAI, J.H.; LIU, Y.H. Biology of *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) on four host plants. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 93, n. 6, p.1721-1725, 2000.

- VENDRAMIM, J.D.; GUZZO, E.C. Plant resistance and insect bioecology and nutrition. In: PANIZZI, A.R.; PARRA, J.R.P. **Insect bioecology and nutrition for integrated pest management**. Boca Raton: CRC, 2012. pp 657-686.
- VET, L.E.M.; DICKE, M. Ecology of infochemical use by natural enemies in a tritrophic context. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 37, p. 141-172, 1992.
- WESTBROOK, C.J.; HALL, D.G.; STOVER, E.; DUAN, Y.P.; LEE, R.F. Colonization of Citrus and Citrus-related Germplasm by *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). **Hortscience**, Alexandria, v. 46, n. 7, p. 997-1005, 2011.
- WISE, M.J.; PARTELOW, J.M.; EVERSON, K.J.; ANSELMO, M.K.; ABRAHAMSON, W.G. Good mothers, bad mothers, and the nature of resistance to herbivory in *Solidago altissima*. **Oecologia**, Berlin, v. 155, p. 257-266, 2008.

2. COMPORTAMENTO DE ESCOLHA HOSPEDEIRA DE *Diaphorina citri* KUWAYAMA, 1908 (HEMIPTERA: LIVIIDAE) EM DIFERENTES VARIEDADES CÍTRICAS E IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS ENVOLVIDOS

RESUMO

Huanglongbing (HLB) é considerada a principal doença da citricultura no mundo. Os sintomas na planta estão associados com as bactérias “*Candidatus Liberibacter spp.*”, cujo vetor é *Diaphorina citri* Kuwayama, 1908 (Hemiptera: Liviidae). Este inseto apresenta uma gama de hospedeiros da família Rutaceae, especialmente do gênero *Citrus*. O processo de escolha e aceitação do hospedeiro, no qual *D. citri* seleciona os mais adequados baseando-se em sinais visuais e químicos, desempenha um papel fundamental na escolha hospedeira. Neste estudo, avaliou-se o efeito de compostos voláteis liberados por plantas cítricas de diferentes variedades sobre o comportamento de seleção de hospedeira de *D. citri*. Foram testadas a tangerineira 'Ponkan' (*Citrus reticulata*), as laranjeiras 'Pêra', 'Hamlin' e 'Valência' (*C. sinensis*) e o limoeiro 'Siciliano' (*C. lemon*) enxertados em limoeiro 'Cravo' (*C. limonia*); além das variedades 'Valência' e 'Pêra' enxertadas em tangerineira 'Sunki' (*C. sunki*) e limoeiro 'Cravo'. Foram realizados bioensaios utilizando olfatomêtro do tipo Y. Os tratamentos foram compostos por diferentes variedades cítricas *versus* controle (branco), e a combinação destas variedades em pares. Foram utilizados *D. citri* (15 dias de idade) criados em murta (*Murraya paniculata*). Os bioensaios foram realizados no período de maior atividade de insetos, entre 10:00 e 17:00 h, sob condições controladas (25 ± 2 °C, U.R. $60 \pm 10\%$). Os compostos orgânicos voláteis liberados pelas plantas foram coletados e identificados. Separadamente, todas as variedades testadas foram atrativas para *D. citri* (exceto 'Valência' para machos). Além disso, quando confrontados entre si, apenas as fêmeas apresentaram resposta diferencial entre as combinações. 'Pêra' e 'Valência' foram mais atrativas quando confrontados com 'Hamlin', e também pela combinação 'Valência' e 'Siciliano', com mais atratividade para a primeira variedade. Não foi observado comportamento de escolha diferenciada para as variedades 'Pêra' e 'Valência' enxertadas nos diferentes porta-enxertos. De acordo com os compostos voláteis obtidos a partir de plantas cítricas, podem ser observadas diferenças no perfil quantitativo e qualitativo para cada variedade testada, com a predominância de terpenoides. Os resultados sugerem que todas as variedades testadas possuem compostos voláteis atraentes para *D. citri* e a identificação destes compostos é útil para uma melhor compreensão do processo de escolha hospedeira desta praga.

Palavras-chave: Psilídeo-asiático-dos-citros; Interação inseto-planta; Olfatometria; Huanglongbing, *Citrus spp.*

ABSTRACT

Huanglongbing (HLB) is considered the most important citrus disease in the world. The symptoms in the plant are associated with the bacteria “*Candidatus Liberibacter spp.*”, which vector is *Diaphorina citri* Kuwayama, 1908 (Hemiptera: Liviidae). This insect has a host range of the Rutaceae family, especially of the genus *Citrus*. The choice process and acceptance of the host, in which *D. citri* selects the most suitable hosts basing on chemical and visual cues plays a key role in this choice. This study evaluated the effect of volatile compounds released by citrus plants of different varieties on the host selection behavior of *D. citri*. Were tested 'Ponkan' mandarin (*Citrus reticulata*), 'Pera', 'Hamlin' and 'Valencia' sweet orange (*C.*

sinensis) and 'Sicilian' lemon (*C. lemon*) grafted on 'Rangpur lime' (*C. limonia*); and also, 'Valenci'a and 'Pera' varieties grafted on 'Sunki' mandarin (*C. sunki*) and 'Rangpur lime'. Bioassays using olfactometer in 'Y' were conducted. The treatments were composed of different citrus varieties vs. control (blank), and the combination of these varieties in pairs. Were used *D. citri* (15 days old) reared in orange jasmine (*Murraya paniculata*). The bioassays were performed at the time of higher insect activity, between 10:00 and 17:00 h, under controlled conditions (25 ± 2 °C, RH $60 \pm 10\%$). The volatile organic compounds released by the plants were collected and identified. Separately, all varieties of citrus were attractive to *D. citri* (except Valencia for males). Moreover, when confronted with each other, only females showed a differential response among the combinations. 'Pera' and 'Valencia' were more attractive when confronted with 'Hamlin', and, also, for the combination between Valencia vs. 'Sicilian', with more attractiveness to the first one. No differentiated choice behavior was observed for the 'Pera' and 'Valencia' varieties grafted on the different rootstocks. According to the compounds obtained from citrus plants, differences in the quantitative and qualitative profile can be observed for each variety tested, with predominance of terpenoids. The results suggest that, all tested varieties have volatile compounds attractive to *D. citri*, and the identification of these compounds are useful for a better understanding the host selection process of this pest.

Keywords: Asian citrus psyllid; Insect-plant interaction; Olfactometry; Huanglongbing; *Citrus* spp.

2.1. Introdução

Insetos fitófagos apresentam estreita relação com seus hospedeiros, os quais constituem principalmente sua fonte alimentar e de reprodução. No entanto, a capacidade dos insetos em utilizar plantas como hospedeiros envolve além da adequação nutricional, uma série de fatores como a localização e a escolha da planta (SIMON et al., 2015).

Dentre os aspectos que afetam o inseto, um dos primeiros é o processo de busca e aceitação para alimentação, no qual a herbívoro procura a planta mais adequada baseando-se em sinais visuais e químicos em possíveis hospedeiros (VET; DICKE, 1992; MORAES; LEWIS; TUMLINSON, 2000; BALLHORN et al., 2008; SULE et al., 2012).

Diaphorina citri Kuwayama, 1908 (Hemiptera: Liviidae) é o principal vetor das bactérias associadas ao Huanglongbing (HLB), e apresenta uma gama de hospedeiros que incluem as espécies e variedades de *Citrus* e afins, incluindo murta (*Murraya paniculata*), principal hospedeiro desse inseto (AUBERT, 1987; HALBERT; MANJUNATH, 2004; TECK et al., 2011).

O HLB avança de maneira muito rápida, reduzindo a produtividade, além de elevar os custos de produção (PALMIERI et al., 2016). Até o momento, não existem medidas curativas para o controle do HLB e seu manejo é focado em ações preventivas, que consta de três táticas

principais: plantio de mudas sadias, eliminação de plantas sintomáticas, e, principalmente, o controle do inseto vetor, basicamente com inseticidas (GOTTWALD, 2010).

A identificação de compostos químicos voláteis atraentes para *D. citri* poderia permitir o desenvolvimento de novas táticas de monitoramento e controle desse inseto, otimizando o uso racional de inseticidas, por exemplo. Ainda, o conhecimento do comportamento de escolha hospedeira de *D. citri*, pode auxiliar no entendimento da epidemiologia do HLB, importantes para futuros trabalhos de resistência de plantas ao psilideo (RUAN et al., 2015).

Adultos de *D. citri* estão associados a ramos novos utilizados para alimentação e principalmente oviposição, pois fêmeas dessa espécie só colocam ovos nessas estruturas (GOMEZ-TORRES, 2009). Dessa forma, a disponibilidade de brotações e consequentemente a liberação de compostos voláteis, desempenham importante papel na atratividade desse inseto por plantas hospedeiras em potencial (HALL et al., 2015).

Os voláteis de plantas são importantes, pois podem fornecer pistas que auxiliam o psilideo a discriminar os hospedeiros mais adequados a seu desenvolvimento (PATT et al., 2014), uma vez que a seleção por sítios ótimos de oviposição é um fator importante para psilideos como *D. citri*, devido à baixa mobilidade de sua fase imatura (TECK et al., 2011).

Os psilídeos são insetos dinâmicos pois apresentam comportamento de escolha hospedeira distinto em função de diferentes espécies vegetais (PATT; SETÁMOU, 2010; RUAN et al., 2015; STOCKTON et al., 2016). Porém, pouco se sabe acerca de sua atratividade em relação a diferentes variedades de uma mesma espécie vegetal. Segundo Ballhorn et al. (2008), variações na composição dos compostos secundários e dos voláteis liberados podem ser encontradas nas diferentes variedades de uma cultivar.

Além da variedade de copa, estudos mostram a influência do porta-enxerto no metabolismo da copa (KOEPEKE; DHINGRA, 2013; SOARES et al., 2015), alterando principalmente a biossíntese dos perfis químicos da planta (RIBEIRO et al., 2008). Sendo assim, a variabilidade na composição de voláteis que podem ser encontrados nas diferentes cultivares tornam ainda mais complexa a dinâmica de busca e aceitação hospedeira por *D. citri*.

Dessa forma, objetivou-se com este trabalho verificar a preferência de *D. citri* entre diferentes variedades cítricas de copa e porta-enxerto por meio de bioensaios de olfatomетria e identificar os possíveis voláteis envolvidos no processo.

2.2. Material e Métodos

2.2.1. Criação de *Diaphorina citri* e manutenção de plantas

Os insetos foram obtidos da criação e manutenção do laboratório de Manejo Integrado de Pragas do Departamento de Entomologia e Acarologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo. Os insetos foram criados em murta [*Murraya paniculata* (L.) Jack.], de acordo com metodologia descrita por Parra et al. (2016).

Foram utilizadas as seguintes variedades de citros: laranjeira doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] das variedades ‘Hamlin’, ‘Pêra’ e ‘Valência’, tangerineira ‘Ponkan’ (*C. reticulata* Blanco) e limoeiro ‘Siciliano’ [*C. limon* (L.) Burm. f.], sobre os porta-enxertos limoeiro ‘Cravo’ (*C. limonia* Osbeck) e tangerineira ‘Sunki’ [*C. sunki* (Hayata)]. As plantas utilizadas no trabalho foram produzidas em viveiro experimental protegido com tela do Centro de Citricultura Sylvio Moreira, em Cordeirópolis/SP. As mudas foram integralmente produzidas em tubetes plásticos de 700 mL (Polifer®). Primeiramente foi realizada a semeadura dos porta-enxertos e posterior enxertia de borbulhas das diferentes variedades de copa. Foram utilizadas mudas com porte médio de 20 cm de copa e 8 meses de idade.

Até o momento da utilização, as mudas foram mantidas em casa de vegetação, onde eram diariamente irrigadas e fertilizadas quinzenalmente com solução foliar do adubo de “Peter’s” (NPK 20 – 20 – 20) a 1%.

2.2.2. Atratividade de *D. citri* em diferentes variedades de copa de citros e seus porta-enxertos

Para investigar o efeito dos voláteis das diferentes variedades de citros sobre o comportamento de seleção hospedeira de *D. citri* foram realizados bioensaios em olfatômetro de vidro do tipo ‘Y’, constituído de um tubo principal e dois tubos laterais de vidro (20 × 3 cm), os quais foram conectados às cubas de vidro contendo os tratamentos, que foram constituídos por duas plantas das diferentes variedades avaliadas. As plantas foram mantidas em cubas de vidro (9,5 cm diâmetro × 50 cm altura) conectadas ao olfatômetro por mangueiras de silicone. O fluxo de ar de 1 L min⁻¹, foi promovido por uma bomba de vácuo e controlado por fluxômetros conectados ao olfatômetro, permitindo passagem do ar pelos tubos laterais e a chegada dos odores ao tubo principal.

O experimento foi dividido em duas etapas. Na primeira, cada tratamento foi composto por uma variedade de copa, sendo elas: laranjeiras ‘Hamlin’, ‘Pêra’ e ‘Valência’, tangerineira

‘Ponkan’ e limoeiro ‘Siciliano’ enxertadas sobre o porta-enxerto limoeiro ‘Cravo’ (*C. limonia* Osbeck) que foram confrontados entre si, dois a dois. Antes de testar a atratividade entre plantas, foram realizados bioensaios comparando a resposta dos insetos para plantas *versus* branco (ar puro) em um total de 30 repetições por tratamento para ambos os sexos.

A atratividade de fêmeas e machos foi avaliada comparando a preferência destes em relação às diferentes variedades de copa testadas. A escolha do odor foi determinada quando um indivíduo cruzou uma linha previamente marcada na porção final do tubo, denominada linha de escolha. O tempo de escolha determinada a cada indivíduo foi de cinco minutos. Insetos que não escolheram entre um dos braços do olfatômetro durante o tempo estipulado foram considerados como não resposta. Apenas insetos que apresentaram resposta foram incluídos na análise dos dados.

Na segunda parte do experimento foram testados diferentes porta-enxertos para aquelas variedades de copa em que *D. citri* apresentou comportamento diferenciado no primeiro experimento. Dessa forma, cada tratamento foi composto pelas variedades de copa ‘Pêra’ e ‘Valência’ enxertadas em limoeiro ‘Cravo’ e tangerineira ‘Sunki’ [*C. sunki* (Hayata)], que foram confrontados entre si, dois a dois. Para este bioensaio, apenas fêmeas de *D. citri* foram utilizadas visto que no experimento anterior, machos dessa espécie não apresentaram atratividade diferenciada entre os hospedeiros testados.

O tubo Y foi montado verticalmente sob um conjunto de luzes brancas fluorescentes suspensas nas extremidades distais dos braços do tubo. O tudo em Y foi montado na vertical devido à fototaxia positiva apresentada por *D. citri* (MANN et al., 2011).

Para ambos experimentos, a cada dez repetições as plantas de citros foram substituídas por outras plantas do mesmo tratamento e os insetos trocados a cada repetição. A fim de evitar tendência da posição pelos insetos, o tubo em Y foi rotacionado a 180° a cada repetição e substituído por um tubo limpo a cada cinco repetições.

Com o intuito de manter maior uniformidade no bioensaio, foram utilizadas mudas com dois fluxos vegetativos (brotos) com tamanho médio de 8-11 mm e adultos com 15 dias de idade, e em jejum por um período de duas horas. Foram utilizadas plantas cítricas intactas, ou seja, sem nenhum contato prévio com *D. citri*.

Os bioensaios foram realizados no horário de maior atividade do inseto, entre as 10:00 e 17:00 h (SETÁMOU et al., 2012), sob condições controladas (24 ± 2 °C; U.R. $60 \pm 10\%$).

2.2.3. Coleta e identificação de voláteis

Para a coleta dos voláteis, as mudas de citros foram acondicionadas dentro de cubas de vidro (18 cm diâmetro $\times$ 45 cm altura), conectadas ao sistema automático de coleta (Research Systems Analytical, Gainesville, FL, EUA). Através da uma abertura superior da cuba, ar purificado e umidificado foi inserido a uma taxa controlada de fluxo de 8,0 ml min⁻¹. Com passagem do ar na cuba, foi possível coletar os compostos voláteis com um coletor de vidro contendo polímero adsorvente Porapak-Q (980/100 mesh), este, acoplado em uma abertura inferior da cuba de vidro.

