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

**Identificação de voláteis de plantas de citros com potencial para
uso no manejo integrado de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera:
Liviidae)**

André Gustavo Corrêa Signoretti

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

**Piracicaba
2014**

André Gustavo Corrêa Signoretti
Engenheiro Agrônomo

**Identificação de voláteis de plantas de citros com potencial para uso no
manejo integrado de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae)**

Orientador:
Prof. Dr. **JOSÉ MAURÍCIO SIMÕES BENTO**

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

**Piracicaba
2014**

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

Signoretti, André Gustavo Corrêa

Identificação de voláteis de plantas de citros com potencial para uso no manejo integrado de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) / André Gustavo Corrêa Signoretti. - - Piracicaba, 2014.

76 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2014.

1. *Diaphorina citri* 2. Huanglongbing 3. Voláteis de plantas 4. Citros 5. Manejo
I. Título

CDD 634.3
S578i

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

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho

Ao meu avô, João Corrêa (in memoriam)

Aos meus pais, Roque e Zélia

Aos meus irmãos, João e Fernanda

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Maurício Simões Bento, pela orientação, motivação, conselhos, lições e amizade, desde quando fui seu estagiário, em 2004;

Aos demais professores do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ, pelos ensinamentos e formação;

Ao FUNDECITRUS, por contribuir com todo suporte necessário para desenvolvimento deste trabalho;

Aos amigos e colegas do Laboratório de Ecologia Química e Comportamento de Insetos, da ESALQ, pelo auxílio em diversas etapas deste trabalho;

Aos amigos e colegas do FUNDECITRUS, pelo auxílio em diversas etapas deste trabalho;

A todos os demais que, de alguma forma, contribuíram neste trabalho;

À minha família, pelo apoio constante e pelos valores morais e princípios que me norteiam;

A Deus, pela força e coragem para seguir firme em meus propósitos.

"Frequentemente é necessário mais coragem para ousar fazer o certo do que
para temer fazer o errado."

Abraham Lincoln

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	15
2.1 Revisão bibliográfica.....	17
2.1.1 Importância do ‘Huanglongbing’ (HLB) ou ‘Greening’ para citricultura.....	17
2.1.2 Aspectos taxonômicos e bioecológicos de <i>D. citri</i>	20
2.1.3 Voláteis de plantas e comportamento de <i>D. citri</i>	23
2.2 Material e métodos	27
2.2.1 Criação dos insetos e cultivo das plantas	27
2.2.2 Resposta de adultos de <i>D. citri</i> aos voláteis de plantas de citros sadias e doentes sintomáticas para HLB	30
2.2.3 Extração, análise química e comparação dos perfis de voláteis de plantas de citros sadias e doentes sintomáticas para HLB	33
2.2.4 Resposta de adultos de <i>D. citri</i> aos voláteis dos extratos naturais de citros e padrões sintéticos.....	35
2.2.5 Resposta de adultos de <i>D. citri</i> a padrões sintéticos de voláteis de citros em condição de semi-campo	37
2.2.6 Avaliação da captura de adultos de <i>D. citri</i> por armadilhas adesivas contendo padrões sintéticos de voláteis de citros em condição de campo	40
2.3 Resultados e Discussão	43
2.3.1 Resposta de adultos de <i>D. citri</i> aos voláteis de plantas de citros sadias e doentes sintomáticas para HLB	43
2.3.2 Análise química e comparação dos perfis de voláteis de plantas de citros sadias e doentes sintomáticas para HLB.....	45
2.3.3 Resposta de adultos de <i>D. citri</i> aos voláteis dos extratos naturais de citros e padrões sintéticos.....	52
2.3.4 Respostas de adultos de <i>D. citri</i> a padrões sintéticos de voláteis de citros em condição de semi-campo	56
2.3.5 Avaliações da captura de adultos de <i>D. citri</i> com armadilhas adesivas contendo padrões sintéticos de voláteis de citros em condição de campo.....	60
3 CONCLUSÕES.....	67
REFERÊNCIAS	68

RESUMO

Identificação de voláteis de plantas de citros com potencial para uso no manejo integrado de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae)

Na busca por compostos voláteis para utilização no manejo comportamental de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae), a resposta destes insetos foi avaliada frente às substâncias liberadas por plantas de laranja, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, variedade 'Pêra', enxertadas sobre limão-cravo, *C. limonia* Osbeck, sadias vs sintomáticas para Huanglongbing (HLB). Voláteis destas plantas, bem como seus extratos foram testados em olfatômetro 'Y' e analisados por GC-MS. Somente fêmeas foram atraídas, tanto para os voláteis quanto para os extratos, e preferencialmente os de plantas doentes. Foram encontrados 47 compostos em extratos de plantas sadias e doentes, dos quais 11 [hexanal; α -tujeno; α -pineno; sabineno; β -mirceno; α -terpineno; limoneno; linalol; composto 37 (não identificado); β -elemeno e β -copaeno] presentes em maior quantidade nos extratos de plantas doentes, sendo que 3 desses compostos (sabineno, linalol e β -elemeno) foram majoritários nos extratos de ambas as plantas, doentes e sadias. Esses três compostos, bem como uma substância padrão para atração (salicilato de metila), foram testados em diferentes concentrações e misturas em laboratório, casa-de-vegetação e campo. O efeito destas substâncias foi dependente de sua concentração e, embora limoneno tenha alterado a resposta comportamental das fêmeas, apenas salicilato de metila e linalol foram atraentes. Em laboratório, a mistura desses dois compostos apresentou efeito sinérgico na atração de fêmeas e, em casa-de-vegetação, a adição de linalol junto a plantas de citros aumentou a atratividade das mesmas para insetos adultos, sugerindo importante participação desses compostos no processo de seleção hospedeira pelo inseto. Estes resultados acrescentam novas informações para a busca de um atraente para *D. citri* visando o manejo comportamental do inseto vetor das bactérias *Liberibacter*, associadas ao HLB, a mais importante doença dos citros no mundo.

Palavras-chave: *Diaphorina citri*; Huanglongbing; Voláteis de plantas; Citros; Manejo

ABSTRACT

Identification of volatiles from citrus plants with potential for use in integrated management of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae)

With the aim of searching for volatile compounds to use in behavioral management of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae), the response of these insects was assessed against the substances released by sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck], variety 'Pera', grafted on Rangpur (*C. limonia* Osbeck), healthy and Huanglongbing (HLB) symptomatic plants. Plant volatiles as well as plant extracts were tested in Y-tube olfactometer assays and analyzed by GC-MS. Only females were attracted to plant volatiles and extracts and they preferred those from HLB-infected plants. A total of 47 compounds was found in the extracts from healthy and infected plants, from which 11 [hexanal; α -thujene; α -pinene; sabinene; β -myrcene; α -terpinene; limonene; linalool; compound #37 (not identified); β -elemene; and β -coapene] were present in higher amounts in infected plant extracts. Three of these volatiles (sabinene, linalool and β -elemene) represented major compounds in both infected and healthy plant blend extracts. These three compounds, as well as a standard substance used for attraction (methyl salicylate), were tested in different concentrations and mixtures in laboratory, greenhouse and field. The effect of these substances was dependent on its concentration and, although limonene changed female behavioral response, only methyl salicylate and linalool were attractive. In the laboratory, the mixture of these two compounds showed a synergistic effect in attracting females and, in greenhouse, the addition of linalool to citrus plants increased the attractiveness of plants to adult insects, suggesting an important role for these compounds in the host selection process by the insect. These results provide novel information about attractants to *D. citri* with the aim of developing a behavioral management approach of the insect vector for Liberibacter, bacteria associated to HLB, the most important citrus disease worldwide.

Keywords: *Diaphorina citri*; Huanglongbing; Plant volatiles; Citrus; Management

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor de citros do mundo, seguido pelos Estados Unidos e China (FNP, 2014). Recentemente a citricultura brasileira vem sofrendo grandes prejuízos ocasionados pelo ‘Greening’ ou ‘Huanglongbing’ (HLB), que é considerada a doença mais grave dos citros no mundo.

Esta doença está presente em mais de 40 países distribuídos pelos continentes Asiático, Africano, Oceania e Americano (BOVÉ, 2006). Desde 2004 quando foi detectada no Brasil, o HLB disseminou-se por quase todos os municípios citrícolas do estado de São Paulo, que é o principal estado produtor. Em setembro de 2012 o estado possuía 64% dos talhões com a doença, onde 6,91% das plantas tiveram que ser erradicadas (FNP, 2014; FUNDECITRUS, 2014b).

Os agentes causais do HLB formam um complexo de bactérias chamadas de *Candidatus Liberibacter* spp. gram-negativas, que se desenvolvem no floema da planta (GARNIER; DANIEL; BOVÉ, 1984). O sintoma mais evidente da doença é a presença de ramos com folhas cloróticas, que se contrastam com as demais folhas da planta. Com a evolução da doença, os ramos também são afetados, que resulta na queda intensa de folhas e seca dos ponteiros. Além disso, as folhas remanescentes passam a apresentar um mosqueado com manchas irregulares de coloração verde clara ou amarela (FUNDECITRUS, 2007). Nos frutos os sintomas são o amadurecimento desuniforme, assimetria bilateral do endocarpo, má formação das sementes e presença de um feixe de vasos alaranjados próximo à inserção do pedúnculo (BOVÉ, 2006). Em estágio avançado a doença promove a morte da planta, e medidas de controle para ela são desconhecidas (HALBERT; MANJUNATH, 2004; BOVÉ, 2006).

A disseminação da doença é realizada pela ação de insetos vetores, ou seja, *Trioza erytreae* (Del Guercio, 1918) (Hemiptera: Triozidae) e *Diaphorina citri* Kuwayama, 1908 (Hemiptera: Liviidae), sendo que, no Brasil, ocorre apenas a segunda. Assim, o manejo da doença é direcionado para ações preventivas, que consistem no plantio de mudas sadias e certificadas, erradicação de plantas doentes para eliminação de fontes de inóculo e controle do vetor.

Alguns trabalhos vêm investigando a interação entre plantas, microorganismos e seus insetos vetores, onde os resultados sugerem uma alteração da comunicação da planta hospedeira com o inseto fitófago por meio de compostos

voláteis (MAYER et al., 2007, 2008; NORONHA Jr., 2010). Muitos destes voláteis, produzidos pelas plantas ou insetos, podem mediar as relações ecológicas dos organismos que os emitem e daqueles que os recebem (DICKE; LOON Van, 2000; POECKE Van; DICKE, 2004).

As relações entre um fitopatógeno, planta hospedeira e inseto vetor mediadas por voláteis de plantas são bastante complexas, e o conhecimento dos mecanismos envolvidos podem auxiliar na descoberta de compostos voláteis para o manejo comportamental desses insetos vetores. Isso é extremamente importante no caso de *D. citri*, pois este inseto tem sido manejado com a aplicação sistemática de inseticidas não seletivos, independente da sua constatação ou não na área. Isso se deve à baixa eficiência na detecção do inseto nos pomares cítricos, cujo monitoramento é realizado pela observação visual de adultos, ninfas ou ovos, com auxílio de lupas, ou com o uso de armadilhas adesivas coloridas (MIRANDA et al., 2009).

Estudos recentes têm mostrado uma forte influência dos voláteis de citros sobre o comportamento de adultos de *D. citri* (WENNINGER; STELINSKI; HALL, 2009; NORONHA Jr., 2010; PATT; SÉTAMOU, 2010; MANN et al., 2012). Os resultados têm apontado uma maior preferência de *D. citri* por voláteis de plantas de citros com HLB em relação àqueles de plantas saudáveis. Contudo, as informações apresentadas ainda são conflitantes e exigem novos trabalhos para melhor compreensão destas interações.

Pelo exposto, no presente trabalho objetivou-se avaliar a resposta de adultos de *D. citri* aos voláteis de plantas de citros saudáveis e plantas de citros com HLB, focando na identificação e testes dos compostos específicos para serem aplicados no manejo integrado deste vetor no campo.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão bibliográfica

2.1.1 Importância do ‘Huanglongbing’ (HLB) ou ‘Greening’ para citricultura

A citricultura tem contribuído significativamente para o desenvolvimento do Brasil desde o início de suas exportações, em 1962, gerando mais de US\$60 bilhões no período. O principal produto exportado pelo Brasil é o suco de laranja, com o qual o país domina 85% do mercado mundial, resultante de 98% da produção brasileira, a qual representa 50% da produção mundial (NEVES, 2010). Neste cenário, o Brasil posiciona-se como maior produtor mundial de laranja, seguido dos Estados Unidos, sendo o estado de São Paulo, responsável por cerca de 75% da produção nacional (FNP, 2014).

Entretanto, diversos fatores afetam a produtividade dos pomares citrícolas, que abrangem, entre outros, os problemas fitossanitários. Por ser uma cultura perene e apresentar estreita base genética, ocupar áreas extensivas e sem barreiras físicas, os citros permanecem suscetíveis a ocorrência de pragas e doenças, as quais foram responsáveis pela erradicação de mais de 40 milhões de plantas na última década (SPÓSITO; BASSANEZI, 2008; NEVES, 2010). Neste sentido, nos últimos anos, a citricultura mundial vem sofrendo grandes prejuízos ocasionados pelo ‘Greening’ ou ‘Huanglongbing’ (HLB), considerado a doença mais grave dos citros no mundo, sendo altamente destrutiva para todas as espécies de citros cultivadas, presente em mais de 40 países distribuídos pelos continentes Asiático, Africano, Oceania e Americano (BOVÉ, 2006).

A doença é conhecida há décadas no sudeste da Ásia e África, sendo relatada pela primeira vez em 1919, no sul da China, contudo, no continente americano, sua constatação foi mais recente. No Brasil o primeiro registro do HLB ocorreu em 2004, na região de Araraquara, estado de São Paulo, enquanto que nos Estados Unidos em 2005, na Flórida (COLETTA-FILHO et al., 2004; HALBERT, 2005; TEIXEIRA et al., 2005; SUTTON, 2005; BOVÉ, 2006; GOTTWALD, 2010). Após 10 anos da detecção do primeiro foco da doença no Brasil, o HLB disseminou-se por quase todos os municípios produtores de citros do estado de São Paulo, sendo registrado, em julho de 2010, em 38% dos talhões e 1,8% das árvores. Em

setembro de 2012, já alcançava 64% dos talhões e 6,9% das plantas do mesmo estado, indicando uma rápida dispersão (FNP, 2014; FUNDECITRUS, 2014b).

