Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Caracterização da movimentação de psilídeos (Hemiptera: Psylloidea) no contexto da disseminação primária do Huanglongbing dos citros

Mayerli Tatiana Borbon Cortes

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

Piracicaba
2019

Mayerli Tatiana Borbon Cortes
Ingeniera Agrónoma

Caracterização da movimentação de psilídeos (Hemiptera: Psylloidea) no contexto da disseminação primária do Huanglongbing dos citros

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **JOÃO ROBERTO SPOTTI LOPES**

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

Piracicaba
2019

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

Borbon Cortes, Mayerli Tatiana

Caracterização da movimentação de psilídeos (Hemiptera: Psylloidea) no contexto da disseminação primária do Huanglongbing dos citros / Mayerli Tatiana Borbon Cortes. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2019.

119 p.

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

1. Huanglongbing 2. Psylloidea 3. Ascensão vertical 4. Métodos de amostragem I. Título

A minhas matriarcas mestras fundamentais Graciela Cortés, Marcela Cortés e Lilliana Hoyos por me transmitir através de seus atos e pensamentos o valioso dos tesoros: humildade, gratidão e sensatez.

A essas três mulheres que são o meu napalm e accionam o botão vermelho quando quero ir em contra da segunda ley da termdinâmica e insistir na ordem do tudo caótico

DEDICO!

AGRADECIMENTOS

A minha mãe biológica, minha mãe-irmã fundamental e minha mãe científica por serem simultaneamente almas de ignição e apaziguadoras!

Ao professor João Roberto Spotti Lopes pelos ensinamentos profissionais e pessoais! Agradeço por ter me aceitado inicialmente no estágio, por me incentivar a fazer o mestrado e pela confiança.

Aos professores Fernando Consôli, Maurício Bento, Wesley Godoy, Roberto Parra e Roberto Zuchi pelos valiosos ensinamentos nas suas aulas!

Aos funcionários do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ, especialmente a Vitor Celso, Carlos Castilho (Carlinhos) e Cristina Jensen pela disposição e ajuda nas viagens. A Silvana Oliveira, Marta Colletti, Andréa Sintoni por fazerem burocraticamente possíveis as viagens e a Francisco Prata (Chico) por aliviar as dores de cabeça com as máquinas de sucção portátil.

A Silvia e Eliana da Biblioteca, pelas dicas e correções da formatação da minha dissertação!

Aos funcionários das Fazenda de Citrosuco S.A., especialmente a Fernando Zorzenon, Cremilda Santos de Amorim, Claudia dos Santos, Marcio Broesler e Tiago dos Santos, pela ajuda na seleção dos pontos de amostragem, logística e acompanhamento inicial.

Agradeço especialmente a Fernando Zorzenon pela proactividade, idéias e disposição! Além do convite para participar no 9 Workshop Manejo do HLB 2018.

Aos donos da fazendas onde foi realizado o projeto, especialmente ao Sr. João da Fazenda Sítio Bom Começo e o Sr. José Carlos da Fazenda Cachoeirinha em Casa Branca, SP.

A todo o pessoal dos condomínios adjacentes à Fazenda Água Sumida, em Santa Maria da Serra. Agradeço pela receptividade, conversas e por serem tão prestativos sempre.

Ao Dr. Daniel Burckhardt e Dalva Luiz de Queiroz pelo conhecimento transmitido sobre taxonomia e coleta de psilídeos, além da identificação taxonômica de muitos exemplares.

A Fundecitrus pelo apoio financiero para a realização do projeto. Especialmente, ao Engenheiro Arthur Tomaseto e ao Pesquisador Nelson Wulff.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudo durante esses dois anos de mestrado.

Ao equipe do Laboratório de Insetos Vetores de Fitopatógenos, especialmente a Taciana Kuhn, Joyce Froza, Anderson Ramos, Karen Komada, Michele Soussa, Thalita Alburquerque, Mariana Bossi e Ricardo Sesso.

Aos estagiários Matheus Forti, Euclides, Leandro, Caroline e Monica, pela grande ajuda em campo e nas trigens!

Aos colegas da pos-graduação da Entomologia ao longo do mestrado.

As faxineiras e vigilantes, por manter nossos lugares de trabalho confortáveis! Além das conversas e ensinamentos!

Ao Anderson Ramos pelas revisões dos escritos ao longo do mestrado e por todo o compartilhado!

Aos meus amigos Nodier Herrera e Brisned Ladino da minha universidade berço, agradeço por ser parte do meu bem emocional! Amizades como essas, são poucas!

A Flávio, Néia, Margarita, Arlindo, Eugenio (Geninho) e Sr. Alberto, por essa energia caipira tão própria que os caracteriza! Pelos ensinamentos de português, pelas conversas, pela energia para ser cada dia pessoas melhores!

Aos amigos peruanos companheiros de caminhos no Brasil, especialmente ao Rafael Vela e Melina Cruzado, pelos momentos compartilhados longe das nossas terras amadas!

Ao Talles do Nascimento, que nos momentos adversos me deu força para continuar, pelo apoio incondicional e por tergirversar situações para conseguir me fazer sorrir!

Ao meu enamorado William Piedrahita, por seu amor indescriptível, sua paciência innata e compreensão!

E por suposto, aos seres cuadrupedos domesticados que fazem da nossa vida un viaje lleno de amor, a Gaya, Pecas, Simona e Domingo, por me fazerem feliz a mim e a minha familía! E outros que foram de passo fugaz no meu passo por Piracicaba, como Jiló e Feijoada.

"¿Para que sirve la utopía?"... pregunta un estudiante en Cartagena de Indias... Entonces, Fernando Birri responde: "La utopía está en el horizonte… yo sé muy bien que nunca la alcanzaré, que si yo camino diez pasos ella se alejará diez pasos, cuánto más la busque menos la encontraré porque ella se va alejando a medida que yo me acerco"… "Entonces, ¿para que sirve?... para eso! Para caminar!"

Eduardo Galeano

SUMÁRIO

RESUMO 9
ABSTRACT 10
1. INTRODUÇÃO 11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 17
2.1. HLB 17
2.1.1. Contexto histórico 17
2.1.2. Agentes etiológicos 18
2.1.3. Relação do HLB com plantas hospedeiras 20
2.1.4. Relação do HLB e o vetor 21
2.1.5. Manejo do HLB 24
2.2. Fatores epidemiológicos do HLB 25
2.3. Migração/dispersão de Psylloidea 26
2.4. Taxonomia e bio-ecologia de Psylloidea 31
2.5. Taxonomia de *D. citri* e relação hospedeiros 33
2.6. Métodos de amostragem aéreos 34
3. MATERIAL E MÉTODOS 37
3.1. Áreas experimentais 37
3.2. Métodos de amostragem 41
3.2.1. Amostragem a diferentes alturas 41
3.2.1.1. Armadilhas adesivas amarelas 41
3.2.1.2. Armadilha de sucção estacionária 42
3.2.2. Amostragem na vegetação 44
3.3. Triagem e identificação de espécimes de Psylloidea 44
3.4. Detecção de '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' em psilídeos 45
3.4.1. Extração de DNA de psilídeos e análise de qPCR 45
3.5. Análise de dados 47
4. RESULTADOS 49
4.1. Análise contexto "plantas de fundo de quintal" 49
4.1.1. Diversidade 49
4.1.1.1. Coleta com armadilhas adesivas amarelas 49
4.1.1.2. Coleta com armadilha de sucção estacionária 51
4.1.1.3. Coleta de Psylloidea em plantas hospedeiras de *D. citri* 52
4.1.2. Análise espacial 53
4.1.2.1. Coleta com armadilhas adesivas amarelas 53
4.1.2.2. Coleta de Psylloidea nas plantas hospedeiras de *D. citri* 57
4.1.3. Análise temporal 59
4.1.3.1. Coleta com armadilhas adesivas amarelas 59
4.1.3.2. Coleta com armadilha de sucção estacionária 63
4.1.3.3. Coleta de Psylloidea em plantas hospedeiras de *D. citri* 64
4.1.4. Análise espaço-temporal de *D. citri* 65
4.1.5. Análise dos métodos de amostragem de psilídeos em altura 68
4.2. Análise contexto pomares com manejo deficiente de *D. citri* 69
4.2.1. Diversidade 69
4.2.1.1. Coleta com armadilhas adesivas amarelas 69
4.2.1.2. Coleta de Psylloidea em plantas hospedeiras de *D. citri* 71

4.2.2. Análise espacial 72
4.2.2.1. Coleta com armadilhas adesivas amarelas 72
4.2.2.2. Coleta de Psylloidea em plantas hospedeiras de *D. citri* 75
4.2.3. Análise temporal 76
4.2.3.1. Coleta com armadilhas adesivas amarelas 76
4.2.3.2. Coleta de Psylloidea em plantas hospedeiras de *D. citri* 80
4.2.4. Análise espaço-temporal de *D. citri* 81
4.3. Comparação dos contextos 83
4.4. Detecção de *C*Las em Psylloidea 87
4.4.1. Detecção de *C*Las em *D. citri* 87
4.4.2. Detecção de *C*Las em outras espécies de Psylloidea 87
5. DISCUSSÃO 89
6. CONCLUSÕES 97
REFERÊNCIAS 99

RESUMO

Caracterização da movimentação de psilídeos (Hemiptera: Psylloidea) no contexto da disseminação primária do Huanglongbing dos citros

O Huanglongbing (HLB) é a na doença mais limitante para a produção de citros no mundo na atualidade. A alta capacidade de disseminação das bactérias associadas ao HLB pode estar associada com a movimentação do psilídeo vetor, *Diaphorina citri*, não apenas entre pomares vizinhos, mas também a longas distâncias. A análise de comportamento de dispersão em populações de *D. citri* e outras espécies de Psylloidea foi abordada mediante o monitoramento espaço-temporal de populações de psilídeos em diferentes alturas e em planta. O monitoramento foi realizado em dois contextos da disseminação primária do HLB, sendo áreas circunvizinhas de pomares comerciais de citros com manejo convencional no Estado de São Paulo. O monitoramento em alturas foi realizado por meio de armadilhas adesivas amarelas alocadas em duas alturas (2,5 e 7,5 m) e armadilha de sucção estacionária. Nos pontos monitorados foram selecionadas plantas hospedeiras de *D. citri*, amostradas quinzenalmente por meio de rede de varredura e armadilha de sucção portátil. Nos dois contextos foi encontrada correlação positiva entre abundância das espécies de psilídeos em relação às alturas e as épocas de monitoramento. No contexto de "plantas de fundo de quintal" coletaram-se 48.8% de psilídeos a 2,5 m e 51.2% a 7,5 m. No contexto de "pomares com manejo deficiente" foi encontrado 48.4% dos indivíduos a 2,5 m e 51.6% a 7,5 m. Foram coletados 148.802 espécimes de psilídeos por meio de armadilhas adesivas amarelas, pertencentes a 6 famílias e 24 gêneros, sendo que as espécies mais frequentes e constantes foram *Heteropsylla* sp., *Isogonoceraia divergipennis*, *Mitrapsylla* spp., *Glycaspis brimblecombei* e *Trioza* sp. No contexto de "plantas de fundo de quintal" a frequência de *D. citri* em alturas foi 1.5% e em planta foi 70.3%. No contexto de pomares com manejo deficiente, a frequência de *D. citri* em alturas foi 0.11% e em planta foi 81.8%. A maior densidade de psilídeos (incluindo *D. citri*) ocorreu do final do inverno até o começo do verão, sendo particularmente concentrada na primavera em ambos os contextos tanto nas áreas circunvizinhas como na borda dos pomares comerciais de citros. *C*Las foi detectada em 40% dos indivíduos de *D. citri* encontrados a 7,5 m e em 63.3% dos indivíduos coletados em plantas cítricas. A detecção de *C*Las foi negativa para as outras espécies de Psylloidea coletadas em altura e em plantas hospedeiras de *D. citri*. A correlação positiva entre psilídeos coletados a 2,5 m e 7,5 m evidencia possíveis movimentos de ascensão vertical nas camadas atmosféricas. A coleta de psilídeos a alturas superiores à da copa de plantas cítricas (como 7,5 m) evidencia possíveis movimentos de longa distância, sugerindo que os insetos estejam sendo transportados pelo vento. A análise da ocorrência espaço-temporal de Psylloidea em armadilhas adesivas pode auxiliar na previsão de movimentos a curta e longa distância de *D. citri*.

Palavras-chave: Huanglongbing; Psylloidea; Ascensão vertical; Métodos de amostragem

ABSTRACT

Characterization of the movement of psyllids (Hemiptera: Psylloidea) in the context of the primary spread of *Citrus* Huanglongbing

Huanglongbing (HLB) is the most limiting disease for the production of *Citrus* in the world today. The high dissemination capacity of the HLB-associated bacteria may be associated with the movement of the psyllid vector, *Diaphorina citri*, not only between neighboring groves, but also at long distances. The dispersion behavior analysis in populations of *D. citri* and other species of Psylloidea was approached through the spatio-temporal analysis of psyllid populations at different heights and plants. The monitoring was carried out in two contexts of the primary spread of HLB, in areas surrounding commercially managed groves in the State of São Paulo. Monitoring at heights was performed using yellow sticky traps allocated at two heights (2.5 and 7.5 m) and a stationery suction-trap. At the monitored points, host plants of *D. citri* were sampled biweekly by means of a sweep net and a portable suction device. In both contexts a positive correlation was found between the abundance of the species of psyllids in relation to the heights and the seasons of monitoring. In the context of backyard plants, 48.8% of the psyllids were collected at 2.5 m and 51.2% at 7.5m. In the context of poor management groves, 48.4% of the individuals were found at 2.5 m and 51.6% at 7.5 m. A total of 148,802 specimens of psyllids were collected using yellow sticky traps belonging to 6 families and 24 genera. The most frequent and constant species were *Heteropsylla* sp., *Isogonoceraia divergipennis*, *Mitrapsylla* spp., *Glycaspis brimblecombei* and *Trioza* sp. In the context of backyard plants the frequency of *D. citri* at the two sampling heights was 1.5% and on plants was 70.3%. In the context of poor management groves, the frequency of *D. citri* at the two heights was 0.11% and in plant was 81.8%. The highest density of psyllids occurred from late winter to early summer, but particularly concentrated in the spring in both contexts. Similarly, *D. citri* showed a population peak in the spring, both in the surrounding areas and on the edge of commercially managed *Citrus* groves. *C*Las was detected in 40% of the *D. citri* individuals found at 7.5 m and in 63.3% of the individuals collected on *Citrus* plants. The detection of *C*Las was negative for the other species of Psylloidea collected by yellow sticky traps and on host plants of *D. citri*. The positive correlation between psyllids collected at 2.5 m and 7.5 m shows possible vertical ascending movements in the atmospheric layers. The collection of psyllids at heights higher than the canopy of *Citrus* plants (e.g. 7.5 m) shows possible long distance movements, suggesting that the insects are being carried by the wind. The spatio-temporal analysis of Psylloidea in yellow sticky traps may aid in the prediction of short and long distance movements of *D. citri*.

Keywords: Huanglongbing; Psylloidea; Vertical ascent; Aerial sampling

1. INTRODUÇÃO

O Huanglongbing (HLB ou Greening) é a doença mais importante da citricultura nas Américas nos últimos anos (Santivañez *et al*., 2013). No século passado a doença destruiu quase 100 milhões de árvores de citros na Ásia e na África, mas no início do século XXI tornou-se a principal ameaça para o futuro da indústria mundial de cítricos (Bové, 2006; Bergamin-Filho *et al*., 2016). Na Flórida, estima-se que entre 90% e 95% das árvores já estão infectadas (Duarte, 2017) e no Estado de São Paulo, Brasil, 42,6 milhões de árvores cítricas foram erradicadas entre 2005 e 2015, de acordo com relatórios da Coordenadoria de Defesa Agropecuária (CDA, 2016).

Os prejuízos econômicos ocasionados pelo HLB são principalmente devidos à perda de produtividade e eliminação de plantas sintomáticas. Embora a eliminação de plantas sintomáticas seja necessária, o diagnóstico do HLB a partir de sintomas é difícil, pois pode ser confundido com outros agentes além de existir um extenso período de incubação da bactéria na planta, entre 6 a 12 meses a partir da inoculação (Coletta-Filho *et al*., 2014). Porém, existem relatos de períodos de incubação superiores a um ano (Zhao, 1981; Aubert, 1987; Yamamoto *et al*., 2006). Apesar disso, alguns sintomas são característicos de acordo com Gottwald *et al*. (2007); por exemplo, a planta infectada geralmente desenvolve um o mais brotos amarelos e pode mostrar aparência setorizada de forma que alguns ramos podem ser assintomáticos (McClean & Schwarz, 1970), talvez devido à infecção sistêmica incompleta ou por diferentes concentrações de bactéria na planta hospedeira (Zhang, 1981; Aubert, 1992). Nas folhas, é evidente a coloração irregular de verde e amarelo (mosqueado), sendo assimétrica tanto abaxial como adaxialmente (Bové, 2006). As folhas podem também apresentar textura mais grossa com nervuras maiores e em etapas avançadas da doença podem aparecer sintomas de deficiência de zinco, com posterior queda da folha e morte do ramo (Gottwald *et al*., 2007). Os frutos das plantas com HLB são pequenos, assimétricos, com eixo central deslocado, apresentam alterações nos padrões de cor (inversão da coloração) e aborto de sementes (Bové, 2006; Gottwald *et al*., 2007).

No Brasil, desde o primeiro relato do HLB em 2004 (Colleta-Filho *et al*., 2004) as estratégias de manejo têm evoluído. Inicialmente o manejo foi direcionado à utilização de técnicas de manejo local para o controle da população do vetor (principalmente por meio de inseticidas químicos) evoluindo para a implementação do controle regional. O controle do vetor na escala local é de eficácia limitada já que consegue reduzir a população do inseto mas não a incidência da doença na mesma proporção, o que já foi demonstrado em áreas de

produção de citros no Brasil e Vietnã (Gatineau *et al*., 2010; Bassanezi *et al*., 2013a,b). Isso pode ser devido ao fato de que a transmissão da bactéria poder ocorrer antes dos psilídeos serem mortos, resultando em insucesso no combate da disseminação primária (Bergamin-Filho *et al*., 2016).

O HLB está associado com agentes causais de diferentes espécies de α-proteobactérias baciliformes do gênero '*Candidatus* Liberibacter', sendo conhecidas na atualidade três espécies, '*Candidatus* Liberibacter africanus' (*C*Laf), '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' (*C*Las) e '*Candidatus* Liberibacter americanus' (*C*Lam), todas restritas ao floema (Bové, 2006; Bové *et al*., 2008). As três espécies apresentam distribuições geográficas distintas, o que está associado a diferentes fatores, relacionados com o inseto vetor, condições climáticas, entre outros (Haapalainen, 2014). Por exemplo, *C*Laf está presente em aproximadamente 17 países da África e na Ásia foi reportada na Arábia Saudita e Iêmen, enquanto que *C*Las apresenta maior distribuição intercontinental, reportada em 21 países nas Américas, aproximadamente 20 países da Ásia, nas Ilhas Maurício, na Ilha da Reunião e na Etiópia na África, e em Papua Nova Guiné na Oceania. No entanto, a espécie *C*Lam é restrita ao Brasil (EPPO, 2018), embora exista um relato isolado de detecção de *C*Lam em adultos de *D. citri* nas áreas de Ouachitas em Arkansas e Oklahoma e em Appalachians na Georgia e Alabama, nos EUA (Nelson *et al*., 2013).

No Brasil *C*Las é a espécie prevalente, com incidência muito maior que *C*Lam (Teixeira *et al*., 2010), sendo as duas espécies transmitidas pelo psilídeo-asiático-dos-citros *Diaphorina citri* (Kuwayama, 1908) (Hemiptera: Liviidae), o único vetor relatado no Brasil (Teixeira *et al*., 2005a). Já *C*Laf é transmitida pelo psilídeo-africano-dos-citros *Trioza erytreae* (Del Guercio, 1918) (Hemiptera: Triozidae), que além de estar na África foi relatado também na Europa (Portugal e Espanha) (Cocuzza *et al*., 2016) e na Ásia (Iêmen e Arábia Saudita) (Bové, 1986). Essas informações são importantes pelo risco que poderia representar a dispersão desses vetores a outras regiões; somando se a isso à capacidade de *T. erytreae* de transmitir *C*Las e de *D. citri* transmitir *C*Laf (Capoor *et al*., 1967; Martinez & Wallace, 1967, Massonié *et al*., 1976; Lallemand *et al*.,1986; Nadarasah & Stavrinides, 2011). Além disso, a bactéria foi detectada em outras espécies de psilídeos em hospedeiros cítricos: por exemplo, Cen *et al*. (2012a) detectaram *C*Las em imaturos de *Cacopsylla citrisuga* (Yang & Li, 1984) (Hemiptera: Psyllidae) em plantas de *Citrus limon* L. na China. Enquanto que, Donovan *et al*. (2012) detectaram *C*Las em indivíduos de *Diaphorina communis* (Mathur, 1975) (Hemiptera: Liviidae) no Butão, sul da Ásia. Não obstante, em nenhum dos dois casos, onde foi detectada a bactéria no vetor, foi testada a capacidade de transmissão desses insetos.

A dinâmica biológica e epidemiológica do HLB é complexa. A interação bactéria-vetor é do tipo persistente propagativa (Inoue *et al*., 2009; Ammar *et al*., 2011a,b; Canale *et al*. 2017). No caso de adultos de *D. citri*, a aquisição da bactéria a partir do acesso à planta infectada pode ocorrer entre 15 a 30 min (Capoor *et al*., 1967) ou mínimo 5 horas (Xu *et al*., 1988). Mas também pode ser adquirida por imaturos de terceiro, quarto e quinto ínstar por meio da alimentação, podendo ser transmitida a outras plantas posterior à emergência do adulto (Capoor *et al*., 1974; Xu *et al*.,1988; Canale *et al*., 2017). Após a aquisição, a colonização sistêmica transcorre no canal alimentar, câmara filtro, túbulos de Malpighi, hemolinfa, músculos, tecidos graxos, ovários e glândulas salivares (Raychaudhuri *et al*., 1972; Ammar *et al*., 2011a,b). A multiplicação de *C*Las foi identificada inicialmente devido à maior concentração da bactéria em imaturos de quinto ínstar e adultos do que nos primeiros estádios dos imaturos (Hung *et al*., 2004). Posteriormente, Inoue *et al*. (2009) encontraram maior concentração de *C*Las em *D. citri* após vários dias da aquisição. Recentemente, Gill *et al*. (2016) elucidaram que *C*Las se multiplica na hemolinfa de *D. citri*, sendo inoculada posteriormente a outras plantas via saliva (Hibino *et al*., 1971; Chen *et al*., 1973; Hung *et al*., 2004).

Epidemiologicamente, o HLB é uma doença policíclica com disseminação primária continua (Bergamin-Filho *et al*., 2016), indicando que a fonte de inóculo que causa as infecções é produzida durante a epidemia e não precisa inóculo primário de fontes externas (doença policíclica), embora ocorra continuamente um processo no qual a infecção é causada a partir de um inóculo primário externo (disseminação primária) (Butt & Royle, 1980; Bergamin-Filho *et al*., 2016). A disseminação primária continua é justamente a característica da doença que representa maiores limitações no manejo, já que convergem vários fatores que condicionam a complexa dinâmica espaço-temporal do HLB (Gottwald *et al*., 2007).

A dinâmica temporal e espacial do HLB, foi estudada primeiramente na Ilha da Reunião (Gottwald *et al*., 1989), China e Filipinas (Gottwald *et al*., 1991), sendo que nos últimos anos vários aspectos epidemiológicos do HLB foram elucidados, principalmente em São Paulo e na Flórida (Halbert, 2005; Bassanezi *et al*., 2005; Gottwald *et al*., 2007, Gottwald *et al*., 2008a,b; Bassanezi *et al*., 2010). A disseminação global do HLB foi associada principalmente ao transporte de material vegetal infectado (Bergamin-Filho *et al*., 2016), enquanto que a disseminação regional e local do HLB foi atribuída principalmente ao sucesso na dispersão de adultos bacterilíferos do vetor, resultando em alta disseminação da bactéria (Martini *et al*., 2015; Bergamin-Filho *et al*., 2016).

A movimentação de *D. citri* ocorre constantemente entre pomares de citros e/ou hospedeiros alternativos a curtas e longas distâncias (Gottwald *et al*., 2010b). A movimentação a curtas distâncias pode ser ativa por voos voluntários e a longas distâncias acredita-se que ocorre de forma passiva mediante o transporte assistido por massas de ar (Bassanezi *et al*., 2010). Evidências de movimentação a longas distâncias de *D. citri* foram relatadas por Gottwald *et al*. (2010a) na análise da disseminação inicial do HLB na Flórida, uma vez que a distância entre as áreas infectadas e os pomares comerciais era de aproximadamente 88 km. Utilizando-se modelo estocástico da dinâmica espaço-temporal, Gottwald *et al*. (2010b) demonstraram que a movimentação de *D. citri* pode ser em média 1,6 km até 3,5 km, mediante a validação da relação continua entre plantas com HLB e as distâncias de movimentação de *D. citri*, sugerindo dispersão regional do vetor. Por outro lado, na disseminação regional do HLB o 'efeito de borda' é uma característica epidemiológica recorrente, pelo fato de que a borda dos pomares está sujeita a constantes re-infestações de insetos bacterilíferos, constituindo um reflexo claro da disseminação primária, com múltiplos relatos na Flórida e São Paulo (Gottwald *et al*., 2010a).

Existem algumas evidências de dispersão de psilídeos a curtas e longas distâncias, ativa ou passivamente, sendo que na maioria dos casos é assistida pelo vento (Hodkinson, 2009). Segundo Hodkinson e Casson (2000), a dispersão efetiva dos psilídeos é um fator evolutivo essencial independentemente do habitat. Por exemplo, a dispersão tem sido estudada nos gêneros *Cardiaspina* (Crawford, 1911), *Ctenarytaina* (Ferris & Klyver, 1932), *Eucalyptolyma* (Froggatt, 1901), *Cacopsylla* (Ossiannilsson, 1970) e *Bactericera* (Puton, 1876) (Hodkinson, 2009). No entanto, para os estudos da dispersão de Psylloidea é fundamental a seleção dos métodos de monitoramento de acordo com os propósitos, podendo-se objetivar em evidências circunstanciais ou não. Nesse sentido têm sido frequentemente usadas armadilhas atrativas, armadilhas de interceptação, marcadores naturais, artificiais e moleculares, entre outros (Reynolds *et al*., 2006). Além disso, compreender as dinâmicas físicas e químicas envolvidas no fenômeno da dispersão é muito importante: por exemplo, a difusão atmosférica é um fator chave para o entendimento da dispersão de insetos, já que depende essencialmente de gradientes de temperatura e vento que mudam vertical e horizontalmente com o tempo (McLean *et al*., 1986).

Estudos de diversos aspectos envolvidos na dinâmica espaço-temporal do HLB são fundamentais para compreender a epidemiologia da doença. O aprimoramento destes estudos é essencial na atualidade, já que a incidência do HLB está aumentando: por exemplo, no

cinturão citrícola do Brasil a incidência incrementou em 8.5% de 2017 a 2018, sendo atualmente 18.2% (Fundecitrus, 2018).

Nesta pesquisa, objetivando-se compreender processos envolvidos na disseminação primária do HLB, realizou-se a análise de possíveis padrões de movimentação de *D. citri* no espaço e no tempo, por meio de coletas a diferentes alturas, na vegetação hospedeira do vetor e na vegetação espontânea. A pesquisa orientou-se principalmente ao monitoramento de *D. citri* em áreas adjacentes de pomares comerciais de citros em duas áreas citrícolas de São Paulo, que apresentam diferentes contextos de disseminação primária do HLB. Nas coletas foram também identificados e contabilizados os indivíduos de outras espécies de Psylloidea, que poderiam fornecer informações importantes para compreender a dispersão de *D. citri* na complexa dinâmica espaço-temporal do HLB, tanto em diferentes alturas de monitoramento como em plantas hospedeiras de *D. citri*. Ademais, procurou-se avaliar a infecção natural por *C*Las em indivíduos de *D. citri* e de diferentes espécies de Psylloidea que foram predominantes nas coletas.

Como o transporte passivo de insetos vetores por meio de massas de ar requer métodos de monitoramento adequados para evitar super ou subestimativas da densidade das populações em estudo, no presente trabalho foram avaliados diferentes métodos de monitoramento em diferentes alturas e em plantas hospedeiras de *D. citri*. Este monitoramento visou a compreensão de processos complexos relacionados com a dispersão, considerando fundamentalmente que a dispersão inclui processos associados tanto com a difusão atmosférica como com o transporte (McLean *et al*., 1986).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. HLB

2.1.1. Contexto histórico

O Huanglongbing (HLB) é uma das doenças mais antigas que afetam os citros, com relatos desde o século XVIII, embora na atualidade seja emergente na América do Sul, Central e Norte (Santivañez *et al*., 2013). Os primeiros relatos do HLB foram de Lin Kung Hsiang, que realizou um extenso trabalho da doença no sudeste da China desde 1941 até 1955, relatando que a doença era conhecida desde 1870 (Bové, 2006). Mas, de acordo com análises geográficos, a disseminação e a especiação dos agentes etiológicos e vetores do HLB, é sugerido que a doença é de origem gondwânica (Bové, 2014).

A doença tem sido denominada de diferentes formas segundo as áreas e no transcorrer do tempo (Bové, 2006). Em 1919 na China, foi reconhecida como "*yellow shoot*", enquanto que em 1921 nas Filipinas foi conhecida como "*mottle leaf*", sendo relacionada com deficiências de zinco; foi também denominada "*Citrus dieback*" na Índia, "*vein phloem degeneration*" na Indonésia e "*Greening*" na África do Sul. Em 1943 em Taiwan foi denominada "*likubin*". Já em Chaozhou e outras áreas da China foi denominada "Huang long bing", doença do dragão amarelo ou broto amarelo (Bové, 2006). Finalmente em 1995 foi aceito o nome Huanglongbing (HLB) na Conferência da Organização Fuzhou, de acordo com a proposta da Organização Internacional de Virologistas de *Citrus* (IOCV) (Bové, 2006; Gottwald, 2007).

Em 1956, Lin Hsiang demonstrou que HLB era transmissível por enxertia, evidenciando um agente causal biótico (Bové, 2006). Posteriormente, McClean e Oberholzer (1965) confirmaram a transmissão via enxertia e demonstraram a transmissão por meio de um vetor, o psilídeo *T. erytreae*. Em 1967, nas Filipinas, demonstrou-se a transmissão por outro psilídeo *D. citri* (Martinez & Wallace, 1967), além de outro relato similar da Índia no mesmo ano (Bové, 2006). Sucessivamente, Schneider (1968) encontrou desordens histológicas, como partes de floema necrótico dispersos no sistema vascular de folhas maduras e acumulação massiva de amido nos vasos floemáticos, impedindo a translocação da seiva, convertendo-se posteriormente em tecidos necrosados.

Inicialmente o HLB foi relacionado a vírus, diagnóstico baseado só na sintomatologia das plantas (*dieback*). Na década de 1970, a doença foi associada a diferentes procariotos, tais como micoplasma e espiroplasma (*Spiroplasma citri*) (Bové, 2006). No

entanto, a partir de estudos por microscopia eletrônica, verificou-se que o suposto agente causal era uma bactéria gram-negativa, restrita aos vasos floemáticos e provida de parede celular (Garnier *et al*., 1984), contudo o diagnóstico foi baseado apenas em evidências indiretas da associação, já que não foram preenchidos os postulados de Koch devido à impossibilidade de isolamento e cultivo da bactéria (Bové, 2006).

2.1.2. Agentes etiológicos

O HLB está associado com agentes causais de diferentes espécies de α-proteobactérias do gênero '*Candidatus* Liberibacter'. Este gênero, '*Candidatus* Liberibacter' pertence à subdivisão α2-proteobacteria da família Rhizobiaceae, da Ordem Rhizobiales (NCBI, 2018). '*Candidatus* Liberibacter' apresenta grande distância filogenética comparado com outros gêneros da família Rhizobiaceae, sendo interpretado como separação antecipada ou como o evento resultante de pressão de seleção (Nelson *et al*., 2013). Assim, Teixeira *et al*. (2008a) e Nelson *et al*. (2013) sugeriram que as espécies de '*Candidatus* Liberibacter' tem origem no período Pangeano, através de estudos que relacionam a movimentação das placas tectônicas e a filogenia, visando a origem geográfica e genética comum.

Dentro do gênero '*Candidatus* Liberibacter' foram descritas três espécies como agentes etiológicos do HLB, *Candidatus* Liberibacter africanus (*C*Laf), *Ca*. L. americanus (*C*Lam) e *Ca*. L. asiaticus (*C*Las). No entanto, outras espécies do gênero foram associadas com doenças em outros hospedeiros. Um exemplo é a bactéria *Ca*. L. solanacearum (*C*Lsol) (syn. *Ca*. L. psyllaurous), associada a doenças em Solanaceae e Apiaceae e transmitida por *Bactericera cockerelli* (Šulc, 1909), *B. trigonica* (Hodkinson, 1981) e *Trioza apicalis* (Foerster, 1848) (Alfaro-Fernández *et al*., 2012a,b; Munyaneza *et al*., 2010). Outra espécie do gênero '*Candidatus* Liberibacter', denominada *Ca*. L. europaeus (*C*Leu), é transmitida por *Cacopsylla pyri* (Linné, 1758) em plantas de *Pyrus communis* L., mas não causa sintomas de doença nessa planta hospedeira, sendo categorizada como endofítico (Raddadi *et al*., 2011). Assim como também, nenhum de três hospedeiros alternativos de oito espécies de *Cacopsylla* (Ossiannilsson, 1970) demonstraram sintomas de doença associada a *C*Leu (Camerota *et al*., 2012). Sucessivamente, plantas de *Cytisus scoparius* L. foram encontradas com sintomas associados a *C*Leu, as quais estavam infestadas com *Arytainilla spartiophila* (Foerster, 1848) (Thompson *et al*., 2013). Outras espécies de bactérias relacionadas, como *Liberibacter crescens* (*C*Lcre) (Leonard *et al*., 2012, Fagen *et al*., 2014) e *Ca*. L. brunswickensis (Morris *et al*., 2017) foram descritas como endofíticas.