Os voláteis foram coletados por um período de sete horas (10:00 - 17:00 h) sob condições controladas (26 ± 2 °C, U.R. $60 \pm 10\%$) (mesmas condições em que os bioensaios foram realizados).

Assim como realizado para o bioensaio de olfatometro em “Y”, a coleta de voláteis foi realizada em duas partes. Para a primeira, foram coletados os compostos voláteis de seis plantas de cada tratamento e um controle (cuba de vidro com ar puro), sendo os tratamentos compostos pelas mesmas variedades do primeiro bioensaio, ou seja: ‘Hamlin’, ‘Pêra’, ‘Valência’, ‘Ponkan’ e ‘Siciliano’ sobre o porta-enxerto limoeiro ‘Cravo’.

Para a segunda parte, um total de cinco plantas por tratamento e um controle foram utilizados. Os tratamentos foram compostos pelas variedades ‘Pêra’ e ‘Valência’ enxertadas em tangerineira ‘Sunki’ e limoeiro ‘Cravo’. Diferentemente do primeiro experimento, devido a indisponibilidade das cubas de vidro, foram utilizados sacos de poliéster (41 $\times$ 33 cm) (Wyda, Sorocaba, SP, Brasil) para a coleta dos compostos voláteis, seguindo-se a mesma metodologia.

Ao término das aerações, todas as folhas das plantas utilizadas foram retiradas, acondicionadas em envelopes de papel e mantidas em estufa a 110 °C, contabilizando posteriormente o peso seco de cada planta. O peso seco das folhas foi utilizado como medida de correção para os voláteis coletados, uma vez que as folhas das variedades estudadas variam em número e tamanho, mesmo usando-se de plantas com a mesma idade.

Após as aerações, os capilares contendo o polímero adsorvente foram eluídos com 150 μ L de diclorometano (Merck, Dietikon, Switzerland) e adicionados a cada amostra, 2 ng de acetato de nonyla, composto sintético usado como padrão interno. Após a eluição, os ‘vials’ (3 mL) contendo as amostras foram fechados hermeticamente e armazenados em freezer à -20 °C onde foram mantidos até o momento das análises.

As análises químicas foram realizadas em um cromatógrafo gasoso (Varian GC 3800) acoplado a um espectrômetro de massa (GC-MSQP 2010, Shimadzu, Japão) equipado com uma coluna capilar apolar (coluna capilar HP1-MS 30 m $\times$ 0,25 mm $\times$ 0,25 mm, Agilent J & W, EUA). O equipamento foi operado em modo de impacto de elétrons (70 eV) e faixa de varredura

de massa de 35-250 m/z. O injetor (modo splitless) e detector foram operados a uma temperatura de 220 °C. Após a injeção de uma alíquota de 2 µl por amostra, a coluna foi mantida a uma temperatura de 35 °C 5 min⁻¹, subindo à 5 °C min⁻¹ até 150 °C e permanecendo nessa temperatura por cinco minutos, para então se elevar novamente a 5 °C min⁻¹ até 250 °C permanecendo nesta por mais 20 min.

Os compostos foram identificados com base no Índice de Kovats (KI) e comparação dos espectros de massa dos mesmos compostos mantidos na biblioteca NIST 2011. Padrões sintéticos (Sigma-Aldrich) dos respectivos compostos também foram utilizados para a identificação e confirmação por co-injeção com o extrato natural. As quantificações foram realizadas em cromatógrafo gasoso acoplado a um detector de ionização de chama (GC-FID 2010, Shimadzu, Japão) equipado com uma coluna capilar HP-5MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 mm, Agilent J & W, EUA).

2.2.4. Análise estatística

Os valores obtidos nos bioensaios em olfatometria foram submetidos à análise estatística com um Modelo Linear Generalizado (GLM - *Generalized Linear Model*) com distribuição binomial.

Antes da análise, as quantidades de compostos voláteis coletados das plantas cítricas foram avaliadas quanto à normalidade e homogeneidade das variâncias usando testes de Bartlett e Shapiro-Wilk. Por não atender a normalidade, os dados referentes as coletas do primeiro teste (diferentes variedades de copa sobre um mesmo porta-enxerto), foram comparados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Dados obtidos do segundo teste (variedades de copa sobre diferentes porta-enxertos) foram comparados por meio do teste não paramétrico de Wilcoxon rank.

Todas as análises foram feitas utilizando-se o software R (R Core Team 2015).

2.3. Resultados

2.3.1. Atratividade de *D. citri* em diferentes variedades de copa de citros e seus porta-enxertos

Inicialmente, todas as variedades cítricas testadas foram atrativas para fêmeas de *D. citri* quando essas foram confrontadas com o tratamento controle (ar puro) (Figura 1). Quanto aos machos, apenas a variedade ‘Valência’ não apresentou atratividade diferenciada frente ao controle (Figura 2). Tais resultados indicam forte atratividade dos insetos, uma vez que, em média, 70% dos insetos testados responderam ao lado do braço do olfatômetro no qual apresentavam odores das plantas cítricas.

Figura 1. Número de fêmeas de *Diaphorina citri* atraídas por compostos orgânicos voláteis emitidos pelas diferentes variedades cítricas (citros vs. branco). Asteriscos indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos, * = $p \leq 0,05$.

Figura 2. Número de machos de *Diaphorina citri* atraídos por compostos orgânicos voláteis emitidos pelas diferentes variedades cítricas (citros vs. branco). Asteriscos indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos, * = $p \leq 0,05$.

Ademais, quando confrontados entre si, houve diferença na resposta entre os genótipos de laranja doce na atratividade das fêmeas de *D. citri*, para a combinação entre ‘Valência’ versus ‘Hamlin’ ($n = 40$; $X^2(79, 78) = 105,85$, $P = 0,02458$) e ‘Pêra’ versus ‘Hamlin’ ($n = 37$; $X^2(73, 72) = 93,25$; $P < 0,001$), ambas com maior atratividade para as primeiras variedades (Figura 3). Ainda, a variedade ‘Valência’ apresentou maior atratividade por fêmeas de *D. citri* quando essa foi comparada com o limão ‘Siciliano’. No entanto, quando machos foram testados, não se observou nenhuma atratividade diferencial entre os diferentes hospedeiros utilizados (Figura 4).

As combinações da variedade de copa ‘Pêra’ sobre os porta-enxertos limoeiro ‘Cravo’ e tangerineira ‘Sunki’ testadas não alteraram o comportamento de escolha hospedeira pelas fêmeas de *D. citri* ($n = 40$; $X^2(79, 78) = 110,40$; $P = 0,502$). O mesmo padrão foi observado para a combinação entre a copa ‘Valência’ sobre os mesmos porta-enxertos ($n = 40$; $X^2(79, 78) = 109,10$; $P = 1,787$) (Figura 5).

Figura 3. Número de fêmeas de *Diaphorina citri* atraídas por compostos orgânicos voláteis emitidos pelas diferentes variedades cítricas (citros vs. citros). O asterisco indica diferença significativa entre os tratamentos, ** = $p \leq 0,05$.

Figura 4. Número de machos de *Diaphorina citri* atraídos por compostos orgânicos voláteis emitidos pelas diferentes variedades cítricas (cítricos vs. cítricos). NS = não significativo.

Figura 5. Número de fêmeas de *Diaphorina citri* atraídas por compostos orgânicos voláteis emitidos pelas diferentes combinações copa e porta-enxerto de cítricos. NS = não significativo.

2.3.2. Coleta e identificação de voláteis

A fim de facilitar o entendimento, os resultados das coletas e identificações dos compostos voláteis foram separados como descrito a seguir.

2.3.2.1. Diferentes variedades de copa sobre um mesmo porta-enxerto

A identificação dos compostos foi realizada com base no cálculo do índice de Kovats (Tabela 1), com a comparação dos espectros de cada composto e com injeção dos compostos sintéticos para confirmação.

No presente estudo, um total de 21 compostos orgânicos voláteis foram coletados e 19 identificados (Tabela 1). No entanto, dentre os compostos voláteis identificados, diferenças estatísticas foram obtidas apenas para os compostos sabineno ($F= 9,58; P \leq 0,05$), (E) alfa-farneseno ($F= 12,46; P \leq 0,05$), ácido benzoico ($F= 3,15; P \leq 0,05$), linalol ($F= 1,94; P \leq 0,05$), germacreno D ($F= 1,19; P \leq 0,05$) e (E)-beta-farneseno ($F= 12,46; P \leq 0,05$) (Figura 6).

Dentre os diversos compostos orgânicos voláteis coletados a partir de plantas de citros das diferentes variedades, observou-se a predominância de monoterpenos e sesquiterpenos (Tabela 1).

Tabela 1. Tempo de retenção (Rt), índice de Kovats (KI), área de pico (%), identificação e classe de compostos org voláteis liberados por cinco genótipos de citros enxertados em limoeiro ‘Cravo’, utilizando-se a análise de GC-MS.

Identificação do composto	Classe	Rt (min)	KI	Área de pico (%)				
				Hamlin	Pêra	Valência	Ponkan	Siciliano
α -pineno	monoterpeno	11,595	939	7,08	9,77	11,65	3,20	5,44
sabineno	monoterpeno	12,772	971	6,00	2,28	0,16	15,81	0,77
limoneno	monoterpeno	14,697	1027	15,57	42,11	7,61	4,15	22,83
cis-ocimeno	monoterpeno	15,402	1048	38,20	14,75	0,40	18,30	5,61
γ -terpineno	monoterpeno	15,728	1058	0,00	0,00	0,00	3,38	0,00
linalol	monoterpeno	17,077	1098	1,41	2,80	0,00	16,18	1,59
nonanol	álcool	17,232	1103	2,06	7,07	18,83	0,90	1,24
ácido benzóico	ácido carboxílico	19,999	1194	10,65	2,16	0,00	1,70	9,66
decanol	aldeído	20,322	1205	1,92	4,75	21,51	1,20	1,31
indol	alcaloide	22,831	1294	0,00	0,00	0,00	0,00	0,73
1,2,3-propanetriol, tracetato	éster	24,374	1351	1,41	0,69	0,00	1,23	0,52
tetradecano <n->	hidrocarboneto	25,617	1398	1,48	4,44	0,00	0,15	0,40
(E)- β -cariofileno	sesquiterpeno	26,254	1423	4,96	1,29	1,13	2,22	1,52
(E)- α -bergamoteno	sesquiterpeno	26,568	1435	0,00	0,00	0,00	2,21	0,00
γ -elemeno	sesquiterpeno	26,621	1437	0,00	0,00	0,00	0,00	0,48
geraniol acetato	cetona	26,991	1451	0,16	1,65	4,90	0,00	0,31
(E)- β -farneseno	sesquiterpeno	27,094	1455	1,26	1,25	0,00	14,10	5,68
germacreno D	sesquiterpeno	27,850	1485	0,27	0,25	0,00	1,30	0,00
(E)- α -farneseno	sesquiterpeno	28,433	1512	0,30	0,00	0,00	3,85	30,04
não identificado I	-	29,647	1584	5,39	3,04	0,00	8,41	1,81
não identificado II	-	29,899	1599	1,88	1,69	33,81	1,71	2,06

Figura 6. Média da área de pico ($\pm$ erro padrão) de compostos orgânicos voláteis de cinco genótipos de citros, utilizando-se a análise de GC-MS.

Figura 6. *Continuação.* Média da área de pico ($\pm$ erro padrão) de compostos orgânicos voláteis de cinco genótipos de citros, utilizando-se a análise de GC-MS.

2.3.2.2. Variedades de copa sobre diferentes porta-enxertos

Assim como para o item anterior (2.3.2.1), a identificação foi realizada com base no cálculo do índice do Kovats e os compostos confirmados com injeção de compostos sintéticos. Um total de 13 compostos voláteis orgânicos foram identificados para a combinação ‘Pêra/Cravo’ e 14 compostos para ‘Pêra/Sunki’, não sendo observadas diferenças significativas entre os tratamentos, com predominância de terpenoides nos compostos voláteis coletados (Tabela 2).

Tabela 2. Tempo de retenção (Rt), área de pico (%), identificação e classe de compostos orgânicos voláteis liberados por laranjeira Pêra enxertada em limão ‘Cravo’ e tangerina ‘Sunki’, utilizando-se a análise de GC-MS.

Identificação do composto	Classe	Rt (min)	Área de Pico (%)		P
			Pêra/Cravo	Pêra/Sunki	
α -pineno	monoterpeno	10,684	$0,42 \pm 0,26$	$1,17 \pm 0,54$	0,19
sabineno	monoterpeno	12,010	$5,74 \pm 4,05$	$19,80 \pm 11,00$	0,11
mirceno	monoterpeno	12,759	$0,61 \pm 0,46$	$2,06 \pm 1,24$	0,28
α -felandreno	monoterpeno	13,112	$0,12 \pm 0,10$	$0,36 \pm 0,21$	0,38
3-careno	monoterpeno	13,366	$2,34 \pm 1,86$	$8,06 \pm 4,89$	0,19
limoneno	monoterpeno	13,959	$6,79 \pm 4,09$	$13,60 \pm 8,04$	0,55
β -ocimeno	monoterpeno	14,651	$1,77 \pm 1,61$	$3,42 \pm 1,62$	0,17
linalol	monoterpeno	16,163	$0,24 \pm 0,18$	$3,09 \pm 2,34$	0,38
citronelol	monoterpeno	17,625	$0,27 \pm 0,12$	$1,28 \pm 0,49$	0,28
(Z)-citrol	monoterpeno	20,087	$0,00 \pm 0,00$	$0,93 \pm 0,88$	0,24
(E)-citrol	monoterpeno	20,916	$0,60 \pm 0,27$	$1,92 \pm 0,62$	0,06
β -cariofileno	sesquiterpeno	25,482	$0,22 \pm 0,07$	$1,20 \pm 0,61$	0,06
β -farneseno	sesquiterpeno	26,401	$0,21 \pm 0,08$	$0,52 \pm 0,17$	0,17
hexadecano	hidrocarboneto	29,719	$1,08 \pm 0,26$	$0,98 \pm 0,43$	0,55

Paras as combinações de ‘Valência’, um total de 11 compostos foram obtidos. Dentre os compostos identificados, diferenças foram obtidas para os monoterpenos: α -pineno, sabineno, mirceno, α -felandreno, 3-careno e linalol (Tabela 3). Assim como para as combinações de ‘Pêra’, houve predominância de terpenoides nos compostos voláteis coletados (Tabela 3).

Tabela 3. Tempo de retenção (Rt), área de pico (%), identificação e classe de compostos orgânicos voláteis liberados por laranjeira ‘Valência’ enxertada em limão ‘Cravo’ e tangerina ‘Sunki’ através da análise de GC-MS.

Identificação do composto	Classe	Rt (min)	Área de Pico (%)		<i>P</i> *
			Valência-Cravo	Valência-Sunki	
α -pineno	monoterpeno	10,676	0,36 $\pm$ 0,11	2,17 $\pm$ 1,28	0,01
sabineno	monoterpeno	12,001	5,32 $\pm$ 1,58	54,49 $\pm$ 38,23	0,01
mirceno	monoterpeno	12,748	0,39 $\pm$ 0,13	6,86 $\pm$ 5,54	0,03
α -felandreno	monoterpeno	13,088	0,06 $\pm$ 0,02	1,39 $\pm$ 1,15	0,01
3-careno	monoterpeno	13,358	1,75 $\pm$ 0,48	17,25 $\pm$ 11,60	0,01
limoneno	monoterpeno	13,947	4,68 $\pm$ 1,80	36,30 $\pm$ 25,86	0,17
β -ocimeno	monoterpeno	14,642	1,10 $\pm$ 0,47	39,28 $\pm$ 36,52	0,08
linalol	monoterpeno	16,139	0,22 $\pm$ 0,13	6,77 $\pm$ 5,25	0,02
citronelol	monoterpeno	17,617	0,06 $\pm$ 0,03	0,69 $\pm$ 0,26	0,05
β -cariofileno	sesquiterpeno	25,478	0,46 $\pm$ 0,14	2,97 $\pm$ 1,65	0,05
β -farneseno	sesquiterpeno	26,382	0,05 $\pm$ 0,02	0,98 $\pm$ 0,75	0,63

*Os valores de *P* em negrito indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($P < 0.05$).