O HLB está associado a um complexo de bactérias restritas ao floema das plantas, pertencente ao gênero *Candidatus Liberibacter*, as quais não são cultiváveis em meio de cultura. Atualmente três liberibacters estão associadas ao HLB: *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Candidatus Liberibacter africanus* e *Candidatus Liberibacter americanus* (BOVÉ et al., 2008; GOTTWALD, 2010). Destas, as espécies *Ca. Liberibacter asiaticus* e *Ca. Liberibacter africanus* já eram conhecidas como agentes causais da doença nos continentes asiático e africano, respectivamente, no entanto, a espécie *Ca. Liberibacter americanus*, até o momento, está restrita ao Brasil (TEIXEIRA et al., 2005; GOTTWALD, 2010). Além disso, em registros ocorridos em 2007, de plantas com sintomas da doença, foi identificado um fitoplasma como novo agente causal do HLB (TEIXEIRA et al., 2008). Ainda assim, a espécie de maior relevância para a citricultura brasileira é a *Ca. Liberibacter asiaticus*, visto que, em 2009, 96% das amostras analisadas pelo Fundecitrus para ocorrência de HLB, provenientes de plantas dos parques citrícolas do estado de São Paulo, estavam associadas à presença desta espécie de bactéria (TEIXEIRA et al., 2010). Mais recentemente, a doença também foi constatada em outras áreas do Brasil, incluindo os estados do Paraná e Minas Gerais, e também em Yucatán, no México; em várias regiões do Caribe; e nos estados do Texas e Califórnia, EUA (MENEGUIM et al., 2008; GOTTWALD, 2010; da GRAÇA et al., 2012; KUMAGAI et al., 2013; FUNDECITRUS, 2014a).

As bactérias causadoras do HLB podem ser disseminadas pela enxertia de material infectado, por plantas parasitas do gênero *Cuscuta* ou por insetos vetores, tais como *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) e *Trioza erytreae* (Del Guercio) (Hemiptera: Triozidae), sendo este último responsável pela transmissão da espécie africana da bactéria (CAPOOR; RAO; VISWANATH, 1974; da GRAÇA, 1991). A espécie *Ca. Liberibacter asiaticus* também foi detectada recentemente em ninfas do psílideo *Cacopsylla citrisuga* (Yang e Li) (Hemiptera: Psyllidae) sobre plantas de limão [*Citrus lemon* (L.) Burm] infectadas com a doença (CEN et al., 2012). No entanto, somente a espécie vetora *D. citri*, comumente chamada de psílideo asiático dos citros, é encontrada nos pomares brasileiros. Embora tenha sido relatada já na década de 1940, só ganhou importância como praga-chave na cultura de citros do país após a constatação do HLB no Brasil em 2004 (COSTA-

LIMA, 1942; COLETTA-FILHO et al., 2004). Uma vez adquirida a bactéria, a transmissão desta para as plantas ocorre por toda a vida do inseto (BOVÉ, 2006). Além disso, a planta conhecida como murta ou falsa-murta (*Murraya paniculata*), utilizada largamente como espécie ornamental no Brasil, também é hospedeira dos tipos asiático e americano de *Ca. Liberibacter* e do inseto vetor *D. citri* (BELASQUE Jr. et al., 2009).

As plantas com HLB apresentam sintomas que podem ser vistos durante o ano todo, embora com maior frequência entre o final do verão e o início da primavera. Estas plantas geralmente apresentam um ou poucos ramos com folhas que perdem parte da sua coloração verde, apresentando-se parcialmente amarelas e verdes, sem uma delimitação clara entre essas duas cores. É possível observar também uma assimetria das regiões verdes e amarelas, comparando-se os lados opostos do limbo foliar, delimitados pela nervura central. Este é o sintoma mais característico de plantas com HLB e é conhecido como “mosqueado”, tendo sido observado em todos os locais nos quais a doença foi descrita até hoje, independentemente do agente causal, do hospedeiro e da condição ambiental. Além disso, as folhas de ramos sintomáticos podem apresentar-se curvadas, de tamanho reduzido, com nervuras mais grossas e escurecidas. Em estádios mais avançados da doença podem ocorrer desfolha e morte de ponteiros. Frutos de ramos sintomáticos podem apresentar maturação incompleta, tamanho reduzido, assimetria em relação à columela central e região estilar mantendo-se verde, diferentemente de frutos de ramos sadios. Quando cortados, é possível observar sementes abortadas e vasos alaranjados, além do albedo com espessura maior que a de um fruto sadio (CAPOOR; RAO; VISWANATH, 1974; COLETTA-FILHO et al., 2005; BOVÉ, 2006; BELASQUE Jr. et al., 2009; GOTTWALD, 2010).

Com o progresso da doença nas plantas, é comum ocorrer queda de frutos, com redução de até 100 % da produção, de acordo com a proporção da copa afetada, além de redução do tamanho dos frutos, dos valores de Brix, *ratio*, porcentagem de suco e sólidos solúveis dos frutos sintomáticos remanescentes. Plantas novas podem ficar comprometidas em um ou dois anos, enquanto plantas mais velhas podem levar de três a cinco anos para que isso ocorra. No entanto, a não ser que a doença esteja em estágio muito avançado, as plantas doentes não morrem, permanecendo debilitadas e improdutivas por anos, de forma que pomares inteiros podem tornar-se economicamente inviáveis após 5 a 10 anos do

aparecimento da primeira planta sintomática, caso não sejam adotadas medidas de controle. Um dos fatores que contribuem para isso é que o período entre a infecção das plantas e o aparecimento dos sintomas pode variar de 6 a 12 meses, se acordo com as condições climáticas, concentração bacteriana e espécie ou variedade envolvida. Logo, a remoção de todas as árvores sintomáticas do pomar não significa a eliminação de todas as plantas infectadas, as quais ainda permanecem como fonte de inóculo para disseminação da doença (BOVÉ, 2006; BASSANEZI et al., 2006; GOTTWALD; DA GRAÇA; BASSANEZI, 2007).

Além disso, não se conhecem, até o momento, medidas curativas de controle do HLB. Tentativas de tratamento de plantas com aplicação de antibióticos (tetraciclina), poda de ramos sintomáticos e até mesmo de todo o dossel da planta já foram realizadas, porém, sem sucesso (BOVÉ, 2006; LOPES et al., 2007). Desta forma, o principal desafio no combate ao HLB é a falta de perspectiva de controle da doença por métodos tradicionais. Assim, o manejo recomendado é o plantio de mudas saudáveis e certificadas, eliminação de plantas doentes e, principalmente, o controle do inseto vetor (KIMATI et al., 2005; BOVÉ, 2006; GOTTWALD, 2010).

2.1.2 Aspectos taxonômicos e bioecológicos de *D. citri*

O psílídeo é um inseto sugador hemimetábolo, cujo adulto mede cerca de 3mm de comprimento, de coloração parda acinzentada, que, em repouso, permanece num ângulo de 45° em relação à superfície da planta, o que ajuda no reconhecimento da praga em campo (GOMES, 1940). Suas asas são transparentes com mosqueado castanho. A coloração de seu abdome pode variar, já sendo observada em tons de cinza/marrom, azul/verde, e laranja/amarelo, podendo estar associadas com a fecundidade ou fertilidade dos adultos (WENNINGER; HALL, 2008; WENNINGER; STELINSKI; HALL, 2009). Antes de chegar à fase adulta, as formas jovens passam por 5 ínstaras ninfais. As ninfas possuem pernas curtas, são achatadas, de coloração amarelada e secretam uma substância açucarada semelhante ao “honeydew”, de coloração esbranquiçada, enquanto aderidas ao hospedeiro. Permanecem praticamente imóveis nas plantas, movendo-se vagarosamente quando perturbadas (LIU; TSAI, 2000; GOMEZ-TORRES, 2009).

Tanto as ninfas quanto os adultos do psílídeo encontram-se, frequentemente, associados a brotações e ramos novos, utilizados tanto para alimentação, quanto

para oviposição, no caso dos adultos. Na ausência de brotações, estes insetos podem se alimentar em folhas maduras, embora não seja o substrato preferido para isso. No entanto, os ovos são depositados apenas em tecidos jovens, particularmente, nos brotos recém-emergidos, com 1 a 5 dias após a brotação. Possuem coloração amarelada e formato alongado. Logo que depositados sobre a planta, são mais claros, evoluindo para um tom alaranjado durante seu desenvolvimento e apresentando 2 pontos vermelhos quando mais maduros. Podem ser encontrados em grande número num único broto, sendo que disponibilidade de brotações nas plantas torna-se um fator limitante na oviposição (LIU; TSAI, 2000; PARRA et al., 2010). A partir daí, a duração do ciclo biológico de *D. citri* pode variar de cerca de 14 a 49 d, de acordo com a temperatura sob a qual se encontra e com o hospedeiro sobre o qual se alimenta. De modo geral, os ovos se desenvolvem num período de aproximadamente 3 a 8 dias, enquanto as ninfas levam 11 a 40 dias para concluir seu desenvolvimento em 5 estádios. Também de acordo com a temperatura e hospedeiro, pode variar a quantidade de ovos depositados pelas fêmeas sobre as brotações, que chegam a cerca de 800 ovos durante sua vida (TSAI; LIU, 2000; NAVA et al., 2007). Fêmeas e machos emergem simultaneamente, sem protandria ou protogenia, e o início da oviposição pelas fêmeas pode se iniciar em apenas um dia após o acasalamento (WENNINGER; HALL 2007).

Os únicos hospedeiros registrados para *D. citri*, pertencem aos gêneros *Citrus* e *Murraya*, ambos da família Rutaceae (HALBERT; MANJUNATH, 2004). Todas as espécies de *Citrus* spp. podem ser hospedeiras do psíldeo, contudo, não são todas *Murraya* spp. que permitem o completo desenvolvimento de *D. citri*, ocorrendo em alguns casos, somente a postura, sem que haja o desenvolvimento ninfal (SILVA et al., 1968; AUBERT, 1987; TSAI; LIU, 2000). Por outro lado, a planta murta, *Murraya paniculata* (L.) Jack é mencionada freqüentemente na literatura como hospedeiro preferencial de *D. citri*, na qual o inseto pode encontrar condições adequadas para alimentação, reprodução e desenvolvimento (AUBERT, 1987; HALBERT; MANJUNATH, 2004; NAVA et al., 2007; IKEDA; ASHIHARA, 2008). Aparentemente, as contínuas brotações de *M. paniculata* contribuem para a manutenção de altas populações de *D. citri*, especialmente quando não há brotações disponíveis nos pomares comerciais de citros (LIU; TSAI, 2000). No entanto, em estudos conduzidos por Nava et al. (2007), não foi observada diferença na duração do ciclo ovo-adulto ou na razão sexual dos insetos emergidos em criações de psíldeo estabelecidas

sobre 3 diferentes hospedeiros: *M. paniculata*, limão-cravo (*Citrus limonia* Osbeck) e tangerina Sunki [*Citrus sunki* (Hayata)]. Já a viabilidade de ninfas foi menor na criação sobre tangerina Sunki.

A murta, além de ser um hospedeiro adequado para um bom desenvolvimento de *D. citri*, também pode hospedar as bactérias causadoras do HLB, servindo, neste caso, como fonte de inóculo de *Ca. Liberibacter* spp. e aumentando as chances de disseminação da doença, uma vez que esta espécie de planta é difundida no Brasil e no mundo como planta ornamental (BELASQUE Jr. et al., 2009; DAMSTEEGT et al., 2010). Num primeiro momento, até mesmo a erradicação da murta foi sugerida como medida para auxiliar no controle da doença, porém, estudos mostraram que a murta apresenta títulos muito baixos da bactéria *Ca. Liberibacter asiaticus* e que a aquisição da bactéria pelos psíldeos nesta planta é muito baixa. Menos de 1% dos insetos criados sobre plantas de murta infectadas apresentaram a bactéria, sugerindo que a presença desta espécie vegetal em áreas urbanas é pouco representativa como fonte de inóculo (BELASQUE Jr. et al., 2009; DAMSTEEGT et al., 2010).

Em plantas de citros, psíldeos adultos são capazes de adquirir a bactéria em 30 min durante sua alimentação. Após essa aquisição, há um período de latência de 21 dias, no qual as bactérias se multiplicam e se difundem pelos tecidos do inseto, alcançando o canal salivar (ROGERS; STANSLY, 2012). Um maior período de acesso à aquisição (PAA) permite um aumento na concentração de bactérias no corpo do inseto, principalmente em ninfas de 5º ínstar, com as quais já foram observados aumentos de até 360 vezes na concentração, originando adultos altamente infectivos (INOUE et al., 2009). Logo, as ninfas são mais eficientes em adquirir as bactérias (60 a 100% de sucesso) comparadas aos adultos (até 40% de sucesso) (PELZ-STELINSKI, 2010). A aquisição de *Ca. Liberibacter asiaticus* pode ser feita por ninfas à partir do 2º ínstar, mas apenas ninfas de 4º e 5º ínstar e adultos infectivos podem transmiti-las para outras plantas. Essa transmissão pode ocorrer à partir de 15 min de alimentação dos insetos e a taxa de infecção das plantas pode chegar a 100% para períodos superiores a 1 h de alimentação (CAPOOR; RAO; VISWANATH, 1974; MEAD; FASULO, 2011).