Com relação a aspectos filogenéticos, Nelson *et al*. (2013) relataram que *C*Las tem relação genética mais próxima com *C*Laf, e *C*Leu apresenta maior proximidade com *C*Lam. Contudo, a partir de comparações genômicas entre similaridade de sequências gênicas e estrutura genômica, *C*Lam é mais próxima de *C*Lsol (Lin *et al*., 2013) que de CLas (Duan *et al*., 2009). Curiosamente, Wulff *et al*., (2014) encontraram que de 658 genes sequenciados para *Liberibacter* spp., só oito foram comuns para *C*Las e *C*Lam mas não foram encontrados em *C*Lsol. Cronologicamente, *C*Las foi separado de um antecessor comum de outras espécies associados ao HLB cerca de mais de 300 milhões de anos (m.a.). A especiação estimada através da técnica do relógio molecular conduziu só a três espécies associadas com o HLB, indicando separação de *C*Laf e *C*Las em 147 m.a. e a separação de *C*Lam do antecessor comum de *C*Laf e *C*Las em 309 m.a. (Teixeira *et al*., 2008a).

De acordo com a sensibilidade à temperatura *C*Laf e *C*Las podem ser caracterizadas diferencialmente, confirmado através de estudos serológicos, hibridizações de DNA e propriedades genômicas (Bové, 2014). A espécie *C*Laf é restrita ao continente africano, ocorrendo em áreas frias (inferiores a 25 °C), sendo que a bactéria e o vetor (*T. erytreae*) não se encontram em altitudes inferiores de 600 a 700 m. Contrariamente, *C*Las se desenvolve em áreas com temperaturas altas (acima de 30 °C) e altitudes baixas (Bové, 2006). Assim, posterior a várias observações de campo e experimentos em laboratório, Catling (1969) observou que *C*Laf é '*heat-sensitive*' e *C*Las é '*heat-tolerant*', assim como os seus vetores, *T. erytreae* e *D. citri*, respectivamente (Bové, 2006; Lopes *et al*., 2009). A anterior descrição permite inferir prováveis processos de co-adaptação entre as bactérias fitopatogênicas e seus vetores, embora tenha sido demostrado experimentalmente que os dois vetores podem transmitir as duas espécies de bactéria (Massonié *et al*., 1976; Lallemand *et al*., 1986).

As diferentes espécies de bactérias apresentam distribuição geográfica mundial convergente/divergente de acordo com o vetor associado e as condições climáticas (Haapalainen, 2014; Bové, 2014). Por exemplo, *C*Laf está presente na África em mais de 13 países e está dispersa em Santa Helena com distribuição restrita na África do sul, Tanzânia e Zimbábue e na Ásia foi reportada em Arábia Saudita e Iêmen (EPPO, 2018). Embora, *C*Las apresenta maior distribuição intercontinental, estando reportada na América (Argentina, Barbados, Belize, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Cuba, Dominica, Republica Dominicana, Guatemala, Honduras, Jamaica, Martinique, México, Nicarágua, Panamá, Paraguai, Puerto Rico, Trinidad y Tobago, Venezuela e USA), na Ásia (Índia, Indonésia, Nepal, Filipinas, Taiwan, Irão, Japão, Malásia, Vietnam, Iemen, Bangladesh, Butão, China, East Timor e aproximadamente mais 6 países), na África (Mauritios, Reunion e Etiopia) e na Oceania

(Papua Nova Guiné). No entanto, a espécie *C*Lam é restrita ao Brasil, embora teve um relato isolado de *C*Lam em adultos de *D. citri* em 2013, nas áreas de Ouachitas em Arkansas e Oklahoma e em Appalachians na Georgia e Alabama, nos EUA (Nelson *et al*., 2013).

Em 2004, foi detectada no Brasil a presença de *C*Las em árvores cítricas através da detecção por PCR de folhas sintomáticas de citros (Colletta-Filho *et al*., 2004), usando 16S rDNA (Jagoueix *et al*., 1997). No entanto, a disseminação de *C*Lam no Brasil foi rápida no início, sendo que a finais de 2004 foi detectada em 46 municípios de SP e após um ano foi detectada em 79 municípios, sendo detectada tanto em plantas como em adultos de *D. citri* (Teixeira *et al*., 2005b). Biologicamente, *C*Lam compartilha características próprias do gênero '*Candidatus* Liberibacter', como a transmissão por enxertia e mediado por inseto vetor além da restrição ao floema (Bové, 2006; Tanaka *et al*., 2007).

2.1.3. Relação do HLB com plantas hospedeiras

O HLB afeta as espécies de *Citrus* de maior importância econômica, tais como laranja doce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), tangerina (*C. reticulata* (L.) Osbeck), limão (*C. limon* L.), pomelo (*C. máxima* L.) e toranja (*C. paradisi* L.) (Haapalainen, 2014). Outras plantas hospedeiras de *C*Las têm sido relatadas, como *Cleome rutidosperma* D.C., *Pisonia aculeate* L., *Trichostigma octandrum* L. (Brown *et al*., 2011), *Murraya paniculata* L. Jack (Damsteegt *et al*., 2010), *Clausena lansium* Skeels (Deng *et al*., 2007), *Severinia buxifolia* Poir (Hung *et al*., 2001), *Limonia acidissima* L. (Hung *et al*., 2000), *Vepris lanceolata* Lam. (Korsten *et al*., 1996). No Brasil, *M. paniculata* é uma espécie hospedeira relevante tanto de *D. citri* (Aubert, 1987), como de *C*Las (Lopes *et al*., 2006) e *C*Lam (Lopes *et al*., 2005). Curiosamente, Walter *et al*. (2012) encontraram que a concentração de *C*Las em *M. paniculata* é aproximadamente quatro vezes menor comparado com a concentração de CLas em *C. sinensis*.

Os agentes etiológicos associados ao HLB, sendo restritos ao floema, causam mudanças anatômicas e bioquímicas na planta. Anatomicamente, *C*Las causa perturbação no floema, causando acumulação de sacarose e amido assim como bloqueio dos poros de plasmodesmas por deposição de calose (Koh *et al*., 2012). Bioquimicamente, *C*Las induz modificações nos perfis proteômicos e no status nutricional, sendo diferente também entre plantas sintomáticas e assintomáticas (Nwugo *et al*., 2013). A bactéria exerce alterações na fotossínteses/assimilação de CO2, homeostases redox, regulação de sínteses de proteínas, chaperonas e no metabolismo da energia da planta (Nwugo *et al*., 2013), o qual causa

concentrações diferenciais de aminoácidos livres e açúcares, por exemplo (Kim *et al*., 2009). Além disso, *C*Las muda a emissão de voláteis, induzindo por exemplo a produção de metil-salicilato como feromônio mímico derivado de psilídeos (Killiny & Jones, 2017).

Os sintomas nas plantas são muitas vezes confundidos com outros agentes, porém as vezes é difícil fazer o diagnóstico do HLB a partir de sintomas, uma vez que a visibilidade dos sintomas dependem do período de incubação, condições ambientais, idade da planta, espécies ou cultivares, manejo agronômico, etc. (McClean & Oberholzer, 1965; Zhao, 1981; Aubert, 1987; Gottwald *et al*., 1989). Além disso, a infecção sistêmica incompleta ou diferentes concentrações da bactéria na planta hospedeira, podem dificultar o diagnóstico preciso do HLB (Zhang, 1981; Aubert, 1992; Garnier *et al*., 2000). No entanto, existem alguns sintomas característicos do HLB sobre os hospedeiros (Gottwald *et al*., 2007), mesmo que nem sempre todos estão simultaneamente (Bové, 2006). Após o período de incubação do patógeno na planta, usualmente a planta infectada desenvolve um o mais brotos amarelos e pode mostrar aparência setorizada na planta, devido a que alguns ramos podem ser assintomáticos (McClean & Schwarz, 1970). Nas folhas é evidente coloração irregular de verde e amarelo, sendo esta assimétrica tanto na face abaxial quanto na face adaxial (Bové, 2006). As folhas podem apresentar textura mais grossa com nervuras maiores e em etapas avançadas da doença podem aparecer sintomas de deficiência de zinco, com posterior queda da folha e morte do ramo (Gottwald *et al*., 2007). Os frutos das plantas com HLB são pequenos, assimétricos, com eixo central deslocado, apresentando mudança dos padrões de cor (inversão da coloração) e aborto de sementes (Bové, 2006).

2.1.4. Relação do HLB e o vetor

O inseto vetor estabelece com a bactéria uma relação do tipo persistente propagativa (Inoue *et al*., 2009; Pelz-Stelinski *et al*., 2010; Ammar *et al*., 2011a,b; Canale *et al*., 2017). Para adultos de *D. citri* as informações a respeito do período de acesso à aquisição (PAA) são contraditórias, segundo Capoor *et al*. (1967) os insetos podem adquirir *C*Las com um PAA mínimo de entre 15 a 30 min, já Van den Berg *et al*. (1992) relata que o PAA mínimo é de 5 horas. A bactéria pode ser adquirida por imaturos de terceiro, quarto e quinto ínstar por meio da alimentação e posteriormente à emergência do adulto a bactéria pode ser inoculada a outras plantas (Capoor *et al*., 1974; Xu *et al*., 1988; Canale *et al*., 2017), neste caso a aquisição é mais eficiente, em tempo e taxa, que em adultos (Pelz-Stelinski *et al*., 2010). Embora, nesse processo a eficiência da aquisição depende de vários fatores, além da idade do inseto, entre os

principais; PAA, comportamento alimentar, status nutricional da planta, local de alimentação na planta e concentração da bactéria na planta fonte (Folimonova & Achor, 2010; Pelz-Stelinski *et al*., 2010; Ammar *et al*., 2011 a,b; Cen *et al*., 2012b; Coletta-Filho *et al*., 2014).

A eficiência na transmissão de *C*Las por *D. citri* pode estar influenciada por fatores diferentes aos relatados na eficiência na aquisição. Acredita-se que a colonização da bactéria no inseto e a propagação em alguns orgãos internos são chaves para a transmissão a plantas sadias (Ammar *et al*., 2011 a,b). A colonização do vetor pela bactéria *C*Las foi observada nas glândulas salivares, no canal alimentar, câmara filtro, túbulos de Malphigi, hemolinfa, músculos, tecidos graxos e ovários de *D. citri*. (Ammar *et al*., 2011a). No entanto, o título bacteriano observado nas glândulas salivares foi menor com respeito ao resto do corpo (Ammar *et al*., 2011b). Portanto, supõe-se que as glândulas salivares constituem uma barreira para a bactéria (Ammar *et al*., 2011a, b), sendo refletido na baixa eficiência de transmissão do vetor, já que a proporção de transmissão de *C*Las mediada por *D. citri* pode ser de 4 a 10% (Pelz-Stelinski *et al*., 2010). No entanto, a eficiência da transmissão é diferente quando a bactéria é adquirida no estádio ninfal ou adulto, sendo mais eficiente quando é adquirida por imaturos (Inoue *et al*., 2009). Por exemplo, Canale *et al*., (2017) encontraram que a taxa de transmissão era 4.4 vezes menor quando *C*Las foi adquirido por adultos.

Para a transmissão é requerido um período durante o qual o inseto pode inocular a bactéria após a aquisição, denominado período de latência (Purcell, 1982). O período de latência de *C*Las em *D. citri*, tem sido inconsistente segundo vários estudos, pudendo variar desde 1 a 25 dias (Capoor *et al*., 1974; Da Graça, 1991; Xu *et al*., 1988, Canale *et al*., 2017). Acredita-se que durante esse período, a bactéria coloniza os diversos orgãos e se multiplica nas glândulas salivares (Ammar *et al*., 2011b, 2016) e na hemolinfa (Gill *et al*., 2016), sendo posteriormente inoculada via saliva durante o processo de alimentação (Hibino *et al*., 1971; Chen *et al*., 1973). Embora, a retenção da bactéria dentro do vetor a longo prazo ocorra, a transmissão de *C*Las pode ser interrumpida e a eficiência da transmissão pode decrescer no transcurso do tempo (Canale *et al*., 2017).

Por outro lado, considerando a relação de dependência da bactéria para sua disseminação mediada pelo vetor, é importante considerar também que *C*Las causa alterações no inseto vetor, tanto no *fitness*, susceptibilidade a inseticidas e no comportamento de voo, entre outras (Vyas *et al*., 2015; Pelz-Stelinski & Killiny, 2016). Em estudos que avaliaram o *fitness* de *D. citri C*Las+, observaram que o desenvolvimento das imaturos e a sobrevivência dos adultos foram menores, enquanto que a taxa reprodutiva da população e a fecundidade foi

maior, sugerindo possível co-evolução entre o fitopatógeno e seu vetor (Pelz-Stelinski & Killiny, 2016).

Ainda que as alterações indiretas induzidas por *C*Las sobre o comportamento de *D. citri* não sejam totalmente compreendidas, alguns autores descrevem a movimentação do vetor como uma das principais alterações, afetando seu deslocamento, a capacidade do voo e a atração sexual, sendo relacionados com estímulos químicos, biológicos e físicos específicos (Martini *et al*., 2015). Acredita-se que as alterações comportamentais do vetor estão associadas à modificação de processos metabólicos induzidos pela bactéria, como por exemplo a regulação coordenada de enzimas mediada por *C*Las, que sugere que a decomposição de compostos como os triglicerídeos e outros, podem entrar na glicólises ou no ciclo do ácido cítrico para a produção de energia, para atividades de alta demanda energética como locomoção e voo (Ramsey *et al*., 2015), sabendo que no voo os insetos, mobilizam, transportam e usam reserva de energia endógena em taxas muito altas (Van Der Horst, 2003). Por exemplo, foi encontrado que o macho se dispersa em distâncias curtas quando se alimenta de plantas com *C*Las e seu voo é iniciado mais cedo, com eventos de voo mais longos (Martini *et al*., 2015). No entanto, a movimentação dos machos é estimulada pelas fêmeas, enquanto que as fêmeas são atraídas por estímulos das plantas, tanto para alimentação como oviposição, ocorrendo diferenciação intraespecífica no deslocamento também pela densidade populacional (Moghbeli-Gharaei *et al*., 2014).

Em relação ao efeito de seleção hospedeiro mediado por *C*Las, Martini *et al*. (2015) relataram que tanto machos como fêmeas adultas de *D. citri* são inicialmente atraídos por plantas infectadas e posteriormente se movimentam a plantas sadias, iniciando a alimentação. Observou-se que adultos de *D. citri* apresentam maior preferência por folhas novas da porção superior da planta e pela nervura principal na face abaxial das folhas, adquirindo a bactéria com maior eficiência em folhas novas assintomáticas (Cen *et al*., 2012b). Em plantas moderadamente sintomáticas a duração no floema é aproximadamente 74% menor, diminuindo 8% em plantas com sintomas severos, mostrando alterações comportamentais segundo a severidade da doença (Cen *et al*., 2012b). Outra observação relevante feita por Martini *et al*. (2014) foi a associação entre a capacidade do voo diferencial com respeito ao morfotipo (segundo o cor do abdômen), indicando que o 32% dos adultos de *D. citri* com abdômen verde-azul apresentaram voos mais longos (maior de 60 s) comparados com o 5% dos indivíduos com abdômen cinza-marrom. A determinação de estes morfotipos diferentes pode ocorrer por plasticidade fenotípica, genética, fatores bióticos (como a qualidade do hospedeiro) ou competição intraespecífica (Wenninger *et al*., 2009).

2.1.5. Manejo do HLB

O HLB foi manejado inicialmente com antibióticos (injeções de bacteriostáticos, como a tetraciclina), mas foram rapidamente abandonados porque o controle não funcionava depois das aplicações (Bové, 2006). Após repetidas aplicações de inseticidas de origem químico, o vetor demonstrou resistência (Tiwari *et al*., 2010) além de causar efeitos deletérios em populações não alvo, como os próprios inimigos naturais do vetor, como *Tamarixia triozae* Burks, 1943 (Liu *et al*., 2012) como resultado do incremento de aplicações de inseticidas químicos (Rogers & Stansly, 2012). As podas também resultaram ineficazes para o manejo da doença (Lopes *et al*., 2007), portanto posteriormente foi proposto o manejo preventivo, medidas de quarentena, eliminação de plantas suscetíveis a Liberibactérias ou hospedeiras do inseto vetor, redução da população do inseto vetor (por meio de inseticidas e controle biológico) e plantio de mudas sadias produzidas em viveiros certificados (Fundecitrus, 2018).

O controle biológico tem sido reportado com sucesso, e inclui vespas parasitoides (Étienne *et al*., 2001), predadores como aranhas, sirfídeos, crisopídeos e coccinelídeos (Michaud, 2004). Os fungos entomopatogênicos também têm sido usados, mostrando ser uma ferramenta promissória no controle do vetor do HLB. Por exemplo, Gandarilla-Pacheco *et al*., (2013) encontraram que *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Isaria fumosorosea* (Wize.), infetaram com sucesso imaturos de *D. citri*. Outra alternativa visada foi a detecção de plantas resistentes, mas ainda não se conhecem plantas resistentes ao HLB (Belasque *et al*., 2010). No entanto, Albrecht e Bowman (2012), reportaram alguns híbridos de citros trifoliata usados como porta-enxerto tolerantes e moderadamente tolerantes a *C*Las.

Portanto, a implementação das diferentes alternativas de controle deve ser baseada no manejo integrado, incluindo uso razoável de inseticidas, conservação de inimigos naturais, liberações de parasitoides e remoção de plantas sintomáticas de HLB, sendo esta última estratégia pouco eficiente para deter a epidemia devido ao extenso período de latência na planta (Coletta-Filho *et al*., 2014). Ainda assim, as estratégias de manejo devem ser orientadas no possível à diminuição de inoculo primário e a restrição da dispersão do vetor. As estritas medidas de quarentena também representam relevância dentro do manejo do HLB, sendo medidas tomadas para evitar a dispersão internacional dos agentes etiológicos associados ou o vetor (Bové, 2006). Por exemplo, a EPPO (European Mediterranean Plant Protection Organization) declarou *D. citri* como praga quarentenária ausente da área EPPO categorizando na lista A1 em 1975 e *C*Laf, *C*Las e *C*Lam em 1984, ainda que também foram

nominadas como pragas quarentenárias pela CPPC (Caribbean Plant Protection Commission) e OIRSA (Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria) (EPPO, 2018).

2.2. Fatores epidemiológicos do HLB

Epidemiologicamente o HLB é progressivo categorizado como epidemia poliética, indicando que a epidemia aumenta em extensão necessitando anos para exibir aumento da incidência da doença (Amorim *et al*., 2016). O incremento em extensão e incidência do HLB tem sido amplamente relatado. No Brasil, por exemplo, a incidência em 2004 foi de 3.4% registrando presença em 35 municípios do cinturão citrícola e Triângulo/Sudoeste de Minas Gerais (Teixeira *et al*., 2005b), e em 2018 a incidência foi de 18.2%, ou seja, 35,3 milhões de árvores sintomáticas (Fundecitrus, 2018). No caso da Flórida, depois da detecção do HLB em 2005, a incidência aumentou de 42% em 2013 a mais de 90% na atualidade (USDA, 2018). Nesse sentido, a incidência do HLB pode atingir mais do 95% das árvores em um período de 10 anos de acordo com Gottwald *et al*. (1991), Bassanezi *et al*. (2006), Gottwald *et al*. (2007), Gottwald *et al*. (2008b) e Bassanezi *et al*. (2010).

Dentro da epidemiologia do HLB têm sido descritos dois padrões de disseminação dos agentes causais, podendo ser primária e secundária. A disseminação primária (ou aloinfecção) ocorre entre áreas diferentes (quando o patógeno é trazido de fontes externas de inoculo) e a disseminação secundária (ou autoinfecção) acontece pela movimentação de adultos bacterilíferos entre plantas da mesma área (Bergamin-Filho *et al*., 2016). No entanto, o HLB é categorizado como uma doença policíclica com disseminação primária continua, indicando que a fonte de inóculo que causa as infeções é produzida durante a epidemia e não precisa inóculo primário de fontes externas (doença policíclica), embora a doença atravessa continuamente um processo no qual a infecção é causada a partir de um inoculo primário externo (Bergamin-Filho *et al*., 2016). A partir da planta fonte do inoculo primário do HLB, seja planta sintomática ou assintomática, se produz a disseminação da doença mediada pela dispersão do vetor (Bassanezi *et al*., 2013b). Portanto, a dispersão do vetor é um fator chave na epidemiologia do HLB, podendo ocorrer em várias escalas espaciais e temporais.

A dinâmica espacial e temporal de *D. citri* tem sido amplamente estudada, sendo primariamente estudada na China, Ilha da Reunião (Gottwald *et al*., 2007) e recentemente no Brasil e na Flórida (Bassanezi *et al*., 2013a). A escala espacial, tem sido desenvolvidos estudos em vários níveis, tanto em árvores adjacentes, dentro de grupos de árvores e entre grupos de árvores por exemplo (Halberth & Manjunath, 2004), a partir do qual no Brasil têm

sido gerados cerca de 155 mapas revelando o incremento da população a escala espacial e temporal do HLB (Bassanezi *et al*., 2005).

Por exemplo, Boina *et al*. (2009) mostrou que os adultos de *D. citri* se movimentam de forma bi-direccional entre pomares manejados e abandonados, sendo maior a proporção de indivíduos se movimentando de pomares não manejados a pomares manejados convencionalmente, de acordo também com os resultados encontrados por Lewis-Rosenblum *et al*. (2015) e Gottwald *et al*. (2007). A movimentação de *D. citri* a curtas e longas distâncias foi estudado também por Gottwald *et al*. (2010b), e os resultados sugeriram que a disseminação da doença ocorre como uma combinação de transmissão através de inóculo primário e secundário, mesmo que não ocorra de forma simultânea podendo ser frequentemente de forma alternada, demostrado através da análise da dinâmica espaço-temporal do HLB por meio de vários modelos.

Outro fator epidemiológico recorrente, é o efeito de borda, referido à maior concentração de plantas com sintomas de HLB na periferia dos pomares cítricos a diferentes escalas espaciais e temporais (Gottwald *et al*., 2008b; Bassanezi *et al*., 2010; Sétamou & Bartels, 2015), o qual está relacionado com o comportamento de dispersão do vetor.

2.3. Migração/dispersão de Psylloidea

Semanticamente os conceitos relacionados com o comportamento de movimento de insetos em diferentes escalas têm sido amplamente discutidos e frequentemente confundidos, principalmente definições ecológicas e comportamentais como foi discutido por Silveira *et al*. (1976) e Kennedy (1985). As confusões semânticas têm origem principalmente na necessidade de classificação dos tipos de movimentação, que dependem principalmente da distância e a forma de deslocamento. Conceitos como dispersão, propagação, migração, têm sido amplamente propostos, definidos como: propagação como o deslocamento de indivíduos em um habitat sem adaptações específicas associadas; dispersão como movimentação a uma área diferente em procura de locais novos para sobrevivência e reprodução sendo que o voo é do tipo apetitivo, caracterizando-se por ser dependente de estímulos, não persistente e sem controle sobre a direção, enquanto que a migração foi definida como a movimentação para uma área favorável e com posterior retorno (Silveira *et al*., 1976).

Entretanto, Johnson (1969) definiu a migração como sinônimo de dispersão adaptativa, já que não é um fenômeno acidental, ocorrendo devido ao voo voluntário do inseto com direção controlada e voo migratório persistente independente de estímulos externos.

Segundo Kennedy (1985), o comportamento migratório persistente e direcionado ocorre por meio da locomoção do inseto ou mediado por algum veículo. Mas segundo Reynolds *et al*. (2006), a locomoção depende de algum tipo de inibição temporal de acordo com o voo normal o que por sua vez promove desinibição e recorrência eventual, sendo inibidas algumas respostas como a percepção de estímulos vegetativos. Contudo, evolutivamente a migração pode ser definida implicitamente como uma adaptação direcionada pela disponibilidade e alterações da localização dos recursos, sendo um processo comportamental dos indivíduos com consequências ecológicas na população (Kennedy, 1985). Por tanto, de acordo com Dingle e Drake (2007) a migração deve ser conceituada desde o mecanismo e a função, abordando aspetos dos indivíduos (fisiologia, comportamento e genética) e a população (ecologia e evolução).

A migração apresenta vários padrões segundo o organismo, espaço, tempo e meio. Segundo o organismo, a migração pode ser de tipo obrigatória (dependência), facultativa (em condições desfavoráveis), parcial (uma fração da população se movimenta e outra permanece em áreas de reprodução ou não reprodução) e diferencial (comportamento diferente entre idades e gênero). Segundo o espaço, pode ser de tipo '*to-and-fro*' no qual os movimentos ocorrem de áreas desfavoráveis a favoráveis, e outros tipos como '*round-trip*', '*loop*', '*one-way*' e altitudinal. Quanto ao tempo, a migração pode ser anual, estacional ou ocasional e irregular. Segundo o meio, pode ser mediante água (diadromica), vento ou outras formas (*drift*) (Dingle, 1996). Dessa forma, quando o voo migratório é assistido por um 'veículo' como o vento, o tipo de deslocação é denominado amplamente como 'embarcação ativa', termo usado extensamente para insetos que ascendem grandes distâncias desde a superfície da Terra (Dingle & Drake, 2007).

As fases da migração/dispersão são principalmente decolagem, transporte vertical e horizontal, descenso e voos pós-migratórios (Reynolds *et al*., 2006). Dentro do processo de movimentação de insetos é importante compreender que mesmo sendo movimentação acidental, o voo é iniciado ativamente e talvez mantido através de padrões de comportamento que ocorrem durante as diferentes fases da migração, dentro do ciclo de vida dos insetos (Dingle, 1996).

A decolagem dos insetos é principalmente influenciada por fatores ambientais, biológicos, etológicos e ecológicos, como fotoperíodo, temperatura, intensidade luminosa, qualidade do alimento, densidade local da população, etc. (Reynolds *et al*., 2006). Frequentemente o voo é iniciado quando os insetos têm a capacidade de voar, ou seja, após da emergência do adulto ou antes de atingirem a maturidade sexual (Johnson, 1969). Após a fase

inicial de decolagem ocorre à fase de transmigração, às vezes denominada como translocação vertical e horizontal. Espacialmente, na escala vertical a migração inicia na camada de ar onde a velocidade do vento é menor que a velocidade de voo do inseto, denominada *flight boundary layer* (Taylor, 1974).

A migração de insetos na maioria das vezes é restrita a 2 km desde o nível do solo, sendo voos altos até de 3 km em circunstâncias específicas, por exemplo em estações quentes no trópico (Reynolds *et al*., 2006). Desta forma, a amplitude da altitude coincide com a *atmospheric boundary layer* (ou *planetary boundary layer*) ou camada limite atmosférica, sendo de 1 até 2 km (Drake & Farrow, 1988), camada na qual as massas de ar são diretamente afetadas pela distribuição vertical da temperatura e vento, assim como também do relevo (McLean *et al*., 1986). Nessa camada as moléculas se movimentam a maior velocidade com respeito ao incremento da altura (McLean *et al*., 1986), sendo essa dinâmica diferente de acordo com a hora do dia (Reynolds *et al*., 2006). Por exemplo, em insetos que exibem migração crepuscular ingressam em uma camada limite atmosférica estável, mas os insetos migrantes no dia entram em uma condição instável devido ao fenômeno de convecção térmica (Drake & Farrow, 1988), compreendendo estabilidade atmosférica como ausência de turbulência e difusão de partículas (McLean *et al*., 1986). Dessa forma, dependendo da condição da camada limite atmosférica, as emigrações podem ser categorizadas como decolagem massal no crepúsculo, ao amanhecer ou durante o dia (Reynolds *et al*., 2006). Portanto, o momento da decolagem depende criticamente da condição da camada limite atmosférica, dentro da qual a dispersão é iniciada (Reynolds *et al*., 2006). Por exemplo, os insetos que emigram durante o dia podem utilizar as correntes convectivas das massas de ar para assistir o ascenso até a camada limite atmosférica (Reynolds *et al*., 2006). Contudo, a dispersão diurna é composta principalmente pelo transporte massal e a difusão turbulenta na atmosfera, o qual horizontalmente pode ocorrer a diferentes escalas, microescala (aproximadamente até 1 km), mesoescala (maior de 1 km até 100 km), e macroescala (1000 km) (McLean *et al*., 1986).

Posterior à fase de transmigração ocorre a fase de descenso e aterrissagem dentro da *flight boundary layer* ou camada limite de voo. Essas fases são as menos entendidas, já que não ocorrem de forma sincronizada, devido à distribuição altamente variável da duração de voo entre os indivíduos da população. Segundo dados de monitoramento com radares, a concentração de migrantes diminui gradualmente pudendo se dissipar eventualmente, presumivelmente porque alguns indivíduos caem durante o período da transmigração (Reynolds *et al*., 2006). Não obstante, sabe-se que essas fases podem ser influenciadas por

fatores relacionados com a reflectância na vegetação (Dingle, 1996; Kennedy, 1985), densidade e temperatura do ar (Drake & Farrow, 1988; Gatehouse, 1997), efeitos topográficos (Noda & Kiritani, 1989), entre outros.

A migração de insetos tem sido amplamente estudada em vetores de vírus, como mosca-branca, afídeos, mosquitos, mosca-negra, cigarrinhas e besouros (Reynolds *et al*., 2006), embora em muitos casos a informação tem sido incompleta ou baseada em suposições. Apesar disso, têm sido documentadas evidências de migrações assistidas pelo vento em diferentes ordens de insetos vetores de fitopatógenos, como o caso de Heteroptera (por exemplo, *Piesma quadratum* Fieber), Auchenorrhyncha (Cicadellidae, Delphacidae), Sternorrhyncha (Aleyrodidae, Aphididae e Pseudococcidae), Thysanoptera (Thripidae) e Coleoptera (Chrysomelidae, Curculionidae), detalhados por Reynolds *et al*. (2006). Pedgley (1999), por exemplo, apresentou 16 tipos de evidências circunstanciais que indicam movimentação de insetos a longas distâncias.

Existem algumas evidências de dispersão de psilídeos a distâncias curtas e longas, sendo que na maioria dos casos é assistida pelo vento. Segundo Hodkinson (2009) a dispersão efetiva é um fator chave dos psilídeos independentemente do habitat, o que permite aos psilídeos se movimentar entre diferentes hospedeiros ou explorar plantas não hospedeiras como sítios de hibernação, permitindo uma rota para diminuir a competição intraespecífica e ataques de inimigos naturais. Em geral, a dispersão foi relatada para os gêneros *Cardiaspina*, *Ctenarytaina*, *Eucalyptolyma*, *Psylla* s.l. e *Bactericera* (Hodkinson, 2009). Ainda sendo raro, já foram relatados casos de movimentação de psilídeos entre hospedeiros diferentes de acordo com as estações. Por exemplo, foi relatada a movimentação de *Bactericera crithmi* (Löw, 1877) de plantas de *Crithmum* sp. L. a plantas de *Ferula* sp. L. saindo no inverno e voltando na primavera (Mifsud, 1997) e *B. cockerelli* se movimentando de plantas de *Lycium* sp. no inverno a outras solanáceas em lugares mais quentes (Wallis, 1946), assim como também *T. apicalis* foi encontrada se movimentando até 1 km a outras plantas para hibernar (Kristoffersen & Anderbrant, 2007). *Cacopsylla melanoneura* (Foerster, 1848), *C. affinis* (Löw, 1880), *Bactericera albiventris* (Foerster, 1848) e *Trioza urticae* (Linné, 1758), foram encontradas hibernando em plantas de *Pinus* sp. L. a 13 km de distância da sua planta hospedeira mais próxima (Hodkinson, 1972, 1983).

Na dinâmica espaço-temporal de psilídeos, foi reportado por exemplo, o psilídeo *Boreioglycaspis melaleucae* Moore, 1964 se movimentando aproximadamente 10 km em um ano (Center *et al*., 2006). Outro caso muito conhecido é a dispersão em menos de dez anos de *Heteropsylla cubana* (Crawford, 1914) desde sua origem na América Central até Ásia,

Austrália e África (Hodkinson, 1988). Outro exemplo, foi o relato de *Limbopsylla laguncularíae* Brown & Hodkinson, 1988 se movimentando vários quilômetros no Panamá (Brown & Hodkinson, 1988). Por outro lado, foi relatado que espécies de psilídeos univoltinas se movimentam no período do outono e primavera, enquanto que nas espécies multivoltinas a dispersão oferece uma alternativa de exploração de hospedeiros alternos, podendo ocorrer indistintamente à estação do ano (Hodkinson, 2009).

No caso de *D. citri*, sabe-se que a habilidade de voo é limitada, sendo que a capacidade máxima de voo é de aproximadamente 1200 m, comprovada mediante experimentos em câmaras de voo (Arakawa & Miyamoto, 2007). Não obstante, a movimentação de *D. citri* assistida pelo vento foi confirmada por Kobori *et al*. (2011) e Boina *et al*. (2009), a distâncias maiores de 7,5 m e entre 60-100 m durante três dias. Sakamaki (2005) também propõe que a movimentação de *D. citri* seja assistida pelo vento, baseando-se na relação de caracteres morfológicos, como o tamanho da asa e o músculo alar do adulto.