2.4. Discussão

O comportamento de escolha hospedeira em psílídeos é complexo e envolve vários fatores, como a planta, sexo e o estágio fisiológico em que os insetos se encontram (PATT; SÉTAMOU, 2007; WENNINGER et al., 2009). Durante o processo de seleção de planta hospedeira, os psílídeos podem se guiar por voláteis liberados por potenciais plantas hospedeiras ou mesmo pela presença desses voláteis associados a seus coespecíficos (HORTON; LONDOLT, 2007; GUÉDOT et al., 2009; PATT; SÉTAMOU, 2007; BALLHORN et al., 2008; WENNINGER et al., 2009).

Os resultados indicaram comportamento diferenciado de fêmeas de *D. citri* em função dos hospedeiros utilizados. A escolha das variedades ‘Pêra’ e ‘Valência’ por fêmeas indica a presença de características favoráveis ao desenvolvimento do inseto, podendo exercer forte influência no processo de seleção hospedeira. Tais resultados podem estar relacionados com a adequabilidade da variedade vegetal a *D. citri* ou mesmo uma plasticidade do inseto em reconhecer o hospedeiro mais adequado para seu desenvolvimento, uma vez que, trabalhos anteriores mostram que a variedade ‘Hamlin’ não é um hospedeiro adequado a esse inseto (ALVES et al., 2014). Com base em testes biológicos e com a elaboração de tabela de vida de fertilidade realizada por Alves et al. (2014), pode-se conhecer o potencial de crescimento de *D. citri* nas diferentes variedades de citros. De acordo com os resultados, a variedade ‘Valência’

foi a mais adequada, enquanto que, a variedade ‘Hamlin’ a menos apropriada ao desenvolvimento desse inseto, sendo a taxa líquida de reprodução (R_0) de *D. citri* 2,5 vezes maior quando criado em ‘Valência’ em relação a ‘Hamlin’.

Segundo Patt et al. (2014), compostos voláteis podem prover pistas que auxiliam os psilídeos a discriminarem entre bons e maus hospedeiros (importantes para reprodução). Ainda, de acordo com Teck et al. (2011), a preferência por sítios ótimos de alimentação e oviposição é um fator importante para insetos sugadores como psilídeos, devido à baixa mobilidade da fase jovem (ninfas).

Maior atratividade foi observada para variedade ‘Valência’ quando confrontada com limoeiro ‘Siciliano’. Essa diferença deve ter ocorrido apenas em função da presença de um composto ou mesmo uma mistura de voláteis mais atrativos na primeira espécie, uma vez que, o limoeiro ‘Siciliano’ também se mostrou um hospedeiro adequado a *D. citri* (ver cap. 3). No entanto, dentre os compostos voláteis identificados, os compostos indol (alcaloide) e (E)-beta-farneseno (monoterpeno) foram comuns apenas ao limoeiro ‘Siciliano’, os quais poderiam estar relacionados com o comportamento de escolha descrito.

Assim como nos resultados obtidos nesse estudo, diferenças na atratividade de *D. citri* foi observada por Patt e Setamou (2010). Dentre quatro espécies de *Citrus* testadas, apenas grapefruit variedade Red Rio (*C. paradisi* MacFadyen) não foi atrativa ao psilídeo. Em contraste com o referido estudo, resultados obtidos por Gharaei et al. (2014) demonstraram que, fêmeas do psilídeo foram atraídas por voláteis de grapefruit (*C. paradisi* cv. Marsh) em bioensaios de olfatômetro, mostrando que, assim como nos resultados obtidos em nosso estudo, fêmeas apresentaram comportamento distinto entre diferentes variedades de uma mesma espécie de citros.

Além das características das plantas, o sexo dos psilídeos influenciou o comportamento de escolha. Diferente do observado para fêmeas, um comportamento de escolha diferenciado não foi observado quando machos foram testados. Assim, como obtido nesse estudo, Yasuda et al. (2005) e Wenninger et al. (2009) observaram que machos e fêmeas de *D. citri* apresentam respostas diferenciadas aos odores de plantas. Resposta diferenciada no comportamento de busca hospedeira baseado no sexo tem sido observada também para outras espécies de psilídeos (SOROKER et al. 2004; HORTON; LANDOLT, 2007; GUÉDOT et al., 2009; WENNINGER et al., 2008).

Segundo Stockton et al. (2016), fêmeas e machos de *D. citi* utilizam diferentes estratégias comportamentais durante o processo de escolha hospedeira. As fêmeas de *D. citri* são mais fortemente atraídas por potenciais hospedeiros, enquanto que, machos apresentam

melhor resposta às plantas hospedeiras com a presença de fêmeas (GHARAEI et al., 2014). No caso do psílideo *Heteropsylla cubana* Crawford 1914, fêmeas conseguiram diferenciar entre plantas suscetíveis das resistentes, enquanto que os machos não foram capazes (LAPIS; BORDER, 1992).

A diferenciação comportamental baseada no sexo pode se dar em função da percepção e interpretação de sinais realizados pelas antenas do inseto. Ambos os sexos apresentam sensilas responsáveis pela recepção de voláteis de plantas hospedeiras, no entanto, machos dessa espécie apresentam uma estrutura extra, a qual está provavelmente relacionada à percepção de feromônios sexuais (ONABOLA et al., 2008). Tal afirmação pode explicar também a resposta diferenciada entre fêmeas e machos obtidos nesse trabalho.

Características hortícolas podem ser obtidas em função de diferentes combinações de variedades de copas e porta-enxertos em citros, podendo ser tanto de caráter morfológico como fisiológico (POMPEU Jr. et al., 2005; KOEPE, DHIGRA, 2013), que podem interferir diretamente no metabolismo da variedade de copa (SOARES et al., 2015), e dessa forma, alterar o perfil químico dos voláteis envolvidos no comportamento de escolha de *D. citri*. A escolha por fêmeas pelas variedades ‘Pêra’ e ‘Valência’ indicou, a princípio, presença de características favoráveis ao desenvolvimento do inseto, exercendo forte influência no processo de escolha hospedeira; no entanto, a mudança do porta-enxerto para ambas as variedades de copas não alterou o comportamento de escolha hospedeira dos insetos.

Efeitos de combinações entre copa e porta-enxerto na atratividade de outros psílideos foram relatados. Shaltiel-Harpaz et al. (2014) avaliaram a atratividade hospedeira como um fator de resistência de duas variedades de porta-enxerto de pereira (*Pyrus communis* L.) ao psílideo *Cacopsylla bidens* (Sulc, 1907), e observaram menor atratividade do psílideo aos porta-enxertos quando comparados a uma variedade suscetível de referência. Ainda, segundo os mesmos autores, tais porta-enxertos quando combinados à copa proviam resistência a *C. bidens*. Segundo Miller et al. (1989), a resistência de variedades a esses insetos pode estar relacionada aos compostos voláteis constitutivos de folhas, afetando a colonização da planta (antixenose).

Os resultados deste trabalho sugerem que, a variedade de copa está mais fortemente relacionada com o comportamento de escolha hospedeira de *D. citri* independente do porta-enxerto utilizado. Os resultados sugerem ainda que, todas as combinações copa e porta-enxerto testadas possuem entre si, compostos voláteis atrativos para *D. citri*.

A atratividade de insetos por voláteis liberados de um determinado hospedeiro podem estar relacionados a diversos fatores, como: as brotações e o perfil de voláteis principalmente

os relacionados a concentração e proporção (mistura) dos compostos envolvidos (BERGSTRÖM, 1995).

No presente estudo, pode-se observar diferenças significativas quanto ao perfil de voláteis identificados nos diferentes hospedeiros. Assim como obtido por Patt e Sétamou (2007) e Hijaz et al. (2013), dentre os diversos compostos orgânicos voláteis coletados a partir de plantas de citros das diferentes variedades no presente trabalho, observou-se a predominância de terpenóides. Essa classe de composto parece ser comum em plantas cítricas e para grande parte da família Rutaceae (GANCEL et al., 2003).

Os terpenóides de forma geral apresentam como função, proteger a planta contra diversos estresses bióticos e abióticos (KEELING; BOHLMANN, 2006; BALDWIN, 2010), além de apresentar um papel importante na interação herbívoro-planta (PARÉ; TUMLINSON, 1999; DUDAREVA et al., 2004).

De acordo com os compostos obtidos das plantas de citros, pode-se observar diferenças no perfil de voláteis em função de cada variedade testada no presente estudo. Observou-se que, alguns compostos são comuns a todas as espécies de citros testadas, porém, podendo apresentar diferenças quantitativas entre elas. A quantidade de compostos voláteis parece ser uma característica variável dentro do gênero *Citrus* (PATT; SÉTAMOU, 2007; HIJAZ et al., 2003). Provavelmente, essa diferença possa estar atrelada a fatores como a espécie, variedade ou até mesmo o estágio fisiológico em que a planta se encontra. De forma contrária, alguns compostos são exclusivos a uma determinada variedade ou espécie. O mesmo padrão pode ser observado quando se utilizou uma mesma variedade de copa sobre diferentes porta-enxertos (Tabela 2 e 3).

Como observado, *D. citri* não apresentou comportamento diferenciado para a variedade ‘Valência’ enxertada em tangerineira ‘Sunki’ e limoeiro ‘Cravo’, mesmo com tais combinações mostrando perfis de compostos voláteis distintos entre elas (Tabela 3), indicando grande plasticidade na interpretação de sinais pelo psilideo. Em função dos resultados obtidos nos bioensaios de atratividade, *D. citri* apresentou alta capacidade de interpretar os sinais, independentemente da quantidade ou proporção de compostos liberados por cada planta.

Conhecer quais os compostos voláteis que são os responsáveis pela atração do psilideo ao hospedeiro é um passo importante para futuros trabalhos, visto que, as identificações desses compostos podem auxiliar no monitoramento (com o uso de armadilhas contendo compostos atrativos, por exemplo) e manejo do psilideo em pomares comerciais.

2.5. Conclusões

- Fêmeas e machos de *D. citri* apresentam comportamento de escolha hospedeira distinto.
- O porta-enxerto não influencia o comportamento de escolha hospedeira de fêmeas de *D. citri*.
- Há predominância de terpenóides nos voláteis coletados em todos os hospedeiros.
- Diferenças qualitativas e quantitativas nos perfis de voláteis são observadas entre os hospedeiros.
- O porta-enxerto altera o perfil químicos dos compostos orgânicos voláteis em plantas de citros.

Referências

- ALVES, G.R.; DINIZ, A.J.F.; PARRA, J.R.P. Biology of the Huanglongbing Vector *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) on Different Host Plants. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 107, n. 2, p. 691-696, 2014.
- 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**, Paris, n. 42, p. 149-162, 1987.
- BALDWIN, I.T. Plant volatiles. **Current Biology**, London, v. 20, n. 9, 2010.
- BALLHORN, D.J.; KAUTZ, S.; LION, U.; HEIL, M. Trade-offs between direct and indirect defences of lima bean (*Phaseolus lunatus*). **Journal of Ecology**, Oxford, v. 96, p. 971-980, 2008.
- BERGSTRÖM G, ROTHSCILD M, GROTH I AND CRIGHTON K. Oviposition by butterflies on young leaves: investigation of leaf volatiles. **Chemoecology**, Basel, v. 5, p. 147-158, 1995.

- DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E.; GERSHENZON, J. Biochemistry of Plant Volatiles. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 135, p. 1893-1902, 2004.
- GANCEL, A.L.; OLLITRAULT, P.; FROELICHER, Y.; TOMI, F.; JACQUEMOND, C.; BRILLOUET, J.M. Leaf volatile compounds of seven citrus somatic tetraploid hybrids sharing will leaf mandarin (*Citrus deliciosa* Ten.) as their common parent. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, p. 6006-6013, 2003.
- GHARAEI, A.M.; ZIAADDINI, M.; JALALI, M.A.; MICHAUD, J.P. Sex-specific responses of Asian citrus psyllid to volatiles of conspecific and host-plant origin. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 138, p. 500-509, 2014.
- GOMEZ-TORRES, M.L. **Estudos bioecológicos de *Tamarixia radiata* (Waterston, 1922) (Hymenoptera: Eulophidae) para o controle de *Diaphorina citri* Kuwayama, 1907 (Hemiptera: Psyllidae).** 2009. 138p. Tese (Doutorado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- GOTTWALD, T.R. Current Epidemiological Understanding of Citrus Huanglongbing. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 48, p. 119-139, 2010.
- GUÉDOT, C.; HORTON, D.R.; LANDOLT, P.J. Attraction of male winterform pear psylla to female- produced volatiles and to female extracts and evidence of male–male repellency. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 130, p. 191-197, 2009.
- HALBERT, S.E.; MANJUNATH, K.L. Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: a literature review and assessment of risk in Florida. **Florida Entomologist**, Lutz, v. 87, n. 3, p. 330-353, 2004.
- HALL, D.G.; HENTZ, M.G.; PATT, J.M. Behavioral Assay on Asian Citrus Psyllid Attraction to Orange Jasmine. **Journal of Insect Behavior**, New York, v. 28, p. 555–568, 2015.
- HIJAZ, F.; EL-SHESHENY, I.; KILLINY, N. Herbivory by the insect *Diaphorina citri* induces greater change in citrus plant volatile profile than does infection by the bacterium, *Candidatus Liberibacter asiaticus*. **Plant Signal Behavior**, v. 8, n. 10, 2013.

- HORTON, D.R.; LANDOLT, P.J. Attraction of male pear psylla, *Cacopsylla pyricola*, to female-infested pear shoots. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 123, p. 177-183, 2007.
- KEELING, C.I.; BOHLMANN J. Genes, enzymes and chemicals of terpenoid diversity in the constitutive and induced defence of conifers against insects and pathogens. **New phytologist**, Cambridge, v. 170, p. 657-675, 2006.
- KOEPKE, T.; DHINGRA, A. Rootstock scion somatogenetic interactions in perennial composite plants. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 32, p. 1321-1337, 2013.
- LAPIS, E.B.; BORDEN, J.H. Olfactory discrimination by *Heteropsylla cubana* (Homoptera: Psyllidae) between susceptible and resistant species of *Leucaena* (leguminosae). **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 19, p. 83-90, 1992.
- MANN, R.S.; PELZ-STELINSKI, K.; HERMANN, S.L.; TIWARI, S.; STELINSKI, L.L. Sexual transmission of a plant pathogenic bacterium, *Candidatus Liberibacter asiaticus*, between conspecific insect vectors during mating. **Plos One**, San Francisco, v. 6, n. 12, 2011.
- MILLER, R.L.; BILLS, D.D; BUTTERY, R.G. Volatile components from Bartlett and Bradford pear leaves. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 37, p. 1476-1479, 1989.
- MORAES, C.M.; LEWIS, W.J.; TUMLINSON, J.H. Examining plant-parasitoid interactions in thritrophic systems. **Anais da Sociedade Brasileira de Entomologia**, Londrina, v. 29, n. 2, p. 189-203. 2000.
- ONAGBOLA, E.O.; MEYER, W.L.; BOINA, D.R.; STELINSKI, L.L. Morphological characterization of the antennal sensilla of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), with reference to their probable functions. **Micron**, New York, v. 39, p. 1184-1191, 2008.