Embora já tenham sido relatadas transmissões transovarianas (dos pais para a prole) da bactéria em *D. citri*, bem como transmissões horizontais (de machos para fêmeas, durante a cópula), estas apresentaram taxas muito baixas, de 2 a 6 e de

4%, respectivamente (PELZ-STELINSKI, 2010; MANN et al., 2011). Isso porque a bactéria pode ser encontrada em vários órgãos internos do inseto, mas com maior concentração no canal alimentar (até 80%) e glândulas salivares (47 a 70%) (AMMAR; SHATTERS Jr.; HALL, 2011). Assim, a melhor forma de impedir o aumento da população de psíldeos infectivos é prevenindo a aquisição das bactérias pelos insetos nas plantas doentes.

A rápida constatação da presença do psíldeo nos pomares de citros é fundamental para uma melhor eficiência no manejo da doença. No entanto, a dificuldade no monitoramento desta praga é grande, visto que este é realizado por meio da observação visual, por 'pragueiros', de ninfas e adultos em brotações ou por meio de armadilhas adesivas amarelas, penduradas na parte externa das plantas. Segundo Miranda et al. (2009), embora o uso de armadilhas adesivas tenha se mostrado mais eficiente do que a observação visual para detecção da praga nos pomares, essa eficiência ainda é baixa, pois consiste na atração do inseto pela cor, limitando-se ao campo visual do psíldeo. Em decorrência desta dificuldade para constatação da praga na área de cultivo, o manejo de controle de *D. citri* vem sendo realizado por meio de diversas e frequentes aplicações de inseticidas químicos, favorecendo o desenvolvimento de populações resistentes desta espécie e reduzindo as populações de inimigos naturais, o que representa uma estratégia de manejo não sustentável (HALBERT; MANJUNATH, 2004; BESALQUE Jr. et al., 2009).

Neste sentido, novos trabalhos precisam ser conduzidos para a elaboração de novas estratégias para o manejo de *D. citri* e, conseqüentemente, do HLB.

2.1.3 Voláteis de plantas e comportamento de *D. citri*

Os compostos orgânicos voláteis ('VOCs') produzidos e liberados pelas plantas tem a função principal de protegê-las do ataque de herbívoros e patógenos, atrair polinizadores e outros organismos benéficos e atuar como sinais na comunicação com outras plantas (BALDWIN, 2010). O perfil de voláteis de uma planta pode ser composto por álcoois, aldeídos, monoterpenos, sesquiterpenos e outras moléculas químicas, podendo ainda sofrer alterações nessa mistura, induzidas por influência de fatores bióticos e abióticos (TURLINGS et al., 1998; FERRY et al., 2004; ARIMURA; MATSUI; TAKABAYASHI, 2009). Embora estas

substâncias sejam comuns em várias espécies de plantas, as características quantitativas e qualitativas dos perfis de voláteis parecem ser particulares. Assim, essa mistura de voláteis pode ser específica para determinadas espécies de plantas, bem como para diferentes genótipos de uma mesma espécie, fornecendo informações utilizadas em interações tróficas complexas entre plantas e insetos (DICKE; SCHUTTE; DIJKMAN, 2000; MEINERS; HILKER, 2000; FRASER; HILDEBRAND, 2003).

Diversos trabalhos já foram realizados para investigar estas interações e já apontaram para uma influência de 'VOCs' sobre o comportamento de herbívoros, onde os compostos liberados pelas plantas foram capazes de atrair ou, até mesmo, de repelir estes insetos após sofrerem induções (DE MORAES; MESCHER; TUMLINSON, 2001; SIGNORETTI; PEÑAFLORES; BENTO, 2012). Embora a maior parte destes estudos sobre interações entre insetos e plantas investiguem os voláteis liberados após danos causados por herbivoria (PICHERSKY; GERSHENZON, 2002), sabe-se que voláteis emitidos pelas plantas infectadas por fitopatógenos têm se mostrado importantes mediadores das relações entre plantas e insetos vetores, promovendo alterações comportamentais nestes últimos. A emissão desses voláteis, em alguns casos, pode tornar as plantas infectadas mais atrativas aos vetores favorecendo assim a disseminação do patógeno (MAUCK; DE MORAES; MESCHER, 2010). Estes conhecimentos vêm promovendo um aumento no interesse por trabalhos com 'VOCs' de plantas e seu efeito sobre o comportamento dos insetos, tornando-se relevante não apenas do ponto de vista do ecossistema natural, mas também do agroecossistema, uma vez que cria novas perspectivas de utilização destas substâncias em estratégias de manejo de pragas (SCHOONHOVEN; van LOON; DICKE, 2005)

Nesse contexto, plantas cítricas são acometidas por fitopatogenias que se enquadram na interação planta-inseto-micoorganismo. Dentre outras, hoje, uma das patogenias mais severas é o HLB, que, conforme apresentado, tem sido responsável pela morte de milhares de árvores nos pomares brasileiros, provocando grandes prejuízos aos citricultores e impactos sociais e econômicos nas regiões produtoras de laranja. A restrição quanto a *D. citri* como espécie vetora das bactérias *C. Liberibacter asiaticus* e *C. Liberibacter americanus*, bem como às plantas hospedeiras destas espécies, são aspectos importantes do ponto de vista evolutivo, com enormes implicações nos mecanismos de interação destes organismos. Neste

sentido, as bactérias *Ca. Liberibacter* spp. são tidas como capazes de promover alterações bioquímicas em seus hospedeiros, promovendo um acúmulo significativo de compostos secundários nas folhas (CEVALLOS-CEVALLOS; REYES-DE-CORCUERA, 2008; MANTHEY, 2008; MANN et al., 2012; ZHAO et al., 2013; HIJAZ; EL-SHESHENY; KILLINY, 2013).

Para avançar nestes conhecimentos, a resposta comportamental de adultos de *D. citri* vem sendo investigada frente aos voláteis de diferentes espécies de plantas, fornecendo subsídios importantes para compreensão dos fatores envolvidos nestas interações. Utilizando olfatômetros 'Y', trabalhos recentes demonstraram a resposta olfativa de *D. citri* para odores de murta e de diferentes espécies de citros (WENNINGER; STELINSKI; HALL, 2009; NORONHA Jr., 2010; PATT; SÉTAMOU, 2010; MANN et al., 2012; ZHAO et al., 2013). De acordo com trabalho de Wenninger, Stelinski e Hall (2009), machos e fêmeas de psílídeos respondem diferentemente aos mesmos estímulos olfativos, e suas respostas variam para diferentes espécies de plantas hospedeiras. Neste mesmo trabalho, relatou a importância da presença de pistas visuais para aumentar a intensidade da resposta destes insetos em direção as fontes de odor e observaram que os insetos acasalados respondem melhor aos estímulos olfativos das plantas do que os insetos virgens. Estudos posteriores verificaram que 'VOCs' de plantas de citros foram mais atraentes para os psílídeos frente aos voláteis de plantas de murta (SULE et al., 2012) e que plantas de citros infectadas com *Ca. Liberibacter asiaticus* foram mais atraentes para adultos de *D. citri* que os voláteis de plantas saudáveis (NORONHA Jr., 2010; MANN et al., 2012; ZHAO et al., 2013). Estes resultados demonstram uma estreita evolução destes fitopatógenos com as plantas que o hospedam e seu vetor para seu benefício próprio.

Buscando compreender as alterações comportamentais dos psílídeos promovidas pelos odores das plantas hospedeiras, os perfis químicos destas plantas foram investigados em diferentes trabalhos a partir de técnicas diversas, tais como aeração dos 'VOCs' liberados pelas plantas, captura em polímeros adsorventes e eluição com solventes, micro extração de fase sólida (SPME) e extração das moléculas voláteis presentes no conteúdo celular das folhas, com análise destas substâncias em equipamento de cromatografia gasosa acoplado a espectrômetro de massas (GC-MS) (CEVALLOS-CEVALLOS; REYES-DE-CORCUERA, 2008; MANTHEY, 2008; PATT; SÉTAMOU, 2010; CEVALLOS-CEVALLOS et al., 2011;

MANN et al., 2012; ZHAO et al., 2013; HIJAZ; EL-SHESHENY; KILLINY, 2013). Porém, poucos trabalhos avaliaram a bioatividade de *standars* (padrões comerciais) para os psílídeos.

Patt e Sétamou (2010) observaram um incremento na captura de psílídeos em armadilhas adesivas impregnadas com uma mistura de 6 terpenos sintéticos, formulada de acordo com análise de voláteis de plantas de murta, por meio de ensaios conduzidos em gaiolas, sem chance de escolha. Mann et al. (2012) compararam o perfil químico de plantas de citros sadias e infectadas com *Ca. Liberibacter asiaticus*, evidenciando uma maior quantidade de salicilato de metila e menores quantidades de antranilato de metila e de D-limoneno nos perfis de voláteis de plantas doentes em relação ao perfil de voláteis de plantas sadias. Avaliando os produtos comerciais padrões destas moléculas em ensaios de olfatometria em 'Y', observou bioatividade do salicilato de metila e de D-limoneno para *D. citri*, com efeitos de atração ou repelência dependentes da dose testada do produto.

Neste sentido, a descoberta de 'VOCs' de citros atraentes para o psílídeo pode contribuir para o desenvolvimento de novas ferramentas ou estratégias de manejo do HLB por meio da manipulação comportamental do inseto vetor, sejam armadilhas adesivas mais atraentes e eficientes para monitoramento desta praga ou produtos do tipo 'atrai-e-mata' (GRAFTON-CARDWELL; STELINSKI; STANSLY, 2013), além de plantas geneticamente modificadas para silenciamento dos genes responsáveis pela produção e liberação destes odores.

No entanto, os perfis químicos de 'VOCs' das plantas hospedeiras obtidas nos diferentes trabalhos apresentam grandes variações. Tais divergências decorrem, principalmente, pela utilização de distintas espécies vegetais, idades e métodos de obtenção e análise dos compostos voláteis. Além disso, as observações de comportamento do psílídeo ainda são conflitantes. Neste contexto, são necessários novos estudos para busca de moléculas químicas voláteis com potencial para aplicação em técnicas de manejo de *D. citri* adaptados ao agroecossistema das principais espécies cultivadas e em condições adequadas aos citros no Brasil.

2.2 Material e métodos

2.2.1 Criação dos insetos e cultivo das plantas

Para início da criação de *Diaphorina citri* no Laboratório de Ecologia Química e Comportamento de Insetos, machos e fêmeas foram coletados em criação previamente estabelecida no Laboratório de Insetos Vetores de Fitopatógenos, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ) e transferidos para plantas de murta – *Murraya paniculata* (L.) Jack (Rutaceae) – com brotações, tanto em casa de vegetação, quanto em laboratório, mantidas com $25 \pm 2^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\%$ UR e fotofase de 14 h, seguindo a metodologia modificada de Skelley e Hoy (2004). Além dos insetos desta colônia, foram utilizados, em experimentos deste trabalho, insetos da colônia mantida em laboratório do Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus), os quais permaneceram submetidos às mesmas condições da criação supracitadas.

As plantas de murta utilizadas na manutenção das colônias de psílídeo foram adquiridas de viveiros e mantidas em casa-de-vegetação, onde receberam podas, adubação e tratamentos fitossanitários. Após um período de 7 a 15 dias, as plantas com brotações foram separadas e transferidas para gaiolas de acrílico (40 cm de largura x 40 cm de profundidade x 60 cm de altura) ou com armações de plástico (40 cm de largura x 40 cm de profundidade x 40 cm de altura), revestidas com tela antiafídica e abertura com zíper na parede anterior, confeccionada em PVC transparente, dentro das quais foram liberados os machos e fêmeas de psílídeos coletados previamente, para realização de posturas (Figura 1).

Figura 1 – Gaiolas de acrílico (esquerda) e em estrutura de PVC (direita) utilizadas para criação e manutenção de *Diaphorina citri* sobre plantas de murta, *Murraya paniculata*

Decorridos até 15 dias da liberação dos psílídeos sobre as plantas de murta nas gaiolas, aquelas com posturas foram transferidas para novas gaiolas, onde permaneceram até completo desenvolvimento ninfal dos psílídeos. Até 7 dias após a emergência dos primeiros adultos, estes foram coletados e transferidos para nova gaiola com 4 a 8 plantas de murta, em grupos de 200 a 300 insetos, machos e fêmeas (aproximadamente 1:1), até atingirem uma idade mínima de 7 e máxima de 15 dias, para uso nos experimentos. Adicionalmente, nos períodos de realização dos bioensaios, todos os adultos, coletados diariamente destas gaiolas, foram separados por sexo, com auxílio de microscópio estereoscópico utilizando aumento de 6 vezes, por meio da visualização da porção final do abdome dos psílídeos em vista ventral, distinguindo-se o aparelho reprodutor de cada sexo, como demonstrado por Aubert (1987).

Já as plantas de citros utilizadas nos experimentos foram obtidas em viveiros certificados e mantidas em casa de vegetação, onde também receberam tratamentos diários para manutenção de sua sanidade. Para este trabalho, foram selecionadas plantas de laranja [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck], variedade ‘Pêra’, enxertadas sobre limão-cravo (*C. limonia* Osbeck) – laranja ‘Pêra’/Cravo – por ser a principal variedade cítrica do Brasil (PIO et al., 2005).

As plantas de citros infectadas com *Ca. Liberibacter asiaticus* para utilização em bioensaios e extrações de voláteis foram preparadas 10 a 15 meses antes dos testes, por meio de enxertia de gema de plantas matrizes infectadas, enquanto as plantas saudáveis foram enxertadas com gemas de plantas matrizes saudáveis (Figuras 2A e 2B). Para uso nos experimentos, foram selecionados ramos em estádios vegetativos V4 a V7 (guia de fases de desenvolvimento dos citros da Stoller®) em plantas com idade de 2 anos. Plantas sintomáticas para HLB tiveram prévia confirmação visual da doença, bem como por meio de testes de PCR no Laboratório de Pesquisa e Diagnóstico do Fundecitrus (Figura 2C). Da mesma forma, estes testes foram realizados para confirmação da ausência do patógeno nas plantas saudáveis.