De acordo com as diferentes fases da migração, são conhecidos alguns aspectos relacionados com a decolagem de *D. citri*, ainda que fatores relacionados com as fases subsequentes são pobremente compreendidos. Por exemplo, foram reportados alguns estímulos abióticos relacionados com decolagem de *D. citri* em plantas de *Citrus* spp., como a intensidade luminosa (Sétamou *et al*., 2012), pressão barométrica e temperatura (Martini & Stelinski, 2017; Tomaseto *et al*., 2017), umidade relativa (Hall & Hentz, 2011), além dos ritmos circadianos (Sétamou *et al*., 2012). Dentro dos fatores bióticos mais comumente relacionados com a decolagem se encontra a presença de brotos das plantas hospedeiras (Kobori *et al*., 2011) e outros discutidos amplamente por Martini & Stelinski (2017) e Tomaseto *et al*. (2017).

Por outro lado, sabe-se que *D. citri* tem capacidade de se dispersar durante o ano todo, só que a atividade é maior na primavera (Hall & Hentz, 2011). Enquanto à dinâmica de voo no dia, Sétamou *et al*. (2012) encontrou que a presença de *D. citri* é de três a quatro vezes maior no dia que na noite, com maior atividade das 12h até 15h. Não obstante, ainda são desconhecidos vários aspectos associados com a dispersão de *D. citri*, devendo ser realizados mais estudos que auxiliem a compreensão dos processos envolvidos nas diferentes fases da migração.

2.4. Taxonomia e bio-ecologia de Psylloidea

A classificação de Psylloidea é baseada em estudos cladísticos e fenéticos de características morfológicas de imaturos e adultos, mas também estudos moleculares têm apoiado a classificação (Thao *et al*., 2000; Ouvrard *et al*., 2002; Percy, 2003; Ouvrard *et al*., 2008), proporcionando suporte às ferramentas morfológicas tradicionais (Xiong *et al*., 2017). Não obstante, a escassez de sequências disponíveis impede maiores estudos evolutivos em Psylloidea (Xiong *et al*., 2017), sendo até agora sequenciado o mitogenoma completo de somente cinco espécies de psilídeos, *Cacopsylla coccinea* Kuwayama, 1908 (Que *et al*., 2015), *Pachypsylla venusta* Osten-Sacken, 1861 (Thao *et al*., 2004), *B. cockerelli* (Wu *et al*., 2016), *B. gobica* (Loginova, 1972) (Zhang *et al*., 2014) e *D. citri* (Xiong *et al*., 2017).

Interessantemente, Ouvrard *et al*. (2008) fizeram comparações entre padrões da base da articulação da asa em Psylloidea para estimar a significância filogenética de esse caracter taxonômico comparado com outros Paraneoptera. Dentro dos atributos descritos para a separação de Psylloidea, foram reportados dois processos autapomórficos dos escleritos basalares, ausência do processo notal mediano da asa, primeiro esclerito axilar em forma de vara, platô umeral fusionado com a base da nervura mediana subcostal, terceiro esclerito axilar pouco esclerotizado com dois braços, platô proximal médio vertical e platô distal médio dividido em dois platôs.

Segundo Ouvrard, (2018) Psylloidea tem 3.528 espécies descritas, 10 táxones intraespecíficos e 52 espécies extintas. Embora, segundo Mazzardo *et al*. (2017) não têm sido descritas nem a metade de espécies que se acredita que existem. O número de espécies de psilídeos reportados em alguns continentes e países foi relacionado com a área por Burckhardt e Queiroz (2012), os quais acreditam que pelo tamanho da área do Brasil, é provável que a fração dos psilídeos relatada até agora respresenta uma pequena fração da diversidade estimada, podendo ser de mais de 1000 espécies (Burckhardt & Queiroz, 2012).

Segundo os registros de Psylloidea no Brasil, existem 89 espécies de psilídeos no país (Burckhardt & Queiroz, 2012; Burckhardt & Queiroz, 2013; Burckhardt *et al*., 2013; Malenovský *et al*., 2015; Burckhardt & Queiroz, 2017; Burckhardt *et al*., 2017; Machado *et al*. 2017; Serbina & Burckhardt, 2017). Dos gêneros descritos, a metade são endémicos da área Neotropical e menos da terceira parte são restritos ao Novo Mundo (Burckhardt & Queiroz, 2012).

Por outro lado, a relação bio-ecológica dos psilídeos com as plantas é complexa. A designação de planta hospedeira de um inseto poder ser relativa do ponto de vista das interações estabelecidas, portanto é interessante a proposta semântica de Burckhardt *et al*. (2014), os quais propuseram usar o termo planta hospedeira sobre a qual as espécies de psilídeos conseguem desenvolver desde o estágio imaturo até o adulto e completar o ciclo de vida. Para outros tipos de hospedeiro foram propostos os termos *overwintering* ou *shelter plant* (quando o hospedeiro pode ser usado para hibernar e também para se alimentar), *food plant* (os adultos se alimentam mas não se reproduzem e não permanecem por muito tempo), *casual plant* (o inseto pode estar presente mas não se alimenta). Embora, algumas espécies de plantas hospedeiras de diferentes famílias botânicas têm sido relatadas como hospedeiras de psilídeos no Brasil. Por exemplo, os membros da família Psyllidae são geralmente monófagos de Fabaceae, Asteraceae ou Solanaceae. A família Triozidae tem relatada maior amplitude de hospedeiros, como por exemplo espécies de Myrtaceae, Bignoniaceae e Lauraceae. No caso de Aphalaridae as relações com os hospedeiros são pouco conhecidas, mas têm sido encontradas em Aquifoliaceae, Lauraceae, Anacardiaceae. As seis espécies de Calophyidae são restritas a Sapindales, já as espécies de Liviidae estão associadas com Anacardiaceae, Malvaceae, Melastomataceae, Myrtaceae ou Rutaceae. Das espécies de Carsidaridae só duas se desenvolvem em Malvales (Burckhardt & Queiroz, 2012). No entanto, existem algumas características das plantas hospedeiras por meio das quais os psilídeos direccionam a sua preferência, podendo ser a fenologia das espécies hospedeiras, quantidade de ceras na superfície foliar como no caso de *Glycaspis brimblecombei* (Baker, 1917), dureza física do broto terminal (em *Ctenarytaina thysanura* Ferris & Klyver, 1932), cor da folha (*Mesohomotoma tessmanni* Aulmann, 1912 e *G. brimblecombei*), presença de atraentes químicos como o cariofileno (*Heteropsylla cubana*) e concentrações de repelentes, como fenoles (*Cacopsylla pyricola* Foerster, 1848), terpenoides (*Boreioglycaspis melaleucae*) ou glucosinolatos (Hodkinson, 2009).

Referente às espécies de psilídeos introduzidas no Brasil, têm sido categorizadas em sua totalidade no status de pragas, segundo afirma Burckhardt e Queiroz (2012). Dentre dessas, espécies do gênero *Agonoscena* (*A. succincta* Heeger, 1855, praga de Sapindales), *Blastopsylla* (*B. occidentalis* Taylor, 1985, praga de Eucalypto), *Ctenarytaina* (*C. eucalypti* Maskell, 1890 e *C. spatulata* Taylor, 1967, pragas de Eucalypto), *Glycaspis* (*G. brimblecombei* praga de Eucalypto), *Heteropsylla* (*H. cubana*, praga de Fabaceae), *Platycorypha* (*P. nigrivirga* Burckhardt, 1987, praga de Fabaceae), *Russelliana* (*R. solanicola* Tuthill, 1959, praga de Solanaceae), *Trioza* (*T. alacris* Flor, 1861 praga de laurel) e

Diaphorina (*D. citri*, praga de Rutaceae). Dessas espécies introduzidas, quatro são provenientes da Austrália, duas da Europa, uma da Ásia e três de América do Sul (Burckhardt & Queiroz, 2012).

2.5. Taxonomia de *D. citri* e relação hospedeiros

D. citri pertence à família Liviidae, dentro da qual duas subfamílias são monofiléticas, Euphyllurinae e Liviinae. Atualmente, *D. citri* pertence à subfamilía Euphyllurinae, a qual tem quatro tribos reconhecidas: Diaphorinini, Euphyllurini, Pachypsylloidini e Strophingiini, no entanto ainda estão pobremente definidas e com dúvidas filogenéticas. Embora, o gênero *Diaphorina* tem sido classificado dentro da tribo Diaphorinini, com 75 espécies descritas (Ouvrard, 2018).

Dentro do gênero *Diaphorina*, tem sido relatadas sete espécies que têm como plantas hospedeiras espécies de *Citrus*; *D. amoena* (Capener, 1970), *D. auberti* (Hollis, 1987), *D. communis* (Mather, 1975), *D. punctulata* (Pettey, 1924), *D. zebrana* (Capener, 1970) e *D. citri*, descrita em 1908 no Shinchiku, Taiwan (Halberth & Manjunath, 2004). Dentro das plantas hospedeiras de *D. citri*, além de espécies de *Citrus*, têm sido descrita principalmente *Murraya paniculata* (Chakraborty *et al*., 1976; Tsai & Liu, 2000) e vários 'hospedeiros alternativos', como *Bergera koeniggi* L. e outras Rutaceae nativas (Sétamou *et al*., 2016). Encontrou-se também que *D. citri* tem a capacidade de se reproduzir e se alimentar em plantas de *Choisya ternata* Kunth, *C. arizonica* Standl., *Helietta parvifolia* Benth (Sétamou *et al*., 2016) e *H. apiculata* Benth (Seraphim *et al*., 2017) mas sobre *Amyris madrensis* S. Watson, *A. texana* Buckley e *Zanthoxylum fagara* (L.) Sarg., os adultos conseguiram ovipositar mas não foi evidenciado o desenvolvimento das imaturos. Já no caso de *Esenbeckia berlandieri* (Baill), *Ptelea trifoliata* (Wafer Ash) e *Casimiroa* sp., os adultos de *D. citri* conseguiram sobreviver mas não se reproduzir (Sétamou *et al*., 2016). Embora, além do gênero *Diaphorina*, foram encontradas outras espécies de psilídeos em citros, *Mesohomotoma lutheri* (Enderlein, 1918), *Cacopsylla citricola* (Yang & Li, 1984), C. *citrisuga*, *C. murrayi* (Mathur, 1975), *Trioza citroimpura* (Yang & Li, 1984), *T. erytreae* e *T. litseae* (Bordage, 1898) (Halberth & Manjunath, 2004).

2.6. Métodos de amostragem aéreos

Para o monitoramento da migração de insetos vetores, têm sido amplamente usados métodos de amostragem aéreos, observações diretas em campo, armadilhas terrestres (sucção, luminosas, entre outras), marcadores naturais, artificiais e moleculares e sensores remotos (principalmente radares entomológicos), em combinação com estudos fisiológicos, análises de trajetória, modelos estocásticos, entre outros (Reynolds *et al*., 1997; Osborne *et al*., 2002; Reynolds *et al*., 2006; Gottwald *et al*., 2010b).

A amostragem aérea tem sido baseada principalmente em redes acopladas a aeronaves (com piloto convencional ou com controle remoto). Este método tem as vantagens de amostrar volumes relativamente grandes e funcionar a diferentes alturas e não ser influenciado pela velocidade do vento (Reynolds *et al*., 2006). Outro método amplamente usado para o monitoramento de insetos em altura, são as armadilhas de sucção, como as que foram usadas por Rothamsted Insect Survey em 1960 para monitorar afídeos vetores a 12 m (Woiwod & Harrington, 1994). No caso dos radares, é vantajoso o uso para monitorar insetos que voam em diferentes alturas já que podem ser obtidas informações relacionadas com tempo, altitude, densidade e direção de voo dos insetos migrantes (Chapman *et al*., 2003).

Os marcadores artificiais como corantes, tintas, materiais fluorescentes, radioisótopos, etc, têm sido amplamente usados para estudos de trajetórias e modelos de dispersão a distâncias curtas e até poucos quilômetros (Akey, 1991; Reynolds *et al*., 1997; Southwood & Henderson, 2000). Mas também têm sido usados marcadores naturais, como pólen, ácaros foréticos e conteúdos intestinais, entre outros (Reynolds *et al*., 1997). No caso dos marcadores moleculares, tem sido relatado principalmente o uso de alozimas e marcadores baseados no DNA nuclear e/ou mitocondrial (microsatelites, RAPDs, AFLPs) (Reynolds *et al*., 2006). Enquanto a estudos direcionados à capacidade relativa de voo, fatores que influenciam o voo, força de voo, frequência de batidas, por exemplo, têm sido usadas amplamente as câmaras de voo e moinhos de voo (*flight mill*) como uma alternativa de simulação da realidade (Dickinson & Lighton, 1995).

Os diversos métodos de monitoramento de insetos vetores proporcionam informação diferente. Portanto, os métodos usados para monitoramento dependem dos objetivos da área abordada, ainda que todos apresentam diferentes vantagens e desvantagens como foi discutido amplamente por Reynolds *et al*. (2006). Nesse sentido, é chave a seleção do método de monitoramento, seja para a compreensão de fenômenos envolvidos com a migração ou conhecimento aplicado, como epidemiologia de doenças.

Hall *et al*. (2010) analisaram a captura de *D. citri* em seis tipos de armadilhas segundo a longitude de onda e o material adesivo, sendo três de cor amarelo brilhante para o olho humano (variando em intensidade), uma de cor lima-verde, e uma de cor amarelo-verde fluorescente. A partir do qual encontrou menores capturas nas armadilhas verdes do que nas amarelas, nas diferentes medições com reflectância espectral, sem diferenças em relação ao material do adesivo. Em outra comparação, foi observado que a quantidade de adultos de *D.citri* coletados foi significativamente maior nas armadilhas adesivas amarelas comparado com armadilhas *Multi-Lure* e armadilhas *CC* (com cobertas plásticas de cores vermelho, azul, preto e verde escuro), durante todo o tempo de monitoramento (Hall *et al*., 2007). Portanto, as armadilhas adesivas amarelas têm sido usadas para monitoramento de diferentes insetos devido à atração, e especificamente para o monitoramento de *D. citri*, têm sido usadas amplamente, já que o psilídeo é altamente atraído pela reflectância das ondas de luz de cor amarela, que curiosamente corresponde à cor das plantas com sintomas (Gottwald *et al*., 2007).

Segundo Aubert & Quilici (1988) e Aubert & Hua (1990) as armadilhas adesivas podem ser usadas para detectar e estimar a abundância relativa de *D. citri*, como afirmaram também Flores *et al*. (2009) em estudos da abundância de *D. citri* em pomares de citros na Flórida, Puerto Rico e Texas. No entanto, Aubert & Hua (1990) encontraram que as armadilhas de cor marrom-amarela são mais eficientes quando o dia está nublado, enquanto que as amarelas brilhantes funcionaram melhor em condição de poucas nuvens. Contudo, de acordo com Hall & Hentz (2010) as armadilhas adesivas amarelas podem ser usadas para detectar e monitorar infestações de *D. citri* em *Citrus* spp., concordando com Aubert & Quilici (1988), Aubert & Hua (1990) e Flores *et al*. (2009).

Por outro lado, o início da utilização de armadilhas de sucção foi particularmente associado com a Rothamsted Experimental Station, Harpenden, UK, em 1940, devido ao interesse em métodos de monitoramento e amostragem não atrativos das populações de insetos com voo ativo (Reynolds *et al*., 2006). Posteriormente, as armadilhas de sucção foram amplamente utilizadas e modificadas, principalmente por Ark e Pienasl' (1970), Palmer (1972), Takagi (1978), Wainhouse (1980), Goodenough et a1. (1983), Bidlingmayer e Evans (1985), Kimsey e Brittnacher (1985) e Taubert e Hertl (1985), citados por Allison e Pike (1988).

Dentre as armadilhas de sucção amplamente usadas, se encontra a armadilha de sucção estacionária, a qual foi desenvolvida principalmente para o monitoramento de afídeos vetores de vírus e mosquitos vetores de doenças humanas (Muirhead-Thomson, 1991). Esse

tipo de armadilha de sucção foi desenvolvido por Johnson (1950a) e modificada posteriormente por Johnson & Taylor (1955) para estudar a distribuição aérea de insetos em diferentes alturas, densidade e periodicidade de voo. O princípio de funcionamento da armadilha de sucção estacionária é baseado na corrente de vento gerada por um ventilador elétrico interno, montado horizontalmente, que gera fluxo de ar para a parte inferior da armadilha através de um cone de malha fina no qual os insetos são retidos e coletados em um compartimento cilíndrico em sua base, permitindo que os insetos fiquem retidos na câmara de captura (Service, 1969; Goodenough, 1983). O princípio de coleta é passivo, já que não existe atrativo e consequentemente são coletados apenas os insetos que ‘voam’ sobre o raio de incidência de sucção da armadilha (Service, 1969).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Áreas experimentais

A seleção das áreas de monitoramento foi realizada considerando os critérios do conceito de disseminação primária, ou seja, áreas vizinhas com possíveis fontes de inóculo próximas a pomares comerciais de citros. As áreas experimentais correspondem a áreas adjacentes de duas fazendas comerciais de *Citrus* spp. da empresa Citrosuco S.A., Fazenda Água Sumida (Botucatu, SP) e Fazenda Nova Era (Casa Branca, SP). As áreas de monitoramento estudadas apresentam contextos diferentes. No caso das áreas próximas à fazenda Água Sumida, a zona de monitoramento corresponde a "plantas de fundo de quintal" (PFQ) e no caso das áreas adjacentes da fazenda Nova Era, o cenário corresponde a pomares com manejo deficiente (MD). Portanto, no contexto de PFQ foram estabelecidos três pontos de monitoramento na borda da fazenda (Figura 1) e pontos de amostragem nas áreas adjacentes, tanto em condomínios residenciais na área sul (Figura 2), norte (Figura 3) e leste (Figura 4) da Fazenda Água Sumida. No contexto MD, foram estabelecidos oito pontos de monitoramento em áreas vizinhas da Fazenda Nova Era (Figura 5). Para o estabelecimento dos pontos de amostragem, inicialmente foram analisados pontos geográficos da borda dos pomares comerciais que apresentaram histórico de maiores coletas de *D. citri* e maior número de plantas eliminadas com sintomas associados ao HLB: no total foram estabelecidos 28 pontos de monitoramento nos dois contextos (Tabela 1).

Tabela 1. Descrição e localização dos pontos monitorados nos dois contextos da disseminação primária do HLB, nos municípios de Botucatu (SP) e Casa Branca (SP).

Fazenda comercial/ Cidade	Área*	Código ponto	Coordenadas		Período de Monitoramento		Hospedeiro	Número de amostragens	
			Latitude	Longitude	Início	Fim		Planta	Armadilhas
Água Sumida /Botucatu	Sul	CS1	22° 41´ 1,40" S	48° 18´ 15,87" O	01/08/2017	20/12/2018	Citrus sp,	28	30
		CS2	22° 41´ 8,42" S	48° 18´ 9,16" O	01/08/2017	20/12/2018	Citrus sp,	28	30
		CS3	22° 41´ 27,96" S	48° 17´ 57,87" O	01/08/2017	20/12/2018	*Murraya paniculata*	28	30
		CS4	22° 41´ 34,60" S	48° 18´ 0,04" O	01/08/2017	20/12/2018	*Murraya paniculata*	28	30
		CS5	22° 41´ 37,51" S	48° 18´ 9,68" O	01/08/2017	20/12/2018	Citrus sp,	28	30
		CS6	22° 41´ 37,26" S	48° 17´ 51,87" O	01/08/2017	20/12/2018	Citrus sp,	28	30
	Norte	CN7	22° 35´ 57,38" S	48° 18´ 38,53" O	01/08/2017	20/12/2018	Citrus sp,	28	30
		CN8	22° 36´ 1,44" S	48° 18´ 43,36" O	01/08/2017	20/12/2018	Citrus sp,	28	30
		CN9	22° 35´ 49,96" S	48° 18´ 16,05" O	01/08/2017	20/12/2018	Citrus sp,	28	30
		CN10	22° 35´ 51,78" S	48° 18´ 14,35" O	01/08/2017	20/12/2018	Citrus sp,	28	30
		CN11	22° 35´ 32,92" S	48° 18´ 40,92" O	01/08/2017	20/12/2018	Citrus sp,	28	30
		CN12	22° 35´ 24,78" S	48° 18´ 28,03" O	01/08/2017	20/12/2018	Citrus sp,	28	30
		CN13	22° 34´ 57,04" S	48° 18´ 53,44" O	01/08/2017	20/12/2018	Citrus sp,	28	30
		CN14	22° 34´ 50,44" S	48° 18´ 46,41" O	01/08/2017	20/12/2018	Citrus sp,	28	30
		CN15	22° 36´ 0,38" S	48° 18´ 23,98" O	19/07/2018	20/12/2018	Sem planta	0	10
	Fazenda	AS1	22° 37' 2,98" S	48° 17' 36,98" O	29/06/2018	20/12/2018	Sem planta	0	10
		AS2	22° 37' 36,90" S	48° 18' 36,59" O	19/07/2018	20/12/2018	Sem planta	0	9
		AS3	22° 36' 54,48" S	48° 16' 42,20" O	19/07/2018	20/12/2018	Sem planta	0	9
	Leste	CL1	22° 36' 13,67" S	48° 13' 37,40" O	28/08/2018	20/12/2018	Citrus sp,	7	7
		CL2	22° 36' 21,50" S	48° 13' 54,85" O	28/08/2018	20/12/2018	Sem planta	0	7
Nova Era / Casa Branca	Leste	NE1	21° 50' 31,00" S	47° 5' 10,00" O	01/11/2017	19/12/2018	Citrus sp,	25	25
	Leste	NE2	21° 50' 5,00" S	47° 5' 15,00" O	01/11/2017	19/12/2018	Citrus sp,	25	25
	Leste	NE3	21° 51' 34,00" S	47° 6' 13,00" O	01/11/2017	19/12/2018	Citrus sp,	25	25
	Nordeste	NE4	21° 49' 51,78" S	47° 3' 54,17" O	01/11/2017	19/12/2018	Citrus sp,	21	25
	Nordeste	NE5	21° 49' 23,00" S	47° 4' 1,00" O	01/11/2017	19/12/2018	Citrus sp,	25	25
	Nordeste	NE6	21° 46' 58,64" S	47° 4' 10,00" O	01/11/2017	19/12/2018	*Murraya paniculata*	23	25
	Nordeste	NE7	21° 49' 8,00" S	47° 5' 10,00" O	01/11/2017	19/12/2018	Citrus sp,	25	25
	Nordeste	NE8	21° 49' 4,00" S	47° 5' 30,00" O	01/11/2017	19/12/2018	Citrus sp,	25	25

*Correspondente à localização geográfica com respecto à Fazenda comercial de *Citrus* spp.

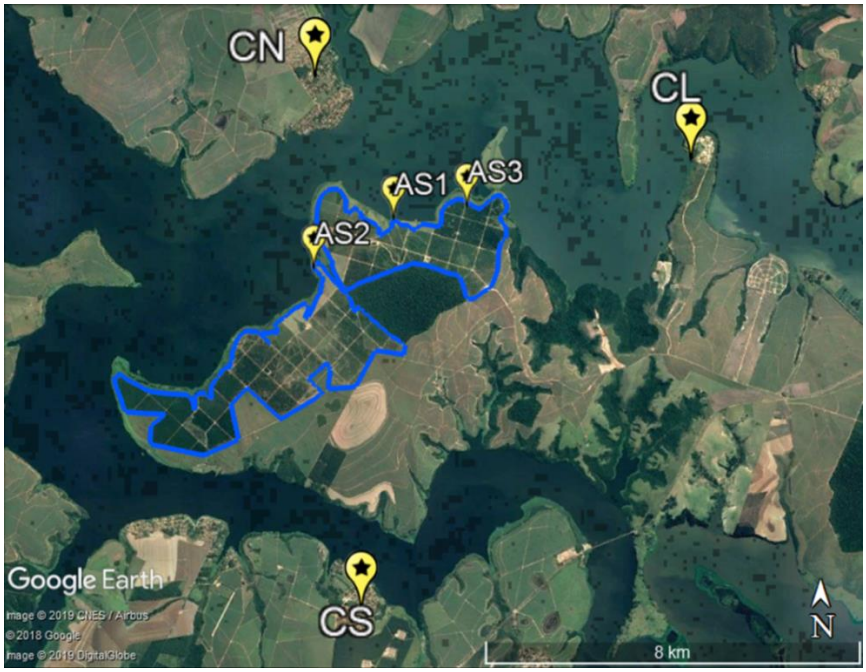

Figura 1. Localização das áreas de amostragem (ícones amarelos) na Fazenda Água Sumida (delimitada por linha azul), Botucatu, SP. AS1, AS2 e AS3: pontos de monitoramento na borda da fazenda. CN: Condomínios ao norte da fazenda. CS: Condomínios ao sul da fazenda. CL: Condomínios ao leste da fazenda.

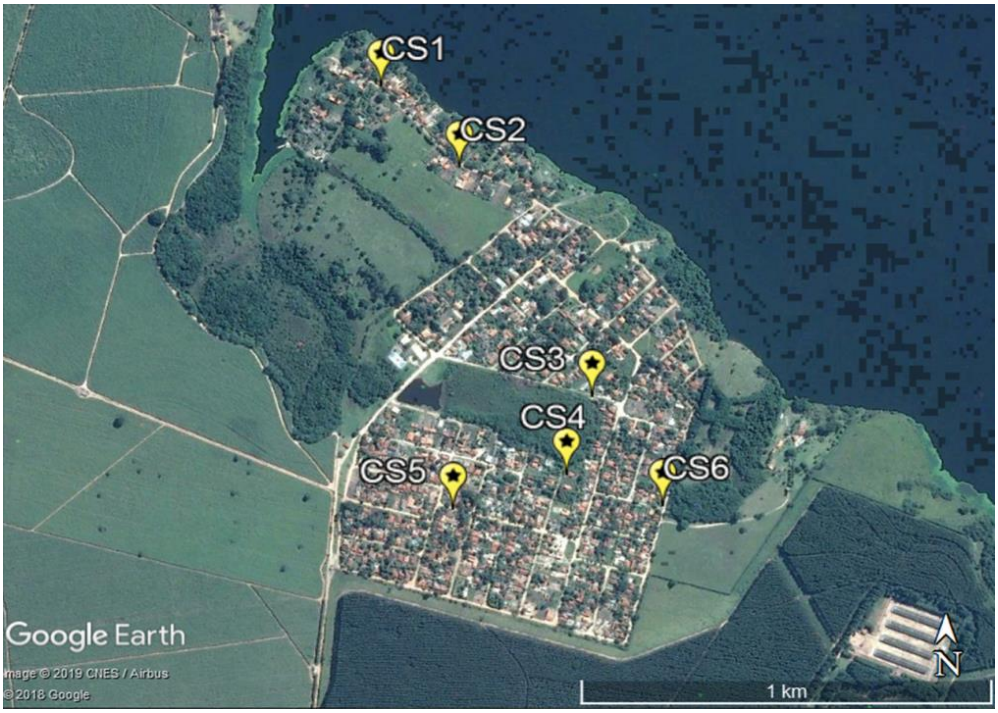

Figura 2. Localização dos pontos de monitoramento (ícones amarelos) nos condomínios ao sul (CS) da fazenda Água Sumida, Botucatu, SP.

Figura 3. Localização dos pontos de monitoramento (ícones amarelos) nos condomínios ao norte (CN) da fazenda Água Sumida, Botucatu, SP.

Figura 4. Localização dos pontos de monitoramento (ícones amarelos) no condomínio ao leste (CL) da fazenda Água Sumida, Botucatu, SP.

Figura 5. Localização dos pontos de monitoramento em áreas vizinhas à fazenda Nova Era (delimitada por linha azul), Casa Branca, SP.

3.2. Métodos de amostragem

O monitoramento de psilídeos foi realizado em diferentes alturas em relação ao nível do solo (2,5 e 7,5 m), nas copas das plantas hospedeiras de *D. citri* (*Citrus* spp. e *Murraya paniculata*) e na vegetação rasteira. O monitoramento a diferentes alturas foi realizado por meio de armadilhas adesivas amarelas e com armadilha de sucção estacionária tipo *Johnson-Taylor* modificada. As amostragens nas plantas foram executadas com rede de varredura e armadilha de sucção portátil. Em todos os casos, a frequência das amostragens em planta e por meio de armadilhas foi quinzenal.

3.2.1. Amostragem a diferentes alturas

3.2.1.1. Armadilhas adesivas amarelas

O monitoramento de populações naturais de *D. citri* e outras espécies de Psylloidea foi realizado em alturas de 2,5 m e 7,5 m acima do nível do solo, conduzido para a captura de psilídeos que eventualmente estariam chegando aos pontos de amostragem carregados por correntes de vento.

Foram utilizadas armadilhas adesivas amarelas (ISCA®, Tecnologias, Ijuí, RS) com dimensões de 30 x 10 cm, alocadas em hastes de bambu de 8 m de comprimento. Foram

dispostas três armadilhas em cada altura, constituindo uma área de monitoramento aproximada de 900 cm^2, orientadas de acordo com a direção dos ventos predominantes. As armadilhas foram trocadas quinzenalmente e embaladas em sacos plásticos transparentes para posterior observação em microscópio estereoscópico no Laboratório de Insetos Vetores de Fitopatógenos (LIV), do Departamento de Entomologia e Acarologia, na Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba - SP. Posteriormente, foram armazenadas a -20°C, até a extração de exemplares para identificação taxonômica e detecção de *C*Las.

O monitoramento por este método foi realizado em todos os pontos de amostragem, tanto no contexto PFQ (Figuras 2, 3 e 4) como no cenário MD (Figura 5).

3.2.1.2. Armadilha de sucção estacionária

A armadilha de sucção estacionária utilizada foi do tipo *Johnson-Taylor* com modificações, a qual foi inicialmente desenvolvida por Johnson (1950a,b), Taylor (1951) e Johnson e Taylor (1955). Posteriormente Allison e Pike (1988) apresentaram a descrição técnica e econômica da armadilha, como uma alternativa relativamente barata e de fácil construção para o monitoramento de pulgões migrantes. As modificações da armadilha usada em este trabalho foram: motor elétrico com potência de 1/4 cv, sem anemômetro acoplado no tubo de PVC da armadilha de sucção e com 7,5 m de altura.

O equipamento foi instalado a 3 m do ponto AS1 (Figura 1) correspondente à borda da fazenda Água Sumida, constituindo um ponto geográfico estratégico com relação à localização geográfica dos pontos de monitoramento nos condomínios ao norte (CN) da fazenda (Figura 6).

A câmara de captura utilizada na armadilha foi um recipiente de vidro com 300 ml de álcool absoluto e 30 ml de glicerina (Figura 6c), com a finalidade de conservar os psilídeos para análises posteriores. Esse recipiente foi retirado a cada 15 dias e levado ao LIV, para triagem dos insetos e posterior identificação.

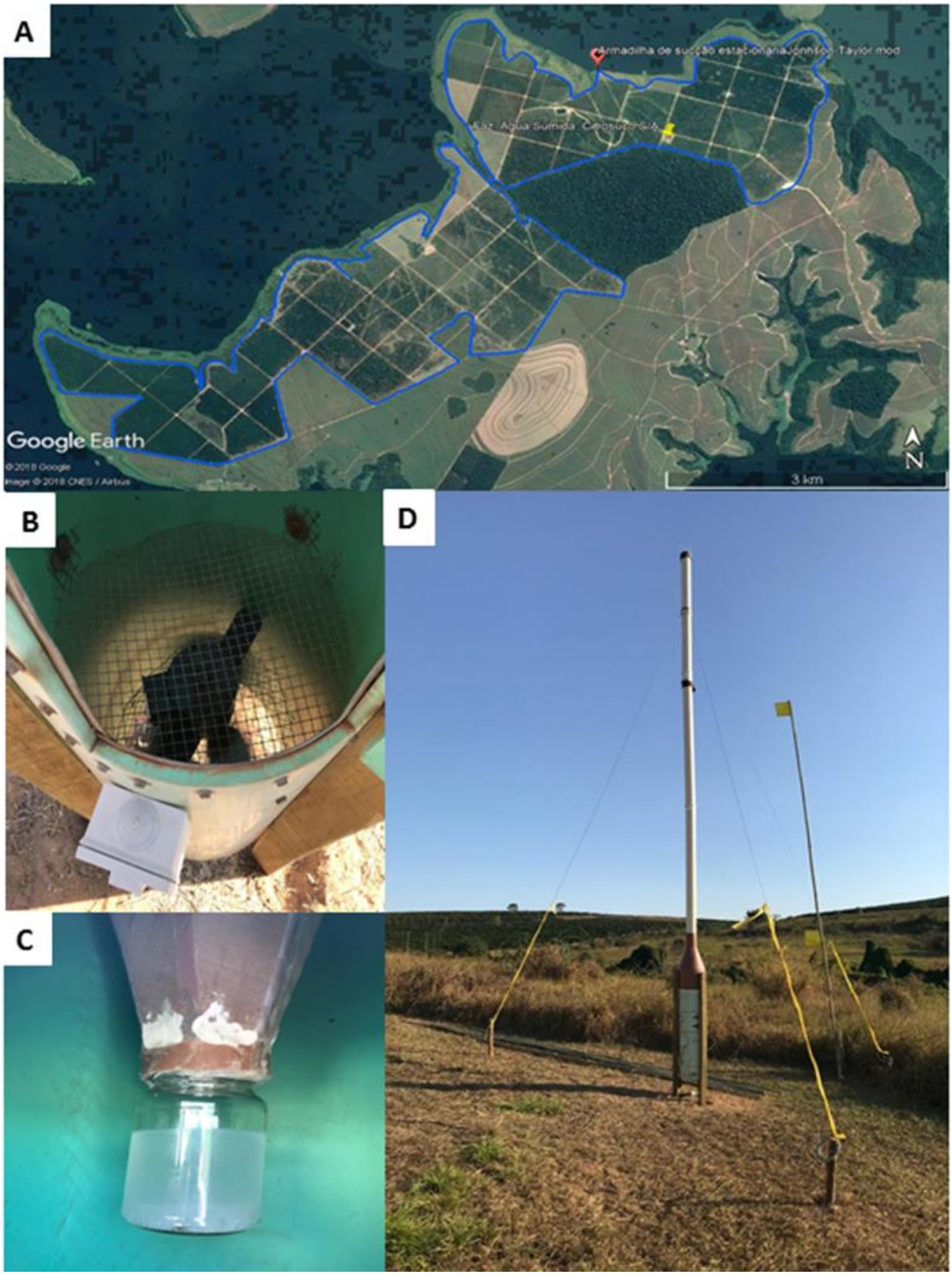

Figura 6. Armadilha de sucção estacionária tipo Johnson-Taylor modificada. A. Localização geográfica da armadilha (22°37'2.97" S 48°17'37.48" O) (ícone vermelho). B. Detalhe do exaustor. C. Funil interno e frasco de captura. D. Armadilha de sucção instalada na borda da Fazenda Água Sumida, próxima ao ponto AS1 (monitoramento com armadilhas adesivas amarelas).