- PALMIERI, F.G.; CAPPELLO, F.P.; BOTEON, M.; PAGLIUCA, L.G. Caminhos da citricultura no pós-crise. **Hortifrut Brasil**, Piracicaba, n. 14, p. 10-19, 2016.
- PARÉ, P.W.; TUMLINSON, J.H. Plant Volatiles as a Defense against Insect Herbivores. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 121, p. 325-331, 1999.
- PARRA, J.R.P.; ALVES, G.R.; DINIZ, A.J.F; VIEIRA, J.M. *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae) X *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae): Mass Rearing and Potential Use of the Parasitoid in Brazil. **Journal of Integrated Pest Management**, College Park, v. 7, p. 1-11, 2016.
- PATT, J.M.; SÉTAMOU, M. Olfactory and visual stimuli affecting host plant detection in *Homalodisca coagulata* (Hemiptera: Cicadellidae). **Environmental Entomology**, Lanham, v. 36, n. 1, p. 142-150, 2007.
- PATT, J.M.; SETAMOU, M. Responses of the Asian Citrus Psyllid to Volatiles Emitted by the Flushing Shoots of Its Rutaceous Host Plants. **Environmental Entomology**, College Park, v. 39, p. 618-624, 2010.
- PATT, J.M.; STOCKTON, D.; MEIKLE, W.G.; SETAMOU, M.; MAFRA-NETO, A.; ADAMCZYK, J.J. Innate and Conditioned Responses to Chemosensory and Visual Cues in Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae), Vector of Huanglongbing Pathogens. **Insects**, Basel, v. 5, p. 921-941, 2014.
- POMPEU JR, J. Porta-enxertos. In: MATTOS JUNIOR, D.; DE NEGRI, D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. **Citros**. Cordeirópolis: IAC, 2005. cap. 4, p. 62-104.
- R CORE TEAM (2015). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>
- RIBEIRO, A.B.; ABDELNUR, P.V.; GARCIA, C.F.; BELINI, A.; SEVERINO, V.G.P.; SILVA, M.F.G.F.; FERNANDES, J.B.; VIEIRA, P.C.; CARVALHO, S.A.; SOUZA, A.A.; MACHADO, M.A. Chemical Characterization of *Citrus sinensis* Grafted on *C. limonia* and

- the Effect of Some Isolated Compounds on the Growth of *Xylella fastidiosa*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Eston, v. 56, p. 7815-7822, 2008.
- RUAN, C.Q.; HALL, D.G.; LIU, B.; DUAN, Y.P.; LI, T.; HU, H.Q.; FAN, G.C. Host-Choice Behavior of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) Under Laboratory Conditions. **Journal of Insect Behavior**, New York, v. 28, p. 138-146, 2015.
- SÉTAMOU, M.; SANCHEZ, A.; PATT, J.M.; NELSON, S.D.; JIFON, J.; LOUZADA, E.S. Diurnal Patterns of Flight Activity and Effects of Light on Host Finding Behavior of the Asian Citrus Psyllid, **Journal of Insect Behavior**, New York, v. 25, p. 264–276, 2012.
- SHALTIEL-HARPAZ, L.S.; SOROKER, V.; KEDOSHIMA, R.; HASON, R.; SOKALSKY, T.; HATIB, K.; YA'AKOCV, I.B.; HOLLAND, D. Two pear accessions evaluated for susceptibility to pear psylla *Cacopsylla bidens* (Sulc) in Israel. **Pest Management Science**, Berlin, v. 70, p. 234-239, 2014.
- SIMON, J.C.; d'ALENÇON, E.; GUY, E.; JACQUIN-JOLY, E.; JAQUIERY, J.; NOUHAUD, P. PECCOUD, J.; SUGIO, A.; STREIFF, R. Genomics of Adaptation to Host-plants in Herbivorous. **Briefings in Functional Genomics**, London, v. 14, p. 413–423, 2015.
- SOARES, M.S.; SILVA, D.F.; FORIM, M.R.; SILVA, M.F.G.F.; FERNANDES, J.B.; VIEIRA, P.C.; SILVA, D.B.; LOPES, N.P.; CARVALHO, S.A.; SOUZA, A.A.; MACHADO, M.A Quantification and localization of hesperidin and rutin in *Citrus sinensis* grafted on *C. limonia* after *Xylella fastidiosa* infection by HPLC-UV and MALDI imaging mass spectrometry. **Phytochemistry**, Washington, v. 115, p. 161-170, 2015.
- SOROKER, V.; TALEBAEV, S.; HARARI, A.R.; WESLEY, D. The Role of Chemical Cues in Host and Mate Location in the Pear Psylla *Cacopsylla bidens* (Homoptera: Psyllidae). **Journal of Insect Behavior**, New York, v. 17, p. 613-626, 2004.
- STOCKTON, D.G.; MARTINI, X.; PATT, J.M.; STELINSKY, L.L. The Influence of Learning on Host Plant Preference in a Significant Phytopathogen Vector, *Diaphorina citri*. **Plos One**, San Francisco, DOI:10.1371/journal.pone.0149815, 2016.

- SULE, H.; MUHAMEND, R. OMAR, D.; HEE, K.A.W. Response of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) to Volatiles Emitted from Leaves of Two Rutaceous Plants. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 4, p. 152-159, 2012.
- TECK, S.L.C.; FATIMAH, A.; BEATTIE, A.; HENG, R.K.J.; KING, W.S. Influence of Host Plant Species and Flush Growth Stage on the Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama. **American journal of Agricultural and Biological Sciences**, New York, v. 6, n. 4, p. 536-543, 2011.
- VET, L.E.M.; DICKE, M. Ecology of infochemical use by natural enemies in a tritrophic context. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 37, p. 141-172, 1992.
- WENNINGER, E.J.; STELINSKI, L.L.; HALL, D.G. Behavioral evidence for a female-produced sex attractant in *Diaphorina citri*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 128, p. 450-459, 2008.
- WENNINGER, E.J.; STELINSKI, L.L.; HALL, D.G. Roles of Olfactory Cues, Visual Cues, and Mating Status in Orientation of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) to Four Different Host Plants. **Environmental Entomology**, New York, v. 38, p. 225-234, 2009.
- YASUDA, K.; KAWA-MURA, F.; OISHI, T. Location and Preference of Adult Asian Citrus 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, v. 49, p. 146-149, 2005.

3. A COMBINAÇÃO COPA/PORTA-ENXERTO DE CITROS INFLUENCIA A ALIMENTAÇÃO E BIOLOGIA DE *Diaphorina citri* KUWAYAMA, 1908 (HEMIPTERA: LIVIIDAE)?*

Autores: Gustavo Rodrigues Alves¹, Vitor Hugo Beloti¹, Kenya Martins Faggioni Floriano¹, Sérgio Alves de Carvalho², Rafael de Andrade Moral³, Clarice Garcia Borges Demétrio³, José Roberto Postali Parra¹ e Pedro Takao Yamamoto¹

1Departamento de Entomologia e Acarologia, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, Brazil; 2 Centro de Citricultura Sylvio Moreira (IAC-APTA), Cordeirópolis, SP, Brazil; 3Departamento de Ciências Exatas, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, Brazil.

*Artigo submetido ao periodico Arthropod-Plant Interactions.

RESUMO

O psíldeo-asiático-dos-citros, *Diaphorina citri* é o principal vetor das bactérias associadas com Huanglongbing, e tem como hospedeiro mais de 50 espécies da família Rutaceae. O número de hospedeiros possíveis é ainda maior se incluirmos suas variedades. Este estudo avaliou a influência de diferentes combinações de variedades de copa e porta-enxerto de citros no desenvolvimento e alimentação do psíldeo. As maiores taxas de sobrevivência para o estágio do ovo foram observadas nas variedades de ‘Valência’ e limão ‘Siciliano’, ambas enxertadas em tangerina ‘Sunki’, com médias de 87,99 e 87,98%, respectivamente; e o menor (67,63%) em ‘Hamlin/limão Cravo’. As menores viabilidades, ninfal e total (ovo-adulto) foram obtidos em ‘Hamlin’, independentemente do porta-enxerto usado. O tempo de desenvolvimento total (ovo-adulto) variou de 17,92 a 19,33 dias para as combinações ‘Pêra/Sunki’ e ‘Hamlin/Swingle’, respectivamente. A análise de agrupamento separou os hospedeiros em dois grupos, o primeiro consistindo nas combinações da variedade ‘Hamlin’ e o segundo grupo formado pelas demais variedades. O maior consumo alimentar (avaliado pela área de *honeydew* secretada) foi observado para as variedades de laranja, sendo que o maior valor foi observado em ‘Valência’ (0,902 cm²); a menor área de *honeydew* foi obtida em ‘Ponkan’ (0,269 cm²). Os porta-enxertos não afetaram o comportamento alimentar de *D. citri*. Os resultados deste estudo poderão auxiliar no desenvolvimento de técnicas de manejo, principalmente no fornecimento de informações para a instalação de novos pomares de citros, bem como para futuras pesquisas de melhoramento da cultura.

Palavras-chave: Psíldeo-asiático-dos-citros; Variedades cítricas; Honeydew; HLB

ABSTRACT

The Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* is the main vector of the bacteria associated with Huanglongbing, and can exploit more than 50 species of the family Rutaceae as hosts. The number of possible hosts is even higher if plant varieties are included. This study evaluated the influence of different combinations of scion and rootstock citrus varieties on the development and feeding of ACP. Survival rates for the egg stage were highest on the ‘Valencia’ and ‘Sicilian’ varieties, both grafted on Sunki mandarin, with means of 87.99 and 87.98%, respectively; and lowest (67.63%) on ‘Hamlin/Rangpur lime’. The lowest levels of both

nymphal and total viability (egg-adult) were obtained on ‘Hamlin’, regardless of the rootstock used. The total development time (egg-adult) ranged from 17.92 to 19.33 days for the ‘Pêra/Sunki’ and ‘Hamlin/Swingle’ combinations, respectively. Cluster analysis separated the hosts into two groups, the first consisting of the combinations of the ‘Hamlin’ variety, and the second group formed by the other varieties. The highest food value (assessed by the area of honeydew produced) was observed for the orange scion varieties, and among these, the highest value was observed on ‘Valencia’ (0.902 cm²); the smallest honeydew area was obtained on ‘Ponkan’ (0.269 cm²). The rootstocks did not affect the feeding behavior of *D. citri*. The results of this study could aid in the development of management techniques, mainly in providing information for the installation of new citrus groves and assistance in crop-improvement research.

Keywords: Asian citrus psyllid; Citrus varieties; Honeydew; HLB

3.1. Introdução

A capacidade dos insetos em utilizar plantas como hospedeiros envolve além da adequação nutricional para seu completo desenvolvimento, uma série de fatores como a localização, a escolha e superação de defesas da planta (SIMON et al. 2015), sendo seu desempenho diretamente afetado pelas características físicas e químicas do hospedeiro em potencial (AWMACK; LEATHER, 2002; HODKINSON, 2009).

A escolha por sítios ótimos para alimentação e oviposição é um fator importante para insetos vetores como psílídeos, devido à baixa mobilidade das ninfas (TECK et al., 2011); no entanto, a escolha do hospedeiro não necessariamente está associada a um melhor desenvolvimento do inseto, podendo apresentar uma correlação negativa entre a oviposição e o valor adaptativo ou “fitness” da prole (MAYHEW, 2001; WISE et al., 2008). Tal fato pode ser utilizado no desenvolvimento de estratégias de manejo de insetos praga.

O psílídeo *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae), é o principal vetor das bactérias associadas ao Huanglongbing (HLB), e apresenta uma gama de hospedeiros que incluem mais de 50 espécies da família Rutaceae, embora nem todos os hospedeiros permitam o completo desenvolvimento do inseto (AUBERT, 1987; HALBERT; MANJUNATH, 2004). No caso da citricultura, o número de hospedeiros disponíveis para *D. citri* pode ser ainda maior se considerarmos as combinações de copas e seus porta-enxertos. Este fator apresenta um papel importante, pois pode controlar muitos aspectos relacionados à morfologia e fisiologia da copa, influenciando a tolerância a estresses abióticos e bióticos além de contribuir no “status” nutricional da planta (KOEPEKE; DHINGRA, 2013; SOARES et al., 2015).

Um grande número de trabalhos relata o desenvolvimento diferencial de *D. citri* em função de diferentes hospedeiros/espécies (TSAI; LIU, 2000; NEHRU et al., 2004; NAVA et

al., 2007; TSAGKARAKIS; ROGERS, 2010; WESTBROOK et al., 2011; BORGONI et al., 2014), e também sobre variedades de uma mesma espécie de citros (ALVES et al., 2014); no entanto, pouco se sabe sobre o efeito de diferentes combinações de copa e porta-enxerto de citros no desenvolvimento de *D. citri*.

Assim, o objetivo com o presente trabalho foi avaliar o efeito de diferentes combinações de variedades de copa e porta-enxerto no desenvolvimento de *D. citri*, diretamente pela medição da duração e viabilidade e indiretamente pela alimentação, a fim de se obter informações para instalação de novos pomares, principalmente na escolha de combinações de variedades/porta-enxerto que serão plantadas com objetivo de reduzir a incidência do psíldeo.

3.2. Material e Métodos

3.2.1. Criação de *Diaphorina citri* e manutenção de plantas

Os insetos foram obtidos da criação de manutenção do laboratório de Manejo Integrado de Pragas do Departamento de Entomologia e Acarologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo. Os insetos foram criados em murta [*Murraya paniculata* (L.) Jack], de acordo com metodologia descrita por Parra et al. (2016).

Foram utilizadas as seguintes variedades de citros: laranjeira doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] das variedades ‘Hamlin’, ‘Pêra’ e ‘Valência’, tangerineira ‘Ponkan’ (*C. reticulata* Blanco) e limoeiro ‘Siciliano’ [*C. limon* (L.) Burm. f.], sobre os porta-enxertos limoeiro ‘Cravo’ (*C. limonia* Osbeck), citrumeleiro ‘Swingle’ [*C. paradisi* Macfad $\times$ *Poncirus trifoliata* (L.)] e tangerineira ‘Sunki’ [*C. sunki* (Hayata)]. As combinações entre as variedades de copa ‘Pêra’ e ‘Siciliano’ sobre citrumelo ‘Swingle’ não foram testadas devido à incompatibilidade dessas combinações.

As plantas utilizadas no trabalho foram produzidas em viveiro experimental protegido com tela do Centro de Citricultura Sylvio Moreira, em Cordeirópolis/SP. As mudas foram integralmente produzidas em tubetes plásticos de 700 mL (Polifer®). Primeiramente foi realizado a semeadura dos porta-enxertos e posterior enxertia de borbulhas das diferentes variedades de copa. Foram utilizadas mudas com porte médio de 22 cm de copa e 8 meses de idade.

3.2.2. Biologia de *D. citri* em diferentes combinações de copa e porta-enxerto

Em cada planta (contendo apenas um broto medindo de 8-12 mm de comprimento) um casal de *D. citri* com 12 dias de idade foi confinado em gaiola de tecido “voile” por um período de 24 horas para oviposição. Após esse período, os casais foram removidos e o número de ovos contados com auxílio de um microscópio estereoscópico. O estudo foi conduzido em câmaras controladas à temperatura de 25 ± 2 °C, U.R. de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14 h. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com um total de 16 repetições (casais) para cada tratamento (hospedeiros).

Diariamente foi realizada a contagem de ninfas eclodidas e sua mortalidade, até a fase adulta. Os parâmetros avaliados foram: tempo de desenvolvimento, viabilidade (para cada fase de desenvolvimento do inseto) e razão sexual (proporção de fêmeas em relação ao total de insetos).

3.2.3. Consumo alimentar de *Diaphorina citri* em diferentes variedades de citros

Para o presente ensaio, dois experimentos foram realizados. No primeiro, foram utilizadas as variedades de laranjeira doce ‘Pêra’, ‘Hamlin’ e ‘Valência’, de tangerineira ‘Ponkan’ e de limoeiro ‘Siciliano’, sobre o mesmo porta-enxerto, o limoeiro ‘Cravo’ e, como tratamento controle utilizou-se a murta *M. paniculata* (principal hospedeiro de *D. citri*). No segundo ensaio foram utilizadas plantas da variedade ‘Pêra’ sobre os porta-enxertos limoeiro ‘Cravo’ e tangerineira ‘Sunki’.

Em cada planta selecionada para o bioensaio, as brotações (10 a 15 mm de comprimento) foram individualizadas com gaiolas confeccionadas de copo plástico descartável transparente (300 mL). Em seguida, discos de papel filtro (ϕ 7 cm) foram colocados na base do pecíolo de cada brotação para reter as gotas de honeydew excretadas (Figura 7A - C) e 10 insetos adultos (sem separação por sexo) foram transferidos para cada gaiola, onde permaneceram por 72 h se alimentando. As gaiolas foram vedadas com tecido “voile” e elástico. O experimento foi realizado em câmara climatizada a 25 ± 2 °C, U.R. $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14 h.

A determinação da área de consumo de *D. citri* foi realizada pela detecção de aminoácidos excretados junto ao “honeydew” pela reação de ninhidrina (BOINA et al., 2009).

Após as 72 h, os discos de papel filtro foram retirados e imediatamente imersos em solução de acetona pura + ninhidrina (SIGMA®) (198 ml + 2 g) por três minutos. Após 24 h

(período necessário para secagem da solução), a área correspondente ao honeydew, marcadas pela cor violeta da solução em cada disco (resultado da reação entre aminoácidos e ninhidrina), foi determinada usando-se o software Quant versão 1.0.1 (Vale et al. 2003) (Figura 7D). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com um total de 10 repetições por tratamento para o primeiro experimento e oito para o segundo.