Figura 2 – A) Enxertia de gemas doentes ou saudáveis em plantas de citros; B) detalhe do enxertia e C) Plantas de citros sadia (esquerda) e com HLB, sintomática (direita)

2.2.2 Resposta de adultos de *D. citri* aos voláteis de plantas de citros sadias e doentes sintomáticas para HLB

Para verificar a influência dos voláteis de citros sobre o comportamento de adultos do psílídeo, os tratamentos: i) plantas de citros sadias, ii) plantas de citros doentes, sintomáticas para HLB e iii) branco (envelope plástico, utilizado como câmara para os demais tratamentos, vazio) foram contrastados 2 a 2, nas seguintes combinações:

- a) Plantas de citros sadia vs branco;
- b) Plantas de citros sadia vs plantas de citros com HLB.

As respostas comportamentais de adultos de *D. citri* foram avaliadas por meio de um olfatômetro de vidro em forma de 'Y', consistindo de um tubo ('braço') central (15 cm de comprimento e 3 cm de Ø) e dois braços laterais (15 cm de comprimento e 3 cm de Ø, com ângulo de 120° entre eles), terminando numa rolha de vidro acoplada aos mesmos, sendo esta atravessada por um tubo de vidro (6mm de Ø interno) fechado com *voil* (para criar um fluxo homogêneo de ar e evitar a fuga de insetos). Cada braço lateral do olfatômetro foi conectado à uma câmara de tratamento (envelope plástico 'Assarápido', WYDA® – 41 cm de altura x 33 cm de base – envolvendo os ramos das plantas) por meio de uma mangueira de politetrafluoretileno – PTFE (100 cm de comprimento x 6mm de Ø interno). Em cada câmara foi acondicionado um tratamento (Figuras 3 e 4).

Figura 3 – Câmaras criadas com o uso de envelopes plásticos do tipo ‘assarápido’, para acondicionamento de plantas de citros durante os ensaios comportamentais com *Diaphorina citri*, com entrada e saída de ar por meio de mangueiras de PTFE conectadas às mesmas

Figura 4 – Sistema de olfatometria em ‘Y’, utilizado para avaliação das respostas comportamentais de adultos de *Diaphorina citri* para voláteis de plantas, em laboratório

O fluxo de ar filtrado dentro do sistema foi estabelecido em 0,4 L/min, de acordo com as observações realizadas em bioensaios preliminares de resposta dos insetos. O fluxo de ar no interior do olfatômetro foi obtido por meio de um sistema de ar-comprimado, consistindo de um compressor de ar isento de óleo, um conjunto de filtros Norgren® (umidade, partículas físicas e odores – carvão ativado), um segundo filtro de carvão ativado, câmaras de umidificação e fluxômetros, previamente à sua injeção nas câmaras com os tratamentos, por meio de mangueiras de PTFE (50 cm de comprimento x 8mm de Ø interno). De cada câmara saiu uma nova mangueira, cujas extremidades foram conectadas às entradas de ar de cada braço lateral do olfatômetro.

Após a montagem do sistema e acondicionamento dos tratamentos nas câmaras, adultos de *D. citri* com 7 a 15 dias de idade, separados por sexo, foram liberados individualmente no olfatômetro, aos quais foram dados até 5 min para cruzar uma linha de início do teste ('linha de resposta' – localizada no braço central, a 5 cm da bifurcação dos braços laterais – Figura 5). Uma vez cruzada essa linha, os insetos foram observados por um período de até 5 min cada, sendo registrada uma escolha após o cruzamento de linhas pontilhadas/tracejadas localizadas a 5 cm da bifurcação, nos braços laterais ('linhas de escolha' – Figura 5). Cada indivíduo que cruzou a 'linha de escolha' representou uma repetição, sendo realizadas ao menos 46 repetições por bioensaio. A cada repetição o olfatômetro foi girado em 180° para evitar a influência do ambiente na análise das respostas. Após cada bioensaio, tanto o olfatômetro quanto as demais peças acopladas ao mesmo foram lavadas com detergente neutro, álcool, acetona e água destilada e deionizada e secos em estufa a 120 °C por 60 min. Todos os testes foram conduzidos em sala com condições controladas (25 ± 2 °C; 70 ± 10 % UR e fotofase de 14h). Os insetos utilizados foram descartados após os bioensaios.

Os dados coletados foram analisados pelo teste Qui-quadrado (χ^2) ($P \leq 0,05$), com o *software* BioEstat 5.3.

Figura 5 – Detalhe das linhas de escolha e de resposta, marcadas nos braços laterais e central, respectivamente, do olfatômetro 'Y' utilizado nos ensaios comportamentais com adultos de *Diaphorina citri*

2.2.3 Extração, análise química e comparação dos perfis de voláteis de plantas de citros sadias e doentes sintomáticas para HLB

Procedimento de extração do conteúdo químico das folhas de citros

O material vegetal utilizado nas extrações consistiu em folhas de citros em estágio V7, as quais foram misturadas em fina trituração em nitrogênio líquido com o auxílio de almofariz e pistilo, durante 30 s. Posteriormente, 50mg do material vegetal triturado, ainda congelado, foi pesado em balança analítica diretamente em microtubos de 2 mL (Axygen®/USA). Deu-se prosseguimento à etapa de extração adicionando-se 1000 µL de hexano ao material e agitando os microtubos à 2000rpm durante 5 min em mesa agitadora. Após o processo de extração com o hexano, o extrato foi centrifugado em centrífuga refrigerada à 4°C e 14000rpm, durante 5 min. Em seguida o extrato hexânico foi separado do resíduo sólido com o auxílio de uma micropipeta de volume variável com ponteiros descartáveis (Axygen®/USA),

succionando-se uma alíquota de 850µl do mesmo e transferido-a para um 'vial' de vidro com tampa de polipropileno com septo em silicone/PTFE, o qual foi armazenado à -20 °C até o momento da utilização da amostra para bioensaios e/ou análises químicas. (Figura 6). No total foram realizadas 7 repetições para cada tratamento (planta sadia e planta com HLB), onde cada repetição consistiu na amostra preparada com 2 folhas de 4 plantas de cada tratamento.

Figura 6 – Algumas etapas do procedimento de extração do conteúdo químico das folhas de citros: A) agitador de microtubos; B) centrífuga refrigerada; C) microtubo contendo o extrato do conteúdo químico em hexano e D) coleta da alíquota do extrato com o auxílio de micropipeta e ponteira descartável

Análise do conteúdo químico dos extratos de citros por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS)

Dois microlitros dos extratos de voláteis de folhas de citros foram injetados em modo 'splitless' em um cromatógrafo a gás (Varian 3800) acoplado a um espectrômetro de massas (Varian 4000 Ion Trap) (Agilent Technologies), equipado com uma coluna HP-5MS (30m x 0,25mm x 0,25µm), utilizando hélio como gás de arraste a um fluxo constante de 1 mL/min. A temperatura do injetor e da linha transferidora foram mantidas a 250 °C, e as do 'ion trap' e 'manifold' a 170 e 50 °C, respectivamente. A temperatura inicial da coluna do GC foi mantida a 40 °C por 5 min, depois ela foi aumentada para 150 °C a 5 °C/min, permanecendo nesta temperatura por 1min e, por fim, aumentada para 250 °C a 20 °C/min,

permanecendo nesta temperatura por 3 min. A amplitude de massa foi de 30 a 400 m/z e a corrente elétrica no filamento foi de 10 miliampéres.

Os compostos foram tentativamente identificados pela comparação de seus espectros de massas com aqueles computadorizados na biblioteca 'NIST 98' do *software* do equipamento e/ou pela co-injeção de *standards* (compostos padrões – 20ng/ µL). Adicionalmente, foram determinados o índice de Kovats (IK) de cada composto.

Cada composto teve sua área calculada com o auxílio do *software* do equipamento, para cada extrato, tanto nos de plantas sadias, quanto nos de plantas com HLB. Posteriormente, para análise estatística, a normalidade dos dados referentes à área dos picos dos compostos foi avaliada utilizando o teste de Shapiro-Wilk (SHAPIRO; WILK, 1965), e a homogeneidade das variâncias foi verificada com o teste de Bartlett (BARTLETT, 1937). A diferença estatística entre plantas sadias e plantas com HLB em relação à área dos picos de cada composto e do total de compostos foi verificada com o teste 't' de Student ($P \leq 0,05$). Ambas as análises foram realizadas no *software* R versão 2.15 (THE R FOUNDATION FOR STATISTICAL COMPUTING, 2012). Já a diferença entre as áreas dos picos de diferentes compostos dentro de um mesmo tratamento foi comparada pelo teste Scott-Knott, utilizando o *software* AgroEstat – Sistema para Análises Estatísticas de Ensaio Agrônomicos, versão 1.1.0.711 (BARBOSA; MALDONADO Jr., 2014).

2.2.4 Resposta de adultos de *D. citri* aos voláteis dos extratos naturais de citros e padrões sintéticos

Os bioensaios comportamentais com os extratos naturais de voláteis obtidos das plantas de citros, assim como com produtos padrões de compostos identificados nas análises químicas, foram conduzidos em sistema de olfatometria em 'Y', de maneira similar aquele utilizado para os ensaios com as plantas, citados anteriormente, sob as mesmas condições laboratoriais e método de avaliação. No entanto, ao invés de envelopes plásticos, foram utilizadas câmaras de vidro horizontais (20 cm de comprimento x 6 cm de Ø interno) (Figuras 7A e 7B). Cada braço lateral do olfatômetro foi conectado a uma câmara horizontal. No interior de cada câmara, nos testes com extratos de plantas, foi colocada uma tira de algodão, onde foram aplicados 10 µL do extrato ou solvente. Já nos testes com produtos

padrões, os tratamentos foram mantidos dentro de 'vials' de 1,5 mL, sem tampa, no interior das câmaras (Figura 7). Dentro de cada 'vial' foram adicionados 100 μ L de uma das soluções dos compostos padrões nas concentrações de 0,01; 0,1; 1 ou 10 μ g/ μ L para cada produto.

Machos e fêmeas de *D. citri* foram avaliados por meio dos tratamentos: i) extratos de plantas de citros sadias, ii) extratos de plantas de citros doentes, sintomáticas para HLB, iii) controle (10 μ L de hexano no algodão) e iv) branco (tira de algodão, sem aplicação do solvente), os quais foram contrastados 2 a 2, nas seguintes combinações:

- a) Controle (10 μ L de hexano no algodão) vs branco (algodão);
- b) Extrato de plantas de citros sadia vs controle;
- c) Extrato de plantas de citros com HLB vs controle;
- d) Extrato de plantas de citros sadia vs extrato de plantas de citros com HLB (experimento conduzido apenas com fêmeas de *D. citri*).

Figura 7 – A) câmara de vidro, utilizada para acondicionamento dos extratos naturais de voláteis de plantas de citros, ou de soluções de compostos padrões; e B) 'vial', onde as soluções foram mantidas durante a condução dos bioensaios com *Diaphorina citri*

O efeito dos produtos padrões foi avaliado somente sobre o comportamento de fêmeas de *D. citri*. Foram avaliados os seguintes compostos: i) salicilato de metila [selecionado como atraente controle (MANN et al., 2012), ii) limoneno, iii) linalool, iv) sabineno, v) salicilato de metila + linalool, vi) controle (100 µL de hexano no 'vial') e vii) branco ('vial' vazio), sendo contrastados 2 a 2, nas seguintes combinações:

- a) Controle (100 µL de hexano no 'vial') vs branco ('vial' vazio);
- b) Salicilato de metila vs controle;
- c) Limoneno vs controle;
- d) Linalool vs controle;
- e) Sabineno vs controle;
- f) Salicilato de metila + linalool (apenas na concentração de 10 µg/ µL cada produto – total de 100 µL) vs salicilato de metila (100 µL da concentração 10 µg/ µL).

Os dados coletados foram analisados pelo teste Qui-quadrado (χ^2) ($P \leq 0,05$), com o *software* BioEstat 5.3.

2.2.5 Resposta de adultos de *D. citri* a padrões sintéticos de voláteis de citros em condição de semi-campo

A preferência de adultos de psíldeo por compostos padrões de voláteis de citros foi avaliada em módulo de 6m de comprimento x 3m de largura, da casa de vegetação do Laboratório de Ecologia Química e Comportamento de Insetos da Esalq/USP. O delineamento experimental utilizado foi de blocos ao acaso com parcelas subdivididas no tempo. Um total de 10 grupos de 5 plantas de citros, com 2 anos de idade, foram distribuídos sobre 2 bancadas de metal, a 1m de altura do piso. Cada bancada configurou um bloco. Os grupos de plantas de uma mesma bancada permaneceram espaçados 1m um do outro e, ao menos, 2m em relação aos grupos de plantas da outra bancada (Figura 8). Em cada grupo de plantas foi pendurada uma armadilha adesiva amarela, com um 'vial' preso à mesma com o auxílio de um arame. Dentro de cada 'vial' foi adicionado um tratamento, num total de 5 tratamentos, sendo: i) branco ('vial' vazio); ii) controle (1 mL de hexano); iii) salicilato de metila (1 mL de solução 200 µg/ µL, em hexano); iv) linalool (1 mL de solução 200 µg/ µL, em hexano) e v) limoneno (1 mL de solução 200 µg/ µL, em

hexano). Os 'vials' permaneceram fechados com tampa revestida em PTFE, com abertura de 2mm, para liberação dos voláteis. Entre as 2 bancadas foram colocadas, no piso, 5 plantas de murta, com 50 psilídeos (machos e fêmeas - 1:1) cada (Figura 9). Os insetos permaneceram confinados às plantas por um envelope de *voil* fechado em sua base (Figura 10).