3.2.2. Amostragem na vegetação

O monitoramento de psilídeos foi realizado nas copas de árvores cítricas ou plantas hospedeiras de *D. citri* contíguas aos locais onde foram estabelecidos os pontos com as armadilhas adesivas amarelas, em todos os casos, exceto nos pontos CN15 (Figura 3), AS1, AS2 e AS3 (Figura 1) no contexto PFQ. A amostragem foi realizada com rede de varredura (rede entomológica clássica de 40 cm de diâmetro e 1 m de comprimento) e armadilha de sucção portátil (Stihl BG86 C/E). No caso da amostragem com rede de varredura foram realizadas quinze redadas nos ramos médios e superiores da planta, já para a armadilha de sucção portátil foram amostrados ramos periféricos no terço médio e inferior das copas, durante 90-120 s por planta.

Também foi realizada coleta de psilídeos nas plantas espontâneas que compõem a flora rasteira dos pontos de monitoramento, com rede de varredura e armadilha de sucção portátil. Por meio de rede de varredura foram realizadas quinze redadas em uma área de aproximadamente 2 m^2 e com armadilha de sucção portátil foram amostradas plantas de cobertura presentes em uma área aproximada de 2 m^2, durante 90-120 s. Os pontos de amostragem de plantas rasteiras foram próximos às plantas hospedeiras de *D. citri* amostradas. As amostragens nas plantas espontâneas no contexto PFQ ocorreram entre 01/08/2017 e 6/10/2018 e no contexto MD entre 01/11/2017 a 28/09/2018.

Os insetos coletados nas plantas foram transferidos para sacos plásticos e levados ao laboratório LIV para posterior triagem e identificação taxonômica.

3.3. Triagem e identificação de espécimes de Psylloidea

Os psilídeos coletados nas plantas e com armadilha de sucção estacionária foram separados de outros insetos com auxílio de pincéis e alfinete entomológico. Posteriormente, os psilídeos foram identificados, quantificados e separados por sexo, sendo conservados em álcool 100% em tubos criogênicos de 1,5 ml e armazenados em freezer (-20 °C).

No caso das armadilhas adesivas amarelas, os psilídeos foram marcados, identificados, classificados segundo o sexo e conservados na própria armadilha a seco a -20 °C. Posteriormente, alguns espécimes foram extraídos para análises taxonômica e detecção de *C*Las. A extração dos psilídeos das armadilhas adesivas foi diferente dependendo da finalidade. Desta forma, quando o propósito era taxonômico, os insetos foram retirados da armadilha por meio de corte de um fragmento do cartão adesivo onde se encontrava o inseto.

Já para detecção de *C*Las foram removidos com auxílio de pincel e adição de uma gota de solvente (óleo mineral) por alguns minutos e retirados com alfinete entomológico e posteriormente armazenados em álcool 100% em tubos criogênicos e conservados no freezer a (-20°C).

A identificação taxonômica foi realizada nas dependências do laboratório LIV e na Universidade de Federal de Paraná, Curitiba, PR. Após a triagem, realizou-se a identificação inicial por meio de chaves dicotômicas (Burckhardt e Queiroz, dados não publicados). Os psilídeos coletados foram identificados até o nível de gênero ou espécie, após consultas aos especialistas em taxonomia de Psylloidea, Dr. Daniel Burckhardt (Natural History Museum Basel-Suiça) e Dra. Dalva Luiz de Queiroz (Embrapa Floresta-Colombo PR).

3.4. Detecção de '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' em psilídeos

3.4.1. Extração de DNA de psilídeos e análise de qPCR

Os insetos alvo para a detecção de *C*Las por qPCR foram indivíduos de *D. citri* capturados nas armadilhas adesivas amarelas dispostas a 7,5 m de altura e exemplares dessa espécie coletados em plantas cítricas durante o período de monitoramento. No caso das demais espécies de psilídeos, foram analisados todos os exemplares encontrados em plantas cítricas coletados com rede de varredura e com armadilha de sucção portátil. Para as outras espécies de psilídeos coletados em armadilhas adesivas amarelas a seleção dos indivíduos foi baseada nos seguintes critérios: espécies de maior frequência em diferentes alturas e espécies de maior constância segundo as épocas de coleta.

Os indivíduos de *D. citri* foram analisados individualmente para detecção de *C*Las. No caso da análise das outras espécies de psilídeos, os indivíduos oriundos de plantas cítricas foram avaliados individualmente. Já os coletados por armadilhas adesivas amarelas foram analisados em amostras compostas de cinco indivíduos da mesma espécie.

A extração de DNA foi realizada seguindo o protocolo descrito por Deng *et al*. (2006) e modificado por Coletta-Filho *et al*. (2010). Os insetos que estavam conservados em álcool 100% foram colocados sobre papel filtro para a secagem e posteriormente foram transferidos para microtubos de 1,5 ml para maceração. No caso de insetos provenientes das plantas, o processo de maceração foi realizado no equipamento Tissuelyser® (Qiagen, Hilden, Alemanha) com o uso de *beads* de metal, sendo o equipamento regulado para 35 oscilações/s durante 5 min. Para os insetos provenientes das armadilhas, a maceração foi feita com auxílio

de pistilo previamente autoclavado. Após a maceração, foram adicionados 30 µl de solução tampão STE (10 mM Tris HCl, 1mM EDTA, 25mM NaCl) e 10 µl de Proteinase K (200 µg/ml) em cada tubo; em seguida as amostras foram submetidas ao vórtex (Labnet International, USA) para a homogeneização por 10 s e mantidas em banho maria a 56°C por 30 minutos. Posteriormente, realizou-se uma etapa adicional de purificação do DNA com o Kit Wizard Promega (DNA Purification Kit Wizard Genomic, Promega®, CA), seguindo as recomendações do fabricante. Em seguida os extratos de DNA foram mantidos em freezer a -20°C até a realização da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR).

Para a qPCR, utilizou-se sonda Taqman (2X TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix- Life Technologies) e o conjunto de oligonucleotídeos "Las 1R" (5'-AAC AAT AGA AGG ATC AAG GAT CT-3') e "Las 1F" (5'-CGA TTG GTG TTC TTG TAG CG-3') e a sonda "Las-I" (5'-AAT CAC CGA AGG AGA AGC CAG CAT TAC A-3'), desenhados por Lin *et al*. (2010), os quais foram baseados na sequência do 16S rDNA de CLas (GenBank AY919311). O volume final da reação foi composta de 0,8µM de cada primer (*forward* e *reverse*), 6,75 µL da sonda (2X TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix- Life Technologies), 3 µL de DNA total de inseto e 0,5 µL de água MiliQ autoclavada.

A amplificação foi realizada no equipamento ABI PRISM 7500 Fast Sequence Detection System (Applied Biosystems, USA), programado com as seguintes condições, de acordo com Coletta-Filho *et al*. (2010): 50 °C por 2 min, acompanhado de um ciclo de desnaturação a 95 °C por 15 s e anelamento/extensão a 60 °C por 1 min. Cada reação teve um controle positivo (inseto *C*Las positivo), controle negativo de inseto (livre de *C*Las proveniente da colônia do laboratório LIV) e um controle negativo da reação (água Milli-Q autoclavada). Todas as amostras foram analisadas em duplicata e considerou-se positivas as amostras que apresentaram valor de Ct (*Cycle threshold*) ≤35 como já determinado por Colleta-Filho *et al*. (2010, 2014).

O anterior procedimento foi usado no caso da análise de indivíduos de *D. citri* coletados em armadilhas adesivas amarelas e planta, assim como também para as outras espécies de Psylloidea. No entanto, para 80 amostras de indivíduos de Psylloidea de outras espécies além de *D. citri*, coletados em armadilhas adesivas amarelas e em plantas hospedeiras de *D. citri*, foi usado o protocolo de qPCR validado por Fundecitrus para o teste de detecção *C*Las.

3.5. Análise de dados

A partir dos psilídeos coletados foi realizada análise faunística clássica, utilizando os índices faunísticos de constância e frequência, calculados com o software ANAFAU (Moraes *et al*., 2003). O cálculo de tais índices foi usado para comparações entre espécies/gênero, locais, época e alturas de coletas. A análise foi realizada tanto para psilídeos capturados com armadilhas adesivas amarelas, armadilha de sucção estacionária e capturados em plantas hospedeiras de *D. citri*.

A constância (C) constitui um índice que indica a porcentagem de número de vezes que uma espécie foi coletada (P) em relação ao número total de coletas feitas no estudo (N), representada mediante a equação: C = Px100/N. A frequência (F) representa a porcentagem de indivíduos de uma espécie (I) em relação ao total de indivíduos coletados (T) calculada pela equação: F = I/T x100 (Silveira-Neto *et al*., 1995).

O coeficiente de correlação de Spearman foi utilizado para analisar a intensidade da relação da distribuição de abundância das espécies coletadas e as diferentes alturas de coleta (2,5 m e 7,5 m), assim como também para a relação de abundância com relação ao tempo de monitoramento, para cada um dos contextos analisados. Esse coeficiente foi escolhido pois se ajusta a análises de dados com distribuição não paramétrica, para a análise de correlação do tipo monotônica. O coeficiente foi calculado com o programa estatístico R (R i386 3.3.2).

Para a análise espaço-temporal de *D. citri*, foram obtidos dados de coleta da borda das fazendas comerciais de citros dos dois contextos analisados, através da base de dados fornecida pelo Fundo da Defesa da Citricultura (Fundecitrus). Esses dados são obtidos por meio de armadilhas adesivas amarelas alocadas a altura da copa das árvores cítricas na borda das fazendas, como parte do programa Alerta Fitossanitário do HLB.

4. RESULTADOS

4.1. Análise contexto “plantas de fundo de quintal”

4.1.1. Diversidade

4.1.1.1. Coleta com armadilhas adesivas amarelas

No contexto de “plantas de fundo de quintal” (PFQ) foram coletados no total 83.561 psilídeos com armadilhas adesivas amarelas, nas duas alturas monitoradas nos 20 pontos de coleta estabelecidos. Os psilídeos coletados foram pertencentes a 24 gêneros (Figura 7), correspondentes às famílias Psyllidae (*Colophorina* Capener, 1973, *Euceropsylla* Boselli, 1929, *Euphalerus* Schwarz, 1904, *Heteropsylla*, *Isogonoceraia*, *Mitrapsylla*, *Platycorypha*, *Russelliana*), Aphalaridae (*Blastopsylla*, *Glycaspis*, *Leurolophus*, *Limataphalara*, *Tainarys*), Triozidae (*Calinda*, *Leuronota*, *Trioza*, *Triozoida*), Liviidae (*Caradocia*, *Diaphorina*, *Diclidophlebia*), Calophyidae (*Calophya*, *Mastigimas*), Carsidaridae (*Paracarsidara*) e Phacopteronidae (*Pseudophacopteron*).

A família Psyllidae representou 76.70% do total de psilídeos coletados, os quais pertencem às subfamílias Ciriacreminae (98.26%), Aphalaroidinae (0.01%), Macrocorsinae (1.51%) e Psyllinae (0.22%). A subfamilía Ciriacreminae foi representada por *Heteropsylla* sp. (59.64%), *Isogonoceraia divergipennis* White & Hodkinson, 1980 (33.65%), *Mitrapsylla* spp. Crawford, 1914 (5.09%), *Heteropsylla caldwelli* Burckhardt, 1987 (0.96%), *Euceropsylla* sp. (0.66%). Aphalaroidinae conteve unicamente indivíduos de *Russelliana solanicola*. A subfamília Macrocorsinae foi representada por *Euphalerus* sp. (92.71%), *E. ostreoides* Crawford, 1925 (7.18%) e *Colophorina* sp. (0.10%). Já Psyllinae apresentou apenas psilídeos do gênero *Platycorypha* (Tuthill, 1945).

Psilídeos da família Aphalaridae representaram 15.72% do total coletado, o qual foi representado pelas subfamílias: Spondyliaspidinae (92.60%), Rhinocolinae (6.90%) e Aphalarinae (0.50%). Spondyliaspidinae foi representada por *Glycaspis brimblecombei* (74.30%) e *Blastopsylla occidentalis* (25.70%). Rhinocolinae foi representada por *Tainarys* sp. (Brèthes, 1920) (97.40%) e *Leurolophus oriformae* (Burckhardt & Basset, 2000) (2.60%). Aphalarinae foi representada unicamente por *Limataphalara* sp. (Hodkinson, 1992).

Apenas 4.95% do total de psilídeos coletados pertenceram à família Triozidae, dos gêneros/espécies de *Trioza* sp. (Foerster, 1848) (97.60%), *Leuronota* sp. (Crawford, 1914) (0.94%), *Calinda* sp. (Blanchard, 1852) (0.87%), *Triozoida limbata* (Enderlein, 1918)

(0.34%) e *Trioza tabebuiae* (0.25%). A família Liviidae representou 1.79% do total de psilídeos coletados, dos quais 99.11% pertenciam à subfamília Euphyllurinae e somente 0.89% a Liviinae. Euphyllurinae foi representada por *D. citri* (85.84%), *Caradocia* sp. (10.13%) e *C. longiantennata* (White & Hodkinson, 1980) (4.04%), e Liviinae foi representada unicamente por *Diclidophlebia* sp.

As famílias com menos indivíduos coletados foram Calophyidae (0.73%), com 93.84% de exemplares de *Calophya* sp. (Löw, 1879) da subfamília Calophyinae e apenas 6.16% de *Mastigimas* sp. (Enderlein, 1921) da subfamília Mastigimatinae. Da familía Carsidaridae (0.11%) somente foram coletados exemplares do gênero *Paracarsidara* (Heslop-Harrison, 1960) e de Phacopteronidae (0.04%) só indivíduos de *Pseudophacopteron longicaudatum* (Malenovský, Burckhardt, Queiroz, Isaias & Oliveira 2015) e outras espécies não identificadas do mesmo gênero. Sendo que a razão sexual de todas as espécies encontradas foi em média de 0,55.

Em termos de constância, as espécies que estiveram presentes em 100% das coletas foram: *B. occidentalis*, *Calophya* sp., *D. citri*, *G. brimblecombei*, *Heteropsylla* sp., *I. divergipennis*, *Mitrapsylla* spp. e *Trioza* sp. As espécies que foram presentes em mais de 50% das coletas foram: *Caradocia* sp. (73%), *Euceropsylla* sp. (60%), *Euphalerus* sp. (73%), *E. ostreoides* (63%), *Heteropsylla caldwelli* (67%), *Limataphalara* sp. (67%), *Paracarsidara* sp. (80%) e *Tainarys* sp. (90%). As espécies presentes entre 25-50% das coletas foram, *Calinda* sp. (30%), *Caradocia longiantennata* (43%), *Leuronota* sp. (40%), *Mastigimas* sp. (27%) e *Platycorypha* sp. (40%). As outras espécies coletadas apresentaram menos de 25% de presença: *Colophorina* sp. (3%), *Diclidophlebia* sp. (13%), *Leurolophus oriformae* (20%), *Pseudophacopteron* sp. (23%), *Pseudophacopteron longicaudatum* (3%), *R. solanicola* (13%), *Trioza tabebuia* (7%) e *Triozoida limbata* (10%).

Com relação à frequência, as espécies mais coletadas foram: *Heteropsylla* sp. (44.9%), *I. divergipennis* (25.3%) e *G. brimblecombei* (10.8%). Outras espécies representaram frequências menores de 5%, como *Trioza* sp. (4.8%), *Mitrapsylla* spp. (3.8%), *B. occidentalis* (3.7%), *D. citri* (1.5%), *Euphalerus* sp. (1.1%) e *Tainarys* sp. (1.1%). As outras espécies coletadas, estiveram frequentes em menos de 1%.

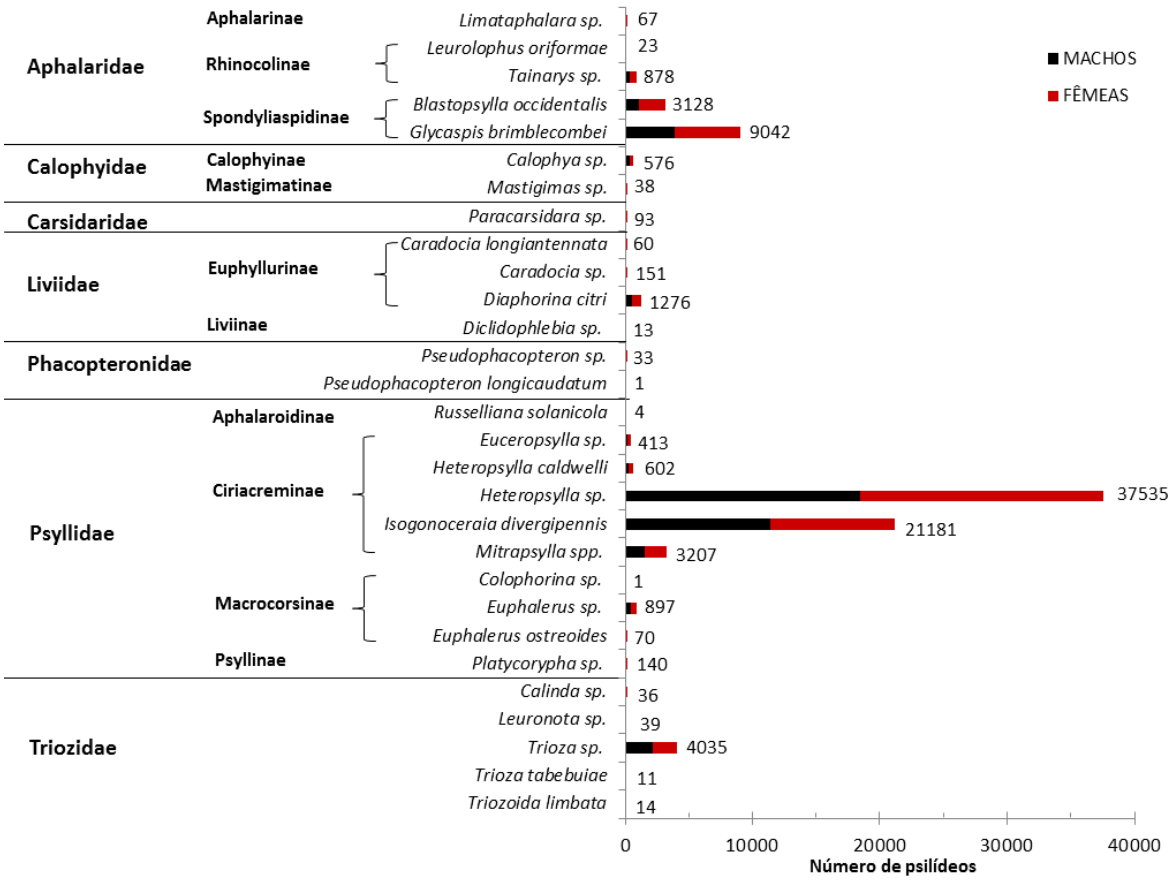

Figura 7. Número total de indivíduos de Psylloidea coletados no contexto "plantas de fundo de quintal" (PFQ) com armadilhas adesivas amarelas instaladas a 2,5 m e 7,5 m de altura, fazenda comercial de *Citrus* spp., Faz. Água Sumida, Citrosuco S.A., Botucatu, SP. 01/08/2017 a 20/12/2018.

4.1.1.2. Coleta com armadilha de sucção estacionária

Durante os cinco meses de monitoramento de psilídeos, por meio de armadilha de sucção estacionária foram encontrados 386 indivíduos, pertencentes às famílias Aphalaridae (62.4%), Psyllidae (37%), Calophyidae (0.3%) e Triozidae (0.3%), sendo coletados 10 gêneros (Figura 8). Deste total, pertencente a Aphalaridae foram coletados 241 indivíduos, sendo 67.2% de *Tainarys* sp., 26.1% de *G. brimblecombei* e 6.7% de *B. occidentalis*. Dentro da família Psyllidae, 60.8% dos espécimes foram de *Heteropsylla* sp., 31.5% de *Mitrapsylla* spp., 3.5% de *Euphalerus* sp., 2.8% de *I. divergipennis* e 1,4% de *Platycorypha* sp. As famílias Calophyidae e Triozidae foram representadas unicamente por um gênero, *Calophya* sp. e *Trioza* sp., respectivamente.

As espécies que apresentaram maior constância durante o período de monitoramento foram *Mitrapsylla* spp. (83.3%), *G. brimblecombei* (66.7%), *I. divergipennis* (50%) e *B.*

occidentalis (50%). No caso de *Heteropsylla* sp. e *Euphalerus* sp. constatou-se presença em 33.3% das coletas. Mas no caso de *Tainarys* sp., *Calophya* sp., *Trioza* sp. e *Platycorypha* sp., observou-se presença em 16.7% do total dos períodos de coleta.

Em relação à frequência das espécies coletadas, *Tainarys* sp. representou 42% do total de espécimes coletados, *Heteropsylla* sp. 22.5%, *G. brimblecombei* 16.3%, *Mitrapsylla* spp. 11.7%, *B. occidentalis* 4.1%, *Euphalerus* sp. 1.3%, I. divergipennis 1%, *Platycorypha* sp. 0.5% e no caso de *Calophya* sp. e *Trioza* sp. apenas 0.3%. Sendo que a razão sexual de todas as espécies encontradas foi em média de 0,45.

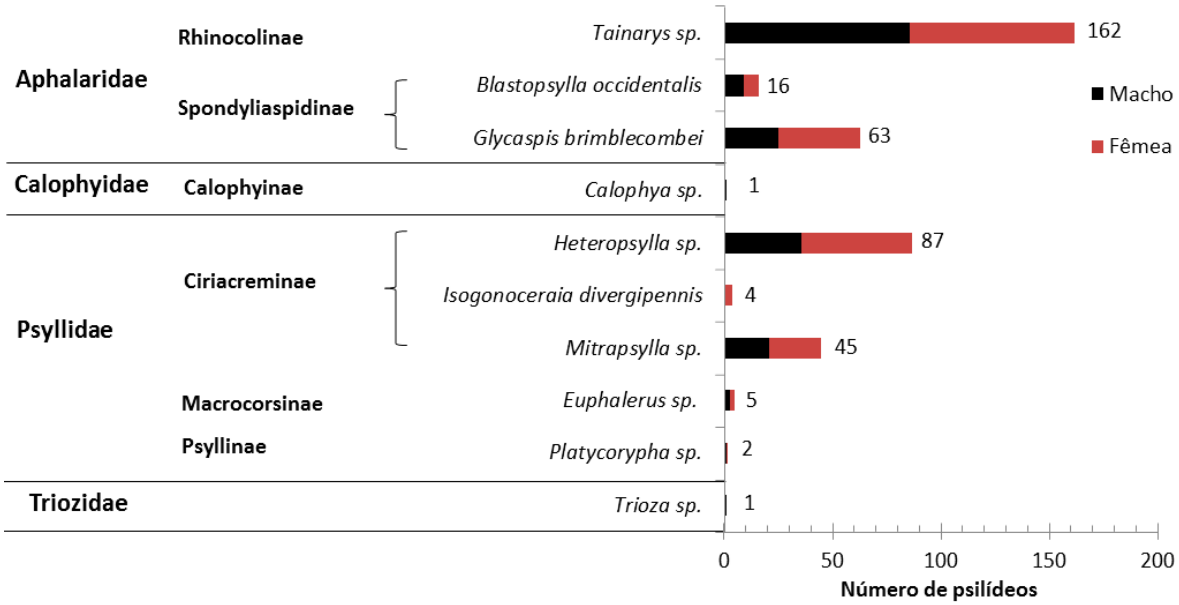

Figura 8. Número total de indivíduos de Psylloidea, coletados no contexto "plantas de fundo de quintal" (PFQ) com armadilha de sucção estacionária instalada em área adjacente a fazenda comercial de *Citrus* spp. Faz. Água Sumida, Citrosuco S.A., Botucatu, SP, 01/08/2017 a 20/12/2018.

4.1.1.3. Coleta de Psylloidea em plantas hospedeiras de *D. citri*

No total foram coletados 5.316 psilídeos em plantas hospedeiras de *D. citri*, pertencentes a *Citrus* spp. e *Murraya paniculata*. Do total de psilídeos coletados, 70.26% foi de *D.citri* e 28.39% de *Heteropsylla* sp., sendo que as outras espécies representaram menos de 1%, compreendendo: *I. divergipennis* (0.85%), *Mitrapsylla* spp. (0.21%), *G. brimblecombei* (0.15%), *Mastigimas* sp. (0.06%), *Trioza* sp. (0.06%), *Calophya* sp. (0.02%) e *Calinda* sp. (0.02%) (Figura 9). Sendo que a razão sexual de todas as espécies encontradas foi em média de 0,54.

A espécie que apresentou 100% de constância durante o período de monitoramento foi *D. citri*. A constância das demais espécies coletadas foi menor que 50%, compreendendo: *I. divergipennis* (35.5%), *G. brimblecombei* (19.4%), *Mitrapsylla* spp. (12.9%), *Heteropsylla* sp. (9.7%), *Mastigimas* sp. (9.7%), *Trioza* sp. (6.5%), *Calophya* sp. (3.2%) e *Calinda* sp. (3.2%).

Quanto à frequência, *D. citri* representou 70.26% do total dos espécimes coletados em planta, seguida de *Heteropsylla* sp. (28.39%), *I. divergipennis* (0.85%), *Mitrapsylla* spp. (0.21%), *G. brimblecombei* (0.15%), *Mastigimas* sp. (0.06%), *Trioza* sp. (0.06%), *Calophya* sp. (0.02%) e *Calinda* sp. (0.02%).

Em plantas espontâneas amostradas na área adjacente às plantas hospedeiras de *D. citri*, só foram encontrados doze indivíduos de *Russelliana solanicola* em uma das amostragens.

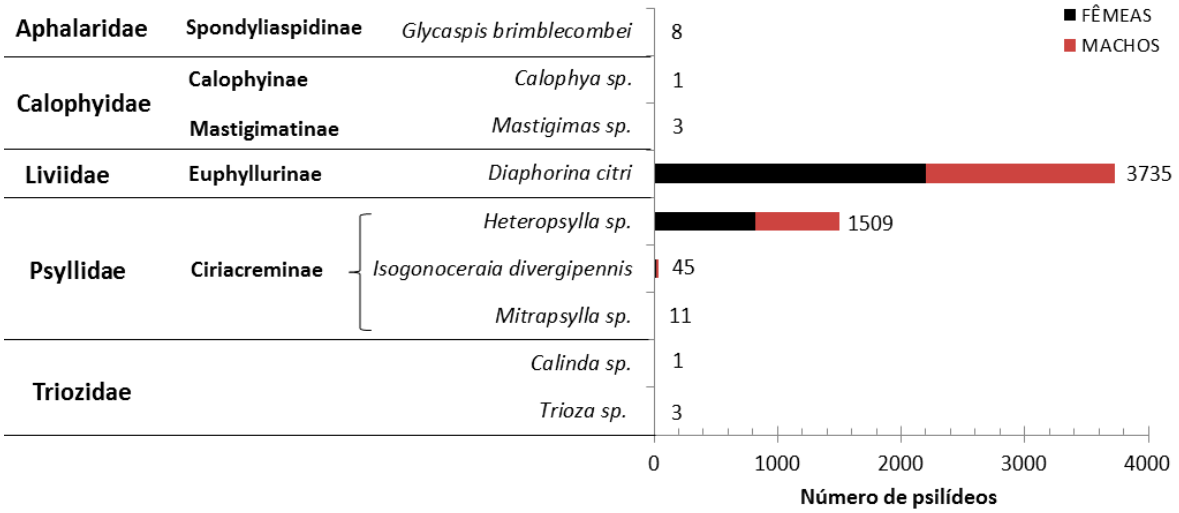

Figura 9. Número total de indivíduos de Psylloidea, coletados no contexto "plantas de fundo de quintal" (PFQ) em plantas hospedeiras de *Diaphorina citri* (*Citrus* spp. e *Murraya paniculata*) em áreas adjacentes da fazenda comercial de *Citrus* spp. Faz. Água Sumida, Citrosuco S.A., Botucatu, SP, 01/08/2017 a 20/12/2018.

4.1.2. Análise espacial

4.1.2.1. Coleta por armadilhas adesivas amarelas

De acordo com as diferentes alturas de coleta por armadilhas adesivas amarelas e a distribuição de abundância das espécies observadas, foi encontrada relação significativa (ρ 0,93; $p<0,05$) de acordo com a análise de correlação de Spearman. No total foram coletados 40.772 psilídeos a 2,5 m (Figura 10A) e 42.789 psilídeos a 7,5 m (Figura 10B). Nas coletas a

2,5 m, as espécies com maior frequência de indivíduos foram: *Heteropsylla* sp. (52.7%) e *I. divergipennis* (25.4%) e a 7,5 m observou-se tendência semelhante, com alta frequência de *Heteropsylla* sp. (37.5%) e *I. divergipennis* (25.3%).

No caso de *D. citri*, foram encontrados 1.192 indivíduos a 2,5 m (camada limite de voo) e apenas 84 indivíduos foram capturados a 7,5 m (camada limite atmosférica). Essa correlação também foi constatada no caso de *Euceropsylla* sp., com 75.3% dos indivíduos capturados a 2,5 m e de *Heteropsylla* sp., que apresentou 57.5% dos indivíduos nesta mesma altura. Contudo, no caso de *G. brimblecombei*, *B. occidentalis*, *Euphalerus* sp. e *Trioza* sp., observou-se maior número de indivíduos a 7,5 m, representando 77.9%, 73.5%, 72.2% e 66.9%, respectivamente, do total coletado para cada espécie nas duas alturas.

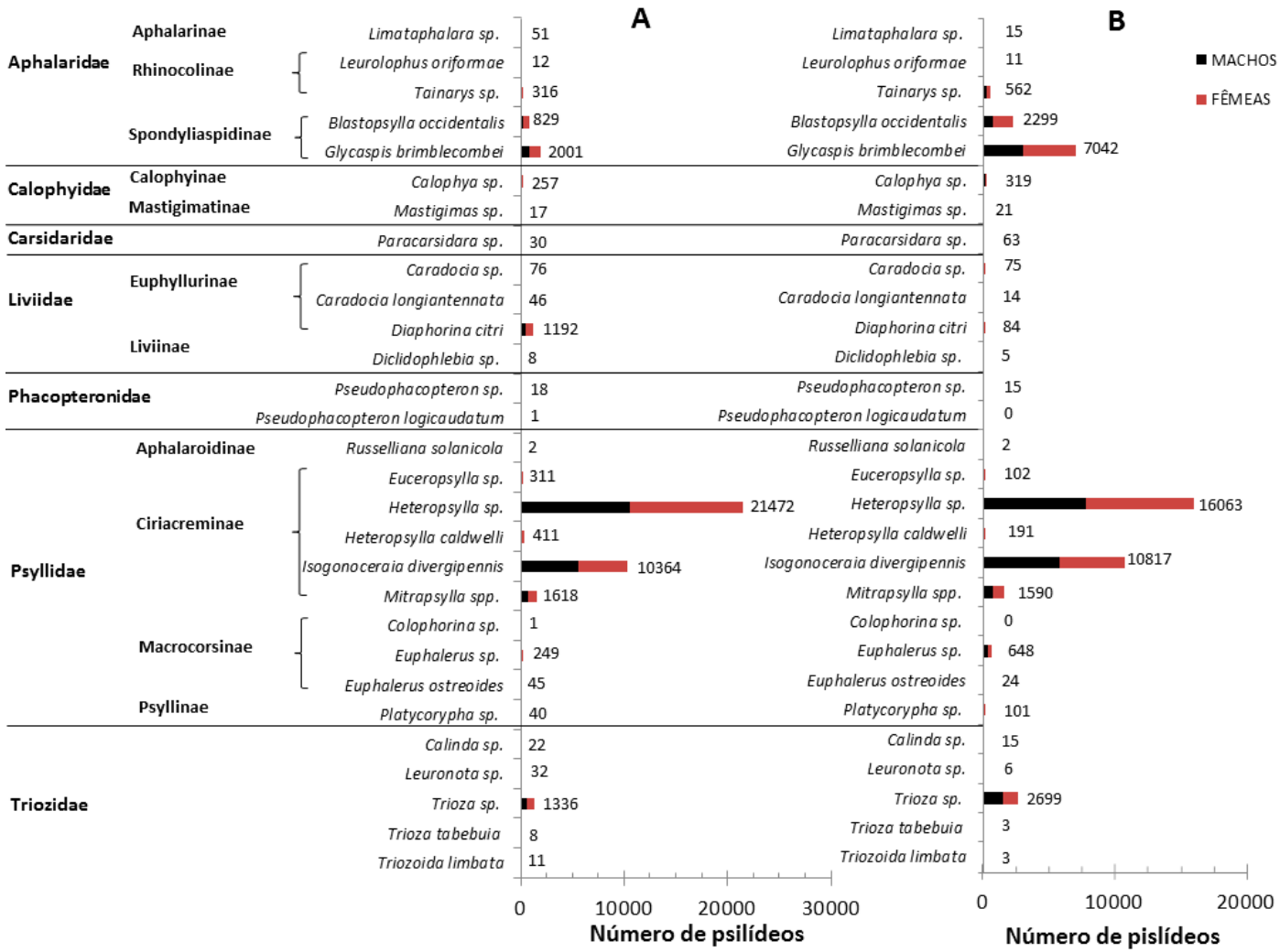

Figura 10. Número total de indivíduos de Psylloidea, coletados no contexto "plantas de fundo de quintal" (PFQ) com armadilhas adesivas amarelas em áreas adjacentes da fazenda comercial de *Citrus* spp. Faz. Água Sumida, Citrosuco S.A., Botucatu, SP. 01/08/2017 a 20/12/2018. A. Psilídeos coletados a 2,5 m de altura. B. Psilídeos coletados a 7,5 m de altura.