Figura 7. Unidade experimental utilizada no teste de consumo alimentar. A) muda de citros em tubete, B) copo plástico transparente acoplado a um saco plástico, C) Unidade experimental contendo disco de papel para a coleta de honeydew e D) disco de papel contendo as áreas de honeydew após tratamento com solução de acetona + ninhidrina. Desenho de Patricia Milano.

3.2.4. Análise estatística

Modelos de análise de variância foram ajustados aos dados de duração e comparações múltiplas foram feitas por meio do teste de Tukey ($P= 0.05$). Modelos lineares generalizados do tipo quase-binomial foram ajustados aos dados de viabilidade e um modelo linear generalizado do tipo binomial foi ajustado aos dados de razão sexual. Comparações múltiplas foram feitas obtendo-se os intervalos de confiança de 95% para os preditores lineares. Ainda, uma análise de agrupamento foi feita utilizando-se a distância euclidiana e o método de agrupamento de Ward, incluindo todas as médias de cada variável biológica obtida nesse experimento.

Para o teste de consumo alimentar, um modelo de análise de variância foi ajustado ao logaritmo natural dos dados e comparações múltiplas foram feitas por meio do teste de Tukey ($P \leq 0.05$). Todas as análises foram feitas utilizando-se o software R (R Core Team 2015).

3.3. Resultados

3.3.1. Biologia de *Diaphorina citri* em diferentes combinações de copa e porta-enxerto

O tempo de desenvolvimento de *D. citri* diferiu em função dos hospedeiros utilizados. Para a fase de ovo, a maior duração foi observada nas combinações ‘Ponkan’ × ‘Cravo’, com média de 5,01 dias e ‘Ponkan’ × ‘Swingle’, com média de 4,89 dias. Essas diferiram da variedade ‘Valência’ enxertada sobre limoeiro ‘Cravo’ (4,18 dias) e sobre citrumeleiro ‘Swingle’ (4,03 dias) (Tabela 4). Por outro lado, as maiores durações da fase ninfal foram observadas na variedade ‘Hamlin’, independente do porta-enxerto utilizado, enquanto que os menores valores foram observados nas combinações da variedade ‘Pêra’. O ciclo total de desenvolvimento (ovo-adulto) variou de 17,92 a 19,33 dias para as combinações de ‘Pêra’ × ‘Sunki’ e ‘Hamlin’ × ‘Swingle’, respectivamente (Tabela 4).

As maiores viabilidades para a fase de ovo foram observadas nas variedades ‘Valência’ e ‘Siciliano’, ambas sobre o porta-enxerto tangerineira ‘Sunki’, com valores de 87,99 e 87,98%, respectivamente. No entanto, a combinação ‘Hamlin’ × ‘Cravo’ foi a que apresentou menor viabilidade de ovo, com média de 67,63%. Para a fase ninfal, as maiores viabilidades foram obtidas das combinações ‘Pêra’ × ‘Cravo’ (86,38%) seguido por ‘Valência’ × ‘Cravo’ (84,69%) e ‘Valência’ × ‘Sunki’ (84,35%). Já os menores valores, tanto da fase ninfal quanto para a viabilidade total dos insetos (ovo-adulto), foram obtidos pelas diferentes combinações da variedade ‘Hamlin’, independente do porta-enxerto utilizado (Tabela 5).

Não houve influência dos hospedeiros na razão sexual de *D. citri*, com predominância de fêmeas em todos os tratamentos (Deviance= 5,24; g.l = 12; $P= 0,949$) (Tabela 5), evidenciando o grande potencial de reprodução desse inseto.

De modo geral, nota-se que as variedades de copa exercem maior influência no desenvolvimento de *D. citri* do que suas combinações com os diferentes porta-enxertos, pois, não foram observadas diferenças estatísticas em nenhum dos parâmetros biológicos avaliados se compararmos cada variedade de copa com seus respectivos porta-enxertos. Tal fato pode ser confirmado pela análise de agrupamento realizada considerando as variáveis biológicas obtidas

nesse experimento (Figura 8). A análise de agrupamento (dendograma comparativo) separou os hospedeiros em dois grupos distintos, sendo o primeiro composto pelas combinações da variedade ‘Hamlin’ sobre os diferentes porta-enxertos e o segundo grupo formado pelos demais hospedeiros (Figura 8).

Tabela 4. Médias ($\pm$ erro padrão) da duração de cada fase de *Diaphorina citri* criados em diferentes combinações de copa e porta-enxerto de citros. Temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, U.R $60 \pm 10\%$ e fotofase 14h.

Variedades		Duração (dias) *		
Porta-enxerto	Copa	Ovo	Ninfa	Ovo-adulto
Limão Cravo	Hamlin	$4,27 \pm 0,13$ bc	$14,50 \pm 0,20$ ab	$18,77 \pm 0,21$ abc
	Pêra	$4,60 \pm 0,17$ abc	$13,43 \pm 0,18$ d	$18,03 \pm 0,09$ cd
	Valência	$4,18 \pm 0,16$ c	$14,22 \pm 0,25$ abcd	$18,40 \pm 0,20$ bcd
	Sicilian	$4,46 \pm 0,15$ abc	$14,13 \pm 0,21$ abcd	$18,59 \pm 0,21$ abcd
	Ponkan	$5,01 \pm 0,10$ a	$13,61 \pm 0,16$ bcd	$18,64 \pm 0,12$ abcd
Citrumelo Swingle	Hamlin	$4,49 \pm 0,12$ abc	$14,84 \pm 0,20$ a	$19,33 \pm 0,18$ a
	Valência	$4,04 \pm 0,12$ c	$14,30 \pm 0,19$ abc	$18,34 \pm 0,15$ bcd
	Ponkan	$4,89 \pm 0,15$ ab	$14,02 \pm 0,16$ abcd	$18,91 \pm 0,15$ ab
Tangerina Sunki	Hamlin	$4,33 \pm 0,09$ bc	$14,29 \pm 0,14$ abc	$18,62 \pm 0,21$ abc
	Pêra	$4,46 \pm 0,14$ abc	$13,46 \pm 0,21$ cd	$17,92 \pm 0,27$ d
	Valência	$4,57 \pm 0,15$ abc	$13,93 \pm 0,19$ abcd	$18,50 \pm 0,15$ bcd
	Siciliano	$4,53 \pm 0,15$ abc	$14,01 \pm 0,18$ abcd	$18,54 \pm 0,11$ abcd
	Ponkan	$4,38 \pm 0,15$ abc	$14,38 \pm 0,19$ abc	$18,76 \pm 0,12$ abc
F		3,65	4,41	4,57
g.l		12, 196	12, 190	12, 190
Valor de P		$\leq 0,0001$	$\leq 0,0001$	$\leq 0,0001$

* Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Tabela 5. Médias ($\pm$ erro padrão) de viabilidade e razão sexual de *Diaphorina citri* criados em diferentes combinações de copa e porta-enxerto de citros. Temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, U.R $60 \pm 10\%$ e fotofase 14h.

Variedades		Viabilidade (%)*			Razão sexual**
Porta-enxerto	Copa	Ovo	Ninfa	Ovo-adulto	
Limão Cravo	Hamlin	$67,63 \pm 3,23$ d	$62,69 \pm 4,94$ bc	$42,33 \pm 3,68$ c	$0,63 \pm 0,04$
	Pêra	$82,86 \pm 1,82$ bcd	$86,38 \pm 2,28$ a	$71,57 \pm 2,78$ a	$0,65 \pm 0,03$
	Valência	$84,37 \pm 1,89$ bc	$84,69 \pm 2,76$ a	$71,45 \pm 2,12$ a	$0,67 \pm 0,05$
	Siciliano	$87,50 \pm 3,50$ b	$76,55 \pm 6,84$ abc	$66,98 \pm 6,89$ a	$0,71 \pm 0,04$
	Ponkan	$81,03 \pm 1,81$ bcd	$82,99 \pm 2,63$ ab	$67,24 \pm 3,19$ a	$0,65 \pm 0,04$
Citrumelo Swingle	Hamlin	$72,64 \pm 3,00$ cd	$64,58 \pm 3,79$ abc	$46,91 \pm 4,64$ bc	$0,65 \pm 0,07$
	Valência	$85,52 \pm 2,92$ b	$80,99 \pm 2,26$ ab	$69,26 \pm 3,30$ a	$0,72 \pm 0,05$
	Ponkan	$87,18 \pm 3,40$ b	$79,24 \pm 4,55$ abc	$69,08 \pm 5,11$ a	$0,61 \pm 0,04$
Tangerina Sunki	Hamlin	$71,06 \pm 3,53$ bcd	$58,36 \pm 6,10$ c	$41,47 \pm 4,88$ c	$0,69 \pm 0,07$
	Pêra	$87,58 \pm 2,38$ a	$78,53 \pm 3,21$ abc	$68,77 \pm 3,72$ a	$0,71 \pm 0,05$
	Valência	$87,99 \pm 3,26$ a	$84,35 \pm 2,86$ a	$74,21 \pm 4,20$ a	$0,66 \pm 0,05$
	Siciliano	$87,98 \pm 2,38$ a	$79,99 \pm 4,34$ abc	$70,38 \pm 4,33$ a	$0,68 \pm 0,04$
	Ponkan	$79,62 \pm 1,92$ bcd	$77,80 \pm 6,31$ ab	$61,94 \pm 6,98$ ab	$0,66 \pm 0,05$
<i>F</i>		5,70	4,24	6,99	
g.l		12, 196	12, 195	12, 195	
Valor de <i>P</i>		$\leq 0,0001$	$\leq 0,0001$	$\leq 0,0001$	

* Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

** Não significativo (Deviance= 5,24; g.l = 12; *P*= 0,949)

Figura 8. Dendrograma comparativo de *Diaphorina citri* criadas em diferentes combinações de copa e porta-enxerto de citros, resultado da análise de agrupamento com base nas médias dos parâmetros biológicos.

3.3.2. Consumo alimentar de *Diaphorina citri* em diferentes variedades de citros

As variedades testadas afetaram a alimentação do psíldeo *D. citri*. A maior área de “honeydew”, o que corresponde a um maior consumo, foi observada nas variedades de laranja doce, dentre elas, o maior valor foi observado em ‘Valência’ (0,902 cm²), diferindo estatisticamente dos demais hospedeiros. Já as menores áreas de honeydew foram obtidas em tangerina ‘Ponkan’ e limoeiro ‘Siciliano’ com valores médios de 0,269 e 0,272 cm², respectivamente ($F = 8,45$; d.f = 5,54; $P < 0,0001$) (Figura 3). Diferentemente do observado para as variedades de copa, para as quais, o consumo foi distinto em função do hospedeiro, quando os porta-enxertos para uma mesma variedade de copa foram testados, não houve diferença no consumo ($F = 0,28$; d.f = 1,14; $P = 0,603$) (Figura 4).

Figura 9. Área de “honeydew” excretada por adultos de *Diaphorina citri* alimentados em diferentes hospedeiros, medida por ninhidrina. Temp. 25 ± 2 °C, U.R $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14h. Médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Figura 10. Área de “honeydew” excretada por adultos de *Diaphorina citri* alimentados em laranja ‘Pêra’ enxertadas sob dois porta-enxertos, medida por ninhidrina. Temp. 25 ± 2 °C, U.R $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14h. Médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância.

3.4. Discussão

Os parâmetros biológicos de *D. citri* foram afetados em função do hospedeiro utilizado. As diferenças observadas no tempo de desenvolvimento entre as fases testadas podem ser devido às alterações na fisiologia dos insetos, decorrentes da ingestão de compostos tóxicos ou metabólitos secundários, ou mesmo pela qualidade nutricional do hospedeiro (SETÁMOU et al., 1999; AWMACK; LEATHER, 2002; VENDRAMIM; GUZZO, 2012).

Resultados similares aos desse estudo foram obtidos por Alves et al. (2014). Os autores observaram que o período embrionário diferiu entre os hospedeiros testados, sendo a maior duração (média de 4.91 dias) obtida na variedade ‘Natal’. Da mesma maneira, Teck et al. (2011) observaram diferenças nas durações tanto para o período ninfal como para o ciclo total (ovo-adulto) em função de três hospedeiros distintos, tangerina (*C. reticulata*), murta (*M. paniculata*) e curry [*M. koenigii* (L.)], sendo esse último o que proporcionou um tempo de desenvolvimento do psíldeo mais longo.

Diferenças no ciclo total (ovo-adulto) de *D. citri* em função das variedades de porta-enxerto de *Citrus* também foram observados por Tsagkarikis e Rogers (2010). Os autores verificaram que a duração foi de 18,47 a 19,67 dias, respectivamente em laranjeira ‘Azeda’ (*C. aurantium* L.) e em tangerineira (*C. reshni* Tanaka) ‘Cleópatra’.

No caso de *D. citri*, além dos parâmetros relacionados ao tempo de desenvolvimento, o hospedeiro também afetou sua viabilidade. Em trabalho recente, Borgoni et al. (2014), comparando diferentes hospedeiros de copas e porta-enxertos, obtiveram uma menor viabilidade da fase de ovo no porta-enxerto citrumelo ‘Swingle’ (67,7%).

No presente trabalho, as diferentes variedades enxertadas em tangerineira ‘Sunki’ não interferiram nos parâmetros biológico de *D. citri*; por outro lado, Nava et al. (2007) obtiveram uma baixa viabilidade ninfal (44,6%) quando o inseto foi criado diretamente sobre essa variedade de porta-enxerto, indicando a presença de características e/ou compostos desfavoráveis ao desenvolvimento de *D. citri*, que não são transferidas para a variedade de copa, não havendo assim, contribuição na alimentação de *D. citri*.

Dentre as variedades de copa, a que proporcionou pior desenvolvimento foi a ‘Hamlin’, independente do porta-enxerto estudados, sendo, portanto, considerada a variedade menos favorável para o desenvolvimento de *D. citri*. Tal confirmação pode ser apoiada pelos resultados obtidos na análise de agrupamento, a qual separou os hospedeiros em dois grupos distintos, sendo o primeiro composto pelas combinações da variedade ‘Hamlin’ e seus porta-enxertos e o segundo grupo formado pelos demais hospedeiros (Figura 9). Segundo Hodkinson

(2009), os diferentes hospedeiros apresentam uma suscetibilidade variável a psilídeos e, muitas vezes, essas diferenças podem ser mais facilmente perceptíveis dentro de uma mesma espécie (variedade) do que entre espécies vegetais.

Em função dos hospedeiros utilizados, as variedades de laranjeiras foram aquelas nas quais os insetos mais se alimentaram, podendo esse grupo, conter características favoráveis ao psilídeo. No entanto, diferente do observado para o experimento de biologia, em que *D. citri* apresentou um menor desempenho em ‘Hamlin’, a alimentação nessa variedade foi similar às demais laranjeiras, naquelas as quais, se obteve uma alta viabilidade. Já o oposto foi observado para murta e pelas variedades ‘Ponkan’ e ‘Siciliano’; todos levaram a um bom desenvolvimento, no entanto, com os menores valores de alimentação. Assim como no experimento de biologia, os diferentes porta-enxertos não influenciaram a alimentação de *D. citri* quando combinados a uma mesma variedade de copa, nesse caso a ‘Pêra’.

O maior consumo alimentar obtido nas laranjeiras pode indicar a presença de fagoestimulantes inerente à espécie (*C. sinensis*) presentes nessas variedades, no entanto, podem apresentar variações na composição dos nutrientes. A melhor qualidade nutricional pode explicar o menor consumo alimentar obtido nos demais hospedeiros, uma vez que, esses, mostraram ser hospedeiros adequados para *D. citri* de acordo com os resultados aqui obtidos no experimento de biologia. Souza et al. (2012) encontraram diferenças em até 20% no teor de nitrato na seiva das variedades ‘Valência’ e ‘Hamlin’. Tal fato pode ser uma das razões para variações nos parâmetros biológicos de *D. citri* aqui observados.