Figura 8 – Grupos de plantas de citros para o bioensaio de preferência de adultos de *Diaphorina citri* por compostos padrões de voláteis de citros, distribuídas sobre as bancadas de metal no interior da casa de vegetação (Laboratório de Ecologia Química e Comportamento de Insetos da Esalq/USP)

Figura 9 – Croqui do experimento para preferência de adultos de *Diaphorina citri* por compostos padrões de voláteis de citros, instalado em casa de vegetação (Laboratório de Ecologia Química e Comportamento de Insetos da Esalq/USP)

No início dos testes, às 8:00h (horário local), os envelopes de *voil* foram retirados, permitindo que os insetos fizessem a escolha pelos tratamentos de preferência. O número de insetos presentes em cada grupo de plantas de citros e em cada armadilha foi contado às 24 e 48h após a liberação dos mesmos. Após esse período, o ‘vial’ contendo o tratamento e a armadilha eram substituídos por novos, sendo pendurados em grupos de plantas que ocupavam diferente posição dentro do bloco. Desta forma, o experimento foi repetido em dias distintos, totalizando 5 repetições no tempo, permitindo que todos os tratamentos ocupassem todas as posições dentro de um mesmo bloco.

Figura 10 – Plantas de murta, *Murraya paniculata* utilizadas para liberação dos psíldeos, *Diaphorina citri*, confinados às mesmas pelo envelope de voil

Os dados de número de insetos sobre o grupo de plantas, assim como o de número de insetos capturados nas armadilhas, foram transformados em $\log(x)+5$ e submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste Tukey ($P < 0,05$), utilizando o software AgroEstat – Sistema para Análises Estatísticas de Ensaio Agrônomicos, versão 1.1.0.711 (BARBOSA; MALDONADO Jr., 2014).

2.2.6 Avaliação da captura de adultos de *D. citri* por armadilhas adesivas contendo padrões sintéticos de voláteis de citros em condição de campo

Os compostos padrões de voláteis testados em laboratório e/ou semi-campo (casa de vegetação), foram adicionados às armadilhas adesivas (30 cm de altura x 10 cm de largura, com cola dos 2 lados) para avaliação da captura de psíldeos adultos em condições de campo. Para tanto, septos de borracha de 8mm de Ø externo (Sigma-Aldrich®) foram impregnados com soluções de compostos padrões isolados ou em mistura, onde, em cada septo, foi aplicado um dos seguintes tratamentos: i) branco (septo não recebeu aplicação de solução); ii) controle (250 µL de hexano); iii) limoneno (250 µL de uma solução 200 µg/ µL, em hexano); iv) salicilato de metila (250 µL de uma solução 200 µg/ µL, em hexano); v) linalool (250

μL de uma solução $200\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$, em hexano); vi) limoneno + salicilato de metila ($250\text{ }\mu\text{L}$ de uma solução $200\text{ }\mu\text{g}$ de cada composto/ μL , em hexano); vii) limoneno + linalool ($250\text{ }\mu\text{L}$ de uma solução $200\text{ }\mu\text{g}$ de cada composto/ μL , em hexano); viii) salicilato de metila + linalool ($250\text{ }\mu\text{L}$ de uma solução $200\text{ }\mu\text{g}$ de cada composto/ μL , em hexano); ix) limoneno + salicilato de metila + linalool ($250\text{ }\mu\text{L}$ de uma solução $200\text{ }\mu\text{g}$ de cada composto/ μL , em hexano) e x) sabineno ($250\text{ }\mu\text{L}$ de uma solução $200\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$, em hexano).

Após a aplicação das soluções nos septos, estes foram mantidos em temperatura ambiente até a total absorção/secagem das mesmas e, então, cada septo foi fixado à uma armadilha por meio de encaixe em furo central, aberto com auxílio de um vazador de metal (6mm de $\varnothing$). Ao redor do septo, na armadilha, foram abertos 8 furos, com a mesma medida, para passagem do ar e dispersão dos voláteis (Figura 11A). As armadilhas com os septos impregnados foram penduradas no terço superior de plantas de citros da variedade 'Pêra', enxertadas sobre 'Cravo', de 10 anos de idade, em pomar de cultivo orgânico, localizado no município de Itirapina-SP (Figura 11B).

Figura 11 – A) armadilha adesiva com septo de borracha fixado e orifícios para passagem do ar pela mesma visando a captura de *Diaphorina citri*; B) armadilha pendurada no terço superior de planta de citros

O experimento foi instalado em blocos inteiramente casualizados, onde cada armadilha representou uma repetição do tratamento, sendo utilizado um total de 10 armadilhas para cada tratamento. Os diferentes tratamentos foram espaçados 30m um do outro numa mesma linha de cultivo e, ao menos, 35m em relação aos tratamentos de outro bloco, num total de 10 blocos (Figura 12).

Figura 12 – Croqui da área experimental de citros onde foram instaladas as armadilhas adesivas para avaliação da captura de *Diaphorina citri* (Itirapina-SP, Imagem aérea: Google Earth)

Após 7 dias da instalação das armadilhas no campo, estas foram coletadas e os psíldeos capturados foram identificados com o auxílio de microscópio estereoscópico (aumento de 6 vezes). Adicionalmente, foi feita a separação destes insetos por sexo, para que machos e fêmeas fossem contados em conjunto e separadamente. Os dados de número de insetos capturados nas armadilhas, foram transformados em $\log(x)+5$ e submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste Tukey ($P < 0,05$), utilizando o *software* AgroEstat – Sistema para Análises Estatísticas de Ensaio Agrônomicos, versão 1.1.0.711 (BARBOSA; MALDONADO Jr., 2014).

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Resposta de adultos de *D. citri* aos voláteis de plantas de citros sadias e doentes sintomáticas para HLB

Fêmeas de *D. citri* foram atraídas pelos voláteis de plantas sadias e de plantas com HLB em comparação a plantas sadias (Figura 13). Os machos, por sua vez, não apresentaram a mesma resposta (Figura 13).

Estes resultados reforçam a importância dos 'VOCs' na busca hospedeira por *D. citri*. Os voláteis de plantas afetam diretamente a fisiologia e o comportamento de

insetos herbívoros. Estes voláteis são detectados a grandes distâncias pelas sensilas das antenas dos insetos, e podem ser utilizados em conjunto com as informações de contato ou visual para a seleção de uma planta hospedeira potencial (VISSER; 1986; HEINZ, 2008).

Figura 13 – Resposta de adultos de *Diaphorina citri* aos voláteis de plantas de citros sadias e plantas de citros sintomáticas para HLB, em um olfatômetro do tipo 'Y'. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; e n.s. (não significativo), pelo teste de χ^2

A observação de que as fêmeas adultas de *D. citri* são atraídas pelos voláteis de plantas sadias de *C. sinensis* 'Pêra' enxertadas sobre 'limão cravo', enquanto que os machos são olfativamente indiferentes a estes voláteis corroboram com Noronha Jr. (2010). Este autor observou que apenas as fêmeas de *D. citri* foram atraídas pelos voláteis de plantas sadias de *C. sinensis* 'Pêra' enxertada sobre 'limão cravo'. Em contraste, Sule et al. (2012) observaram que os machos do psílideo também foram atraídos pelos voláteis de plantas sadias de citros. Porém, estes autores testaram machos e fêmeas juntos, o que impossibilitou a distinção das respostas entre os sexos. Além disso, eles utilizaram *Citrus suhuiensis*. Segundo Wenninger, Stelinski e Hall (2009) machos de *D. citri* são responsivos aos voláteis desta planta.

Por outro lado, foi observado que os machos de *D. citri* foram indiferentes aos voláteis de plantas com HLB ou sadias (Figura 13). Embora tenha utilizado a mesma espécie de citros do presente trabalho, Noronha Jr. (2010) observou que os machos de *D. citri* preferiram voláteis das plantas doentes comparados aos das plantas sadias. Entretanto, este autor não observou a atração dos machos para os voláteis das plantas doentes em contraste com o ar limpo, sugerindo que os voláteis das plantas doentes não são atrativos para machos do psíldeo, o que condiz com o presente trabalho. Estes resultados diferem de Mann et al. (2012) e Zhao et al. (2013). Contudo, Mann et al. (2012) utilizaram pés francos de *C. sinensis* (plantas obtidas diretamente de sementes, sem porta-enxerto), com 14 a 16 semanas de idade, enquanto que Zhao et al. (2013) utilizaram *C. reticulata* em seus estudos. Já no presente trabalho, foram utilizadas plantas de *C. reticulata* com 2 anos de idade enxertadas sobre 'limão-cravo'. Portanto, parece que a associação copa e porta-enxerto, assim como a idade da planta podem alterar a fisiologia dos citros e, consequentemente, o desenvolvimento de *Ca. Liberibacter asiaticus* e a resposta de fêmeas e machos de *D. citri* (FOLIMONOVA et al., 2009; ALBRECHT; BOWMAN, 2012).

Tomados juntos, estes resultados sugerem a necessidade de comparar os perfis químicos de plantas de citros sadias e infectadas com *Ca. Liberibacter asiaticus* para compreensão das alterações bioquímicas envolvidas, visando a busca por semioquímicos alvos para aplicação no manejo integrado de *D. citri*.

2.3.2 Análise química e comparação dos perfis de voláteis de plantas de citros sadias e doentes sintomáticas para HLB

Foram encontrados 47 compostos voláteis nos extratos de plantas de citros sadias e plantas de citros com HLB (Tabela 1). As médias das áreas totais dos compostos encontrados foram semelhantes nestes dois tratamentos (teste 't' de Student, $P > 5\%$). Por outro lado, 11 deles estavam em maior quantidade nos extratos de plantas de citros com HLB em comparação com plantas sadias, ou seja: i) hexanal ($P = 0,017$); ii) α -tujeno ($P = 0,005$); iii) α -pineno ($P = 0,003$); iv) sabineno ($P = 0,029$); v) β -mirceno ($p = 0,025$); vi) α -terpineno ($P = 0,007$); vii) limoneno ($P = 0,019$); viii) linalol ($P = 0,05$) ix) composto 37 (não identificado; $P = 0,019$); x) β -elemeno ($P = 0,015$) e xi) β -copaeno ($P = 0,003$) (Tabela 1 e Figura 14).

Sabineno, linalol e β -elemeno foram encontrados significativamente em maiores quantidades tanto nos extratos de plantas sadias, quanto nos extratos de plantas com HLB (Scott-Knott; $P \leq 0,05$), (Figuras 15 e 16).

Tabela 1 – Lista dos compostos químicos encontrados nos extratos de voláteis de plantas de citros sadias e plantas de citros sintomáticas para HLB

Nº	Nome do composto	RT (min)	KI	Área			Teste-t		
				HLB	% ^b	Sadia	% ^b	P	Significância
1	Metilbenzeno	5,70	785	432316	0,49	362382	0,54	0,100	ns
2	Z-pentenol	5,93	789	78226	0,09	99118	0,15	0,532	ns
3	Acetato de Isobutila	6,03	791	35192	0,04	28070	0,04	0,256	ns
4	3-Hexanona	6,33	797	17126	0,02	11115	0,02	0,325	ns
5	2-Hexanona	6,48	800	20383	0,02	13847	0,02	0,550	ns
6	Z-3-Hexenal	6,70	807	2280120	2,58	3551836	5,30	0,260	ns
7	Hexanal ^a	6,74	808	2087857	2,37	1133713	1,69	0,017	*
8	Não identificado	8,37	857	395104	0,45	493788	0,74	0,469	ns
9	E-2-Hexenal	8,60	863	1550109	1,76	2673675	3,99	0,971	ns
10	(E,E)-2,4 Hexadienal	10,64	915	113432	0,13	120152	0,18	0,833	ns
11	α-Tujeno	11,21	932	233364	0,26	127753	0,19	0,005	**
12	α-Pineno ^a	11,41	938	886089	1,00	455286	0,68	0,003	**
13	Não identificado	12,44	966	322540	0,37	319233	0,48	0,713	ns
14	Sabineno ^a	12,84	977	21302857	24,14	13762571	20,54	0,029	*
15	β-Pineno ^a	12,91	978	258975	0,29	641386	0,96	0,077	ns
16	β-Mirceno ^a	13,49	993	1816143	2,06	1148938	1,71	0,025	*
17	3-δ-Careno	14,09	1010	3469286	3,93	2705585	4,04	0,331	ns
18	α-Terpineno	14,32	1017	257163	0,29	165745	0,25	0,007	**
19	Limoneno ^a	14,72	1030	2256857	2,56	1292407	1,93	0,019	*
20	Z-β-Ocimenos ^a	15,08	1042	140525	0,16	100398	0,15	0,144	ns
21	E-β-Ocimenos ^a	15,41	1052	4626000	5,24	3209780	4,79	0,075	ns
22	γ-Terpineno ^a	15,76	1062	307785	0,35	192196	0,29	0,118	ns
23	cis-Hidrato de sabineno	16,02	1070	1106059	1,25	924528	1,38	0,114	ns
24	Terpinoleno	16,71	1089	894285	1,01	725371	1,08	0,400	ns
25	Linalol ^a	17,09	1100	14097143	15,97	7662348	11,44	0,050	*
26	Isopulegol	18,52	1148	79796	0,09	85373	0,13	0,898	ns
27	Citronelal	18,76	1156	1019663	1,16	1256304	1,88	0,618	ns
28	Z-Isocitral	19,11	1167	1019663	1,16	1019663	1,52	0,148	ns
29	E-Isocitral	19,66	1185	158025	0,18	149682	0,22	0,214	ns
30	α-Terpineol	19,90	1192	732103	0,83	940445	1,40	0,174	ns
31	Citronelol	20,99	1230	99565	0,11	163678	0,24	0,164	ns
32	Z-Citral ^a	21,37	1244	1616942	1,83	1548420	2,31	0,256	ns
33	E-Citral ^a	22,20	1273	1886496	2,14	1757503	2,62	0,268	ns
34	δ-Elemeno	24,07	1342	108172	0,12	77276	0,12	0,065	ns
35	α-Copaeno ^a	25,11	1381	54520	0,06	60596	0,09	0,641	ns
36	Não identificado	25,24	1385	25149	0,03	65699	0,10	0,524	ns
37	Não identificado	25,34	1389	975876	1,11	679755	1,01	0,019	*
38	β-Elemeno	25,55	1396	12805714	14,51	8882714	13,26	0,015	*
39	Sesquitujeno	25,85	1408	84270	0,10	100490	0,15	0,456	ns
40	E-β-Cariofileno ^a	26,28	1425	2456429	2,78	2081674	3,11	0,246	ns
41	β-Copaeno	26,51	1434	189249	0,21	104977	0,16	0,003	**
42	E-β-Farneseno ^a	27,13	1459	2516286	2,85	2213214	3,30	0,397	ns
43	(E,E)-α-Farneseno ^a	28,44	1513	391552	0,44	483362	0,72	0,233	ns
44	δ-Cadineno	28,80	1535	369041	0,42	393138	0,59	0,739	ns
45	Elemol	29,26	1562	198093	0,22	170386	0,25	0,350	ns
46	β-Sinensal	31,04	1704	2018429	2,29	2182978	3,26	0,700	ns
47	α-Sinensal	31,53	1763	466942	0,53	658036	0,98	0,121	ns
Total				88256912	100	66996585	100	0,098	ns