No que se refere à distribuição espacial de psilídeos encontrados nas diferentes áreas com relação à Fazenda Comercial Água Sumida (Figura 1), foi evidenciado maior número de psilídeos nos pontos de amostragem dos condomínios ao norte (53.87%) (Figura 3), com média de 4.880 psilídeos por ponto, comparado com 4.117 psilídeos por ponto nos condomínios ao sul (30.29%) (Figura 2). Nos pontos localizados na área leste (5.7%) (Figura 4), foram encontrados em média 2.337 psilídeos por ponto e nos pontos dispostos na borda da fazenda (10.11%) (Figura 1) foram coletados em média 2.747 psilídeos por ponto (Figura 11).

Nos condomínios ao sul da fazenda, a maior quantidade de psilídeos foi encontrada no ponto CS1, representando 24.3% do total de psilídeos encontrados naqueles condomínios. No entanto, nos pontos CS2, CS3, CS4 e CS5 foram encontrados em média 16.5% do total de psilídeos coletados nos condomínios ao sul. É importante ressaltar que um dos pontos dos condomínios ao sul (CS6) ficou sem monitoramento por três períodos, que compreendeu entre 09/05/2018 e 02/08/2018, o que pode ter afetado a quantidade de psilídeos (10.1%) encontrados naqueles condomínios.

No caso de condomínios localizados ao norte, foram coletados maior número de psilídeos nos pontos CN8 e CN14, 18.6% e 13.5% do total, respectivamente. O ponto CN9 representou 15%, os pontos CN10 e CN11 representaram 10.6% e 10.3%, respectivamente. Os pontos CN12 e CN13, representaram 8.3% e 7.8%, respectivamente. No entanto, o ponto CN7 representou 4.1% do total de psilídeos coletados naqueles condomínios, esclarecendo que desde o período de 19/7/2018 até 20/12/2018 esse ponto não teve monitoramento, devido à erradicação da planta hospedeira de *D. citri* próxima e da remoção da unidade estrutural das armadilhas adesivas (haste de bambu). O ponto CN15 representou 11.8% de psilídeos totais coletados nos condomínios ao norte, durante o tempo total de monitoramento nesse ponto (Tabela 1). A pesar do menor tempo de monitoramento no ponto CN15, é interessante salientar que o mesmo apresentou maior quantidade de psilídeos coletados comparado com outros pontos, já que a localização geográfica corresponde a um ponto estratégico na beira do Rio Piracicaba (Figura 3), onde se acredita que seja um lugar de atmosfera instável (maior turbulência e difusão de partículas) propícia para a ascensão de insetos assistida pela convecção térmica.

No condomínio ao leste, foi capturado 5.7% do total dos indivíduos coletados no contexto PFQ, sendo que foi monitorado por apenas sete períodos (coletas) comparado com o total de 30 períodos nos outros condomínios (Tabela 1). Os percentuais de coleta dos dois pontos de monitoramento no condomínio ao leste foram muito próximas, com 46.7% dos

indivíduos no ponto CL1 e 53.3% no CL2, sendo esse último localizado na beira da Represa Barra Bonita.

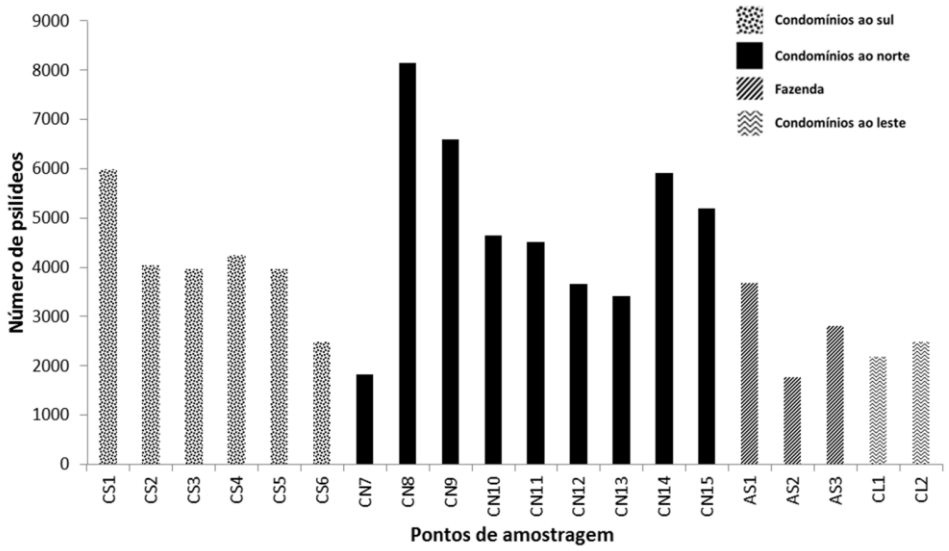

Figura 11. Número total de indivíduos de Psylloidea coletados no contexto "plantas de fundo de quintal" (PFQ) por armadilhas adesivas amarelas nos pontos de monitoramento em condomínios ao sul (CS), ao norte (CN) e ao leste (CL), bem como nas bordas (AS) da Fazenda Água Sumida, Citrosuco S.A. Botucatu, SP. Períodos de amostragem: CS e CN, 01/08/2017-20/12/2018; CL, 28/08/2018-20/12/2018; AS1, 29/06/2018-20/12/2018; AS2 e AS3, 19/07/2018-20/12/2018.

4.1.2.2. Coleta de Psylloidea nas plantas hospedeiras de *D. citri*

Nas plantas hospedeiras de *D. citri*, a coleta foi maior nos condomínios ao sul da Fazenda Água Sumida, representando 61.1% dos indivíduos em relação às outras áreas. Nos condomínios ao norte foi coletado 38.2% do total de psilídeos e no condomínio ao leste (ponto CL1) da fazenda foi coletado 0.7% (Figura 12).

Nos condomínios ao sul, o ponto com maior número de psilídeos coletados foi o CS1 (1.577 psilídeos), representando 48.6% do total de coleta naquela área, o qual corresponde a um local de aproximadamente 35 plantas de diversas espécies de *Citrus* spp., sem manejo do inseto vetor. Dos psilídeos coletados nesse ponto, 95.4% foi correspondente a *Heteropsylla* sp., 4.4% a *D.citri*, 0.1% a *G. brimblecombei* e 0.1% a *Mitrapsylla* spp. É importante esclarecer que grande proporção dos indivíduos de *Heteropsylla* sp. foram coletados em uma das coletas como um evento circunstancial isolado (06/10/2018), no qual foram coletados 1.500 indivíduos. Nos pontos CS2, CS3, CS4, CS5 e CS6 foram coletados, respectivamente, 11.5%, 14.6%, 5.9%, 12.0% e 7.4% do total de psilídeos naquela área. Quanto aos indivíduos

de *R. solanicola*, foram encontrados apenas na vegetação rasteira, unicamente no ponto CS1, em uma das amostragens (29/09/2017).

Em todos os pontos monitorados nos condomínios ao sul da Faz. Água Sumida, *D. citri* apresentou a maior frequência em plantas cítricas em relação às outras espécies de psilídeos coletadas, exceto no ponto CS1. As frequências relativas de *D. citri* foram: 98.7% (CS2), 99.4% (CS3), 94.8% (CS4), 99.7% (CS5) e 97.1% (CS6). Entre as demais espécies de psilídeos, foram coletadas *I. divergipennis*, *Heteropsylla* sp., *G. brimblecombei* e *Mitrapsylla* spp. no ponto CS2, *I. divergipennis* e *Mitrapsylla* spp. em CS3 e CS4 (onde também foram coletados indivíduos de *Calinda* sp.), *I. divergipennis* em CS5 e *Trioza* sp., *Mastigimas* sp. e *I. divergipennis* no ponto CS6.

Nos condomínios ao norte da Faz. Água Sumida foram coletados em plantas um total 2.031 psilídeos, distribuídos com diferentes frequências nos pontos CN7 (0.3%), CN8 (6.1%), CN9 (11.7%), CN10 (23.5%), CN11 (13.3%), CN12 (26.9%), CN13 (10.4%) e CN14 (7.8%). *D. citri* foi a espécie de psilídeo mais capturada, com frequências variando de 96.2 a 100% nos pontos CN7 a CN14. Em todos os pontos foram encontrados espécimes de *I. divergipennis*, exceto em CN11 e CN14. Exemplares de *Mitrapsylla* spp. foram encontrados nos pontos CN8, CN10, CN12 e CN14, enquanto que os de *Heteropsylla* sp. foram encontrados nos pontos CN10 e CN13. Já nos pontos CN10 e CN12 foram encontrados unicamente indivíduos de *G. brimblecombei*, além de *D. citri*. Além disso, no ponto CN11 foram encontrados indivíduos dos gêneros *Calophya* sp. e *Trioza* sp.

No caso do condomínio ao leste da fazenda, foi encontrado só um indivíduo de *Mitrapsylla* spp. durante todo o tempo de monitoramento no ponto CL1, além de *D. citri*, como esclarecido anteriormente.

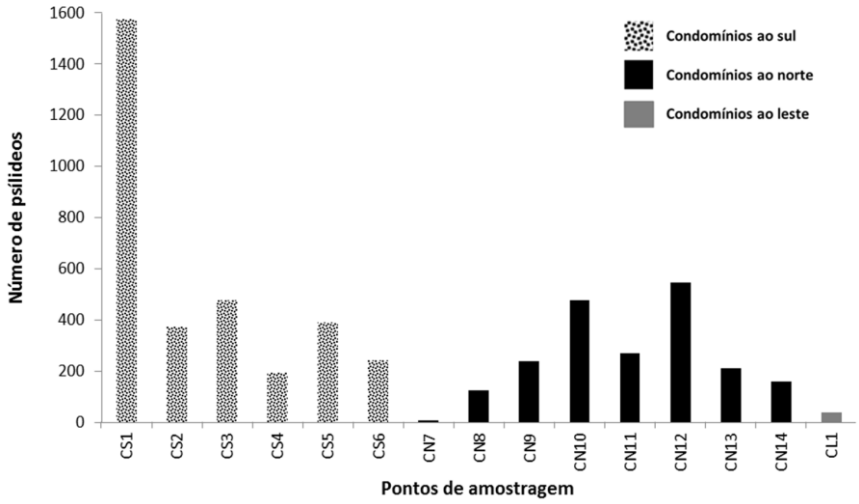

Figura 12. Número total de indivíduos de Psylloidea coletados no contexto "plantas de fundo de quintal" (PFQ) em plantas hospedeiras de *Diaphorina citri* nos pontos de monitoramento em condomínios ao sul (CS), ao norte (CN) e ao leste (CL), Fazenda Água Sumida, Citrosuco S.A. Botucatu, SP. Períodos de amostragem: CS e CN, 01/08/2017-20/12/2018; CL, 28/08/2018-20/12/2018.

4.1.3. Análise temporal

4.1.3.1. Coleta com armadilhas adesivas amarelas

Foi encontrada relação significativa (ρ 0,86; p<0,05) entre a abundância de espécies nas diferentes alturas de coleta por armadilhas adesivas amarelas e a distribuição no tempo, de acordo com a análise de correlação de Spearman. Durante os 16 meses de monitoramento evidenciou-se maior número de psilídeos na primavera, tanto em 2017 como em 2018 (Figura 13). Em 2017, foram coletados 17.903 psilídeos (21.4%) desde o final do inverno (01/09/2017) até o começo do verão (21/12/2017), sendo que o número de insetos aumentou aproximadamente nove vezes no final do inverno (01/09/2017 até 15/09/2017) comparado com a quinzena anterior (16/08/2017 até 01/09/2017).

Em 2018, foram coletados 57.974 psilídeos (69.4%) desde o final do inverno (28/08/2018) até o começo do verão (20/12/2018), sendo que o número de insetos aumentou aproximadamente 28 vezes no final do inverno (28/08/2018 até 21/09/2018) comparado com o período anterior de monitoramento (17/08/2018 até 28/08/2018). Na primavera de 2018 (21/09/2018 até 20/12/2018) foram coletados 45.700 psilídeos, que representam o 54.7% do total de psilídeos coletados (Figura 13). Contudo, foi claro que na primavera de 2017 e 2018 a média de psilídeos coletados por ponto por dia foi maior com respeito às outras estações, sendo coletados em média 7,27 e 14,21 psilídeos/dia, respectivamente (Tabela 3).

Em relação às coletas na primavera nas alturas de amostragem estabelecidas, foram observados 56.8% dos psilídeos a 7,5 m na primavera de 2017 e na primavera de 2018 foram encontrados 52% de psilídeos nesta mesma altura. Considerando-se os percentuais próximos a 50% nas duas primaveras (períodos que correspondem aos picos de maior coleta) é possível inferir que os psilídeos se movimentam na camada limite de voo e na camada limite atmosférica em proporções semelhantes (Figura 13). Embora, na primavera de 2017 foi encontrado que 8,52 psilídeos/dia por ponto de amostragem, se movimentam a 7,5 m e 6.03 psilídeos/dia se movimenta a 2,5 m. Diferencialmente, na primavera de 2018 a média de psilídeos se movimentando a 2,5 m (15.28 psilídeos/dia) foi maior comparado com os encontrados a 7,5 m (13.15 psilídeos/dia) (Tabela 3).

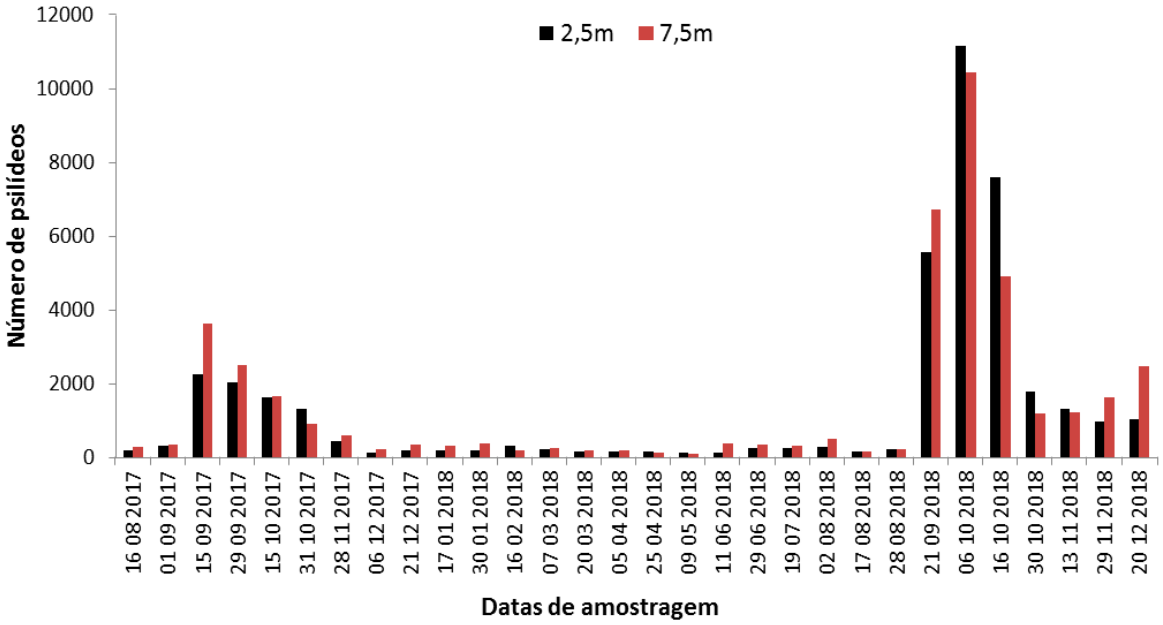

Figura 13. Número total de indivíduos de Psylloidea coletados no contexto "plantas de fundo de quintal" (PFQ) com armadilhas adesivas amarelas posicionadas nas alturas de 2,5 e 7,5 m, em áreas adjacentes e bordas da fazenda comercial de *Citrus* spp. Faz. Água Sumida, Citrosuco S.A., Botucatu, SP.

A coleta de psilídeos a 7,5 m foi maior que 70% comparando-se com os psilídeos coletados a 2,5 m em dois dos 30 períodos monitorados no total, correspondentes a coletas entre 09/05/2018 até 11/06/2018 e entre 29/11/2018 e 20/12/2018. Em sete períodos não consecutivos as coletas de psilídeos a 7,5 m representaram entre 60% e 70%. Nos outros 21 períodos monitorados a proporção de psilídeos coletados a 7,5 m variou entre 60% e 40%, sendo em média 50.6% (Tabela 2). Contudo, as altas proporções de psilídeos encontrados a

7,5 m fornecem evidência circunstancial da movimentação de psilídeos na camada limite atmosférica.

As espécies que apresentaram maior frequência durante o tempo total de monitoramento foram *Heteropsylla* sp., *I. divergipennis* e *G. brimblecombei*, as quais apresentaram picos de coleta durante a primavera, assim como *D. citri* (Figura 14). Dessa forma, na primavera de 2017 foram coletados 4.870 indivíduos de *Heteropsylla* sp. e na primavera de 2018 foram coletados 32.039 indivíduos, representando 13% e 85.4%, respectivamente, do total de indivíduos coletados de esse gênero (37.535). No caso de *I. divergipennis*, na primavera de 2017 foram coletados 7.144 indivíduos e na primavera de 2018 foram coletados 12.196 indivíduos, representando 33.7% e 57.6%, respectivamente, do total de indivíduos coletados de essa espécie (21.181). No caso de *G. brimblecombei*, na primavera de 2017 foram coletados 2.329 indivíduos e na primavera de 2018 foram coletados 5.337 indivíduos, representando 25.8% e 59%, respectivamente, do total de indivíduos coletados de essa espécie (9.042). No caso de *D. citri*, na primavera de 2017 foram coletados 133 indivíduos e na primavera de 2018 foram coletados 835 indivíduos, representando 10.4% e 65.5%, respectivamente, do total de indivíduos coletados de essa espécie (1.276).

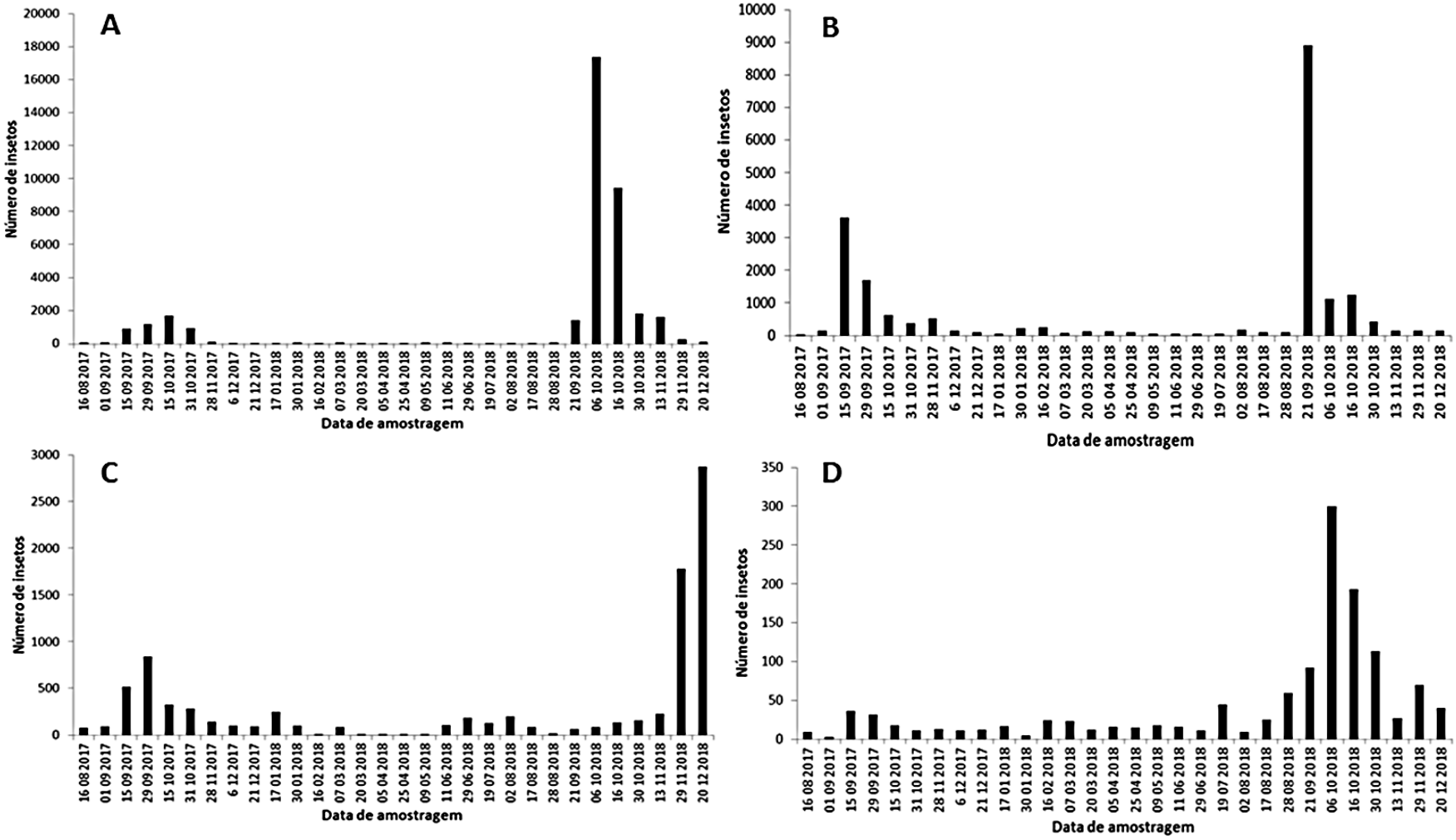

Figura 14. Número total de indivíduos de diferentes espécies de Psylloidea coletados no contexto "plantas de fundo de quintal" (PFQ) com armadilhas adesivas amarelas em áreas adjacentes e borda da fazenda comercial de *Citrus* spp. Faz. Água Sumida, Citrosuco S.A. (Botucatu, SP). A. *Heteropsylla* sp. B. *Isogonoceraia divergipennis*. C. *Glycaspis brimblecombei*. D. *Diaphorina citri*.

4.1.3.2. Coleta com armadilha de sucção estacionária

A tendência de maior coleta de psilídeos durante o final do inverno e começo da primavera também foi constatada por meio das coletas com a armadilha de sucção estacionária, já que 77.2% de psilídeos foram coletados entre o 01/09/2018 até o 6/10/2018 (Figura 15). É importante destacar que no período relatado anteriormente, houve um período de interrupção de funcionamento da armadilha devido a problemas técnicos (31/08/2018 a 21/09/2018). Posteriormente, entre o 6/10/2018 e o 13/11/2018, a armadilha também teve interrupção no funcionamento.

Quanto à constância das espécies coletadas com a armadilha de sucção estacionária no tempo, o período entre 19/7/2018 até 1/8/2018 apresentou o maior número de espécies. Nesse período foram encontradas sete espécies, sendo correspondentes a *G. brimblecombei*, *Mitrapsylla* spp., *I. divergipennis*, *B. occidentalis*, *Calophya* sp., *Trioza* sp. e *Euphalerus* sp. No período correspondente ao final do inverno e começo da primavera (30/08/2018 até 06/10/2018) foram encontradas seis espécies, *Mitrapsylla* spp., *I. divergipennis*, *B. occidentalis*, *Tainarys* sp., *Heteropsylla* sp., e *Platycorypha* sp. Nos outros períodos monitorados o número de espécies foi restringido a dois ou três gêneros (Figura 15).

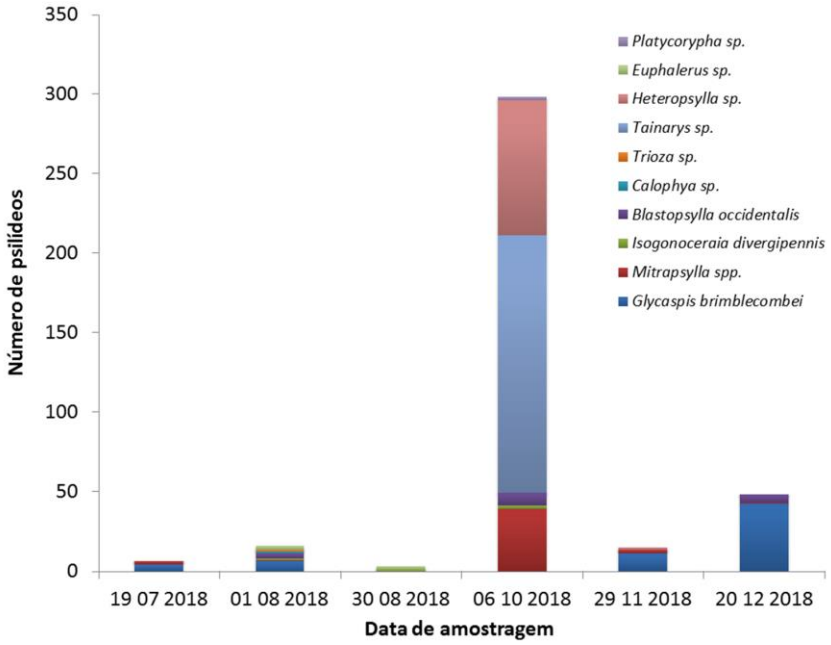

Figura 15. Espécies de Psylloidea coletados no contexto "plantas de fundo de quintal" (PFQ) com armadilha de sucção estacionária na borda da fazenda comercial de *Citrus* spp. Faz. Água Sumida, Citrosuco S.A., Botucatu, SP.

4.1.3.3. Coleta de Psylloidea em plantas hospedeiras de *D. citri*

Coincidentemente com o encontrado em armadilhas de altura, em plantas hospedeiras de *D. citri* foi coletado 45.6% de psilídeos durante o começo da primavera de 2018 (21/09/2018 até o 16/10/2018), enquanto que no período da primavera de 2017 foi coletado só 6% do total de psilídeos coletados durante todo o tempo de monitoramento. No entanto, a população de psilídeos em planta durante as outras estações se manteve em média em 2.7%, comparado com os psilídeos coletados durante a primavera (Figura 16).

A dinâmica temporal obtida a partir das coletas de psilídeos em plantas hospedeiras de *D. citri* comparada com a dinâmica temporal em altura parece ser convergente nesse contexto, de acordo com evidências circunstanciais encontradas em 2018. Entretanto, é preciso comparar essas dinâmicas em períodos de tempo maiores com a finalidade de ter maiores critérios de análise baseados em evidências temporais e espaciais das populações amostradas.

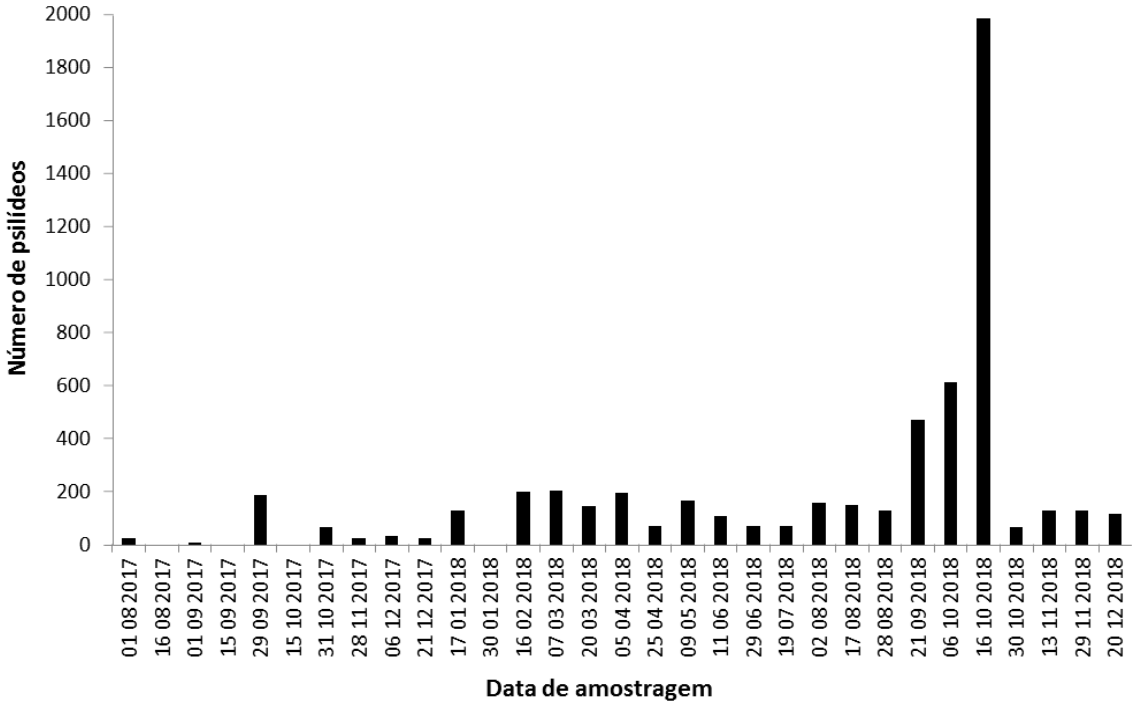

Figura 16. Número total de indivíduos de Psylloidea coletados no contexto "plantas de fundo de quintal" (PFQ) em plantas hospedeiras de *D. citri* de condomínios adjacentes à fazenda comercial de *Citrus* spp. Faz. Água Sumida, Citrosuco S.A., Botucatu, SP.

Do total de insetos coletados em plantas hospedeiras de *D. citri*, 60% (3.177) foi coletado com rede de varredura e 40% (2.139) com armadilha de sucção portátil, durante todo o período de monitoramento. A diversidade de espécies coletadas pelos dois métodos foi semelhante, incluindo indivíduos de *D. citri*, *I. divergipennis*, *Mitrapsylla* spp., *G. brimblecombei*, *Heteropsylla* sp. e *Mastigimas* sp. As espécies que divergiram dependendo do método de amostragem em planta foram *Calophya* sp. e *Trioza* sp., as quais só foram coletadas com armadilha de sucção portátil, e *Calinda* sp., a qual só foi coletada com rede de varredura. Do total de indivíduos coletados de *D. citri* (3.735), 56.1% foi coletado com armadilha de sucção portátil, sendo que o restante 43.9% foi coletado com rede de varredura. No caso de *Mastigimas* sp. e *Mitrapsylla* spp., foi coletada maior proporção com armadilha de sucção portátil, sendo coletado 55% e 67%, respectivamente. Mas no caso de *I. divergipennis* e *Heteropsylla* sp., a maior coleta de indivíduos foi com rede de varredura, representando 58% e 99.5%, respectivamente. No caso de *G. brimblecombei* a proporção de indivíduos coletados pelos dois métodos foi equivalente (50%).

Os indivíduos de *R. solanicola* foram coletados na vegetação rasteira em uma única data na primavera (29/09/2017), e somente em um ponto de monitoramento

4.1.4. Análise espaço-temporal de *D. citri*

A partir dos resultados de coleta em plantas hospedeiras de *D. citri* e em alturas (Figura 17), é possível inferir que a densidade populacional de *D. citri* em planta é diferente da encontrada nas diferentes alturas avaliadas. No entanto, na primavera de 2018 foi encontrado o maior pico populacional de *D. citri* nas plantas (21/09/2018) antecipando o pico populacional encontrado a 2,5 m (06/10/2018), indicando que após do aumento drástico da densidade populacional em planta os adultos embarcam em movimentos de dispersão. Dessa forma, na planta o aumento da população amostrada de *D. citri* começou no final de inverno (28/08/2018), se mantendo até a metade da primavera (16/10/2018). Ao passo que a 2,5 m a população de *D. citri* começou a apresentar aumento gradual no inverno (desde 17/7/2018) até o começo da primavera (21/09/2018), sendo que no começo da primavera a população coletada a 2,5 m apresentou um pico populacional de 283 indivíduos, diminuindo gradualmente até o 13/11/2018. Segundo as coletas de *D. citri* a 7,5 m, o pico populacional foi correspondente ao período descrito para as coletas a 2,5 m, mesmo sendo em uma proporção de menor captura de insetos.

Por outro lado, foi possível comparar o número de indivíduos de *D. citri* coletados nas diferentes alturas nas áreas vizinhas e na borda da fazenda comercial de citros (Figura 18), sendo que as coletas na borda da fazenda foram obtidas à altura das copas das árvores. Por exemplo, foi evidente que a população amostrada a 2,5 m começou a aumentar no final do inverno e mostrou um pico populacional na primeira semana da primavera de 2017 nas duas localidades, diminuindo drasticamente na quinzena seguinte. No entanto, na primavera de 2018 foi evidente que o pico populacional encontrado em altura nas áreas adjacentes à fazenda foi antecipado ao pico encontrado nos pontos da borda da fazenda. Assim, a partir de evidências circunstanciais é possível inferir que pode existir alguma relação espaço-temporal que direciona o comportamento migratório de *D. citri* entre as duas áreas comparadas.