Um pior desempenho, seja no desenvolvimento ou alimentação de insetos fitófagos, pode se dar em função de características fisiológicas (por exemplo, nutricionais) ou morfológicas de seus hospedeiros (VENDRAMIM; GUZZO, 2012; WILSON et al., 2015). Setamou et al. (2016) atribuíram a alta mortalidade de *D. citri* em rutáceas nativas aos fatores relacionados à baixa qualidade nutricional e a dificuldade dos insetos em acessar os vasos do floema.

A qualidade e quantidade dos recursos disponíveis podem afetar a população de herbívoros alterando sua preferência e “fitness” em função do hospedeiro (VENDRAMIM; GUZZO, 2012; GARCÍA-PEREZ et al., 2013; MALINGA et al., 2014). Segundo Steinbauer (2013), variações na qualidade nutricional dos diferentes hospedeiros, principalmente relacionados à disponibilidade de aminoácidos livres, podem determinar o desempenho de insetos sugadores.

Dentre os vários atributos que os porta-enxertos podem modificar na copa (morfológicos e fisiológicos) a variação no perfil de compostos secundários já foi observada

(SOARES et al., 2015; CANO; BERMEJO, 2011; RIBEIRO et al., 2008). Esta variação pode afetar o desempenho de insetos sugadores que se alimentam na copa (MUÑOZ et al., 2008). No entanto, de acordo com os resultados obtidos no presente estudo, o mesmo parece não ocorrer para *D. citri*, uma vez que não foi verificada influência do porta-enxerto nas diferentes variedades de copa testadas tanto para o experimento de biologia como para o de alimentação.

Considerando o número de hospedeiros já registrados para *D. citri* (HALBERT; MANJUNATH, 2004), os compostos secundários não devem influenciar o desenvolvimento da espécie uma vez que, segundo Saha et al. (2012), quanto maior o número de hospedeiros em que insetos herbívoros são aptos a explorar, maiores são suas chances em lidar como uma gama de compostos secundários (devido sua pré-adaptação).

Os resultados obtidos na presente pesquisa poderão fornecer subsídios para instalação de novos pomares de citros, especialmente na escolha de variedades de copa a serem plantadas, principalmente aquelas que serão alocadas nas bordas dos pomares devido à maior concentração da população de psílídeos nessa área (BELASQUE JR et al., 2009; SÉTAMOU; BARTELS, 2015).

O plantio de variedades menos adequadas ao psílídeo, poderá acarretar na diminuição da população em campo e consequentemente a incidência da doença. Além disso, o conhecimento acerca do comportamento alimentar pode indicar aspectos úteis para futuros estudos de resistência às pragas, transmissão de fitopatógenos ou melhoramento da cultura bem como servir para futuras técnicas de manejo dessa praga na cultura de citros.

3.5. Conclusões

- A viabilidade e tempo de desenvolvimento de *D. citri* são afetadas pelos hospedeiros avaliados.
- A variedade ‘Hamlin’ é a menos adequada a *D. citri*, independentemente do porta-enxerto utilizado.
- O consumo alimentar de *D. citri* é distinto entre as diferentes variedades de copa de citros, sendo maior nas variedades de laranja doce.
- O porta-enxerto não influencia o consumo alimentar de *D. citri*.

REFERÊNCIAS

- Alves GR, Diniz AJF, Parra JRP (2014) Biology of the Huanglongbing Vector *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) on Different Host Plants. J. Econ. Entomol. 107:691-696
- Aubert, B (1987) *Trioza erythrae* Del Guercio and *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae), the two vectors of citrus greening disease: biological aspects and possible control strategies. Fruits 42:149-162
- Awmack CS, Leather SR (2002) Host plant quality and fecundity in herbivorous insects. Annu. Rev. Entomol. 47:817-844
- Belasque Jr J, Yamamoto PT, Miranda MP, Bassanesi RB, Ayres AJ, Bové JM (2009) Controle do huanglongbing no estado de São Paulo, Brasil. Citrus Res. Technol. 31:53-64
- Boina RD, Onagbola EO, Salyanib M, Stelinski LL (2009) Antifeedant and sublethal effects of imidacloprid on Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*. Pest Management Science. 65: 870–877
- Borgoni PC, Vendramim, JD, Lourenção AL, Machado MA (2014) Resistance of *Citrus* and Related Genera to *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae). Neotrop Entomol 43:465-469. doi: 10.1007/s13744-014-0230-0
- Cano A, Bermejo A (2011) Influence of rootstock and cultivar on bioactive compounds in citrus peels. J Sci Food Agric 91:1702-1711. doi: 10.1002/jsfa.4375
- García-Pérez F, Ortega-Arenas LD, López-Arroyo JI, González-Hernández A, Lomeli-Flores JR, Romero-Nápoles J (2013) Morphometry of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) on Six Rutaceae from Veracruz, Mexico. Fla. Entomol. 96:529-537. doi: <http://dx.doi.org/10.1653/024.096.0218>
- Halbert SE, Manjunath KL (2004) Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: a literature review and assessment of risk in Florida. Fla. Entomol. 87:330-353.

- Hodkinson ID (2009) Life cycle variation and adaptation in jumping plant lice (Insecta: Hemiptera: Psyllodea): a global synthesis. *J. Nat. Hist.* 43:65–179
- Koepke T, Dhingra A (2013) Rootstock scion somatogenetic interactions in perennial composite plants. *Plant Cell. Rep.* 32:1321-1337. doi: 10.1007/s00299-013-1471-9
- Malinga GM, Valtonen A, Nyeko P, Vesterinen EJ, Roininen H (2014) Bottom-up impact on the cecidomyiid leaf galler and its parasitism in a tropical rainforest. *Oecologia* 176:511-520. doi: 10.1007/s00442-014-3024-5
- Mayhew PJ (2001) Herbivore host choice and optimal bad motherhood. *Trends Ecol. Evol.* 16:165-167
- Muñoz ST, García AH, Pérez MJ, Boyero JR, Vela JM, Martínez-Ferri E (2008) Effects of Rootstock and Flushing on the Incidence of Three Insects on ‘Clementine de Nules’ Citrus Trees. *Environ. Entomol.* 37:1531-1537. doi: <http://dx.doi.org/10.1603/0046-225X-37.6.1531>
- Nava DE, Gomez-Torres ML, Rodrigues MDL, Bento JMS, Parra JRP (2007) Biology of *Diaphorina citri* (Hem., Psyllidae) on different hosts and different temperatures. *J. Appl. Entomol.* 131:709-715
- Nehru RK, Bhagat KC, Koul VK (2004) Influence of citrus species on the development of *Diaphorina citri*. *Ann. Pl. Protec. Sci.* 12:436-438
- Parra JRP, Alves GR, Diniz AJF, Vieira JM (2016) *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae) × *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae): Mass Rearing and Potential Use of the Parasitoid in Brazil. *J. Int. Pest. Manage.* 7:1-11
- R Core Team (2015). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>

- Ribeiro, AB, Abdelnur PV, Garcia CF, Belini A, Severino VGP, da Silva MFGF, Fernandes JB, Vieira PC, Carvalho AS, Souza AA, Machado MA (2008) Chemical Characterization of *Citrus sinensis* Grafted on *C. limonia* and the Effect of Some Isolated Compounds on the Growth of *Xylella fastidiosa*. J. Agric. Food Chem. 56:7815-7822
- Saha D, Mukhopadhyay A, Bahadur M (2012) Effect of host plants on fitness traits and detoxifying enzymes activity of *Helopeltis theivora*, a major sucking insect pest of tea. Phytoparasitica 40:433-444. doi: 10.1007/s12600-012-0244-2
- Sétamou M, Bartels DW (2015) Living on the Edges: Spatial Niche Occupation of Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae), in Citrus Groves. PLoS ONE 10(7):e0131917. doi: 10.1371/journal.pone.0131917
- Sétamou M, Graça JV, Sandoval II JL (2016) Suitability of native North American Rutaceae to serve as host plants for the Asian citrus psyllid (Hemiptera: Liviidae). J. Appl. Entomol. doi: 10.1111/jen.12300
- Sétamou M, Schulthess F, Bosque-Pérez NA, Poehling H-M, Borgemeister C (1999) Bionomics of *Mussidia nigrivenella* (Lepidoptera: Pyralidae) on three host plants. Bull. Entomol. Res. 89:465-471. doi: <http://dx.doi.org/10.1017/S0007485399000607>
- Simon JC, d'Alençon E, Guy E, Jacquin-Joly E, Jaquiéry J, Nouhaud P, Peccoud J, Sugio A, Streiff R (2015) Genomics of adaptation to host-plants in herbivorous insects. Brief. Funct. Genomics 14:413-423. doi: 10.1093/bfpg/elv015
- Soares MS, da Silva DF, Forim MR, da Silva MFGF, Fernandes VB, Vieira PC, Silva DB, Lopes NP, Carvalho SA, de Souza AA, Machado MA (2015) Quantification and localization of hesperidin and rutin in *Citrus sinensis* grafted on *C. limonia* after *Xylella fastidiosa* infection by HPLC-UV and MALDI imaging mass spectrometry. Phytochemistry 115:161-170. doi: 10.1016/j.phytochem.2015.02.011.
- Souza TR, Villas-Boas RL, Quaggio JA, Salomão LC (2012) Nutrientes na seiva de plantas cítricas fertirrigadas. Rev. Bras. Frutic. 34:482-492

- Steinbauer MJ (2013) Shoot Feeding as a Nutrient Acquisition Strategy in Free-Living Psyllids. PLoS ONE 8(10): e77990. doi: 10.1371/journal.pone.0077990
- Teck SLC, Fatimah A, Beattie A, Heng RQJ, King. WS (2011) Influence of host plant species and flush growth stage on the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama. Am. J. Agric. Biol. Sci. 6:536-543
- Tsagkarakis AE, Rogers ME (2010) Suitability of ‘Cleopatra’ Mandarin as a host plant for *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). Fla. Entomol. 93:451-453. DOI: 10.1653/024.093.0322
- Tsai JH, Liu YH (2000) Biology of *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) on four host plants. J. Econ. Entomol. 93:1721-1725
- Vale FXR, Fernandes-Filho E, Liberato JR (2003) A software plant disease severity assessment. In: International Congress of Plant Pathology, 8, 2003, Christchurch. Proceedings... Christchurch: Plant Pathology Society, p.105
- Vendramim JD, Guzzo EC (2012) Plant resistance and insect bioecology and nutrition. In: Panizzi AR, Parra JRP (ed) Insect bioecology and nutrition for integrated pest management. CRC, Boca Raton, pp 657-686
- Westbrook CJ, Hall DG, Stover E. Duan YP, Lee RF (2011) Colonization of citrus and citrus-related germplasm by *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). HortScience 46:997-1005
- Wilson H, Miles AF, Daane KM, Altieri MA (2015) Landscape Diversity and Crop Vigor Influence Biological Control of the Western Grape Leafhopper (*E. elegantula* Osborn) in Vineyards. PLoS ONE 10(11): e0141752. doi: 10.1371/journal.pone.0141752
- Wise MJ, Partelow JM, Everson KJ, Anselmo MK, Abrahamson WG (2008) Good mothers, bad mothers, and the nature of resistance to herbivory in *Solidago altissima*. Oecologia 155:257-266

4. COMPORTAMENTO ALIMENTAR DE *Diaphorina citri* KUWAYAMA, 1908 (HEMIPTERA: LIVIIDAE) EM DIFERENTES ESPÉCIES CÍTRICAS UTILIZANDO A TÉCNICA DE ‘ELECTRICAL PENETRATION GRAPH’ (EPG)

RESUMO

Huanglongbing (HLB) é atualmente a doença mais destrutiva da citricultura no mundo. O psílideo asiático-dos-citros, *Diaphorina citri*, é o principal vetor das bactérias associadas ao HLB, “*Candidatus Liberibacter spp.*”. *D. citri* é capaz de explorar um grande número de hospedeiros, no entanto, algumas dessas plantas não são adequadas a seu completo desenvolvimento. Um desempenho diferenciado, pode se dar em função de características fisiológicas ou morfológicas de seus hospedeiros. Apesar da importância de *D. citri* no complexo HLB, pouco se sabe sobre seu comportamento alimentar em diferentes plantas hospedeiras e sua relação com o fitness do inseto. Para o monitoramento do comportamento alimentar de *D. citri* utilizou-se a técnica de Electrical Penetration Graph (EPG). Foram utilizadas as seguintes variedades de citros: laranjeiras doces, *Citrus sinensis* (‘Hamlin’, ‘Pêra’ e ‘Valência’), tangerineira ‘Ponkan’ (*C. reticulata*) e limoeiro ‘Siciliano’ (*C. lemon*), todas enxertadas em limoeiro ‘Cravo’ (*C. limonia*). Cada inseto foi monitorado por um período de oito horas. Os seguintes parâmetros foram avaliados: número de provas por inseto (NPI), número de vezes que se realiza uma determinada onda por inseto (NWEI), duração de onda por inseto (WDI), duração de onda por evento (WDE), proporção de indivíduos que produziram um tipo específico de onda (PPW), e tempo de evento por inseto. Não foram observadas diferenças dentre 27 variáveis de EPG avaliadas. Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que *D. citri* não apresentou comportamento alimentar diferenciado em nenhuma das espécies/variedades de citros testada, podendo indicar a princípio, a ausência de fatores morfológicos e químicos de resistência de plantas cítricas à *D. citri*.

Palavras-chave: Psílideo-asiático-dos-citros; Hospedeiros; EPG; Huanglongbing

ABSTRACT

Huanglongbing (HLB) is currently the most destructive citrus disease in the world. The Asian-citrus psyllid, *Diaphorina citri* is the main vector of bacteria associated with HLB, “*Candidatus Liberibacter spp.*”. *D. citri* is able to exploit a large number of hosts, however, some of these plants do not allow their complete development. A differentiated performance may be due to the physiological or morphological characteristics of its hosts. Despite the importance of *D. citri* in the HLB complex, little is known about its feeding behavior in different host plants and its relation to insect fitness. The Electrical Penetration Graph (EPG) technique was used to monitoring the feeding behavior of *D. citri*. The following citrus varieties were used: sweet orange, *Citrus sinensis* (‘Hamlin’, ‘Pêra’ and ‘Valencia’), ‘Ponkan’ mandarin (*C. reticulata*) and ‘Sicilian’ lemon (*C. lemon*) grafted on Rangpur lime (*C. limonia*). Each insect was monitored for eight hours. The following parameters were evaluated: number of probes per insect (NPI), number of waveform events per insect (NWEI), waveform duration per insect (WDI), waveform duration per event (WDE), proportion of individuals) that produced a specific waveform type (PPW) and time to event per insect. No statistical differences were observed among 27 EPG variables evaluated. The results obtained in this study showed that *D. citri* did not present a differentiated feeding behavior in any of the tested citrus species/varieties, and

may indicate, initially, the absence of morphological resistance factors of citrus plants to *D. citri*.

Keywords: Asian citrus psyllid; Host; EPG; Huanglongbing

4.1. Introdução

Dentre as várias doenças que ocorrem na cultura de citros, atualmente, a principal ameaça ao setor é o Huanglongbing (HLB) ou “greening”, que vem representando um enorme risco à sustentabilidade do agronegócio citrícola no Brasil e no mundo (BOVÉ, 2006; HALL et al., 2012; GRAFTON-CARDWELL et al., 2013). Desde de seu primeiro registro em 2004 até o primeiro semestre de 2016, mais de 44 milhões de plantas foram eliminadas no estado de São Paulo (CDA, 2016).

No Brasil, a doença é causada pelas bactérias “*Candidatus*. L. asiaticus” e “*Ca*. L. americanus” sendo o principal vetor o psíldeo *Diaphorina citri* Kuwayama, 1908 (Hemiptera: Liviidae) (GRAÇA et al., 2016).

D. citri possui uma gama de hospedeiros de cerca de 50 espécies da família Rutaceae, incluindo todas as espécies do gênero *Citrus* e suas variedades (AUBERT 1987; HALBERT; MANJUNATH, 2004).

Alguns estudos têm mostrado a influência do hospedeiro tanto em parâmetros comportamentais (escolha hospedeira) como no desenvolvimento de *D. citri* (TSAI; LIU, 2000; NAVA et al., 2007; WESTBROOK et al., 2011; TECK et al., 2011; ALVES et al., 2014; BORGONI et al., 2014; SETÁMOU; GRAÇA; SANDOVAL II, 2016).