^a Identificação feita pela co-injeção de composto sintético padrão^b % em relação a área total dos compostos do tratamentoTR = Tempo de retenção; KI = Índice de Kovats; Teste-*t* de Student (**P* ≤ 0,05; ** *P* ≤ 0,01)

Figura 14 – Áreas médias dos compostos químicos que foram encontrados em maiores quantidades nos extratos de voláteis de plantas de citros sadias e plantas de citros sintomáticas para HLB. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; e n.s. (nãõ significativo), pelo teste 't' de Student

Figura 15 – Compostos químicos encontrados nos extratos de voláteis de plantas de citros sadias. Barras com letras iguais possuem áreas médias de compostos semelhantes entre si (teste de Scott-Knott, $P \leq 0,05$)

Figura 16 – Compostos químicos encontrados nos extratos de voláteis de plantas de citros sintomáticas para HLB. Barras com letras iguais possuem áreas médias de compostos semelhantes entre si (teste de Scott-Knott, $P \leq 0,05$)

Dos 47 compostos encontrados nas análises químicas, hexanal, α -tujeno, α -pineno, sabineno, β -mirceno, α -terpineno, limoneno, linalol, um composto não identificado (composto 37), β -elemeno e β -copaeno podem estar envolvidos na alteração comportamental de adultos de *D. citri*, uma vez que encontraram-se em maior quantidade nos extratos de plantas doentes em relação aos de plantas sadias (Tabela 1 e Figura 14). Embora distintos perfis de voláteis de plantas de citros sadias e infectadas com *Ca. Liberibacter asiaticus* já tenham sido observados em trabalhos prévios (CEVALLOS-CEVALLOS et al., 2011; MANN et al., 2012; ZHAO et al., 2013; HIJAZ; EL-SHESHENY; KILLINY, 2013), os resultados do presente trabalho a primeira evidência experimental de alterações químicas ocorridas em plantas de *C. sinensis* 'Pêra' enxertada sobre 'limão cravo', que é a principal variedade cítrica dos pomares brasileiros (PIO et al., 2005).

Cevallos-Cevallos et al. (2011), ao estudarem folhas de plantas de citros da variedade 'Valência' infectadas com HLB e com sintomas de deficiência de Zinco, observaram moléculas de ácido oxo-butanodióico, arabitól e neo-inositol e, ainda, níveis de isocarífileno, α -salineno, β -salineno e frutose significativamente maiores em folhas de plantas sadias. Porém, estes autores sugeriram que mais estudos deveriam ser realizados com diferentes cultivares, estresses bióticos e abióticos e estações do ano para confirmar a correlação destes compostos com a infecção pela bactéria. Por outro lado, Mann et al. (2012) verificaram um aumento significativo de salicilato de metila, e a diminuição da concentração de antranilato de metila e D-limoneno em folhas de *C. sinensis* infectadas com *Ca. Liberibacter asiaticus*, sugerindo que tais alterações possam aumentar a atração do inseto vetor *D. citri* a planta hospedeira. Zhao et al. (2013) encontraram 9 compostos em ambas plantas de citros sadias e infectadas, mas apenas nas plantas doentes detectaram (+)-epi-biciclosesquifelandreno. Já Hijaz, El-Shesheny e Killiny (2013) verificaram níveis de D-limoneno, β -felandreno, citronelal e undecanal 4 a 20 vezes maiores em plantas infectadas com *Ca. Liberibacter asiaticus* em comparação a plantas sadias.

A proporção dos voláteis dentro de um mesmo tratamento analisada no presente trabalho sugere que as moléculas sabineno, linalol e β -elemeno podem estar envolvidos no processo de busca hospedeira de *D. citri*, visto que eles foram dominantes tanto nos extratos de plantas doentes, quanto nos extratos de plantas sadias (Figuras 15 e 16). Similarmente, Zhao et al. (2013) verificaram que β -elemeno e β -felandreno foram os principais voláteis de plantas de citros sadias e doentes.

Paralelamente, linalol, (E)- β -ocimeno, acetato de linalil e β -cariofileno foram quantitativamente dominantes no perfil de voláteis encontrados em toranja var. 'Rio Red', limão 'Meyer' [Citrus x limon (L.) Burm.f.] e *M. paniculata*, sugerindo que eles são os responsáveis pela atração dos psílídeos para a planta (Patt e Sétamou, 2010). A variação dos perfis de voláteis apresentados pelos diferentes trabalhos pode ser devido ao uso de diferentes materiais e métodos utilizados na obtenção dos extratos.

2.3.3 Resposta de adultos de *D. citri* aos voláteis dos extratos naturais de citros e padrões sintéticos

As respostas olfativas de machos e fêmeas de *D. citri* aos voláteis de extratos naturais de plantas de citros sadias e com HLB estão ilustradas na figura 17. As fêmeas desta espécie preferiram os voláteis dos extratos de plantas sadias em comparação ao controle (hexano), assim como os voláteis dos extratos de plantas com HLB em comparação tanto com o controle como as plantas sadias. Os machos, por outro lado, não exibiram uma resposta olfativa distinta a nenhum dos tratamentos em todos os contrastes.

Figura 17 – Resposta de machos e fêmeas de *Diaphorina citri* aos voláteis de extratos de plantas de citros sadias ou com HLB, em um olfatômetro do tipo ‘Y’. Branco = ar limpo. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; e n.s. (não significativo), pelo teste de χ^2

Os resultados dos bioensaios sobre a resposta de fêmeas de *D. citri* aos extratos naturais dos voláteis de plantas de citros sadias e com HLB estão na figura 18.

As fêmeas do psílídeo preferiram somente salicilato de metila (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e linalol (0,01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) em comparação ao controle (hexano). Adicionalmente, elas foram atraídas pela mistura salicilato de metila + linalol (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 1:1) em comparação com salicilato de metila sozinho (Figura 18). Por outro lado, elas preferiram os voláteis do tratamento controle em comparação ao limoneno (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$).

Figura 18 – Resposta de fêmeas de *Diaphorina citri* a compostos padrões sintéticos de voláteis de citros sob diferentes concentrações, em um olfatômetro do tipo 'Y'. MeSA = salicilato de metila. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; e n.s. (não significativo) pelo teste de χ^2

As respostas dos adultos de *D. citri* aos extratos naturais de voláteis de plantas de citros sadias e com HLB corroboraram com àquelas observadas usando plantas vivas, para os quais apenas as fêmeas foram atraídas, principalmente as infectadas por HLB (Figura 13). Isto indica que os compostos responsáveis pela atração dos psílídeos foram efetivamente extraídos das folhas com a técnica empregada. Estes resultados poderão direcionar a busca de compostos de interesse, especialmente os majoritários e os que apresentaram diferenças significativas de concentração entre tratamentos testados.

Embora nem todos os compostos de interesse tenham sido testados neste trabalho, devido a indisponibilidade comercial e/ou prazo de entrega dos padrões sintéticos, salicilato de metila, limoneno e linalol sintéticos foram atrativos nos bioensaios olfatométricos (Figura 18). As respostas dos insetos a estes compostos foram distintas e dependentes das concentrações dos produtos. Este padrão também foi observado por Mann et al. (2012), embora os autores tenham utilizado diferentes doses ao invés de soluções com diferentes concentrações de compostos. Enquanto os resultados do presente trabalho apontem um efeito não atrativo do limoneno a 10 µg/µL, Mann et al. (2012) observaram um efeito atraente deste composto a 100 µg. Já salicilato de metila foi atraente para fêmeas do psílídeo tanto no presente trabalho quanto no trabalho de Mann et al. (2012). Contudo, estes autores observaram um efeito deste composto a 100 µg/µL. No entanto, o olfatômetro 'Y' não é indicado para estudos envolvendo compostos supostamente repelentes. Portanto, para confirmação de uma possível repelência de altas doses de limoneno e salicilato de metila, é necessária a condução de ensaios com estes compostos em olfatômetro de 4-vias (VET; HEYMANS; MEELIS, 1983).

Patt e Sétamou (2010) em experimentos com gaiolas sem chance de escolha verificaram a atratividade de uma mistura de seis compostos sintéticos (β -ocimeno, β -cariofileno, linalol, α -cubebeno, D-limoneno e mirceno, 5:3:1:1:1:1), cuja composição baseou-se no perfil de 'VOCs' encontrados em *M. Paniculata*. Porém observaram que apenas 21% do total de insetos foram capturados pela armadilha impregnada com estes compostos, sendo 14% com armadilha controle. Portanto, é necessário conhecer o papel de cada composto para que se busque a melhor mistura para captura de *D. citri*.

No presente trabalho demonstrou-se pela primeira vez que o linalol em combinação com outros compostos pode ser atrativo para fêmeas de *D. citri* (Figura

18). Embora este composto linalol não tenha sido atrativo isoladamente a 10 µg/ µL, ele foi atrativo em mistura com salicilato de metila na mesma concentração (Figura 18).

Estes resultados são suportados por Wenninger, Stelinski e Hall (2009), que observaram que antenas de *D. citri* responderam com maior intensidade para misturas de compostos do que para compostos testados individualmente. Além disso, sabe-se que a composição, proporção e concentração dos voláteis no perfil podem fornecer diferentes pistas para os insetos em sua busca por hospedeiros (BENGTSSON et al., 2006). Desta forma, é provável que mais de um composto esteja envolvido na alteração comportamental de fêmeas de *D. citri* frente aos voláteis de plantas de citros infectadas com a bactéria causadora do HLB.

2.3.4 Respostas de adultos de *D. citri* a padrões sintéticos de voláteis de citros em condição de semi-campo

Não houve diferença entre os tratamentos no número de psílídeos capturados nas armadilhas após 24 e 48 h da liberação dos insetos na casa de vegetação (Figuras 19 e 20).

Por outro lado, o número de insetos encontrados sobre as plantas foi maior no tratamento com linalol em comparação ao branco ('vial' vazio) e ao controle (vial com hexano) 24 h após a liberação dos insetos ($P \leq 0,05$) (Figura 21). Além disso, apesar de não ter havido diferença, plantas com o referido tratamento atraíram mais insetos do que salicilato de metila e limoneno no mesmo período (Figura 21).

Já, o número de insetos sobre as plantas foi igual entre o controle, salicilato de metila, linalol e limoneno 48 h após o início do experimento. Diferença no número de insetos sobre as plantas foi observada somente quando salicilato de metila, linalol e limoneno foram comparados com o branco (Figura 22).

Figura 19 – Número de machos e fêmeas de *Diaphorina citri* capturados em armadilhas adesivas amarelas com padrões sintéticos sobre plantas de citros (laranja 'Pêra' / 'Cravo' com 2 anos de idade) em uma casa de vegetação após 24 h da liberação dos insetos. Branco = vial vazio; MeSA = salicilato de metila. Concentração dos atraentes = 200 µg de composto/ µL de hexano. Números seguidos de mesma letra nas barras não diferem estatisticamente entre si (Tukey, $P \leq 0,05$)

Figura 20 – Número de machos e fêmeas de *Diaphorina citri* capturados em armadilhas adesivas amarelas com padrões sintéticos sobre plantas de citros (laranja 'Pêra' / 'Cravo' com 2 anos de idade) em uma casa de vegetação após 48 h da liberação dos insetos. Branco = vial vazio; MeSA = salicilato de metila. Concentração dos atraentes = 200 µg de composto/ µL de hexano. Números seguidos de mesma letra nas barras não diferem estatisticamente entre si (Tukey, $P \leq 0,05$)

Figura 21 – Número de adultos de *Diaphorina citri* encontrados sobre plantas de citros (laranja 'Pêra' / 'Cravo' com 2 anos de idade) contendo armadilhas adesivas amarelas com padrões sintéticos sob casa de vegetação após 24 h da liberação dos insetos. Branco = vial vazio; MeSA = salicilato de metila. Concentração dos atraentes = 200 µg de composto/ µL de hexano. Números seguidos de mesma letra nas barras não diferem estatisticamente entre si (Tukey, $P \leq 0,05$)

Figura 22 – Número de adultos de *Diaphorina citri* encontrados sobre plantas de citros (laranja 'Pêra' / 'Cravo' com 2 anos de idade) contendo armadilhas adesivas amarelas com padrões sintéticos sob casa de vegetação após 48 h da liberação dos insetos. Branco = vial vazio; MeSA = salicilato de metila. Concentração dos atraentes = 200 µg de composto/ µL de hexano. Números seguidos de mesma letra nas barras não diferem estatisticamente entre si (Tukey, $P \leq 0,05$)

Sabe-se que as pistas visuais aumentam a intensidade da resposta dos adultos de *D. citri* aos estímulos olfativos de voláteis de plantas (WENNINGER; STELINSKI; HALL, 2009) e que o amarelo é a cor mais eficiente para captura de psílídeos em estratégias de monitoramento desta praga por meio de armadilhas adesivas, assemelhando-se à coloração das brotações. No entanto, no presente trabalho, a associação dos compostos voláteis às armadilhas adesivas não exerceu influência sobre a captura de *D. citri* (Figuras 19 e 20). Conforme mencionado anteriormente, Patt e Sétamou (2010) também observaram baixa captura de psílídeos pelas armadilhas adesivas, mesmo quando impregnadas com uma mistura de 'VOCs'. Segundo estes autores, a localização das armadilhas à 8 cm abaixo do topo das gaiolas onde o ensaio foi conduzido, mesmo com insetos confinados e sem chance de escolha, pode ter sido uma das razões da baixa captura, visto que os psílídeos são fototrópicos positivos e, alcançando o ponto alto da gaiola, não voariam para baixo a fim de localizar a fonte de odor. Nos ensaios do presente trabalho, as armadilhas foram fixadas no terço superior das plantas de citros. Logo, após os insetos alcançarem o topo das plantas ou o teto da estufa, não se espera que eles voem em sentido contrário, seguindo para baixo, para buscar as fontes de odor localizadas junto às armadilhas.