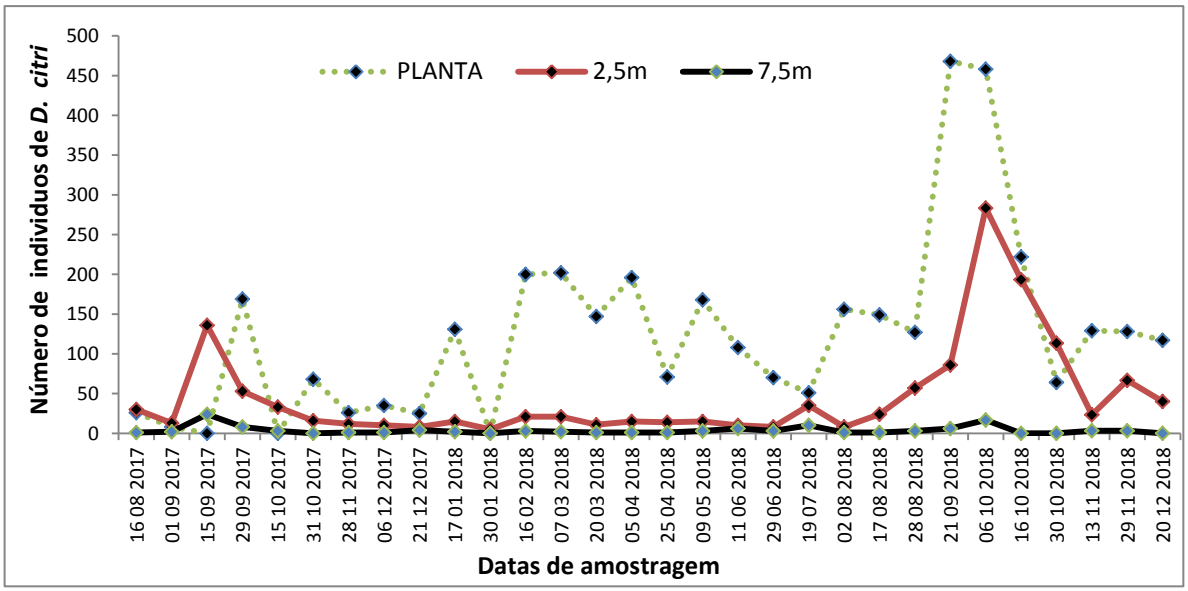

Figura 17. Número total de indivíduos de *Diaphorina citri* coletados no contexto "plantas de fundo de quintal" (PFQ), com armadilhas adesivas amarelas em diferentes alturas (2,5 e 7,5 m) e em plantas de condomínios adjacentes à fazenda comercial de *Citrus* spp. Faz. Água Sumida, Citrosuco S.A., Botucatu, SP.

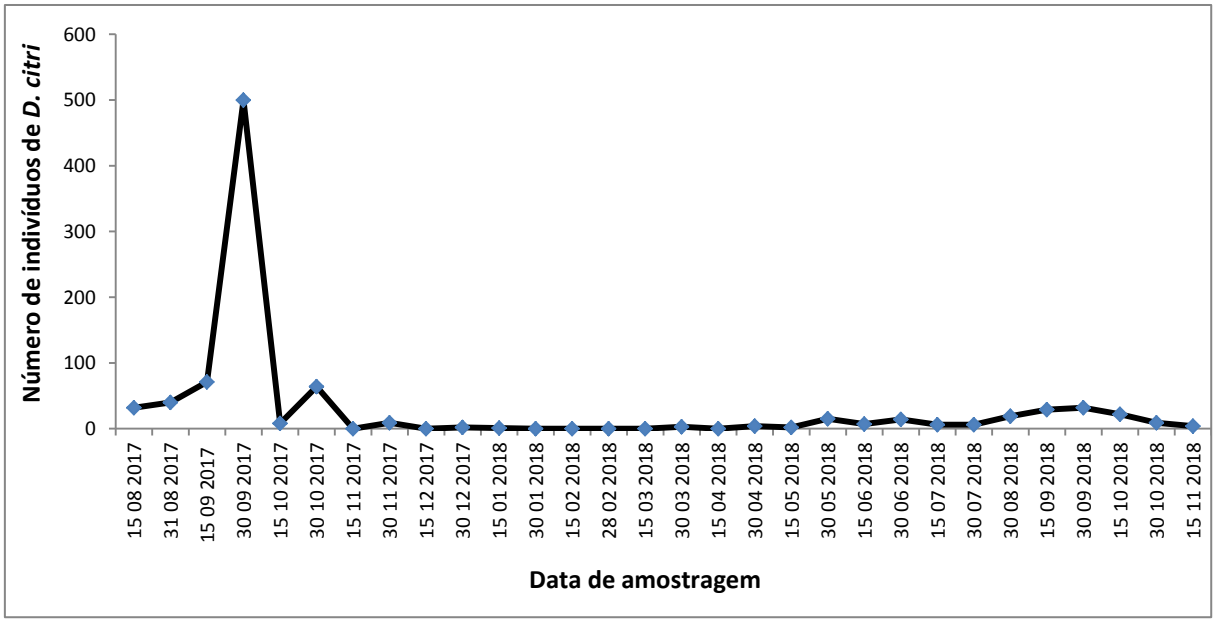

Figura 18. Número total de indivíduos de *Diaphorina citri* capturados com armadilhas adesivas amarelas à altura da copa das árvores cítricas na borda da fazenda comercial de *Citrus* spp. Faz. Água Sumida, Citrosuco S.A., Botucatu, SP.

4.1.5. Análise dos métodos de amostragem de psilídeos em altura

A partir dos resultados de coleta de psilídeos com armadilhas adesivas amarelas e armadilha de sucção estacionária, foi encontrada diferença tanto na quantidade como na diversidade de psilídeos coletados a 7,5 m.

Em geral, foram coletados maior número de psilídeos e maior diversidade de espécies com armadilhas adesivas amarelas comparado com a armadilha de sucção estacionária (Figura 19). Nas mesmas datas de amostragem e altura (7,5 m) foram coletados no total 15.569 psilídeos com armadilhas adesivas amarelas e apenas 386 com armadilha de sucção estacionária. Quanto ao número de espécies, foram coletadas no total 10 espécies com armadilha de sucção estacionária e 28 por meio de armadilhas adesivas amarelas (detalhadas no ítem 1.1.2). As espécies coletadas por ambos os métodos foram: *G. brimblecombei*, *Mitrapsylla* spp., *I. divergipennis*, *B. occidentalis*, *Calophya* sp., *Trioza* sp., *Tainarys* sp., *Heteropsylla* sp., *Euphalerus* sp. e *Platycorypha* sp.

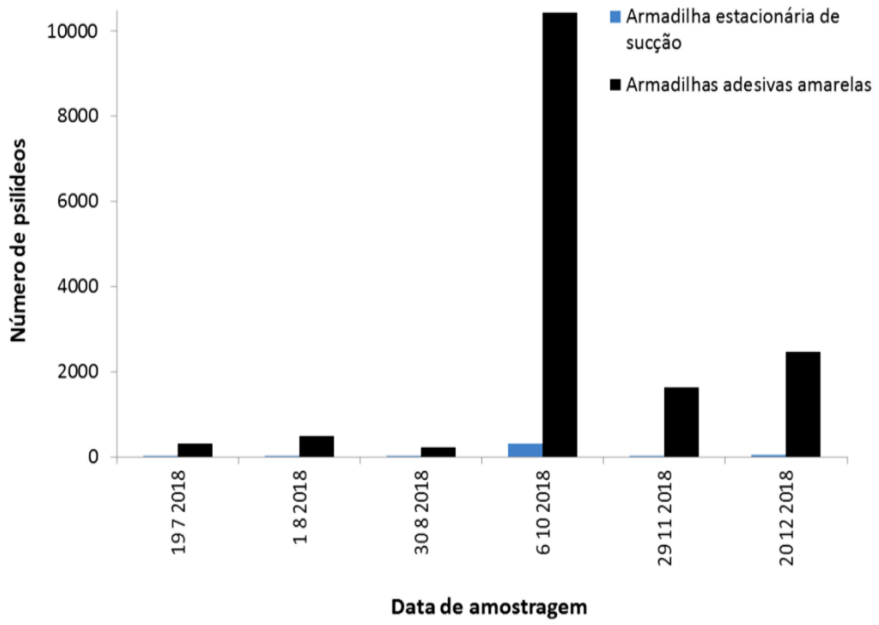

Figura 19. Comparação do número total de indivíduos de Psylloidea coletados com armadilhas adesivas amarelas e armadilha de sucção estacionária na borda da fazenda comercial de *Citrus* spp. Faz. Água Sumida, Citrosuco S.A., Botucatu, SP.

4.2. Análise contexto pomares com manejo deficiente de *D. citri*

4.2.1. Diversidade

4.2.1.1. Coleta com armadilhas adesivas amarelas

No contexto de pomares de manejo deficiente (MD) foram coletados 65.241 psilídeos no total dos pontos monitorados e nas diferentes alturas de coleta, por meio de armadilhas adesivas amarelas pertencentes a 22 gêneros (Figura 20), correspondentes às famílias Psyllidae (*Colophorina*, *Euceropsylla*, *Euphalerus*, *Heteropsylla*, *Isogonoceraia*, *Mitrapsylla*, *Platycorypha*, *Russelliana*), Aphalaridae (*Blastopsylla*, *Glycaspis*, *Leurolophus*, *Limataphalara*, *Tainarys*), Liviidae (*Caradocia*, *Diaphorina*, *Diclidophlebia*), Triozidae (*Calinda*, *Trioza*), Calophyidae (*Calophya*, *Mastigimas*), Carsidaridae (*Paracarsidara*) e Phacopteronidae (*Pseudophacopteron*). No entanto, não foi possível a identificação taxonômica de um indivíduo da família Psyllidae.

A família Psyllidae representou 49.8% do total de psilídeos coletados, distribuídos nas subfamílias Ciriacreminae (96.9%), Macrocorsinae (2.8%) Psyllinae (0.2%) e Aphalaroidinae (0.1%). Ciriacreminae foi representada por *Heteropsylla* sp. (69.8%), *I. divergipennis* (24.8%), *Mitrapsylla* spp. (5.0%) *Euceropsylla* sp. (0.4%) e *Heteropsylla caldwelli* (0.4%). Macrocorsinae foi representada por *Euphalerus* sp. (98.2%), *E. ostreoides* (1.6%) e *Colophorina* sp. (0.3%). Da subfamília Psyllinae foram encontrados unicamente indivíduos de *Platycorypha* sp. e a subfamília Aphalaroidinae foi representada unicamente por *R. solanicola*.

A família Triozidae representou 42.7% do total de psilídeos coletados, sendo 99.98% de *Trioza* sp. e 0.02% de *Calinda* sp. A família Aphalaridae representou 6.3% do total de psilídeos coletados, distribuídos nas subfamílias: Spondyliaspidinae (95.05%), Rhinocolinae (4.93%) e Aphalarinae (0.02%). Spondyliaspidinae foi representada por *B. occidentalis* (61.4%) e *G. brimblecombei* (38.6%). Rhinocolinae foi representada por *Leurolophus oriformae* (7.3%) e *Tainarys* sp. (92.7%) e a subfamília Aphalarinae foi representada unicamente por *Limataphalara* sp.

A família Liviidae representou 0.2% do total de psilídeos coletados, distribuídos nas subfamílias Euphyllurinae (91.4%) e Liviinae (8.4%). A subfamília Euphyllurinae foi representada por *Caradocia* sp. (23.2%), *C. longiantennata* (11%) e *D. citri* (65.8%) e a subfamília Liviinae foi representada unicamente por *Diclidophlebia* sp. A família Calophyidae foi representada por *Calophya* sp. (96.4%) e *Mastigimas* sp. (3.6%), das

subfamílias Calophyinae e Mastigimatinae, respectivamente. Da família Carsidaridae só foram coletados indivíduos do gênero *Paracarsidara* e da família Phacopteronidae foram coletados indivíduos de espécies não identificadas do gênero *Pseudophacopteron*. Sendo que a razão sexual de todas as espécies encontradas foi em média de 0,53.

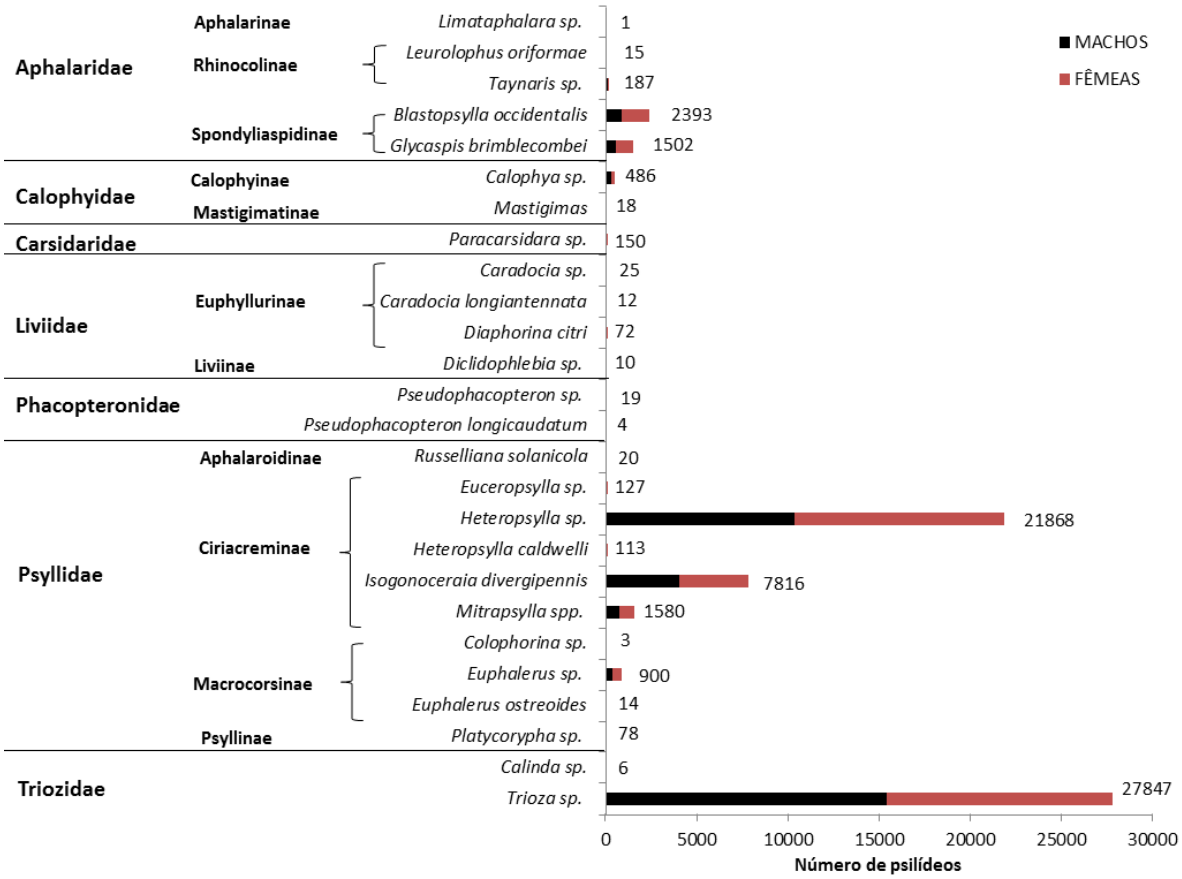

Figura 20. Número total de indivíduos de Psylloidea, coletados no contexto de pomares com manejo deficiente (MD) com armadilhas adesivas amarelas instaladas a 2,5 e 7,5 m de altura em áreas vizinhas à fazenda comercial de *Citrus* spp., Faz. Nova Era, Citrosuco S.A., Casa Branca, SP. 01/11/2017 a 19/12/2018.

As espécies que apresentaram constância de 100% no total das 25 coletas por meio de armadilhas adesivas amarelas foram: *B. occidentalis*, *Calophya* sp., *G. brimblecombei*, *Heteropsylla* sp., *I. divergipennis*, *Mitrapsylla* spp. e *Trioza* sp. *Paracarsidara* sp. e *Euphalerus* sp. apresentaram constância de 92% e 56%, respectivamente, enquanto que *Tainarys* sp. e *D. citri* estiveram presentes em 64% do total das coletas. As espécies de psilídeos que apresentaram constância entre 25 e 50% do total das coletas foram: *Heteropsylla caldwelli* (44%), *R. solanicola* (40%), *Caradocia* sp. (32%), *Euceropsylla* sp. (32%) e *Platycorypha* sp. (32%). As espécies que representaram constância menor que 25% do total das coletas foram: *Euphalerus ostreoides* (24%), *Diclidophlebia* sp. (20%), *Pseudophacopteron* sp. (20%) *Mastigimas* sp. (16%), *Leurolophus oriformae* (16%), *P.*

longicaudatum (12%), *Calinda* sp. (8%), *Caradocia longiantennata* (8%), *Colophorina* sp. (4%) e *Limataphalara* sp. (4%).

Quanto à frequência, as espécies mais coletadas em relação ao número total de psilídeos coletados foram: *Trioza* sp. (42.7%), *Heteropsylla* sp. (33.5%), *I. divergipennis* (12%), *B. occidentalis* (3.7%), *Mitrapsylla* spp. (2.4%), *G. brimblecombei* (2.3%) e *Euphalerus* sp. (1.4%), sendo que as demais espécies apresentaram frequência inferior a 1%.

4.2.1.2. Coleta de Psylloidea em plantas hospedeiras de *D. citri*

No total foram coletados 550 psilídeos em plantas hospedeiras de *D. citri*. Do total de psilídeos coletados, 81.8% foram de *D.citri*, 12.4% de *I. divergipennis* e 2.9% de *Mitrapsylla* spp., sendo que as outras espécies representaram menos de 1%: *Leurolophus oriformae* (0.5%), *Platycorypha* sp. (0.5%), *G. brimblecombei* (0.7%), *Heteropsylla* sp. (0.4%), *B. occidentalis* (0.2%) e *Euceropsylla* sp. (0.5%) (Figura 21).

D. citri apresentou 100% de constância durante o total do período de monitoramento. Para as outras espécies coletadas em plantas, a constância foi inferior a 50%: *I. divergipennis* (38.1%), *Mitrapsylla* spp. (28.6%), *L. oriformae* (14.3%), *G. brimblecombei*, *Platycorypha* sp. (9.5%), *Heteropsylla* sp. (9.5%), *Euceropsylla* sp. (4.8%) e *B. occidentalis* (4.8%).

Não foram encontrados indivíduos de Psylloidea em nenhuma das amostragens realizadas com rede de varredura e armadilha de sucção portátil na vegetação rasteira.

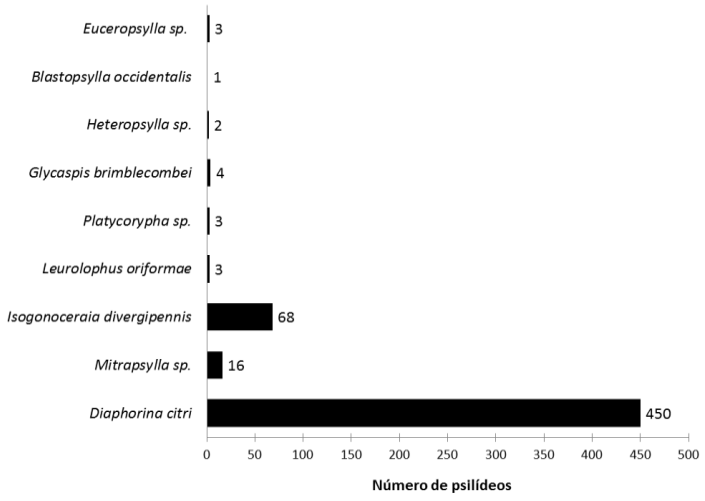

Figura 21. Número total de indivíduos de Psylloidea por gênero ou espécie, coletadoscom rede de varredura e succionador portátil no contexto de pomares com manejo deficiente (MD) em plantas hospedeiras de *Diaphorina citri* em áreas vizinhas à fazenda comercial de *Citrus* spp., Faz. Nova Era, Citrosuco S.A., Casa Branca, SP. 01/11/2017 a 19/12/2018.

4.2.2. Análise espacial

4.2.2.1. Coleta com armadilhas adesivas amarelas

Houve correspondência significativa entre os números totais de psilídeos capturados ao longo de todo o período de amostragem nas alturas de 2,5 e 7,5 m (ρ 0,92; p<0,05) de acordo com a análise de correlação de Spearman. No total foram coletados 31.558 psilídeos a 2,5 m e 33.683 psilídeos a 7,5 m. Dentre os psilídeos capturados a 2,5 m, as espécies com maior frequência foram: *Heteropsylla* sp. (39.77%), *Trioza* sp. (31.85%), *I. divergipennis* (18.41%), *B. occidentalis* (2.77%) e *Mitrapsylla* spp. (2%), sendo que as demais espécies coletadas representaram menos de 2% (Figura 22A). Das espécies coletadas a 7,5 m, as mais frequentes foram: *Trioza* sp. (52.8%), *Heteropsylla* sp. (27.6%), *I. divergipennis* (6.0%), *B. occidentalis* (4.5%), *G. brimblecombei* (2.9%), *Mitrapsylla* spp. (2.7%) e *Euphalerus* sp. (1.5%), sendo que as demais espécies coletadas representaram menos de 1% (Figura 22B).

No caso de *D. citri*, foram coletados 65 indivíduos a 2,5 m e apenas 7 a 7,5 m, sugerindo hipoteticamente que 90.05% dos indivíduos estariam se movimentando na camada limite de voo e o restante estariam se movimentado passivamente na camada limite atmosférica. Para algumas espécies também foram coletados mais de 70% dos indivíduos na altura de 2,5 m, tais como *Diclidophlebia* sp. (100%), *Limataphalara* sp. (100%), *Leurolophus oriformae* (93.3%), *E. ostreoides* (93%), *Caradocia* sp. (88.2%), *Heteropsylla caldwelli* (87.6%), *Caradocia longiantennata* (83.3%), *Mastigimas* sp. (78.2%), *Pseudophacopteron* sp. (75%) e *I. divergipennis* (74.3%). Outras espécies apresentaram entre 50 e 70% dos indivíduos se movimentando a 2,5 m: *R. solanicola* (65.6%). *Platycorypha* sp. (62.7%), *Mitrapsylla* spp. (60%), *Heteropsylla* sp. (57.5%), *Euceropsylla* sp. (53.9%) e *Paracarsidara* sp. (52.3%). Em contraste, algumas das espécies foram coletadas com frequência de indivíduos superior a 60% na altura de 7,5 m, tais como *Colophorina* sp. (100%), *Tainarys* sp. (66.3%), *G. brimblecombei* (65.9%), *Trioza* sp. (63.9%), *B. occidentalis* (63.5%) e *Calophya* sp. (61.3%).

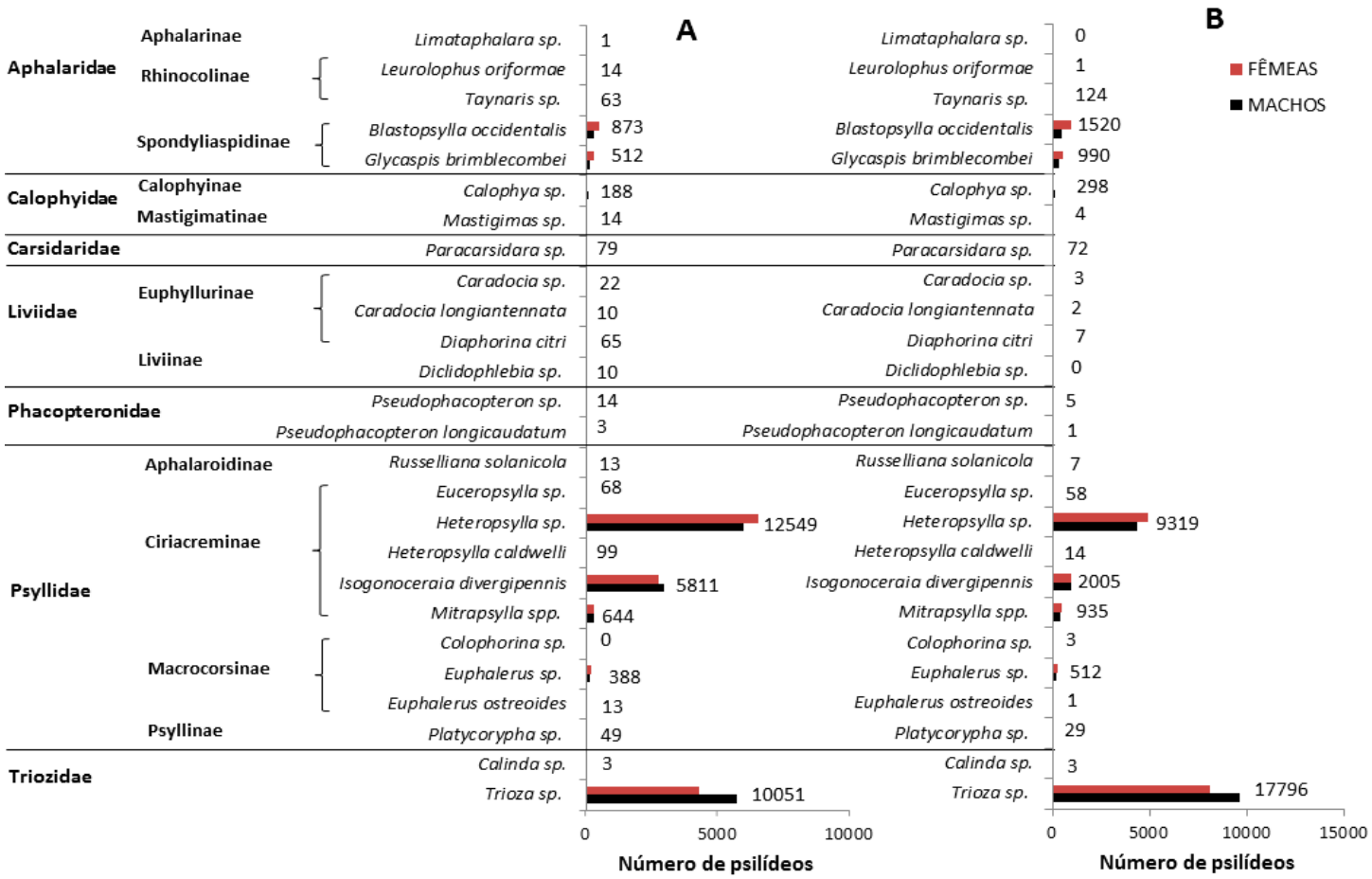

Figura 22. Número total de indivíduos de Psylloidea, coletados no contexto de pomares com manejo deficiente (MD) com armadilhas adesivas amarelas em áreas vizinhas à fazenda comercial de *Citrus* spp. Faz. Nova Era, Citrosuco S.A., Casa Branca, SP. 01/11/2017 a 19/12/2018. A. Psilídeos coletados a 2,5 m de altura. B. Psilídeos coletados a 7,5 m de altura.

Nos diferentes pontos de monitoriamento com armadilhas adesivas amarelas (Figura 23), evidenciou-se maior número de psilídeos no ponto NE3 com total de coleta de 27.362 psilídeos, representando o 40.9% do total de espécimes coletados, seguido pelo ponto NE6 com 10.848 psilídeos (16.2%) e o ponto NE1 com 7.529 psilídeos (11.2%). Nos outros pontos, as coletas foram em média de 4.334 de psilídeos por ponto (6.5%), durante todo o período de monitoramento. No caso da maior coleta no ponto NE3, *Trioza* sp. representou 54.5% do total de indivíduos capturados de 14/6/2018 até o final do período monitorado. O segundo ponto de maior coleta (NE6) foi no cemitério de Casa Branca (SP), área com alta presença de *M. paniculata*; deve-se salientar que no início do monitoramento (01/11/2017 a 14/11/2017) o ponto NE6 correspondeu a um pomar de *Citrus* spp. abandonado, onde foram coletados 102 psilídeos, sendo 45 indivíduos a 2,5 m e 57 espécimes a 7,5 m. Esse pomar abandonado foi erradicado após uma quinzena do início do monitoramento, razão pela qual o ponto NC6 foi transferido para o cemitério de Casa Branca (SP), onde as amostragens foram reiniciadas a partir de 20/12/2017. No ponto NE4 foram coletados 3.855 psilídeos, representando 5,8% do total de psilídeos em todos os pontos, sendo que esse ponto também teve sua localização alterada, ficando sem monitoramento no período de 14/11/2017 a 15/1/2018.

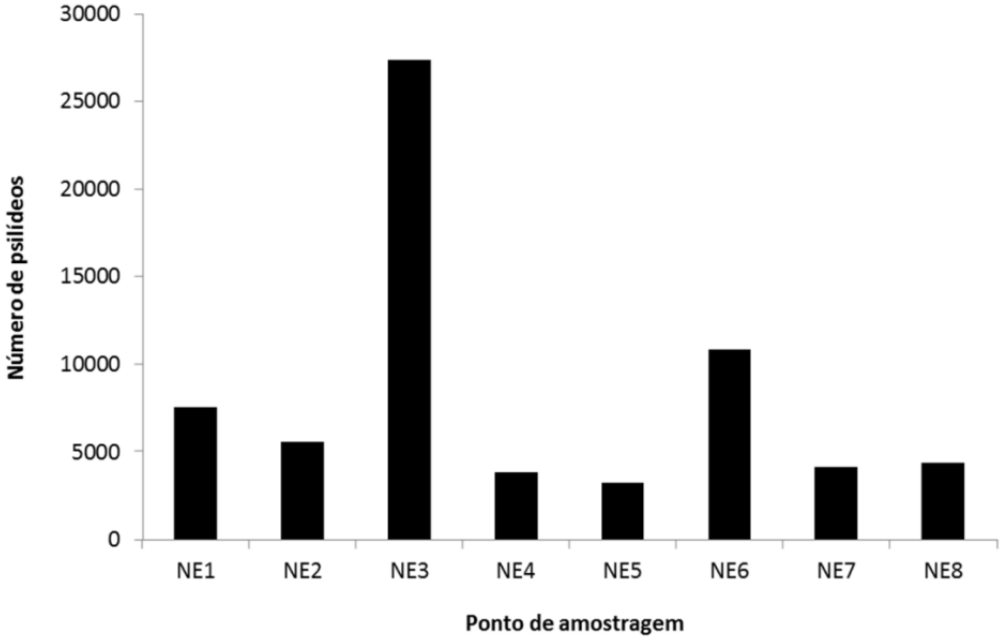

Figura 23. Número total de indivíduos de Psylloidea coletados no contexto de pomares com manejo deficiente (MD) com armadilhas adesivas amarelas em áreas vizinhas á fazenda comercial de *Citrus* spp., Faz. Nova Era, Citrosuco S.A., Casa Branca, SP. 01/11/2017 a 19/12/2018.

4.2.2.2. Coleta de Psylloidea em plantas hospedeiras de *D. citri*

O ponto de maior coleta de psilídeos em plantas hospedeiras de *D. citri* com rede de varredura e armadilha de sucção portátil foi o NE6, o qual representou 91.45% do total de psilídeos coletados em todos os pontos. Nos pontos NE5 e NE4 foram coletados 3.6% e 2.9% dos psilídeos, respectivamente, e menos de 1% nos demais pontos (Figura 24). Dos psilídeos coletados em NE6, 84.9% foram de *D. citri*, 12.9% de *I. divergipennis*, 1% de *Mitrapsylla* spp., 0.6% de *Euceropsylla* sp., 0.4% de *Platycorypha* sp. e 0.2% de espécies de *Heteropsylla*. No ponto NE5, 75% dos psilídeos coletados foram de *D. citri*, 10% de *I. divergipennis*, 5% de *Mitrapsylla* spp., 5% de *G. brimblecombei* e 5% de *B. occidentalis*. Já no ponto NE4, *Mitrapsylla* spp. representou a maior parte dos indivíduos coletados (50%), seguida por *D. citri* (18.75%), *Leurolophus oriformae*, *Pseudophacopteron* sp. e *I. divergipennis*, sendo que as três últimas espécies representaram percentuais homogêneas de indivíduos (6.25%). Nos demais pontos, a coleta de psilídeos foi mais baixa que nos pontos detalhados anteriormente, encontrando-se só um indivíduo de *D. citri* e dois de *G. brimblecombei* no ponto NE1, dois indivíduos de *D. citri*, um de *Mitrapsylla* spp. e um de *G. brimblecombei* no ponto NE7, e dois indivíduos de *D. citri* e um de *Heteropsylla* sp. no ponto NE8, durante todo o tempo de monitoramento.

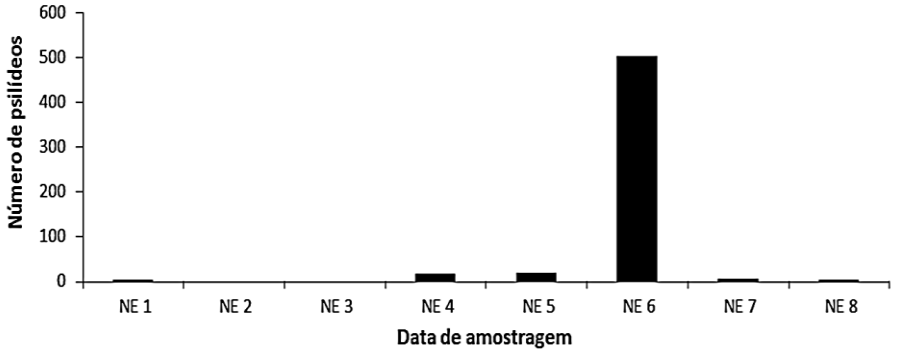

Figura 24. Número total de indivíduos de Psylloidea coletados no contexto de pomares com manejo deficiente (MD) em plantas hospedeiras de *Diaphorina citri*, em áreas vizinhas á fazenda comercial de *Citrus* spp., Nova Era, Citrosuco S.A., Casa Branca, SP. 01/11/2017 a 19/12/2018.