Uma vez que a capacidade de um inseto se alimentar depende de características químicas e morfológicas da planta, diferenças nos tecidos vegetais podem afetar a capacidade de alimentação entre diferentes espécies ou variedades (VENDRAMIM; GUZZO, 2012). Dessa forma, a utilização de uma técnica que caracterize comportamentos alimentares distintos pode revelar aspectos favoráveis da planta para estudos posteriores de resistência à praga.

Diferentemente de insetos mastigadores, para os quais é facilmente observado o hábito alimentar, o mesmo não é válido para insetos sugadores que se alimentam de seiva por meio da inserção de seus estiletes no tecido foliar, sendo necessárias técnicas especializadas para o estudo do comportamento alimentar desse grupo de insetos (BONANI, 2009).

Uma das formas de se estudar a alimentação de insetos sugadores é a utilização da técnica de ‘Electrical Penetration Graph’ (EPG). A técnica consiste em incorporar o inseto e a

planta em um circuito elétrico acoplado a um sistema de medição, de forma que, no momento em que o inseto insere os estiletes no tecido vegetal, o circuito é fechado, ocorrendo uma variação na voltagem que produz diferentes tipos de ondas, que podem indicar a localização, bem como a atividade do inseto na planta (TJALLINGII, 1985; BACKUS, 1994; PRADO; TJALLINGII, 1994).

A técnica de EPG é muito utilizada para estudos relacionados ao comportamento alimentar de hemípteros, principalmente os relacionados à transmissão de fitopatógenos, interação inseto-planta, estudos de resistência de plantas e influência de inseticidas sobre o comportamento alimentar desses insetos (COLLAR; FERERES, 1998; GARZO et al., 2002; ALVAREZ et al., 2006; BUTLER et al., 2012).

Estudos utilizando-se o EPG já são muito bem documentados para afídeos, cigarrinhas e moscas-brancas (aleirodídeos) (PRADO; TJALLINGII, 1994), porém, são poucas as informações para o grupo dos psílídeos (BONANI et al., 2010).

Variações na atividade alimentar em diferentes plantas podem ser relacionadas a diversos aspectos da resistência de plantas (LEI et al., 1999; ALVAREZ et al., 2006, GARZO et al., 2002; COLE, 1994), sendo o entendimento da relação inseto-planta muito importante para o manejo do complexo vetor doença (WU et al., 2016).

Embora *D. citri* provoque danos diretos às plantas pela sucção de seiva, o inseto assume significativa importância devido à transmissão das bactérias associadas ao HLB, e os mecanismos envolvidos no comportamento alimentar e consequentemente na transmissão da bactéria pelo psílídeo precisam ser melhores esclarecidos.

Estudos com uso de EPG com outros insetos sugadores mostraram que diferentes variedades de uma mesma planta podem conduzir a comportamentos alimentares diferenciados entre elas (CHEN et al., 1997; LEI et al., 1999; GARZO et al., 2002; ALVAREZ et al., 2006; JIN; BAOYU, 2007). Dada a importância do complexo HLB e uma vez que estudos dessa natureza não foram ainda realizados para variedades de citros, a avaliação da atividade alimentar de *D. citri* em nestes hospedeiros pode fornecer informações úteis a futuros trabalhos de melhoramento da cultura visando ao manejo do vetor e da doença.

Dessa forma, objetivou-se com este trabalho verificar se o comportamento alimentar de *D. citri* é influenciado por diferentes espécies cítricas.

4.2. Material e Métodos

4.2.1. Insetos e plantas

O estudo sobre o comportamento alimentar de *D. citri* utilizando-se a técnica de EPG foi conduzido no Laboratório Entomologia do Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus). Os insetos utilizados foram provenientes de criação de manutenção do referido laboratório, criados em murta [*Murraya paniculata* (L.) Jack], em condições controladas, com temperatura a 25 ± 2 °C, U.R. de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14 h.

Antes da realização do experimento, adultos de *D. citri* (com em média 12 dias) foram removidos da planta de murta e transferidos por 24 horas para um período de condicionamento nas respectivas variedades de citros.

Foram utilizadas as seguintes espécies de citros: laranjeira doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] das variedades ‘Hamlin’, ‘Pêra’ e ‘Valência’, tangerineira ‘Ponkan’ (*C. reticulata* Blanco) e limoeiro ‘Siciliano’ [*C. lemon* (L.) Burm. f.], todas enxertadas em limoeiro ‘Cravo’ (*C. limonia* Osbeck). As plantas utilizadas foram produzidas em viveiro experimental protegido com tela do Centro de Citricultura Sylvio Moreira, em Cordeirópolis/SP. As mudas foram integralmente produzidas em tubetes plásticos de 700 mL (Polifer®). Primeiramente foi realizada a semeadura dos porta-enxertos e posterior enxertia de borbulhas das diferentes variedades de copa. Até o momento da utilização, as mudas foram mantidas em casa de vegetação, onde eram diariamente irrigadas e fertilizadas quinzenalmente com solução foliar do adubo de “Peters” (NPK 20 – 20 – 20) a 1%.

4.2.2. Obtenção e marcação de gráficos de penetração eletrônica (Electrical penetration graph)

O monitoramento do comportamento alimentar de *D. citri* foi realizado utilizando um dispositivo de DC-EPG (Modelo GIGA-8; EPG Systems, Wageningen, The Netherlands). Descrições técnicas detalhadas do sistema podem ser obtidas em Tjallingii (1978). Os registros das ondas foram realizados com o auxílio de um amplificador (x 100) (DATAQ Instruments, Akron, OH), e o sinal convertido digitalmente para um computador, utilizado tanto para aquisição como para a análise de dados EPG usando o software Stylet + (EPG Systems).

Fêmeas de *D. citri* foram anestesiadas com CO₂ por um período de três a cinco segundos e, na sequência, imobilizadas com uma bomba a vácuo. Com o auxílio de um microscópio estereoscópico, foi fixado no dorso do inseto com cola de prata condutora, um fio de ouro de 20 µm de diâmetro e 3 cm de comprimento ligado a um eletrodo de cobre. Em

seguida, o eletrodo foi acoplado ao equipamento de EPG, e o inseto colocado sobre a superfície abaxial da folha da planta, e um segundo eletrodo foi inserido no substrato da planta de citros. Para os testes, foram utilizadas apenas folhas tenras com em média 7 cm (estágio V5) (Figura 11A).

A fim de se evitar interferências elétricas do ambiente externo, todo o processo de monitoramento foi realizado dentro de uma gaiola de “Faraday” (100 × 110 × 90 cm), mantida em sala climatizada a temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, U.R. $60 \pm 10\%$ e luz artificial providas por seis lâmpadas fluorescentes (240 W). Cada inseto foi monitorado por um período de oito horas (Figura 11B).

Figura 11. Obtenção e marcação dos dados de EPG. (A) Fêmea de *D. citri* (detalhe em vermelho) presa a um fio de ouro acoplado em um eletrodo em folha de citros e (B) vista geral do experimento de EPG. Temp. $25 \pm 2^\circ\text{C}$, U.R. $60 \pm 10\%$ e fotofase 14 h.

As formas de ondas de EPG para *D. citri* foram identificadas e marcadas de acordo com os padrões de ondas descritos por Bonani et al. (2010).

Os padrões de onda de EPG, originados a partir por alterações na voltagem devido às variações da resistência elétrica do circuito em função da posição dos estiletes nos tecidos vegetais e as variações nas forças eletromotrizes durante a alimentação de *D. citri* na planta, assim como sua correlação com as atividades alimentares desse inseto estão descritas abaixo:

Onda Np: não prova, relacionada também com a movimentação do psílídeo na superfície foliar (YOUN et al., 2011).

Onda C: associada com a secreção da bainha salivar e caminhar do estilete através da epiderme e parênquima.

Onda D: primeiro contato do estilete com o floema.

Onda E1: comportamento de salivação nos vasos do floema e de modo geral, com a inoculação das bactérias associadas ao HLB na planta.

Onda E2: ingestão de seiva nos vasos do floema. Fase em que ocorre a aquisição do patógeno pelo inseto.

Onda G: provavelmente ingestão de seiva no xilema (reidratação).

As variáveis de resposta de EPG foram calculadas a partir dos dados gravados em software específico (EPG-Excel Data Workbook) desenvolvido por Sarria et al. (2009).

As variáveis analisadas foram separadas por não sequenciais e sequenciais. Variáveis não sequenciais são aquelas não diretamente relacionada a um evento (onda) anterior e sequenciais, variáveis dependentes de um evento anterior.

Variáveis não sequenciais avaliadas foram: número de provas por inseto (NPI), número de vezes que se realiza uma determinada onda por inseto (NWEI), duração de onda por inseto (WDI), duração de onda por evento (WDE), proporção de indivíduos que produziram um tipo específico de onda (PPW), e sequencial: tempo de evento por inseto (BACKUS et al., 2007; BONANI et al., 2010).

4.2.3. Análise estatística

Para a análise estatística dados de proporção de indivíduos que produziram um tipo específico de onda (PPW) foram utilizados modelos lineares generalizados (glm) do tipo binomial, para dados do número de vezes que se realiza uma determinada onda por inseto (NWEI) (ondas D e E1), glm do tipo Poisson; para a duração de onda por evento (WDE) (ondas Np, C, D e E2), duração de onda por inseto (WDI) (ondas Np, C, D e G) e tempo de evento por inseto (primeira prova) utilizou-se glm do tipo binomial negativo. Para os demais parâmetros, foi utilizado um modelo linear generalizado do tipo quase-Poisson (NELDER; WEDDERBURN, 1972). A qualidade do ajuste para todos os modelos foi avaliada utilizando gráficos seminormais por meio do pacote de envelope simulado hnp (MORAL et al., 2016).

Todas as análises foram feitas utilizando-se o software R (R Core Team 2015).

4.3. Resultados

Durante a avaliação do comportamento alimentar de *D. citri*, por um período de oito horas, as seis formas de ondas distintas (Np, C, D, E1, E2, G), como reportadas por Bonani et al. (2010), foram verificadas neste trabalho. Para as 27 variáveis, sequenciais e não sequenciais avaliadas, não foram observadas diferenças estatísticas, independentemente do hospedeiro testado (Tabela 6). O menor número de provas por inseto (NPI) foi observado na variedade ‘Hamlin’ (2,81); por outro lado, a variedade ‘Valência’ foi a qual *D. citri* realizou o maior número de provas (4,87).

Quanto ao número de vezes que se realiza uma determinada onda por inseto (NWEI), o mesmo padrão foi observado para a onda C (secreção de bainha estiletar e caminhamento). O maior valor foi verificado para a variedade ‘Valência’ (em média 6x), enquanto que a menor foi observada em ‘Hamlin’. Ainda, ondas do tipo D, E1, E2 apresentaram valores similares entre os diferentes hospedeiros, com valor máximo 1,5x para as ondas D e E1 quando insetos se alimentaram na variedade ‘Valência’. Quanto à onda G, as variedades ‘Pêra’ e ‘Siciliano’ foram as quais fêmeas de *D. citri* mais realizaram esse tipo de onda (relacionada com a ingestão de seiva do xilema).

Tabela 6. Média ($\pm$ erro padrão da média) das variáveis não sequenciais de EPG por um período de 8 horas de monitoramento de *D. citri* se alimentando em cinco hospedeiros

Variável de EPG	Hospedeiro					Distribuição	gl	P
	Hamlin n = 22	Pêra n = 22	Valência n = 21	Ponkan n = 19	Siciliano n = 20			
NPI	2,81 $\pm$ 0,53	4,18 $\pm$ 0,60	4,87 $\pm$ 0,73	4,10 $\pm$ 0,85	4,85 $\pm$ 0,65	F = 1,656	4; 102	0,166
NWEI								
Np	3,18 $\pm$ 0,56	4,68 $\pm$ 0,57	5,21 $\pm$ 0,70	4,63 $\pm$ 0,86	5,00 $\pm$ 0,67	F = 1,530	4; 102	0,199
C	3,77 $\pm$ 0,68	5,41 $\pm$ 0,79	6,08 $\pm$ 1,07	4,89 $\pm$ 0,95	5,95 $\pm$ 0,78	F = 1,232	4; 102	0,301
D	1,18 $\pm$ 0,24	1,23 $\pm$ 0,26	1,54 $\pm$ 0,47	1,05 $\pm$ 0,19	1,15 $\pm$ 0,25	X ² = 2,398	4; 102	0,663
E1	1,18 $\pm$ 0,24	1,23 $\pm$ 0,26	1,54 $\pm$ 0,47	1,05 $\pm$ 0,19	1,15 $\pm$ 0,25	X ² = 2,398	4; 102	0,663
E2	1,00 $\pm$ 0,17	1,23 $\pm$ 0,26	1,12 $\pm$ 0,27	1,00 $\pm$ 0,18	1,05 $\pm$ 0,21	F = 0,179	4; 102	0,948
G	0,23 $\pm$ 0,11	0,41 $\pm$ 0,15	0,16 $\pm$ 0,07	0,11 $\pm$ 0,07	0,45 $\pm$ 0,15	F = 1,717	4; 102	0,151
WDI (min)								
Np	199,26 $\pm$ 33,16	194,79 $\pm$ 30,96	229,80 $\pm$ 33,20	234,18 $\pm$ 34,12	181,79 $\pm$ 24,72	F = 0,437	4; 102	0,781
C	41,73 $\pm$ 13,75	124,83 $\pm$ 20,21	103,49 $\pm$ 13,17	91,33 $\pm$ 12,66	121,05 $\pm$ 16,13	F = 1,566	4; 93	0,181
D	0,67 $\pm$ 0,11	0,81 $\pm$ 0,11	0,94 $\pm$ 0,22	0,77 $\pm$ 0,12	0,69 $\pm$ 0,13	F = 0,763	4; 71	0,548
E1	1,30 $\pm$ 0,29	1,45 $\pm$ 0,50	1,60 $\pm$ 0,31	1,35 $\pm$ 0,42	1,81 $\pm$ 0,47	F = 0,264	4; 71	0,899
E2	262,41 $\pm$ 31,89	224,63 $\pm$ 28,99	227,71 $\pm$ 25,66	232,44 $\pm$ 30,90	209,55 $\pm$ 24,18	F = 0,489	4; 71	0,743
G	39,20 $\pm$ 17,60	51,23 $\pm$ 19,67	33,01 $\pm$ 16,18	29,07 $\pm$ 19,64	50,00 $\pm$ 21,86	F = 0,255	4; 19	0,906
WDE (min)								
Np	62,63 $\pm$ 12,65	41,61 $\pm$ 8,04	44,12 $\pm$ 7,71	50,56 $\pm$ 10,12	36,36 $\pm$ 5,31	F = 2,198	4; 481	0,066
C	18,19 $\pm$ 2,93	20,98 $\pm$ 2,90	14,88 $\pm$ 1,66	16,69 $\pm$ 2,01	20,34 $\pm$ 2,53	F = 2,003	4; 555	0,091
D	0,44 $\pm$ 0,02	0,45 $\pm$ 0,04	0,41 $\pm$ 0,02	0,50 $\pm$ 0,06	0,45 $\pm$ 0,03	F = 0,996	4; 128	0,401
E1	0,85 $\pm$ 0,14	0,80 $\pm$ 0,16	0,69 $\pm$ 0,11	0,87 $\pm$ 0,23	1,18 $\pm$ 0,24	F = 1,086	4; 128	0,365
E2	202,77 $\pm$ 33,44	124,79 $\pm$ 22,59	134,94 $\pm$ 24,45	159,04 $\pm$ 31,17	149,69 $\pm$ 22,63	F = 0,758	4; 111	0,552
G	31,36 $\pm$ 15,72	39,85 $\pm$ 16,43	33,01 $\pm$ 16,18	29,08 $\pm$ 19,64	38,89 $\pm$ 18,44	F = 0,054	4; 24	0,994

A duração de onda por inseto (WDI) foi similar entre os hospedeiros testados (Tabela 6). A onda do tipo Np (não prova e movimento do inseto na folha) foi maior em termos absolutos, em ‘Ponkan’, com em média 234,18 minutos/inseto. O registro mais longo do caminhar estiletar (onda do tipo C) foi observado em ‘Pêra’, com em média 124 minutos e o menor em ‘Hamlin’ com apenas 41,73 minutos/inseto, o que representa em média 7,66% do tempo gasto nesse comportamento (Figura 12). De forma contrária, insetos monitorados na variedade ‘Hamlin’ foram os quais permaneceram mais tempo se alimentando nos vasos do floema (onda E2), em média 262,41 minutos/inseto ou, 48% do tempo gasto nessa atividade (Figura 12).