Por outro lado, os resultados obtidos no presente trabalho, ao avaliar a associação de soluções de compostos padrões de voláteis a grupos de plantas de citros sadias, permitiram demonstrar, pela primeira vez, que o aumento do nível de linalol no perfil de voláteis de plantas de citros foi capaz de promover um aumento na atratividade deste hospedeiro para os psílídeos (Figura 21), representando uma pista olfativa que permite aos insetos discriminarem entre diferentes plantas durante sua busca por um hospedeiro, assim como entre plantas sadias e doentes com HLB.

A seleção hospedeira de *D. citri* por plantas com HLB parece ser influenciada, num primeiro momento, pelas pistas olfativas (MANN et al., 2012), o que corrobora os resultados obtidos no presente trabalho, onde a maior presença de psílídeos foi observada nas plantas com dispersor de linalol após 24 h da liberação destes insetos, sugerindo um papel importante deste composto na seleção inicial das plantas hospedeiras (Figura 21). Mann et al. (2012) demonstraram que, após determinado período se alimentando sobre as plantas doentes, inicialmente preferidas pelos psílídeos com base em seu odor, estes insetos migraram para plantas vizinhas sadias, possivelmente devido a qualidade nutricional inferior das

plantas doentes. As observações destes autores foram corroboradas por Zhao et al. (2013), que encontraram alterações nas concentrações de carboidratos solúveis nas plantas doentes. Porém, no presente trabalho, somente foram utilizadas plantas sadias nos ensaios em estufa. Desta forma, é possível que mecanismos de defesa desencadeados pela infestação das plantas tenham alterado a preferência dos psílídeos num segundo momento, no decorrer do período total de avaliação dos ensaios (Figura 22). Além disso, machos e fêmeas foram utilizadas no experimento. Assim a presença dos insetos nas plantas pode ter sido influenciada pela busca de parceiros sexuais (NORONHA Jr., 2010).

Estas evidências criam perspectivas promissoras para trabalhos direcionados à manipulação genética de plantas de citros. O silenciamento de genes responsáveis pela produção/liberação de linalol pode reduzir a atratividade das plantas para o vetor *D. citri*. Da mesma forma, pode dificultar a localização de plantas infectadas com *Ca. Liberibacter asiaticus*, reduzindo a dispersão da doença no pomar.

2.3.5 Avaliações da captura de adultos de *D. citri* com armadilhas adesivas contendo padrões sintéticos de voláteis de citros em condição de campo

Embora armadilhas adesivas contendo septos tratados com produtos padrões tenham apresentado médias de captura de psílídeos superior em até mais de 2 vezes a média apresentada pelas armadilhas controle e/ou branco, não houve diferença estatística entre o número médio de adultos de *D. citri* capturados por armadilhas, tanto no total de adultos, quanto na avaliação separada de machos e fêmeas (Tukey, $P \leq 0,05$) (Figuras 23 a 25).

Figura 23 – Número de machos e fêmeas de *Diaphorina citri* capturadas com armadilhas adesivas amarelas contendo septos de borracha impregnados com 250 μL de padrões sintéticos de voláteis de citros (200 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) em um pomar de citros (10 anos de idade; laranja 'Pêra' / 'Cravo'; Itirapina-SP) após 7 d após da instalação do experimento. MeSA = salicilato de metila. Números seguidos de mesma letra nas barras não diferem estatisticamente entre si (Tukey, $P \leq 0,05$)

Figura 24 – Número de machos de *Diaphorina citri* capturados com armadilhas adesivas amarelas contendo septos de borracha impregnados com 250 µL de padrões sintéticos de voláteis de citros (200 µg/ µL) em um pomar de citros (10 anos de idade; laranja ‘Pêra’ / ‘Cravo’; Itirapina-SP) após 7 d após da instalação do experimento. MeSA = salicilato de metila. Números seguidos de mesma letra nas barras não diferem estatisticamente entre si (Tukey, $P \leq 0,05$)

Figura 25 – Número de fêmeas de *Diaphorina citri* capturadas com armadilhas adesivas amarelas contendo septos de borracha impregnados com 250 μ L de padrões sintéticos de voláteis de citros (200 μ g/ μ L) em um pomar de citros (10 anos de idade; laranja ‘Pêra’ / ‘Cravo’; Itirapina-SP) após 7 d após da instalação do experimento. MeSA = salicilato de metila. Números seguidos de mesma letra nas barras não diferem estatisticamente entre si (Tukey, $P \leq 0,05$)

A quantidade de adultos de *D. citri* capturados nas armadilhas foi baixa, além de ter sido nula em grande parte delas, o que dificultou a comparação dos diferentes tratamentos (Figuras 23 a 25). Esta dificuldade é comum a outros trabalhos que buscaram avaliar modelos, pistas visuais e/ou associação de voláteis de plantas às armadilhas para captura de *D. citri* em campo (HALL; HENTZ; CIOMPERLIK, 2007; SÉTAMOU et al., 2012; GODFRAY et al., 2013). No entanto, foi possível observar que o maior número de psíldeos foi capturado pelas armadilhas adesivas amarelas

com salicilato de metila (Figura 23). Embora não tenha sido o tratamento que mais capturou fêmeas, este foi o tratamento que capturou maior número de machos desta espécie (Figuras 24 e 25). Os machos também pareceram ter sido influenciados pelo hexano (controle) (Figura 24). Paralelamente, no ensaio de campo deste trabalho, as fêmeas do psíldeo foram capturadas em maior número pelas armadilhas com limoneno, sem sofrer influência aparente do hexano (Figura 25).

Vale lembrar que, nas análises químicas do presente trabalho, não foram detectadas moléculas de salicilato de metila nos extratos naturais de plantas infectadas (Tabela 1). Da mesma forma, os machos de *D. citri* não responderam aos voláteis das plantas de citros com HLB ou ao seu extrato natural (Figuras 13 e 17). Já no trabalho de Mann et al. (2012), as plantas de citros com HLB que foram preferidas por machos do psíldeo nos ensaios em olfatômetro, também tiveram a constatação de salicilato de metila em seu perfil químico. Segundo os mesmos autores, esta substância também foi detectada em plantas similares infestadas por coespecíficos. Deste modo, é provável que esta molécula tenha peculiar importância para a atração de machos de *D. citri*, devendo ser investigada sob o ponto de vista de comunicação sexual desta praga.

As misturas de compostos comerciais, surpreendentemente, pareceram ser menos eficientes na atração dos psíldeos do que os compostos individualmente nas armadilhas. Porém, sabendo-se que a composição, proporção e concentração dos voláteis num perfil podem ser discriminadas pelos insetos na busca por hospedeiros (BENGTSSON et al., 2006), e que os diferentes fatores bióticos e abióticos encontrados em campo podem afetar o comportamento dos insetos (ARIMURA; MATSUI; TAKABAYASHI, 2009), é necessário, ainda, testar novas soluções de compostos voláteis, tanto em condições de laboratório, quanto em condições de semi-campo e campo. Adicionalmente, deve-se investigar a associação destes compostos e misturas às pistas visuais, tais como sinais luminosos, os quais podem incrementar consideravelmente a captura de psíldeos em armadilhas adesivas (SÉTAMOU et al., 2012).

Pela disponibilidade de moléculas comerciais acessíveis durante o período de desenvolvimento deste trabalho, outras substâncias identificadas diferencialmente no perfil de voláteis de plantas de citros com HLB (Tabela 1), mas que não foram testadas, deverão ser investigadas em trabalhos futuros, dando continuidade à pesquisa e complementando as lacunas necessárias para viabilizar o

desenvolvimento de métodos mais eficientes para o monitoramento e/ou controle de *D. citri*.

3 CONCLUSÕES

- Apenas fêmeas do psílídeo *Diaphorina citri* são atraídas por voláteis de plantas de *Citrus sinensis* variedade 'Pera' enxertada sobre limão-cravo;
- Os compostos hexanal, α -tujeno, α -pineno, sabineno, β -mirceno, α -terpineno, limoneno, linalol, β -elemeno e β -copaeno são encontrados em maior quantidade em folhas de plantas de *Citrus sinensis* variedade 'Pêra' enxertada sobre limão-cravo infectadas com a bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus*, do que em folhas destas plantas sem a doença;
- Salicilato de metila e linalol são atraentes para fêmeas de *D. citri* e a mistura destes compostos apresenta efeito sinérgico na atração destes insetos;
- Limoneno é capaz de alterar a resposta comportamental de fêmeas de *D. citri*;
- A resposta comportamental de fêmeas de *D. citri* depende da concentração e da quantidade de compostos envolvidos em seu estímulo olfativo;
- Incremento de linalol no perfil de voláteis de plantas de *C. sinensis* variedade 'Pera' enxertada sobre limão-cravo é capaz de aumentar sua atratividade para adultos de *D. citri*.

REFERÊNCIAS

ALBRECHT U.; BOWMAN, K.D. Transcriptional response of susceptible and tolerant citrus to infection with *Candidatus Liberibacter asiaticus*. **Plant Science**, New York, v. 185-186, p. 118-130, 2012

AMMAR, E.D. ; SHHATTERS Jr., R.G. ; HALL, D.G. Localization of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, Associated with Citrus Huanglongbing Disease, in its Psyllid Vector using Fluorescence in situ Hybridization. **Journal of Phytopathology**, Berlim, v. 159, p. 726-734, 2011.

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

AUBERT, B. Le psylle asiatique des agrumes (*Diaphorina citri*) Kuwayama au Brésil. **Fruits**, Saint Pierre, v. 42, p. 225- 229, 1987.

BALDWIN, I.T. Plant Volatiles. **Current Biology**, Cambridge v. 20, n. 9, p. 392-397, 2010.

BARBOSA, J.C.; MALDONADO Jr., W. **AgroEstat** – Sistema para Análises Estatísticas de Ensaios Agronômicos. Jaboticabal: UNESP, 2014.

BARTLETT, M.S. Properties of sufficiency and statistical tests. In: Royal Society A-Mathematical Physical and Engineering Sciences, 1937, London. **Proceedings...** London, v. 160, p. 268-282, 1937.

BASSANEZI, R.B.; MONTESINO, L.H.; BUSATO, L.A.; STUCHI, E.S. Damages caused by huanglongbing on sweet orange yield and quality in São Paulo. In: Huanglongbing-Greening International Workshop, 2006, Ribeirão Preto. **Proceedings...** Ribeirão Preto, 2006. p. 39.

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

BENGTTSSON, M.; JAASTAD, G.; KNUDSEN, G.; KOBRO, S.; BÄCKMAN, A.C.; PETTERSSON, E.; WITZGALL, P. Plant volatiles mediate attraction to host and non-host plant in apple fruit moth, *Argyresthia conjugella*. **Entomologica Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 118, n. 1, p. 77-85, 2006.

BOVÉ J.M.; TEIXEIRA D.C.; WULFF N.A.; EVEILLARD S.; SAILLARD C.; BASSANEZI R. B.; LOPES S.A.; YAMAMOTO P.T.; AYRES A.J. Several Liberibacter and Phytoplasma species are individually associated with HLB. In: INTERNATIONAL RESEARCH CONFERENCE ON HUANGLONGBING.2008. Orlando. **Proceedings...** Orlando, 2008. p.152-155.

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

CAPOOR, S.P.; RAO, D.G.; VISWANATH, S.M. Greening disease of citrus in the Deccan Trap Country and its relationship with the vector, *Diaphorina citri* Kuwayama. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL CITRUS VIROLOGY, 6, 1974, Riverside. **Proceedings...** Riverside: University of California, 1974. P 43-49.

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**, Gainesville, v. 95, n. 2, p. 304-311, 2012.

CEVALLOS-CEVALLOS J.M.; GARCIA-TORRES R.; ETXEBERRIA E.; REYES-DE-CORCUERA J.I. GC-MS analysis of headspace and liquid extracts for metabolomic differentiation of citrus huanglongbing and zinc deficiency in leaves of “Valencia” sweet orange from commercial groves. **Phytochemical Analysis**, Malden, v. 22, p. 236-246, 2011.

CEVALLOS-CEVALLOS, J.M.; CORCUERA, R.J.I. Metabolite changes in HLB Orange leaves by GC-MS and other techniques. In: INTERNATIONAL RESEARCHCONFERENCE ON HUANGLONGBING, 2008, Orlando. **Proceedings...** Orlando: USDA, ARS, 2008. p. 176-177.

COLETTA-FILHO, H.D.; CARLOS, E.F.; TAKITA, M.A.; TARGON, M.L.P.N.; ALVES, K.C.S.; AMARAL, A.M. do; MACHADO, M.A. P14 - Effective detection and genome sequencing approaches of *Candidatus Liberibacter* sp. Causing Huanglongbing (HLB) in São Paulo, Brazil. In: INTERNATIONAL CITRUS CANKER AND HUANGLONGBING RESEARCH WORKSHOP, 2., 2005, Orlando. **Proceedings...** Orlando: Florida Citrus Mutual, 2005. p. 79

COLETTA-FILHO, H.D.; TARGON, M.L.P.N.; TAKITA, M.A.; NEGRI, J.D. DE; POMPEU Jr. , J.; MACHADO, M.A. First report of the causal agent of Huanglongbing (“*Candidatus Liberibacter Asiaticus*”) in Brazil. **Plant Disease**, Davis, v. 88, p. 1382, 2004.

COSTA-LIMA. **Insetos do Brasil**: homópteros. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Agronomia, 1942. t. 3, cap. 23, p. 94-111. (Série Didática, 4).