Em relação à coleta de psilídeos em plantas hospedeiras de *D. citri*, por meio de rede de varredura e com armadilha de sucção portátil foram coletados 57% (312) e 43% (238) dos indivíduos, respectivamente, durante o período total de monitoramento. No ponto NE1 foram coletados dois indivíduos de *G. brimblecombei*, sendo um coletado com rede de varredura e o outro com sucção, e um indivíduo de *D. citri* com armadilha de sucção portátil. No ponto

NE4 foram coletados seis indivíduos com rede de varredura, pertencentes a *D. citri* (3), *Leurolophus oriformae* (1), *I. divergipennis* (1) e *Mitrapsylla* spp. (1), e com armadilha de sucção portátil foram coletados 10 indivíduos, pertencentes a *Mitrapsylla* spp. (7), *Leurolophus* sp. (2) e *Psedophacopteron* sp. (1). No ponto NE5 foram coletados indivíduos de *D. citri* (5), *Mitrapsylla* spp. (1), *G. brimblecombei* (1) e *B. occidentalis* (1), sendo que com sucção foram coletados indivíduos de *I. divergipennis* (2) e *D.citri* (10). No ponto NE6, para *I. divergipennis* foram coletados 50 indivíduos com rede de varredura e 15 com armadilha de sucção portátil, e no caso de *D. citri* foram coletados 236 indivíduos com rede de varredura e 188 com sucção; nesse ponto foram também coletados indivíduos de *Euceropsylla* sp. (1), *Platycorypha* sp. (3) e *Mitrapsylla* spp. (3) com rede, sendo que com sucção foram coletados indivíduos de *Mitraspylla* spp. (2), *Heteropsylla* sp. (1), *Euceropsylla* sp. (2) e *Platycorypha* sp. (1). No ponto NE7 foram coletados indivíduos somente por meio de sucção, sendo exemplares de *D. citri* (2) e *Mitraspylla* spp. (1), enquanto que no ponto NE8 foram capturados indivíduos de *D. citri* (2) somente com rede, sendo que com sucção foi coletado um indivíduo de *Heteropsylla* sp.

4.2.3. Análise temporal

4.2.3.1. Coleta com armadilhas adesivas amarelas

Relacionando-se o número total de indivíduos de Psylloidea nas alturas de 2,5 e 7,5 m ao longo do período de monitoramento, foi encontrada correlação significativa (ρ 0,94; $p<0,05$) pelo método de Spearman. Durante os 13 meses de monitoramento evidenciou-se maior número de psilídeos na primavera de 2018, sendo coletados 47.323 psilídeos desde o final do inverno (12/9/2018) até o final da primavera (19/12/2018), representando 72.5% do total de psilídeos coletados (Figura 25). Em 2017 o monitoramento foi iniciado no meio da primavera, sendo que no período de 1/11/2017 até 14/11/2017 foram coletados 1.821 psilídeos (2.8%), e de 14/11/2017 até o final da primavera (21/12/2017) foram coletados 3.6% do total de psilídeos. Além da primavera, observou-se aumento da população entre 28/06/2018 e 01/08/2018 (início a meio de inverno), sendo coletados nesse período 7.535 psilídeos, representando 11.5% do total das coletas. Interessantemente, no período do final da primavera de 2017 foram encontrados em média por ponto 3,70 psilídeos/dia, comparado com a primavera de 2018, na qual foram encontrados 28,31 psilídeos/dia, sendo que no inverno de

2018 foram encontrados 14,70 psilídeos/dia com maiores médias de coleta de psilídeos a 7,5 m com é explicito na Tabela 3.

Considerando-se as 25 coletas realizadas, os percentuais de indivíduos em relação ao total coletado a 7,5 m foram maiores de 70% em dois períodos, entre 7/12/2017 e 20/12/2017 (74%) e entre 7/5/2018 e 24/5/2018 (72.6%). Em sete períodos não consecutivos as coletas de psilídeos a 7,5 m representaram menos de 70%, mas foram maiores de 60%. Em dez períodos monitorados o percentual de psilídeos coletados a 7,5 m foi menor do que 60%, mas superior a 50%, comparado com psilídeos coletados a 2,5 m. Outros seis períodos não consecutivos apresentaram, em média, 46.5% dos psilídeos coletados a 7,5 m (Figura 25 e Tabela 2). As altas proporções de psilídeos encontrados a 7,5 m constituem evidência circunstancial da movimentação de psilídeos na camada limite atmosférica.

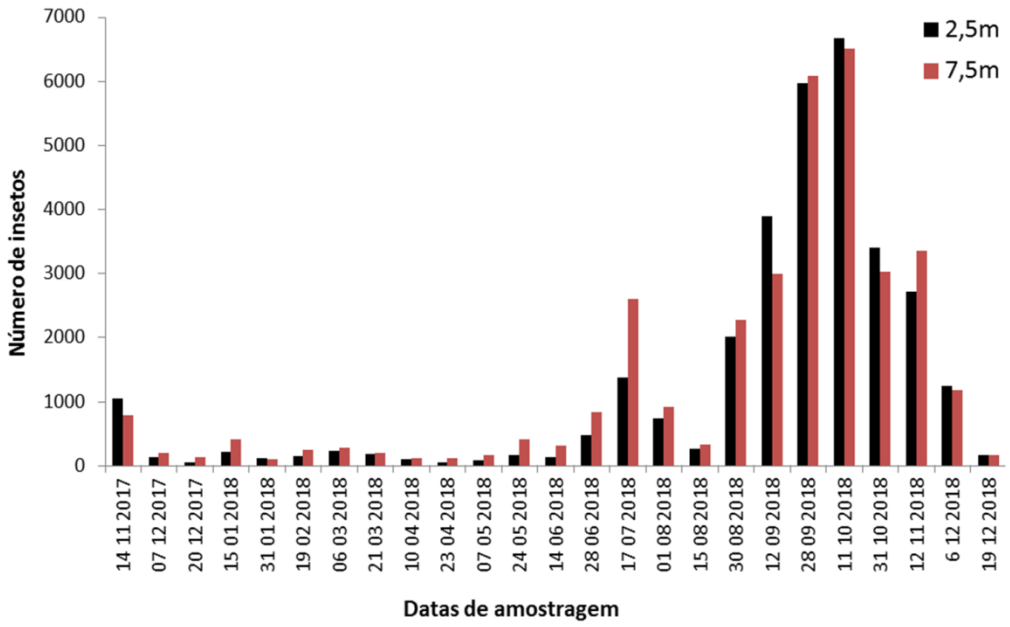

Figura 25. Número total de indivíduos de Psylloidea, coletados no contexto de pomares com manejo deficiente (MD) por meio de armadilhas adesivas amarelas, de acordo com a altura de amostragem (2,5 e 7,5 m) em áreas vizinhas à fazenda comercial de *Citrus* spp., Faz. Nova Era, Citrosuco S.A., Casa Branca, SP.

As espécies com maior frequência de captura durante a primavera foram *Heteropsylla* sp., *I. divergipennis* e *Trioza* sp. (Figura 26). Dessa forma, na primavera foram coletados 19.643 indivíduos de *Heteropsylla* sp., os quais representaram 89.9% do total coletado desse gênero (21.843). No caso de *I. divergipennis*, na primavera foram coletados 2.697 indivíduos, representando 34.5% do total coletado dessa espécie (7.816). No caso de *Trioza* sp. na primavera foram coletados 14.074 indivíduos representando 50.5% do total

coletado desse gênero (27.848). No caso de *D. citri*, na primavera foram coletados 28 indivíduos, equivalente a 38.9% do total coletado dessa espécie (72).

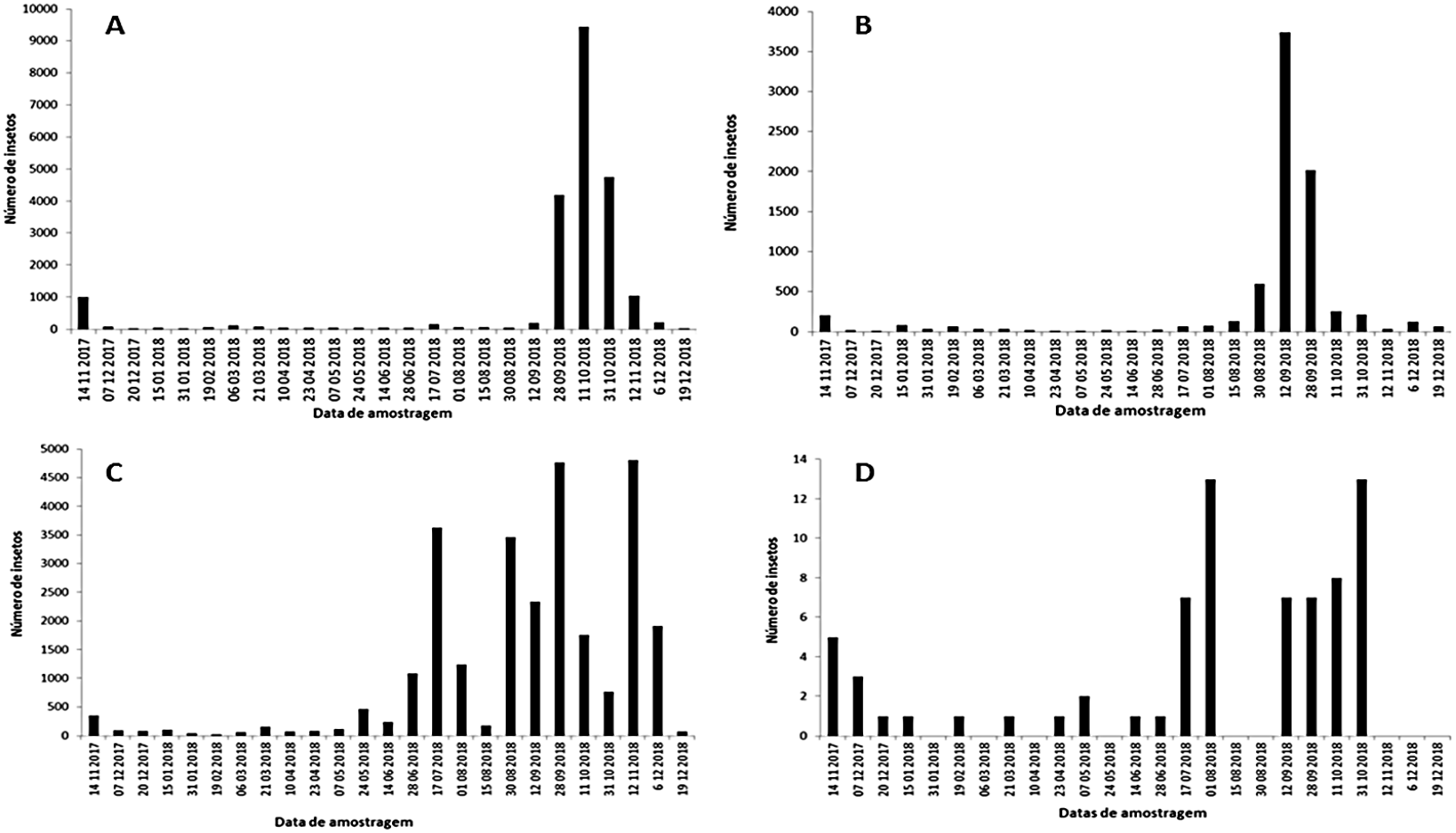

Figura 26. Número total de indivíduos de Psylloidea, coletados no contexto de pomares com manejo deficiente (MD) por meio de armadilhas adesivas amarelas em áreas vizinhas à fazenda comercial de *Citrus* spp. Faz. Nova Era, Citrosuco S.A., Casa Branca, SP. A. *Heteropsylla* sp. B. *Isogonoceraia divergipennis*. C. *Trioza* sp. D. *Diaphorina citri*.

4.2.3.2. Coleta de Psylloidea em plantas hospedeiras de *D. citri*

As coletas de espécies de Psylloidea em plantas hospedeiras de *D. citri* aparentemente não mostraram um padrão claro de abundância de psilídeos (Figura 27), como ocorreu em coletas a diferentes alturas por meio de armadilhas adesivas amarelas. No entanto, as maiores coletas nas plantas ocorreram no período final do inverno (30/8/2018 até 12/9/2018), representando 15.2% (84 psilídeos) do total das coletas. Outro período que apresentou pico de coleta foi o correspondente a 07/05/2018 até 24/05/2018, representando 12.5% (69 psilídeos). Nos demais períodos de monitoramento os psilídeos coletados não representaram, em cada período, mais do que 10% do total de indivíduos.

Os resultados obtidos com as coletas de psilídeos em planta no contexto de pomares com manejo deficiente sugerem que as populações de psilídeos que embarcam em processos de dispersão é diferente da dinâmica da população na planta.

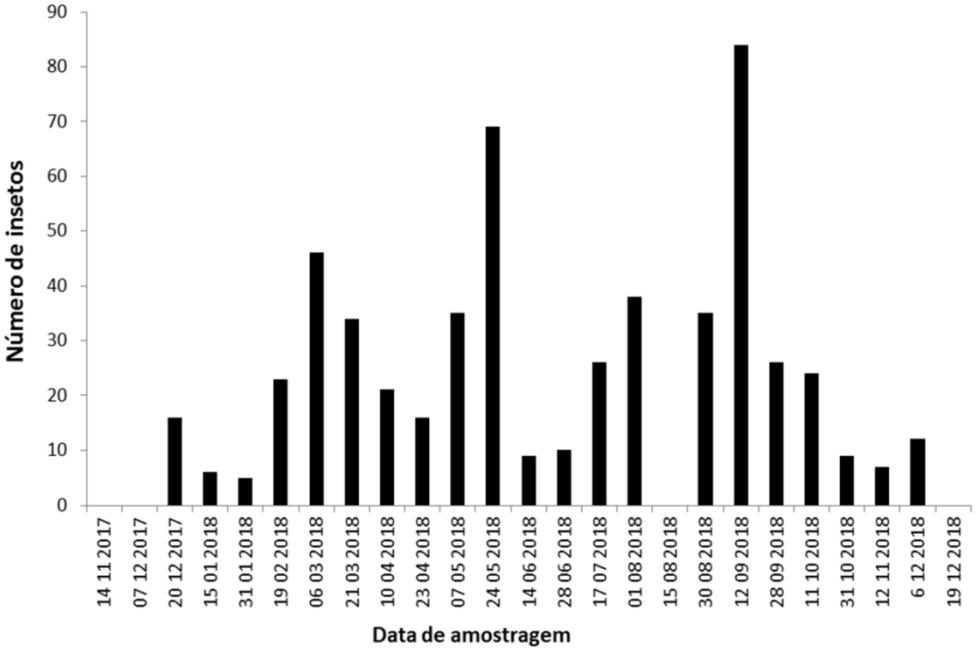

Figura 27. Número total de indivíduos de Psylloidea coletados no contexto plantas de pomares com manejo deficiente (MD) em plantas hospedeiras de *Diaphorina citri*, em áreas vizinhas à fazenda comercial de *Citrus* spp. Faz. Nova Era, Citrosuco S.A., Casa Branca, SP.

4.2.4. Análise espaço-temporal de *D. citri*

Analisando-se os números de indivíduos de *D. citri* coletados por rede de varredura e armadilha de sucção portátil em plantas de citros e de murta, e por armadilhas adesivas amarelas nas alturas de 2,5 e 7,5 m (Figura 28), é possível constatar que a densidade populacional em planta é diferente das encontradas nas diferentes alturas avaliadas. No entanto, foram encontrados picos populacionais coincidentes tanto em planta como armadilhas adesivas amarelas em dois períodos. Dessa forma, na quinzena de 17/07/2018 até 01/08/2018 evidenciou-se o primeiro pico populacional em armadilhas adesivas amarelas a 2,5 m, o qual foi precedido pelo maior pico populacional de *D. citri* em plantas obtido no final do outono. Posteriormente, no final do inverno foi encontrado o segundo maior pico populacional de *D. citri* em planta, que curiosamente precedeu o pico populacional encontrado a 2,5 m. Quanto às coletas de *D. citri* a 7,5 m, o pico populacional foi correspondente ao período descrito para as coletas a 2,5 m, mesmo sendo em uma proporção de menor captura de insetos.

De um modo geral, os dados sugerem que a densidade populacional de *D. citri* em suas plantas hospedeiras tende a ser muito alta na quinzena anterior ao pico populacional nas diferentes alturas de amostragem por armadilhas adesivas amarelas. No entanto, nem todo pico populacional de *D. citri* em planta é seguido de um pico populacional em altura, indicando que as dinâmicas populacionais de psilídeos em planta são diferentes das dinâmicas a diferentes alturas de amostragem por armadilhas adesivas. Portanto, é possível inferir que o comportamento migratório de *D. citri* é influenciado pela interação entre fatores abióticos e bióticos em diferentes escalas espaciais e temporais.

Quanto à comparação entre os indivíduos de *D. citri* coletados por armadilhas adesivas amarelas nas diferentes alturas nas áreas vizinhas (Figura 28) e na borda da fazenda comercial de citros (Figura 29), foi evidente que no final do inverno a população amostrada a 2,5 m e em plantas nas áreas vizinhas começou a aumentar sincronicamente com o aumento da população em plantas na borda da fazenda comercial, sendo que os picos populacionais das áreas vizinhas antecederam o pico da borda da fazenda. Dessa forma, do final do inverno (30/08/2018) até o segundo mês da primavera (15/11/2018) as populações de *D. citri* mostraram o máximo pico populacional nas duas áreas, sendo muito importante essa convergência desde a perspectiva epidemiológica da disseminação primária.

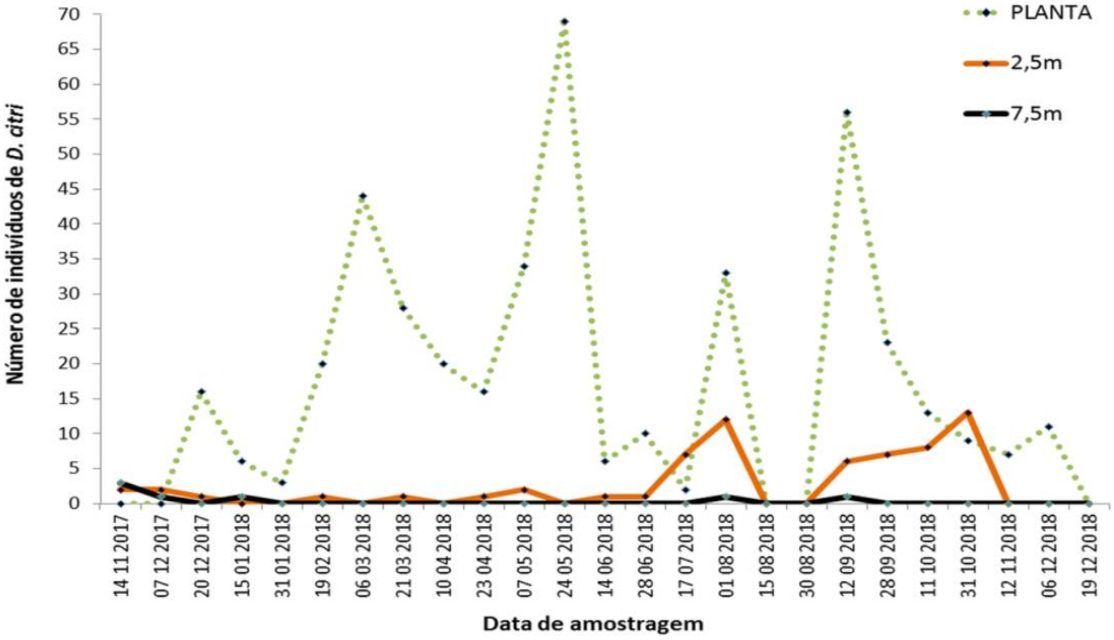

Figura 28. Número total de indivíduos de *Diaphorina citri* coletados no contexto de pomares com manejo deficiente (MD), por meio de armadilhas adesivas amarelas nas alturas de 2,5 e 7,5 m, ou com redede carredura e armadilha de sucção portátil sobre plantas de citros e murta, em áreas vizinhas à fazenda comercial de *Citrus* spp. Faz. Nova Era, Citrosuco S.A., Casa Branca, SP.

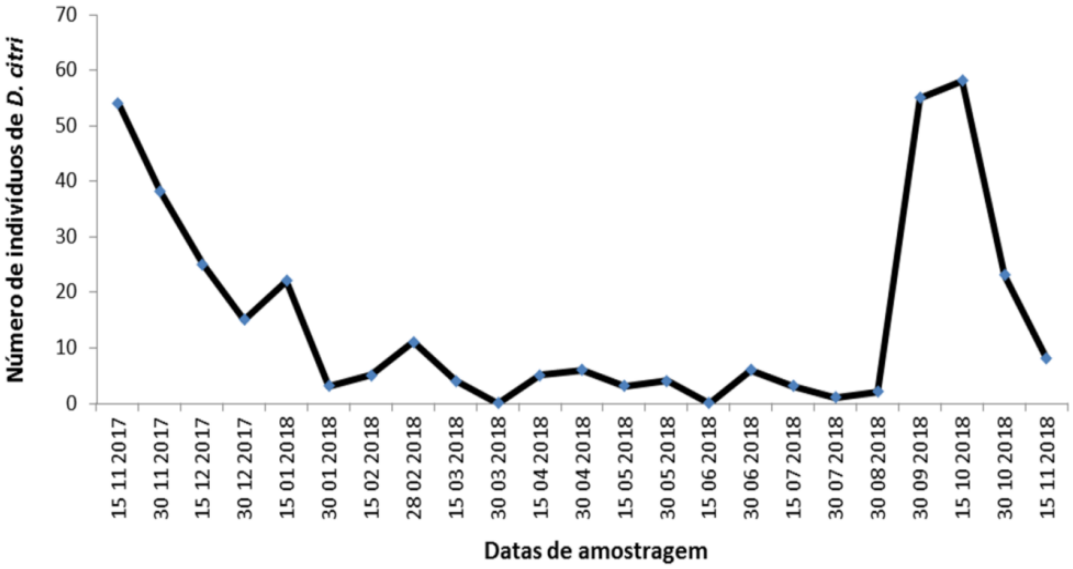

Figura 29. Número total de indivíduos de *Diaphorina citri* capturados com armadilhas adesivas amarelas à altura da copa das árvores cítricas no perímetro da borda da fazenda comercial de *Citrus* spp. Faz. Nova Era, Citrosuco S.A., Casa Branca, SP.

4.3. Comparação dos contextos

A diversidade de indivíduos de Psylloidea coletados por meio de armadilhas adesivas amarelas no contexto de "plantas de fundo de quintal" (PFQ) (Figura 7) foi maior comparado com a diversidade encontrada no contexto de pomares de citros com manejo deficiente (MD) (Figura 20). Pois foram encontrados 24 gêneros no contexto PFQ e 22 gêneros no contexto MD, assim como o número de indivíduos encontrados foi maior no primeiro contexto, sendo diferente em 18.320 indivíduos. Entretanto, é conveniente esclarecer que o contexto MD foi monitorado por menos tempo (25 períodos) que o contexto PFQ (30 períodos), assim como o número de pontos monitorados foi maior no contexto PFQ (20 pontos) que no MD (oito pontos) (Tabela 1).

A frequência das espécies encontradas com armadilhas adesivas amarelas às diferentes alturas monitoradas foi convergente nos dois contextos, sendo as espécies mais frequentes: *B. occidentalis*, *Calophya* sp., *G. brimblecombei*, *Heteropsylla* sp., *I. divergipennis*, *Mitrapsylla* spp. e *Trioza* sp.; porém, houve diferença no caso de *D. citri* que foi frequente no contexto PFQ e não no contexto MD.

O número total de psilídeos encontrados em plantas hospedeiras (*Citrus* spp. e *Murraya paniculata*) de *D. citri* no contexto de PFQ (Figura 9) foi aproximadamente dez vezes superior (5.316 psilídeos) que no contexto MD (550) (Figura 21). No entanto, no contexto MD foi encontrada uma maior frequência de *D. citri* (81.8%) que no PFQ (70.3%) em relação ao número total de indivíduos das outras espécies de psilídeos em cada contexto. Nos dois contextos foram encontradas oito espécies de psilídeos nessas plantas além de *D. citri*, variando em quantidade e espécie. No contexto PFQ, 28.4% dos psilídeos foram representados por *Heteropsylla* sp., sendo que as outras espécies representaram menos de 1% cada uma, sendo coletados indivíduos de *Mastigimas* sp., *Trioza* sp., *Calophya* sp., *Calinda* sp. e *G. brimblecombei*. No caso do contexto MD foi encontrada uma maior frequência de indivíduos de *I. divergipennis* (12.4%) e *Mitrapsylla* spp. (3%), sendo que as outras espécies (*Leurolophus oriformae*, *Platycorypha* sp., *B. occidentalis*, *Euceropyslla* sp., *G. brimblecombei*) representaram menos de 1% cada uma.

A constância de *D. citri* em planta foi de 100% em ambos os contextos. Entre as demais espécies de psilídeos, *I. divergipennis* (35.5%) e *G. brimblecombei* (19.4%) foram as que apresentaram as maiores constâncias no contexto PFQ, enquanto que as mais contantes no contexto MD foram *Mitrapsylla* spp. (28.6%) e *Leurolophus oriformae* (14.3%).

Com relação à dinâmica espacial em diferentes alturas por meio do monitoramento com armadilhas adesivas amarelas, no contexto PFQ foram encontrados 40.772 psilídeos a 2,5 m, comparado com 31.558 indivíduos no contexto MD. *Heteropsylla* sp. e *I. divergipennis* apresentaram as maiores frequências a 2,5 m nos dois contextos, enquanto que *Trioza* sp. apresentou maior frequência no contexto MD. No caso de *D. citri*, foram capturados 1.127 indivíduos a mais a 2,5 m no contexto PFQ, comparado com os indivíduos encontrados nessa altura no contexto MD. No contexto PFQ foram encontrados 9.214 psilídeos a mais na altura de 7,5 m do que no contexto MD, sendo que no contexto PFQ as espécies de maior constância foram *Heteropsylla* sp., *I. divergipennis* e *G. brimblecombei*, e no caso do MD as espécies mais constantes foram *Trioza* sp. e *Heteropsylla* sp. No caso de *D. citri*, no contexto PFQ a coleta a 7,5 m foi aproximadamente doze vezes maior que no contexto MD.

Por outro lado, na primavera de 2018 foram coletados 10.651 psilídeos a mais no contexto PFQ que no contexto MD, por armadilhas adesivas amarelas. É interessante ressaltar que no contexto MD foi encontrado um pico populacional no inverno, sendo de 7.535 psilídeos, situação não encontrada no contexto PFQ. Com respeito às coletas a 7,5 m, foi encontrada convergência nos dois contextos em relação ao número de períodos nos quais a quantidade de psilídeos foi maior de 70% comparado com a coleta a 2,5 m, situação apresentada em dois períodos nos dois contextos. Similarmente, em sete períodos de monitoramento foram encontrados mais de 60% do total de psilídeos coletados a 7,5 m nos dois contextos. Entretanto, no contexto PFQ foram encontrados dois períodos a mais com coletas maiores de 50% a 7,5 m (Tabela 2).

Quanto à frequência das espécies encontradas por armadilhas adesivas amarelas, durante a primavera as espécies mais frequentes foram *Heteropsylla* sp. e *I. divergipennis* nos dois contextos, seguidas de *G. brimblecombei* no contexto PFQ e de *Trioza* sp. no contexto MD. No caso de *D. citri*, durante a primavera foram coletados aproximadamente 30 vezes mais indivíduos no contexto PFQ comparado com o contexto MD.

A dinâmica temporal em plantas apresentou divergências nos dois contextos. Em geral, no contexto PFQ a densidade populacional foi maior no começo da primavera e até um mês depois, sendo que no resto dos períodos monitorados a média de coleta foi de 2.7% comparado com 45.6% de psilídeos coletados na primavera. Em contrapartida, no contexto MD não foi evidente um padrão claro de pico populacional na primavera, sendo que as maiores coletas foram no começo (12.5%) e no final do inverno (15.2%), sendo nas outras datas menores de 10%.

Tabela 2. Comparação coletas de psilídeos capturados a diferentes alturas acima do nível do solo (2,5 e 7,5 m) nos dois contextos da disseminação primária do HLB.

CONTEXTO "PLANTAS DE FUNDO DE QUINTAL"				CONTEXTO "POMARES COM MANEJO DEFICIENTE"			
Período de monitoramento		Altura de monitoramento		Período de monitoramento		Altura de monitoramento	
Início	Fim	2,5m (%)	7,5m (%)	Início	Fim	2,5m (%)	7,5m (%)
01 08 2017	16 08 2017	40,68	59,32	01 11 2017	14 11 2017	57,22	42,78
16 08 2017	01 09 2017	47,69	52,31	14 11 2017	07 12 2017	40,30	59,70
01 09 2017	15 09 2017	38,44	61,56	07 12 2017	20 12 2017	25,99	74,01
15 09 2017	29 09 2017	44,68	55,32	20 12 2017	15 01 2018	33,49	66,51
29 09 2017	15 10 2017	49,58	50,42	15 01 2018	31 01 2018	52,31	47,69
15 10 2017	31 10 2017	59,08	40,92	31 01 2018	19 02 2018	38,31	61,69
31 10 2017	28 11 2017	42,05	57,95	19 02 2018	06 03 2018	45,26	54,74
28 11 2017	6 12 2017	33,52	66,48	06 03 2018	21 03 2018	48,12	51,88
6 12 2017	21 12 2017	35,02	64,98	21 03 2018	10 04 2018	47,27	52,73
21 12 2017	17 01 2018	36,78	63,22	10 04 2018	23 04 2018	31,25	68,75
17 01 2018	30 01 2018	33,84	66,16	23 04 2018	07 05 2018	34,01	65,99
30 01 2018	16 02 2018	62,81	37,19	07 05 2018	24 05 2018	27,40	72,60
16 02 2018	07 03 2018	48,75	51,25	24 05 2018	14 06 2018	30,61	69,39
07 03 2018	20 03 2018	42,61	57,39	14 06 2018	28 06 2018	36,41	63,59
20 03 2018	05 04 2018	43,94	56,06	28 06 2018	17 07 2018	34,57	65,43
05 04 2018	25 04 2018	55,16	44,84	17 07 2018	01 08 2018	44,57	55,43
25 04 2018	09 05 2018	55,65	44,35	01 08 2018	15 08 2018	44,83	55,17
09 05 2018	11 06 2018	27,38	72,62	15 08 2018	30 08 2018	47,05	52,95
11 06 2018	29 06 2018	42,95	57,05	30 08 2018	12 09 2018	56,58	43,42
29 06 2018	19 07 2018	45,72	54,28	12 09 2018	28 09 2018	49,54	50,46
19 07 2018	02 08 2018	35,47	64,53	28 09 2018	11 10 2018	50,66	49,34
02 08 2018	17 08 2018	50,46	49,54	11 10 2018	31 10 2018	52,90	47,10
17 08 2018	28 08 2018	48,87	51,13	31 10 2018	12 11 2018	44,80	55,20
28 08 2018	21 09 2018	45,36	54,64	12 11 2018	6 12 2018	51,38	48,62
21 09 2018	06 10 2018	51,70	48,30	6 12 2018	19 12 2018	49,47	50,53
06 10 2018	16 10 2018	60,80	39,20				
16 10 2018	30 10 2018	59,80	40,20				
30 10 2018	13 11 2018	51,25	48,75				
13 11 2018	29 11 2018	37,36	62,64				
29 11 2018	20 12 2018	29,63	70,37				

Tabela 3. Comparação de médias de psilídeos capturados a diferentes alturas acima do nível do solo (2,5 e 7,5 m) nos dois contextos da disseminação primária do HLB.