Assim como para as demais variáveis, não foram observadas diferenças significativas no que se refere à duração de onda por evento (WDE) em nenhum hospedeiro.

Figura 12. Duração relativa (% do total de duração de onda por inseto) por um período de oito horas de registro em diferentes hospedeiros. Np = não prova, C = caminhar estiletar, D = primeiro contato com o floema, E1 = salvação no floema, E2 = ingestão de seiva no floema e G = ingestão de seiva no xilema.

As proporções de indivíduos que produziram um tipo específico de onda (PPW) foram similares entre os tratamentos. Em todos os hospedeiros, os adultos de *D. citri* produziram ondas do tipo C. Para as ondas do tipo D seguidas de E1 (D+E1) e E2, o padrão foi o mesmo,

ou seja, aqueles insetos que tiveram contato com floema (D) e salivaram (E1) foram capazes de se alimentar do conteúdo do tecido floemático (onda E2) (Tabela 7).

Tabela 6. Porcentagem de *D. citri* que produziram uma onda específica (PPW) em cinco hospedeiros por um período de 8 horas.

Tipo de onda	Hospedeiro					X ²	gl	P
	Hamlin	Pêra	Valência	Ponkan	Siciliano			
C	100	100	100	100	100	-	-	-
D + E1	77,2	68,1	76,2	68,4	75,0	0,592	4; 102	0,963
E2	77,2	68,1	76,2	68,4	75,0	0,957	4; 102	0,916

Quanto aos parâmetros sequenciais, referentes ao tempo de evento por inseto, não foram observadas diferenças significativas para as variáveis: primeira prova ($F = 1,127$; $gl = 4$, $P = 0,341$), primeira onda D ($F = 0,925$; $gl = 4$; $P = 0,454$), primeira onda E1 ($F = 0,919$; $gl = 4$; $P = 0,457$) e primeira onda E2 ($F = 1,208$; $gl = 4$; $P = 0,314$) (Figura 13). Da mesma forma, o tempo até a primeira onda E2 (≤ 10 min), ou seja, início do registro de EPG até a primeira alimentação nos vasos do floema por um período maior que 10 minutos, não apresentou diferença significativa entre as variedades/espécies testadas ($F = 1,456$; $gl = 4$; $P = 0,222$) (Figura 14).

Figura 13. Média ($\pm$ erro padrão) do tempo de evento por inseto (min) por *D. citri* em cinco hospedeiros por um período de 8 horas.

Figura 14. Média ($\pm$ erro padrão) de tempo até a primeira onda E2 (≤ 10 min) realizada por *D. citri* em cinco hospedeiros por um período de 8 horas.

4.4. Discussão

De modo geral, em insetos sugadores de seiva, o comportamento alimentar se inicia pelo contato labial do inseto com a superfície foliar, seguido da penetração estiletar através dos diferentes tecidos vegetais até por fim, chegarem aos tecidos vasculares (LEI et al., 1999). No entanto, a localização dos tecidos vasculares pelo inseto está atrelada a uma série de comportamentos influenciados por fatores morfológicos e químicos da planta (SOGAWA, 1982; LEI et al., 1999), podendo esses fatores serem usados como indicativos de aspectos ligados a resistência de plantas a insetos.

A resistência é resultante de uma complexa interação do inseto e a planta, e os mecanismos pelos quais as plantas apresentam um tipo de resistência está relacionada com alterações na biologia e comportamento do inseto (VENDRAMIM; GUZZO, 2012). Segundo os mesmos autores, os mecanismos ou causas da resistência de plantas estão relacionados a fatores, físicos, químicos e morfológicos das mesmas.

De modo a complementar estudos biológicos do inseto, a avaliação da atividade alimentar por meio do EPG é uma importante técnica para caracterização de de fatores de resistência a insetos em tecidos de plantas hospedeiras (CHEN et al., 1997; GARZO et al., 2002; JIN; LEI et al., 1999; ALVAREZ et al., 2006).

Segundo Jin e Baoyo (2007), durante o processo de alimentação, um maior número de provas, e longos períodos até a alimentação efetiva realizadas pelo inseto, podem ser indicativos da existência de fatores que dificultam ou até mesmo impedem uma alimentação regular. Tal fato não foi observado no presente trabalho, em que, o número de provas por inseto (NPI) e o número de vezes que se realizou uma determinada onda (NWEI) foram similares entre os diferentes hospedeiros testados.

Quanto ao WDI, os tempos gastos por inseto foram parecidos entre os hospedeiros para todos os padrões de onda, com exceção da onda do tipo C (que corresponde a fase de caminamento estiletar), que foi numericamente menor na variedade 'Hamlin'.

Utilizando a técnica de EPG para monitorar o comportamento alimentar de *Myzus persicae* (Sulzer, 1776) (Hemiptera: Aphididae) em diferentes genótipos de batata (*Solanum tuberosum* L.), Alvarez et al. (2006) observaram resistência diferenciada entre os genótipos em três diferentes níveis no tecido da planta (epiderme, mesofilo e floema). Tal fato foi também verificado para o pulgão *Aphis gossypii* Glöver, 1877 (Hemiptera: Aphididae) em genótipos de melão (*Cucumis melo* L.); dentre os hospedeiros testados, TGR-1551 não permitiu que o pulgão iniciasse a alimentação no floema, sugerido assim, a existência de uma barreira nos tecidos desse hospedeiro (GARZO et al., 2002).

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram que *D. citri* não apresentou comportamento alimentar diferenciado em nenhuma das espécies de citros testada, podendo indicar a princípio, a ausência de fatores morfológicos de resistência de plantas cítricas à *D. citri*.

Além dos caracteres morfológicos do tecido vegetal, fatores químicos, podem afetar o comportamento alimentar de insetos sugadores de seiva (JIN; BAOYO, 2007). A qualidade, o pH e a presença de várias substâncias (como inibidores de alimentação, por exemplo) na seiva do floema poderiam alterar o comportamento alimentar desses insetos, afetando principalmente o número de provas e a duração de uma determinada onda (AUCLAIR et al., 1982; CHEN et al., 1997; JIN; BAOYO, 2007).

Chen et al. (1997) observaram diferenças no comportamento alimentar de *A. gossypii* em genótipos de melão com perfis distintos de aminoácidos. Tal fato foi também observado para *Nilaparvata lugens* (Stal) (Hemiptera: Delphacidae) em arroz (*Oryza sativa* L.) (SOGAWA, 1982). Os autores relataram que, em genótipos suscetíveis foram realizadas em média 16 provas, enquanto que no material resistente (com menor concentração de nitrogênio na seiva) em média 30 provas foram registradas.

Variações no ‘fitness’ ou comportamento (alimentar ou não) de insetos em diferentes hospedeiros (variedades) podem ser relacionados a variações das características físicas ou químicas da planta na qual se alimentam. Por meio da utilização do EPG, não foram verificadas, nesse trabalho, diferenças significativas entre os hospedeiros testados, os quais aparentemente não possuem variações morfológicas e químicas entre si suficientes para afetar o comportamento alimentar de *D. citri*. Deste modo, acredita-se que variações biológicas desta praga em diferentes hospedeiros, obtidas por diversos autores, se devam às variações na composição da seiva dos mesmos, uma vez que, segundo Teck et al. (2011) e Killiny (2016), a mudança no perfil nutricional, especialmente aminoácidos, tem papel fundamental na sobrevivência de *D. citri*. Tal fato poderia ser elucidado pela avaliação da composição nutricional da seiva dessas plantas, bem como a presença de compostos secundários que poderiam estar afetando o desenvolvimento desses insetos.

4.5. Conclusão

- O comportamento alimentar observado utilizando a técnica de EPG é similar entre os diferentes hospedeiros testados.

Referências

- ALVAREZ, A.E., TJALLINGII, W.F., GARZO, E., VLEESHOUWERS, V., DICKE, M., VOSMAN, B. Location of resistance factors in the leaves of potato and wild tuber-bearing *Solanum* species to the aphid *Myzus persicae*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 121, n. 2, p. 145-157, 2006.
- ALVES, G.R.; DINIZ, A.J.F.; PARRA, J.R.P. Biology of the Huanglongbing Vector *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) on Different Host Plants. **Journal of Economic Entomology**, v. 107, n. 2, p. 691-696, 2014.
- 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**, Paris, n. 42, p. 149-162, 1987.

- AUCLAIR, J.L.; BALDOS, E.; HEINRICHS, E.A. Biochemical evidence for the feeding sites of the leafhopper *Nephotettix virescens* within susceptible and resistance plants. **Insect Science and Its Application**, Elmsford, v. 27, p. 77–82, 1982.
- BACKUS, E.A. History, development and applications of AC electronic insect feeding monitors. In: ELLSBURY, M.M.; BACKUS, E.A.; ULLMAN, D.L. (ed). **History, Development and Applications of the AC Electronic Insect Feeding Monitors**. Lanham: Entomological Society of America, 1994, p. 1-15.
- BACKUS, E.A.; CLINE, A.R.; ELLERSEICK, M.R.; SERRANO, M.S. *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae) feeding on cotton: new methods and parameters for analysis of nonsequential electrical penetration graph data. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 100, n. 2, p. 296-310, 2007.
- BORGONI, P.C.; VENDRAMIM, J.D.; LOURENÇÃO, A.L.; MACHADO, M.A. Resistance of *Citrus* and Related Genera to *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v.43, p. 465-469, 2014.
- BONANI, J. P. Caracterização do aparelho bucal e comportamento alimentar de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) em *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. **2009. 83p. Tese (Doutorado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.**
- BONANI, J.P.; FERERES, A.; GARZO, E.; MIRANDA, M.P.; APPEZZATO-DA-GLORIA, B.; LOPES, J.R.S. Characterization of electrical penetration graphs of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, in sweet orange seedlings. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 134, n. 1, p. 35-49, 2010.
- BOVÉ, J.M. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus, **Journal of Plant Pathology**, Pisa, v. 88, n. 1, p. 7-37, 2006.
- BUTLER, C.D.; WALKER, G.P.; TRUMBLE, J.T. Feeding disruption of potato psyllid, *Bactericera cockerelli*, by imidacloprid as measured by electrical penetration graphs. **Entomologia experimentalis et applicata**, Dordrecht, v. 142, n. 3, p. 247-257, 2012.

- CHEN, J.Q.; RAHBÉ, Y.; DELOBEL, B.; SAUVION, N.; GUILLAUD, J.; FEBVAY, G. Melon resistance to the aphid *Aphis gossypii*: behavioural analysis and chemical correlations with nitrogenous compounds. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 85, n. 1, p. 33-44, 1997.
- COLE, R. A. Location a resistance mechanism to the cabbage aphid in two wild Brassicas. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 71, p. 23-21, 1994.
- COLLAR, J.L.; FERERES, A. Nonpersistent Virus Transmission Efficiency Determined by Aphid Probing Behavior During Intracellular Punctures. **Environmental Entomology**, College Park, v. 27, p. 583-591, 1998.
- COORDENADORIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA (CDA). Disponível em: <<http://www.defesaagropecuaria.sp.gov.br/www/gdsv/index?action=dadosCitriculturaPaulista>>. Acesso em: 15 out. 2016.
- GRAÇA, J.V.; DOUHAN, G.W.; HALBERT, S.E.; KEREMANE, M.L.; LEE, R.L.; VIDALAKIS, G.; ZHAO, H. Huanglongbing: An overview of a complex pathosystem ravaging the world's citrus. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 58, n. 4, p. 373–387, 2016.
- GARZO, E.; SORIA, C.; GOMEZ-GUILLAMON, M.L.; FERERES, A. Feeding behavior of *Aphis gossypii* on resistant accessions of different melon genotypes (*Cucumis melo*). **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 30, n. 2, p. 129-140, 2002.
- GRAFTON-CARDWELL, E.; STELINSKI, L.L.; STANSKY, P.A. Biology and management of Asian citrus psyllid, vector of the huanglongbing pathogens **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 58, p. 413-432, 2013.
- HALBERT, S.E.; MANJUNATH, K.L. Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: a literature review and assessment of risk in Florida. **Florida Entomologist**, Lutz, v. 87, n. 3, p. 330-353, 2004.

- HALL, D.G.; RICHARDSON, M.L.; AMMAR, E.; HALBERT, S.E. Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, vector of citrus huanglongbing disease. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 146, p. 207-223, 2012.
- JIN, M.; BAOYU, H. Probing behavior of the tea green leafhopper on different tea plant cultivars. **Acta Ecologica Sinica**, v. 27, n. 10, p. 3973-3982, 2007.
- LEI, H.; LENTEREN, J.V.; TJALLINGII, W.F. Analysis of resistance in tomato and sweet pepper against the greenhouse whitefly using electrically monitored and visually observed probing and feeding behaviour. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 92, n. 3, p. 299-309, 1999.
- KILLINY, N. Metabolomic comparative analysis of the phloem sap of curry leaf tree (*Bergera koenigii*), orange jasmine (*Murraya paniculata*), and Valencia sweet orange (*Citrus sinensis*) supports their differential responses to Huanglongbing. **Plant Signaling & Behavior**, Philadelphia, v. 11, n. 11, 2016.
- MORAL, R.A.; HINDE, J.; DEMÉTRIO, C.G.B. hnp: Half-Normal Plots with Simulation Envelopes. **R package version 1.2-1**. 2016.
- NAVA, D.E.; TORRES, M.L.G.; RODRIGUES, M.D.L.; BENTO, J.M.S.; PARRA, J.R.P. Biology of *Diaphorina citri* (Hem., Psyllidae) on different hosts and different temperatures. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 131, p. 9-10, 2007.
- NELDER, J.A.; WEDDERBURN, R.W.M. Generalized linear models. **Journal of the Royal Statistical Society**, v. 135, p. 370-384, 1972.
- PRADO, E. TJALLINGII, W. F. Aphid activities during sieve element punctures. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 72, p. 157–165, 1994
- R Core Team (2015). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>

- SARRIA, E.; CID, M.; GARZO, E.; FERERES, A. Workbook for automatic parameter calculation of EPG data. **Computers and Electronics in Agriculture**, New York, v. 67, p. 35–42, 2009.
- SETÁMOU, M.; GRAÇA, J.V.; SANDOVAL II, J.L. Suitability of native North American Rutaceae to serve as host plants for the Asian citrus psyllid (Hemiptera: Liviidae). **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v 140, n. 9, p. 645-654, 2016.
- SOGAWA, K. The rice brown planthopper: feeding physiology and host plant interactions. **Annual review of entomology**, Stanford, v. 27, n. 1, p. 49-73, 1982.
- TECK, S.L.C.; FATIMAH, A.; BEATTIE, A.; HENG, R.K.J.; KING, W.S. Influence of Host Plant Species and Flush Growth Stage on the Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama. **American journal of Agricultural and Biological Sciences**, New York, v. 6, n. 4, p. 536-543, 2011.
- TJALLINGII, W.F. Electronic recording of penetration behaviour by aphids. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 24, n. 3, p. 721-730, 1978.
- TJALLINGII, W.F. Electrical recording of stylet penetration activities. **Natural Enemies and Control**, Amsterdam, p. 98 – 108 ,1988.
- TJALLINGII, W.F. Electrical nature of recorded signals during stylet penetration by aphids. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 38, p. 177-186, 1985.
- TSAI, J.H.; LIU, Y.H. Biology of *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) on four host plants. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 93, n. 6, p.1721-1725, 2000.
- VENDRAMIM, J. D, AND E. C. GUZZO. 2012. Plant Resistance and Insect Bioecology and Nutrition, pp. 657-686. In A. R. Panizzi and J. R. P. Parra (eds.), **Insect Bioecology and Nutrition for Integrated Pest Management**, CRC Press, Boca Raton, FL.

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

WU, T.; LUO, X.; XU, C.; WU, F.; QURESHI, J.A.; CEN, Y. Feeding behavior of *Diaphorina citri* and its transmission of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ to citrus. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 161, n. 2, p. 104-111, 2016.

YOUN, Y.; BACKUS, E.A.; SERIKAWA, R.H.; STELINSKI, L.L. Correlation of an electrical penetration graph waveform with walking by Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). **Florida Entomologist**, Gainesville. v. 94, n. 4, p. 1084-1087, 2011.