DAMSTEEGT, V.D.; POSTNIKOVA, E.N. STONE, A.L.; KUHLMANN, M.; WILSON, C.; SECHLER, A.; SCHAAD, N.W.; BRLANSKY, R.H.; SCHENEIDER, W.L. *Murraya paniculata* and Related Species as Potential Hosts and Inoculum Reservoirs of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’, Causal Agent of Huanglongbing. **Plant Disease**, St. Paul, v. 94, n. 5, p. 528-533, 2010.

DE MORAES, C.M.; MESCHER, M.C.; TUMLINSON, J.H. Caterpillar-induced nocturnal plant volatiles repel conspecific females. **Nature**, London v. 410, p. 577-580, 2001.

DICKE, M.; LOON, J.J.A. Van. Multitrophic effects of herbivore-induced plant volatiles in an evolutionary context: review. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 97, p. 237- 249, 2000.

DICKE, M.; SCHUTTE, C.; DIJKMAN, H. Change in behavioral response to herbivore-induced plant volatiles in a predatory mite population. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 26, p. 1497-1514, 2000.

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

FNP CONSULTORIA & COMERCIO. Citros Laranja. In:_____. **Agrianual 2014:** anuário da agricultura brasileira. São Paulo: Informa Economics FNP, 2014. p. 237-269.

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

FRASER, A.M.; MECHABER, W.L.; HILDEBRAND, J.G. Electroantennographic and behavioral responses of the sphinx moth *Manduca sexta* to host plant headspace volatiles. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 29, p. 1813-1833, 2003.

FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA. Disponível em: <http://www.fundecitrus.com.br/doencas/greening/10>. Acesso em: 25 mai 2014a.

_____. Disponível em: <http://www.fundecitrus.com.br/levantamentos/greening/10>. Acesso em: 28 mai 2014b.

_____. **Manual técnico de Greening**. Araraquara, 2007. 12p.

GARNIER, M.; DANIEL, N.; BOVÉ, J.M. The greening organism is a Gram negative bacterium. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 12., 1984, Riverside. **Proceedings...** Riverside: IOCV, 1984. p. 115-124.

GODFREY, K.E.; GALINDO, C.; PATT, J.M.; LUQUE-WILLIAMS, M. Evaluation of Color and Scent Attractants Used to Trap and Detect Asian Citrus Psyllid (Hemiptera: Liviidae) in Urban Environments. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 96, n. 4, p. 1406-1416, 2013.

GOMES, J.G. Chave de campo para a determinação das principais pragas dos citros. **Revista da Sociedade Brasileira de Agronomia**, Rio de Janeiro, v.3, n.1, p. 58-108, 1940.

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, 2009.

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

GOTTWALD, T.R.; DA GRAÇA, J.V.; BASSANEZI, R.B. Citrus huanglongbing: the pathogen and its impact. **Plant Health Progress**. 6 Sept. 2007. Online (doi: 10.1094/PHP-2007-0906-01-RV).

GRAÇA, J.V. da. Citrus Greening Disease, **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 29, p. 109-139, 1991.

GRAÇA, J.V. da; SETAMOU, M.; SKARIA, M.; JUNTA, M. Citrus Greening Disease (HLB) confirmed in Texas. **Citrus Center Newsletter**, Welasco, p. 1-3, 20 mai 2012.

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

HALBERT, S.E. The discovery of huanglongbing in Florida. In: INTERNATIONAL CITRUS CANCER AND HUANGLONGBING RESEARCH WORKSHOP, 2., 2005, Orlando. **Proceedings...** Orlando: Florida Department of Agriculture & Consumer Services, 2005. p. 50.

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**, Gainesville, v. 87, p. 330-353, 2004.

HALL, D.G.; HENTZ, M.G.; CIOMPERLIK, M.A. A comparison of traps and stem tap sampling for monitoring adult Asian citrus psyllid (Hemiptera: Psyllidae) in citrus. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 90, p. 327-334, 2007.

HEINZ, C.A. Host Plant Odor Extracts with Strong Effects on Oviposition Behavior in *Papilio polyxenes*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Malden, v. 128, p. 265-273, 2008.

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 Signaling & Behavior**, Austin, v. 8, n. 10, e25677, Oct., 2013.

IKEDA, K; ASHIHARA, W. Preference of Adult Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) for *Murraya paniculata* and *Citrus unshiu*. **Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology**, Tokyo, v.52, n.1, p.27-30, 2008.

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

KIMATI, H.; AMORIN, L.; REZENDE, J.A.A.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de Fitopatologia**, Piracicaba: Ceres, 2005. 663p.

KUMAGAI, L.; LEVESQUE, C.; BLOMQUIST, C.L.; MADISHETTY, K.; GUO, Y.Y.; WOODS, P.; ROONEY-LATHAM, S.; RASCOE, J.; GALLINDO, T.; SCHNABEL, D.; POLEK, M. First report of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' associated with citrus Huanglongbing (HLB) in California. **Plant Disease**, St. Paul, v. 97, n. 2, p. 283, 2013.

LIU, H.Y.; TSAI, J.H. Effects of temperature on biology and life table parameters of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae). **Annals of Applied Biology**, Oxford, v. 137, p. 201- 201, 2000.

LOPES, S.A.; FRASE, 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.

MANN R.S.; ALI J.G.; HERMANN S.L.; TIWARI, S.; PELZ-STELINSKI, K.S.; ALBORN H.T.; STELINSKI L.L. Induced release of a plant-defense volatile 'deceptively' attracts insect vectors to plants infected with a bacterial pathogen. **PlosPathogens**, San Francisco, v.8, n. 3, p.1-13, 2012.

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.

MANTHEY, J.A. Differences in secondary metabolites in leaves from trees affected with the greening (HLB) disease. In: INTERNATIONAL RESEARCH CONFERENCE ON HUANGLONGBING, 2008, Orlando. **Proceedings...** Orlando: USDA, ARS, 2008. p. 182.

MAUCK, K.E; DE MORAES, C.M; MESCHER, M.C. Deceptive chemical signals by a plant virus attract insect vectors to inferior hosts. National Academy of Sciences of the USA, 2010, Washington. **Proceedings...** Washington, 2010, v. 1, n. 1, p. 1- 6.

MAYER, C.J.; VILSINSKAS, A.; GROSS, J. Chemo-ecologically mediated interactions among "*Candidatus Phytoplasma mali*", its vector *Cacopsylla picta*, and their host plant *Malus domestica*. **Bulletin of Insectology**, Bologna, v. 60, n. 2, p. 209-210, 2007.

_____. Phytopathogen lures its insect vector by altering host plant odor. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 34, p. 1045-1049, 2008.

MEAD, F.W.; FASULO, T.R. **Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama** (Insecta: Hemiptera: Psyllidae) Gainesville: University of Florida, 2011. 8p. (IFAS Extension, 33).

MEINERS, T.; HILKER, M. Induction of plant synomones by oviposition of a phytophagous insect. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 26, p. 221-232, 2000.

MENEGUIM, L.; BUASSI, M.; VILAS-BOAS, L.A.; MARQUES-MARÇAL, V.V.; PACCOLA-MEIRELLES, L.D.; LEITE JUNIOR, R.P. Ocorrência de *Candidatus* Liberibacter asiaticus agente causal do huanglongbing no estado do Paraná. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 33, n. 100, 2008.

MIRANDA, P.M.; NORONHA JUNIOR, N.C.; MARQUES, R.N. Alternativa para o Manejo do vetor do greening no Brasil. In: _____ **Avanços em Fitossanidade, 2011**. Botucatu: UNESP/FEPAP 2011. cap.11, p.143-163.

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

NEVES, M.F. **O retrato da citricultura brasileira**. Ribeirão Preto: Markestrat, 2010. 139p.

NORONHA Jr., N.C. **Efeito dos coespecíficos e voláteis das plantas *Murraya paniculata* (L.) Jack, *Psidium guajava* L. e *Citrus sinensis* (L.) Osbeck sobre o comportamento de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae)**. 2010. 72p. Tese (Doutorado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.

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.

PATT J.M., SÉTAMOU M. Responses of the Asian citrus psyllid to volatiles emitted by the flushing shoots of its rutaceous host plants. **Environmental Entomology**, Lanham, v.39, n.2, p. 618-24, 2010.

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

PICHERSKY, E.; GERSHENZON, J. The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. **Current Opinion in Plant Biology**, Oxford, v. 5, p. 237-43, 2002.

PIO, R.M.; FIGUEIREDO, J.O.; STUCHI, E.S.; CARDOSO, S.A.B. Variedades copas. In: MATTOS Jr, D.; DE NEGRI, D.; PIO, R.M.; POMPEU Jr., J. **Citros**. Cordeirópolis: IAC, 2005. Cap. 3, p. 37-60.

POECKE, R.M.P. Van; DICKE, M. Indirect defenses of plant against herbivores: Using *Arabidopsis thaliana* as a model plant. **Plant Biology**, Malden, v. 6, p. 387-401, 2004.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R 2.15**. Vienna, 2012. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>. Acesso em: 10 dez. 2012.

ROGERS, M.E.; STANSLY, P.A. **Biology and environment of the Asian Citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama, in Florida Citrus**. Gainesville: University of Florida, 2012. 6p. (IFAS Extension, ENY-739).

SCHOONHOVEN, L.M.; van LOON, J.J.A.; DICKE, M. **Insect-Plant Biology**, Wageningen: Oxford University, 2005. 440p.

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**, Dordrecht, v. 25, p. 264–276, 2012.

SHAPIRO, S.S.; WILK, M.B. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**, Oxford, v. 52, p. 591-611, 1965.

SIGNORETTI, A.G.; PEÑAFLORES, M.F.G.V.; BENTO, J.M.S. Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), female moths respond to herbivore-induced corn volatiles. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 41, p. 22–26, 2012.

SILVA, A.G.A.; GONÇALVES, C.R.; GALVÃO, D.M.; GONÇALVES, A.J.L.; GOMES, J.; SILVA, M.N.; SIMONI, L. **Quarto catálogo dos insetos que vivem nas plantas do Brasil**. Seus parasitos e predadores. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1968. pt. 2, t. 1: Insetos, hospedeiros e inimigos naturais, 622p.

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

SPÓSITO, M.B.; BASSANEZI, R.B. Manejo de doenças dos citros. In: SENE PINTO, A.; ZACCARO, R.P. (Org.). **Produção de mudas e manejo fitossanitário dos citros**. Piracicaba, 2008. p. 87-108.

SULE, H.; MUHAMAD, R.; OMAR, D.; HEE, A.K. Response of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) to Volatiles Emitted from Leaves of Two Rutaceous Plants. **Journal of Agricultural Science**, Toronto, v. 4, n. 6, p. 152-159, 2012.

SUTTON, B.D. Detection and identification of citrus huanglongbing (Greening) in Florida, USA. In: INTERNATIONAL CITRUS CANCKER AND HUANGLONGBING RESEARCH WORKSHOP, 2., 2005, Orlando. **Proceedings...** Orlando: Florida University, 2005. Abstract H-11.

TEIXEIRA, D.C.; DANET, J.L.; EVEILLARD, S.; MARTINS, E.C.; JESUS Jr., W.C.; YAMAMOTO, P.T.; LOPES, S.A.; BASSANEZI, R.B.; AYRES, A.J.; SAILLARD, C.; BOVE, J.M. Citrus huanglongbing in São Paulo State, Brazil: PCR detection of the 'Candidatus' Liberibacter species associated with the disease. **Molecular and Cellular Probes**, Oxford, v. 19, p. 173- 179, 2005.

TEIXEIRA, D.C.; WULF, N.A.; LOPES, S.A.; YAMAMOTO, P.T.; MIRANDA, M.P.; SPÓSITO, M.B.; BELASQUE JUNIOR, J. & BASSANEZI, R.B. Caracterização e etiologia das bactérias associadas ao *huanglongbing*. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v. 31, n.2, p. 115-128, 2010.

TEIXEIRA, D.C.; WULFF, N.A.; MARTINS, E.C.; KITAJIMA, E.W.; BASSANEZI, R.; AYRES, A.J.; EVEILLARD, S.; SAILLARD, C.; BOVÉ, J.M. A Phytoplasma Closely related to the pigeon pea witches-broom phytoplasma (16Sr IX) is associated with citrus huanglongbing symptoms in state of São Paulo, SP. **Phytopatology**, St. Paul, v. 98, n. 9, p.997-984, 2008.

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

TURLINGS, T.C.J.; LENGWILER, U.B.; BERNASCONI, M.L.; WECHSLER, D. Timing of induced volatile emissions in maize seedlings. **Planta**, Heidelberg, v. 207, p. 146-152, 1998.

VET, L.E.M.; LENTEREN, J.C.; HEYMANS, M.; MEELIS, E. An airflow olfactometer for measuring olfactory responses os hymenopterous parasitoids and other small insects. **Physiological Entomology**, Maldem, v. 8, p. 97-106, 1983.

VISSER, J.H. Host Odor Perception in Phytophagous Insects. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 31, p. 121-144, 2006.

WENNINGER, E.J.; HALL, D.G. Daily Timing of Mating and Age at Reproductive Maturity in *Diaphorina citri* (Hemiptera : Psyllidae). **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 90, n. 4, p. 715-722, 2007.

_____. Importance of multiple mating to female reproductive output in *Diaphorina citri*. **Physiological Entomology**, Oxford, v. 33, n. 4, p. 316-321, 2008.

WENNINGER, E. J.; STELINSKI, L. L.; HALL, D. G. Relationships Between Adult Abdominal Color and Reproductive Potential in *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). **Annals of the Entomological Society of America**, Lanham, v. 102, n. 3, p. 476-483, 2009.

ZHAO J.-P.; WANG H.-T.; ZENG, X.-N.; XUE, P.-P. Differences in selection behaviors and chemical cues of adult asian citrus psyllids, *Diaphorina citri*, on healthy and huanglongbing-infected young shoots of citrus plants. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v.5, n.9, p. 83-91, 2013.