CONTEXTO "PLANTAS DE FUNDO DE QUINTAL"				CONTEXTO "POMARES COM MANEJO DEFICIENTE"			
Período		Média*		Período		Média*	
Início	Fim	2,5m	7,5m	Início	Fim	2,5m	7,5m
01 08 2017	16 08 2017	0,89	1,30	01 11 2017	14 11 2017	10,02	7,49
16 08 2017	01 09 2017	1,38	1,52	14 11 2017	07 12 2017	0,96	1,43
01 09 2017	15 09 2017	11,55	18,51	07 12 2017	20 12 2017	0,59	1,68
15 09 2017	29 09 2017	10,30	12,76	20 12 2017	15 01 2018	1,34	2,66
29 09 2017	15 10 2017	7,32	7,44	15 01 2018	31 01 2018	0,88	0,80
15 10 2017	31 10 2017	5,94	4,11	31 01 2018	19 02 2018	1,01	1,63
31 10 2017	28 11 2017	1,12	1,54	19 02 2018	06 03 2018	1,91	2,31
28 11 2017	06 12 2017	1,06	2,11	06 03 2018	21 03 2018	1,49	1,61
06 12 2017	21 12 2017	0,89	1,65	21 03 2018	10 04 2018	0,65	0,73
21 12 2017	17 01 2018	0,49	0,84	10 04 2018	23 04 2018	0,53	1,16
17 01 2018	30 01 2018	1,10	2,16	23 04 2018	07 05 2018	0,75	1,46
30 01 2018	16 02 2018	1,37	0,81	07 05 2018	24 05 2018	1,15	3,06
16 02 2018	07 03 2018	0,88	0,92	24 05 2018	14 06 2018	0,80	1,82
07 03 2018	20 03 2018	0,82	1,11	14 06 2018	28 06 2018	4,23	7,39
20 03 2018	05 04 2018	0,70	0,89	28 06 2018	17 07 2018	9,05	17,12
05 04 2018	25 04 2018	0,55	0,45	17 07 2018	01 08 2018	6,15	7,65
25 04 2018	09 05 2018	0,68	0,54	01 08 2018	15 08 2018	2,40	2,96
09 05 2018	11 06 2018	0,28	0,76	15 08 2018	30 08 2018	16,78	18,88
11 06 2018	29 06 2018	0,99	1,32	30 08 2018	12 09 2018	37,38	28,69
29 06 2018	19 07 2018	0,89	1,06	12 09 2018	28 09 2018	46,66	47,52
19 07 2018	02 08 2018	1,08	1,96	28 09 2018	11 10 2018	64,16	62,48
02 08 2018	17 08 2018	0,61	0,60	11 10 2018	31 10 2018	21,27	18,94
17 08 2018	28 08 2018	1,09	1,14	31 10 2018	12 11 2018	28,26	34,83
28 08 2018	21 09 2018	11,60	13,97	12 11 2018	6 12 2018	6,48	6,13
21 09 2018	06 10 2018	37,23	34,79	6 12 2018	19 12 2018	1,51	1,54
06 10 2018	16 10 2018	37,97	24,48				
16 10 2018	30 10 2018	6,32	4,25				
30 10 2018	13 11 2018	4,64	4,42				
13 11 2018	29 11 2018	3,03	5,08				
29 11 2018	20 12 2018	2,48	5,88				

*Corresponde à média de psilídeos coletados por ponto em um dia, dentro do período de monitoramento referido.

4.4. Detecção de *C*Las em Psylloidea

4.4.1. Detecção de *C*Las em *D. citri*

De acordo com a análise de detecção de *C*Las em 85 adultos de *D. citri* coletados com armadilhas adesivas amarelas a 7,5 m de altura nos dois contextos, foi encontrado 40% de indivíduos positivos para *C*Las (*C*Las+). No contexto PFQ, foram analisados 78 indivíduos de *D. citri* do total de 84 exemplares capturados a 7,5 m. A partir desses indivíduos analisados, 33 exemplares foram *C*Las+, representando assim 42.3%. No contexto de pomares com manejo deficiente foram analisados 7 indivíduos de *D. citri*, dos quais só um exemplar foi *C*Las+. Os valores de *Ct* encontrados, variaram entre 24,78 e 32,49.

No caso da detecção de *C*Las em indivíduos de *D. citri* coletados em plantas cítricas no contexto PFQ, foi encontrado 63.3% dos exemplares *C*Las+, do total de 60 analisados. Os indivíduos nos quais *C*Las foi detectado pertencem aos pontos: CS2 (1), CS5 (6), CS6 (2), CN9 (6), CN10 (3), CN11 (7), CN12 (6), CN14 (4) e CL1 (1) no contexto de PFQ e no ponto AS4 (2) no contexto de pomares de MD (manejo deficiente). Os valores de *Ct* variaram entre 22,84 e 34,77.

4.4.2. Detecção de *C*Las em outras espécies de Psylloidea

De acordo com os diferentes testes realizados para a detecção de *C*Las em amostras de DNA de outras espécies de psilídeos provenientes de armadilhas adesivas amarelas a 2,5 m e 7,5 m ou coletados em plantas, todas as amostras foram negativas para a bactéria. No caso da análise por meio do método proposto por Li *et al*. (2006) foi usada a média do *Ct* dos controles positivos, correspondente a 22,0 e a média do threshold 0,067, com a finalidade de padronizar as análises, sendo que todas as amostras analisadas foram negativas.

Em todos os testes, os controles de *D. citri C*Las+ foram positivos, enquanto que os controles *D. citri C*Las- e o controle com água da reação foram negativos, conforme se esperava. Algumas amostras apresentaram *Ct* próximo de 35 ou maiores, portanto foram considerados como amostras negativas para *C*Las.

5. DISCUSSÃO

A movimentação de psilídeos foi constatada a 2,5 m e 7,5 m, alturas que teoricamente correspondem à camada limite do voo e à camada limite atmosférica, respectivamente, nos estudos de dispersão de insetos como foi proposto por McLean *et al*. (1986) e Drake e Farrow (1988). No entanto, é uma categorização relativa já que é difícil estabelecer os limites das camadas devido à alta irregularidade dos fluxos de ar, pois não ocorre de maneira laminar além de que as velocidades de voo das populações e indivíduos podem ser diferentes (Taylor, 1974), somado às diferenças do relevo (Silveira *et al*., 1976). A correlação positiva entre psilídeos capturados nas diferentes alturas (2,5 m e 7,5 m) permite inferir que os indivíduos estiveram sujeitos a processos de ascensão vertical que provavelmente foram auxiliados pelos fenômenos físicos das massas de ar nas diferentes camadas da atmosfera, de acordo com análises de movimentação vertical em outros hemípteros e outras ordens de insetos analisados por Taylor (1974), McLean *et al*. (1986), Dingle (1996) e Reynolds *et al*. (2006).

Em relação aos psilídeos capturados a 2,5 m de altura, foi encontrada convergência quantitativa com os coletados a 7,5 m de altura. Tal convergência na densidade de psilídeos encontrados nas diferentes alturas pode ser o reflexo de vários fatores, como a velocidade de vento, a convecção térmica e o transporte de insetos desde locais distantes como discutido amplamente por Drake e Farrow (1988). No entanto, em cada altura os processos envolvidos na movimentação em diferentes alturas podem ser divergentes, pois apresentam complexidades diferentes. Por exemplo, a 2,5 m de altura podem ser coletados psilídeos que decolaram voluntária ou acidentalmente das plantas próximas, ou estão em processos de aterrisagem, ou mesmo insetos que perderam o controle da direção do voo devido a maiores velocidades de vento, como foi também discutido por Hall e Henz (2011). No caso de *D. citri*, os fatores que influenciam o processo de decolagem voluntária têm sido amplamente estudados, como número de brotações, qualidade nutricional da planta hospedeira, densidade populacional do inseto, assim como também a influência de estímulos externos associados a fatores ambientais como temperatura, fotoperíodo, intensidade luminosa e velocidade do vento (Sales, 2015; Tomaseto *et al*., 2017).

Quanto à captura a 7,5 m de altura, acredita-se que são psilídeos que provém do transporte de massas de ar em ascensão desde a superfície terrestre devido à convecção térmica ou são provenientes de outras áreas a partir de transporte horizontal. Por exemplo, no caso de *D. citri* foi relatado que 7 m é a altura suficiente para entrar em correntes de vento na camada limite atmosférica e ser transportado a distâncias horizontais entre 0,5 e 4,0 km,

dependendo da velocidade do vento e a duração do voo sustentado na camada limite de voo (Aubert, 1990), sabendo que os adultos de *D. citri* tem capacidade média de voo de 200 m com capacidade máxima de 2,4 km sem assistência do vento em condições de laboratório, com velocidade média de voo de 16,74 cm/s (Martini *et al*., 2014). No entanto, a velocidade do vento nas áreas experimentais não foi mensurada localmente. No entanto, segundo dados da estação meteorológica de Barra Bonita (INMET, 2019), localizada próxima às áreas experimentais no contexto de "plantas de fundo de quintal" (PFQ), a velocidade de vento máxima foi de 7,7 m/s, coincidindo com a época de maior coleta de psilídeos (no começo da primavera).

A relação positiva entre a média de adultos de *D. citri* capturados mediante armadilhas adesivas amarelas e a velocidade de vento máxima em pomares de citros foi constatada também por Hall (2010) e Hall e Henz (2011). Assim como também, a dinâmica do vento foi relatada desempenhando um papel importante na dispersão passiva e infestação espacial de *T. erytreae* (Cocuzza *et al*., 2016). Em relação à possível influência de fatores ambientais na captura de psilídeos a alturas maiores de 7,5 m, Hall e Henz (2011) encontraram correlação entre a captura de *D. citri* a 10 m de altura e a umidade relativa do ar, mas não com respeito à velocidade do vento, temperatura do ar e intensidade luminosa.

Em relação à ocorrência temporal de psilídeos coletados tanto por armadilhas adesivas amarelas quanto por rede de varredura ou armadilha de sucção portátil sobre plantas hospedeiras de *D. citri*, foi evidente em ambos os contextos que a maior densidade populacional de psilídeos é concentrada principalmente do final do inverno até o começo do verão. Esses resultados assemelham-se aos de Yamamoto *et al*. (2001) e Wang *et al*. (1996), no Brasil e Taiwan, respectivamente, que relataram os maiores picos populacionais de *D. citri* no final da primavera e início do verão e diminuição da população no inverno e no outono.

Neste estudo, a densidade populacional de *D. citri* nas plantas hospedeiras foi muito alta no período imediatamente anterior ao pico populacional nas diferentes alturas, indicando assim que possivelmente a interação entre fatores abióticos específicos do período da primavera, fatores biológicos dos psilídeos (fisiologia, comportamento e genética) e plantas hospedeiras, além de fatores ecológicos das populações de psilídeos constituem os mecanismos e a função que direciona o comportamento migratório de *D. citri*, de acordo com Dingle e Drake (2007). Coerentemente, Lewis-Rosenblum *et al*. (2015) em estudos na Florida sobre padrões sazonais de comportamento de voo e dispersão a longa distância de *D. citri*, observaram que a dispersão foi maior durante a primavera e o verão e decresceu durante os meses frios (setembro a março). Analogamente, Das *et al*. (2002) por meio do estudo da

dinâmica temporal de *D. citri* na Índia, observaram a maior densidade populacional entre fevereiro e abril, correspondente ao verão, e a menor entre outubro e fevereiro. Coincidentemente, Aubert e Hua (1990) encontraram que a máxima capacidade de voo de *D. citri* foi no verão sobre copas de *M. paniculata* na China.

Em relação a outras espécies de Psylloidea, coerentemente com os resultados obtidos neste estudo, Machado *et al*. (2017) encontraram o maior pico populacional de *Heteropsylla caldwelli* na primavera e no verão, o qual foi correlacionado diretamente com a temperatura do ar. Apesar de que, curiosamente, Van den Berg *et al*. (1987) encontraram maior densidade populacional de *T. erytreae* durante o inverno e o verão.

Analisando-se os padrões de captura em armadilhas adesivas amarelas das espécies de psilídeos mais frequentes em relação à captura de indivíduos de *D. citri* nos mesmos períodos nos dois contextos, parece ser possível usar dados de coletas de outras espécies de psilídeos que são muito mais frequentes para auxiliar a compreensão da dinâmica temporal de dispersão de *D. citri*. Apesar de diferentes espécies de psilídeos apresentarem dinâmicas temporais distintas, a informação diversa pode ser útil para o manejo de *D. citri*.

No contexto de pomares com manejo deficiente em Casa Branca (SP), por exemplo, *Heteropsylla* sp. constitui um gênero que poderia ser usado como indicador do período de maior coleta na primavera, sendo correspondente com a ocorrência de *D. citri* em altura durante esse período. No caso de *Isogonoceraia divergipennis*, é uma espécie que poderia apoiar a análise do aumento gradual da população de *D. citri* no tempo, já que coincidentemente começa desde o final do inverno, intensificando-se no meio da primavera e diminuindo no final da primavera. No entanto, a espécie que exibiu dinâmica temporal mais próxima com *D. citri* no contexto de pomares com manejo deficiente foi *Trioza* sp., já que no final da primavera de 2017 a sua densidade populacional foi diminuindo proporcionalmente até o começo do verão e no começo do inverno ocorreu aumento da população, mostrando um pico populacional muito próximo ao pico da primavera e posteriormente diminuindo no final do segundo mês do inverno, de modo semelhante ao que aconteceu também com *D. citri*. Já no final do inverno, os indivíduos de *Trioza* sp. apresentaram aumento abrupto da população, sendo na quinzena antecipada ao aumento de *D. citri*, o qual permitiria usar essa informação na previsão de movimentação de *D. citri*, se esse fosse o padrão sazonal. Entretanto, na segunda metade da primavera de 2018 a dinâmica populacional de *Trioza* sp. foi divergente em relação à de *D. citri*, indicando a necessidade de séries temporais mais longas para este tipo de análise. Mesmo assim, os indivíduos de *Trioza* sp. poderiam ser usados como potenciais indicadores de comportamento migratório de *D. citri* nesse contexto. Portanto a

análise da dinâmica de movimentação em alturas de diferentes espécies de psilídeos constitui um mecanismo funcional que proporciona informação valiosa no contexto epidemiológico da disseminação primária do HLB em diferentes contextos regionais.

No contexto de “plantas de fundo de quintal”, município de Botucatu (SP), algumas das espécies de psilídeos mais frequentes também poderiam ser usadas como uma ferramenta para analisar o comportamento migratório de *D. citri*, já que além de oferecer diferente informação, apresentam densidades populacionais muito altas que facilitariam diversas análises. Por exemplo, o gênero *Heteropsylla* sp. poderia ser usado como indicador do período de maior coleta podendo ser associado com maior atividade de dispersão de *D. citri*, já que o período foi exatamente correspondente. No caso de *I. divergipennis*, poderia constituir uma espécie chave na previsão da movimentação de *D. citri*, já que o pico populacional maior antecede o pico de coleta de *D. citri*. Os resultados obtidos com *G. brimblecombei* oferecem outro tipo de apoio na análise da dinâmica da densidade populacional de *D. citri*, já que em períodos diferentes aos de maior coleta apresentou em geral uma dinâmica muito próxima com *D. citri*. Outro aspecto importante a ser discutido é que nem todas as espécies de psilídeos apresentam picos populacionais nas épocas descritas anteriormente em todos os anos, como foi evidente com *G. brimblecombei*. Contudo, este tipo de informação é de importância epidemiológica no contexto da disseminação primária do HLB, já que fornece uma ferramenta de análise que pode ser empregada no aprimoramento de estratégias de manejo de *D. citri*.

Como foi discutido anteriormente, as espécies de Psylloidea mais frequentes e constantes coletadas por meio de armadilhas adesivas amarelas em diferentes alturas, no contexto de “plantas de fundo de quintal” foram: *Heteropsylla* sp., *I. divergipennis, G. brimblecombei, Trioza* sp., *Mitrapsylla* spp., e *B. occidentalis*. Dentre essas espécies, as pertencentes à família Psyllidae (*Heteropsylla* sp., *I. divergipennis* e *Mitrapsylla* spp.) têm sido reportadas como geralmente monófagas de Fabaceae, enquanto que *G. brimblecombei* e *B. occidentalis* têm sido relatadas como pragas introduzidas no Brasil associadas a eucalipto, e o gênero *Trioza* tem sido associada a Myrtaceae e outras famílias (Burckhardt & Quieroz, 2012).

A alta frequência e constância de algumas espécies de psilídeos podem ser explicadas devido à presença dessas plantas hospedeiras na região, já que o bioma predominante é de mata atlântica e cerrado, segundo o Instituto Florestal do Estado de São Paulo (2019), com maior predominância de espécies de Fabaceae, tais como *Piptadenia gonoacantha, Copaifera langsdorffii, Bauhinia rufa, Stryphnodendron adstringen* e *Caesalpinia pluviosa* (hospedeira

de *I. divergipenis*), principalmente. Mas também são encontradas espécies de outras famílias, como C*asearia sylvestris* (Flacourtiaceae), *Ficus guaranitica* Chodat. (Moraceae), *Cedrela fissilis* (Meliaceae, hospedeira de *Mastigimas* sp.), *Cabralea canjerana* (Meliaceae) e *Eucalyptus* spp. (Myrtaceae). No entanto, indivíduos de *Calophya* sp. e *D. citri* estiveram presentes no 100% das coletas, podendo estar associados à presença de plantas pertencentes às famílias Anacardiaceae e Rutaceae, respectivamente.

No contexto de pomares com manejo deficiente, as espécies mais frequentes e constantes foram *B. occidentalis, G. brimblecombei, Heteropsylla* sp., *I. divergipennis, Mitrapsylla* sp. e *Trioza* sp. No caso de *B. occidentalis e G. brimblecombei,* a frequência e constância obtida podem ser explicadas devido à predominância das florestas implantadas com pinus e eucaliptos, na região de Casa Branca. Entretanto os ecossistemas de mata ciliar e cerrado, também são predominantes, o que poderia explicar a abundância das espécies de Psyllidae e Triozidae encontradas, já que foram observadas plantas de Fabaceae, Myrtaceae e Lauraceae. Portanto, é possível que a dispersão dessas espécies de psilídeos possa estar acompanhando a distribuição espacial das plantas hospedeiras e/ou a disponibilidade temporal dos recursos alimentares. Por exemplo, tem sido relatado que *T. erytreae* apresenta movimentações em massa, otimizando a colonização de hospedeiros cítricos comerciais a partir de plantas hospedeiras da área circundante (Van den Berg *et al*., 1991).

Em relação à coleta em plantas de *Citrus* spp. ou *Murraya paniculata* de espécies de Psylloidea que não têm essas espécies vegetais como hospedeiras, é possível que corresponda a processos acidentais ou mesmo que tais psilídeos usem as plantas como hospedeiros casuais sem iniciar processos de alimentação ou reprodução. Psilídeos são geralmente designados como sugadores de seiva altamente específicos, já que o número de espécies de plantas nas quais conseguem desenvolver seu ciclo de vida é uma ou poucas (Hodkinson, 1974; Burckhardt & Basset, 2000; Percy *et al*., 2004; Hollis, 2004; Burckhardt, 2005). Não obstante, neste trabalho não foram estudadas as relações das outras espécies de psilídeos com as plantas hospedeiras de *D. citri*. No entanto, sabe-se que o ciclo de vida dos psilídeos podem ter amplas variações, assim como também modificações biológicas e mecanismos adaptativos para explorar diferentes hospedeiros em diferentes contextos ambientais (Hodkinson, 2009).

Em relação aos diferentes métodos de coleta de psilídeos em plantas usados nesta pesquisa, não foram encontradas divergências em captura por meio de rede de varredura e com armadilha de sucção portátil, em termos de abundância e diversidade. A dinâmica das populações de insetos em planta depende de fatores extrínsecos aos métodos de coleta, tais como capacidade biótica das espécies, relação com a planta hospedeira, condições ambientais,

entre outras (Silveira *et al*., 1976). Apesar de que a eficiência ou precisão das amostragens podem resultar em estimativas diferentes dependendo de fatores humanos (como disposição pessoal), componentes mecânicos, econômicos e até análises estatísticas, conforme discutido por Silveira *et al*. (1976).

Por outro lado, a seleção dos métodos de monitoramento de insetos em voo a diferentes alturas constitui um desafio, já que todas as técnicas oferecem vantagens e desvantagens como foi discutido amplamente por Reynolds *et al*. (2006). Neste trabalho foram encontradas grandes divergências na quantidade de psilídeos coletados a 7,5 m por meio de armadilhas adesivas amarelas e com o equipamento de sucção estacionário. As armadilhas adesivas amarelas constituem um método amplamente usado para monitoramento de infestações e estimativa de abundância relativa de populações de *D. citri* em pomareas cítricos, de acordo com Aubert e Quilici (1988), Aubert e Hua, (1990), Flores *et al*. (2009) e Hall e Hentz, (2010), entre outros.

As altas densidades de psilídeos encontradas nas armadilhas adesivas amarelas comparadas com as encontradas na armadilha de sucção estacionária podem estar relacionadas com vários fatores. Em certas circunstâncias as armadilhas adesivas amarelas podem induzir estimativas erradas sobre densidade e proporções de espécies coletadas, considerando que a captura podem ser influenciadas por variações em velocidades de vento e densidades populacionais diferentes. Em contraste, a armadilha de sucção pode funcionar com quantidades de ar relativamente constantes a diferentes velocidades de vento (sejam muito baixas ou muito altas) (Johnson, 1950a).

De acordo com as altas densidades de psilídeos encontradas nas armadilhas amarelas nesse estudo, é possível pensar que a reflectância da cor conduza à alteração do comportamento dos psilídeos devido ao ‘super estímulo’ induzido pela reflectância da cor (Hall *et al*., 2010), embora a 7,5 m em ausência de vento é provável que os psilídeos não respondam a esse estímulo, devido à restrição na resolução espacial, como foi documentado para vários hemípteros de pequeno tamanho (Dingle, 1996; Land, 1997; Kennedy, 1985). Contudo, os dois tipos de armadilhas usadas para o monitoramento em altura coletaram psilídeos durante todo o tempo de monitoramento, mesmo com proporções diferentes, sendo que nos dois casos é difícil diferenciar entre indivíduos que estão em processo de ascensão na área ou que proveem de outras áreas, como discutido por Reynolds *et al*. (2006).

A bactéria *C*Las foi detectada em indivíduos de *D. citri* coletados por meio de armadilhas adesivas amarelas a 7,5 m de altura e em plantas cítricas nos dois contextos da disseminação primária analisados. A proporção de indivíduos de *D. citri* coletados por meio

de armadilhas adesivas amarelas e positivos para a bactéria (*C*Las+) foi maior em 21.3% à encontrada por Ferreira (2014) em pomares não manejados no Centro Sul do Estado de São Paulo. No entanto, a proporção de *D. citri C*Las+ encontrada por Chinelato (2017) em pomares com manejo deficiente ou sem manejo no Estado de São Paulo, que variou entre 33% e 72%, foi semelhante à encontrada neste estudo. No entanto, é essencial destacar que os insetos aqui analisados foram coletados na camada limite atmosférica, onde as correntes convectivas podem estar carregando esses insetos a outras áreas ou provenientes de outras áreas, o que representa grande importância na disseminação primária do HLB.

No caso da detecção de *C*Las em adultos de *D. citri* provenientes de plantas cítricas, foram encontrados valores muito próximos ao encontrado por Coy e Stelinsky (2015), que observaram taxas de detecção de *C*Las entre 37,5 e 100% (média de 68.8%) em populações de *D. citri* coletadas sobre árvores cítricas em diferentes regiões da Florida. É importante ressaltar que os insetos obtidos neste trabalho foram provenientes de plantas visualmente sintomáticas, comparado com o estudo realizado por Coy e Stelinsky (2015). No entanto, Tiwari *et al*. (2010) encontraram apenas 1.9% de adultos de *D.citri C*Las+ provenientes de plantas de pomares abandonados e 1.2% em pomares manejados, e 2.9% de *D.citri C*Las+ se dispersando de pomares abandonados a manejados na Florida. Contudo, foi evidente a detecção de *C*Las em indivíduos de *D. citri* durante os diferentes períodos de monitoramento, tanto em planta como em altura, de acordo com Bassanezi *et al*. (2010), Tiwari *et al*. (2010) e Hall *et al*. (2013), que confirmaram a presença de psilídeos infectivos indistintamente da época de coleta.

Em relação à detecção de *C*Las em outras espécies de Psylloidea, foi negativa em todas as amostras analisadas conforme se esperava, já que as espécies de psilídeos encontradas não têm os *Citrus* spp. como plantas hospedeiras, assim como também não existe relato prévio de detecção de *C*Las nesses psilídeos. De acordo com os métodos usados para a detecção de *C*Las, o método pertencente ao protocolo interno de Fundecitrus foi mais rigoroso que o outro método usado, desenvolvido por Li *et al*. (2006) e baseado em 16S rDNA (qPCR TaqMan) e primers/sonda para o gene *Wingless* de *D. citri* (Manjunath *et al*., 2008). Segundo Shin & van Bruggen (2017) o uso de esses *primers* (Jagoueix *et al*., 1994; Li *et al*., 2006) pode conduzir a amplificações pobres ou mesmo falsos positivos (reações inespecíficas) como foi relatado também por Fujikawa e Iwanami (2012) e Kogenaru *et al*. (2014).

Em relação à detecção de *C*Las a partir de psilídeos coletados em armadilhas adesivas, Irey *et al*. (2011) e Sala (2013) observaram que a detecção de *Ca*. Liberibacter spp. e de *C*Las em adultos de *D. citri*, respectivamente, diminuiu em função do tempo de exposição do

psilídeo à armadilha, tanto no inverno como no verão. Portanto a quantidade e qualidade de DNA no caso de insetos extraídos de armadilhas adesivas, podem ser afetados pelo tempo de armazenamento; de acordo com Sala (2013), há decréscimo na quantidade de DNA total com o tempo de exposição de *D. citri* em armadilhas adesivas, com diferenças significativas a partir de 3 dias, sugerindo que as condições climáticas ou a cola podem interferir na degradação do DNA.

O monitoramento das populações de psilídeos nas duas regiões dentro do contexto da disseminação primária do HLB aportou informações relevantes que sugerem dispersão de indivíduos de Psylloidea, compreendendo semanticamente a dispersão como deslocamento a diferentes áreas sem controle da direção, com ocorrência não persistente e dependente de estímulos (Silveira *et al*., 1976; Kennedy, 1985). Constatou-se correlação entre as densidades populacionais de psilídeos encontradas nas diferentes alturas monitoradas ao longo do tempo, talvez indicando fenômenos de ascensão vertical ou mesmo como resultado de transporte horizontal a partir de outras áreas.

A movimentação de *D. citri* e outros Psylloidea ocorrendo em diferentes escalas de espaço e tempo, em diferentes contextos onde os agroecossistemas de citros se desenvolvem é de importância para análise, já que quanto maior é a densidade de psilídeos nas plantações cítricas circunvizinhas, maior o fluxo migratório de psilídeos adultos para plantações com manejo e consequentemente maiores as chances de ocorrência de novas infecções, especialmente com psilídeos bacterilíferos provenientes de áreas de remoção de plantas com HLB (Bergamin-Filho *et al.*, 2016). Em muitos casos, a imigração de insetos bacterilíferos pode saturar os pomares manejados, fazendo com que a incidência da doença não seja influenciada pela mortalidade do vetor em pomares com manejo (Belasque *et al*,. 2010; Bassanezi *et al.*, 2013b).

Os resultados do presente estudo fornecem uma ferramenta potencial de análise para o aprimoramento das estratégias de manejo do HLB, já que reportou altas densidades de *D. citri* e outros Psylloidea nas áreas adjacentes a pomares com manejo convencional, e taxas relativamente elevadas de indivíduos de *D. citri* infectados por *C*Las em plantas hospedeiras e se movimentando a 7,5 m, além de confirmar as épocas de maior ocorrência de psilídeos como fator chave para decisão do momento do controle.

6. CONCLUSÕES

- A ocorrência espaço-temporal de *D. citri* e outras espécies Psylloidea frequentes e constantes em armadilhas adesivas amarelas posicionadas em alturas de 2,5 e 7,5 m acima do nível do solo, evidenciam padrões de movimento relativamente análogos.

- A distribuição de abundância de psilídeos na camada limite de voo (2,5 m) está correlacionada com os psilídeos na camada limite atmosférica (7,5 m).

- A ocorrência temporal de *D. citri* é semelhante à de outros Psylloidea, com maiores níveis populacionais a partir do final do inverno e até o final da primavera, tanto nas áreas adjacentes de pomares comerciais de citros correspondentes a "plantas de fundo de quintal" como em pomares de citros com manejo deficiente.

- Para o monitoramento de psilídeos em altura, as armadilhas adesivas amarelas constituem um método que oferece informação representativa da densidade populacional.

- A amostragem de psilídeos em plantas hospedeiras de *D. citri* com rede de varredura ou com armadilha de sucção portátil proporciona informação equivalente da densidade populacional de psilídeos.

- *C*Las foi detectada em indivíduos de *D. citri* coletados na camada limite atmosférica, a 7,5 m acima do nível do solo, bem como sobre plantas de *Citrus* spp., em áreas vizinhas a pomares comerciais manejados, em diferentes contextos de disseminação primária.

REFERÊNCIAS

Akey, D.H. (1991). A review of marking techniques in arthropods and an introduction to elemental marking. Southwest Entomol. Suppl. 14:1-8.

Albrecht, U., Bowman, K.D. (2012). Tolerance of trifoliate Citrus rootstock hybrids to *Candidatus* Liberibacter asiaticus. Scientia Horticulturae. 147:71-80.

Alfaro-Fernández, A., Cebrián, M.C., Villaescusa, F.J., Hermoso de Mendoza, A., Ferrándiz, J.C., Sanjuán, S., Font, M.I. (2012a). First report of "*Candidatus* Liberibacter solanacearum" in carrot in mainland Spain. Plant Disease. 96:582.

Alfaro-Fernández, A., Siverio, F., Cebrián, M.C., Villaescusa, F.J., Font, M.I. (2012b). '*Candidatus* Liberibacter solanacearum' associated with *Bactericera trigonica* affected carrots in the Canary Islands. Plant Disease. 96:581.

Allison, D., Pike, K.S. (1988). An inexpensive suction trap and its use in an aphid monitoring network. J. Agric. Entomol. 5(2):103-107.

Ammar E.D, Shatters, R.G., Hall, D.G. (2011a). Localization of *Candidatus* Liberibacter asiaticus, associated with Citrus huanglongbing disease, in its psyllid vector using fluorescence in situ hybridization. Journal Phytopathology. 159:726–734.

Ammar, E.D., Shatters, R.G., Lynch, C., Hall, D.G. (2011b). Detection and relative titer of *Candidatus* Liberibacter asiaticus in the salivary glands and alimentary canal of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) vector of Citrus Huanglongbing Disease. Annals of the Entomological Society of America, College Park. 104:526-533.

Ammar, E.D., Ramos, J.E., Hall, D.G., Dawson, W.O., Shatters, R.G. (2016). Acquisition, Replication and Inoculation of *Candidatus* Liberibacter asiaticus following various Acquisition Periods on Huanglongbing Infected Citrus by Nymphs and Adults of the Asian Citrus Psyllid. PLoS ONE. 11(7): e0159594.

Amorim, L., Spósito, M.M., Kuniyuki, H. (2016). Doenças da videira. In: Amorim, L., Rezende, J.A.M., Bergamin-Filho, A., Camargo, L.E. Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. São Paulo, SP, Brazil: Agronómica Ceres. 745-758.

Arakawa, K., Miyamoto, K. (2007). Flight ability of Asiatic Citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera; Psyllidae), measured by a flight mill. Res. B. Plant Prot. Serv. Japan. 43:23-26.

Aubert, B. (1987). *Trioza* erytreae Del Guercio and *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psylloidae), the two vectors of Citrus greening disease: Biological aspects and possible control strategies. Fruits. 42:149-162.

Aubert, B., Quilici, S. (1988). Monitoring adult psyllas on yellow traps in Reunion Island. In: Timmer, L.W., Garnsey, S.M., Navarro, L. (Eds.). Proceedings of the 10th IOVC. 249-254.

Aubert, B., Hua, X.Y. (1990). Monitoring flight activity of *Diaphorina citri* on Citrus and *Murraya* canopies. In: Aubert, B., Tontyaporn, S., Buangsuwon, D. (Eds.), Rehabilitation of Citrus Industry in the Asia Pacific Region. Proceedings of the 4th International Asia Pacific Conference on Citrus Rehabilitation. FAO/UNDP, Rome/Chiang Mai, Thailand. 181-187.

Aubert, B. (1990). Integrated activities for the control of huanglongbing/greening and its vector *Diaphorina citri* Kuwayama in Asia. Rehabilitation of Citrus Industry in the Asia Pacific Region (ed. by B Aubert, S Tontyaporn & D Buangsuwon). FAO/UNDP, Rome. Italy.133–144.

Aubert, B. (1992). Citrus greening disease, a serious limiting factor for citriculture in Asia and Africa. Proc. Intl. Soc. Citricult. 817-820.

Bassanezi, R.B., Busato, L.A., Bergamin-Filho, A., Amorim, L., Gottwald, T.R. (2005). Preliminary spatial pattern analysis of huanglongbing in São Paulo, Brazil. In: Hilf ME, Duran/Vila N & Rocha/Peña MA (Eds.) Proc. 16th Conf. Intern. Organization Citrus Virol., Univ. California, Riverside. p. 341/355.

Bassanezi, R.B., Bergamin Filho, A., Amorim, L., Gottwald, T.R. (2006). Epidemiology of huanglongbing in São Paulo. Proceedings of Huanglongbing Greening International Workshop, Ribeirão Preto. p.37.

Bassanezi, R.B., Lopes, S.A., Belasque, J., Spósito, M.B., Yamamoto, P., Miranda, M., Teixeira, D.C., Wulff, N.A. (2010). Epidemiologia do huanglongbing e suas implicações para o manejo da doença. Citrus Research & Technology, Cordeirópolis. 31(1):11-23.

Bassanezi, R. B., Jr, J. B., & Montesino, L. H. (2013a). Frequency of symptomatic trees removal in small Citrus blocks on Citrus huanglongbing epidemics. Crop Protection. 52: 72–77. http://doi.org/10.1016/j.cropro.2013.05.012

Bassanezi, R.B., Montesino, L.H., Gimenes Fernandes, N., Yamamoto, P.T., Gottwald, T.R., Amorim, L., Bergamin Filho, A. (2013b). Efficacy of area-wide inoculum reduction and vector control on temporal progress of huanglongbing in young sweet orange plantings. Plant Dis. 97:789-796.

Becker-Migdisova, E.E. (1973). Systematics of the Psyllomorpha and the position of the group within the order Homoptera. In: Dokalady na dvadza t chetvertom escheghodnom ch tenii pamyati (Ed. by E. P. Narchik). N. A. Kholodovskogo 1971. [In Russian, English translation, British Lending Library, Boston Spa. I. 90-117

Belasque, J., Yamamoto, P., Miranda, M., Bassanezi, R., Ayres, A.J., Bové, J.M. (2010). Controle do huanglongbing no estado de São Paulo, Brasil. Citrus Research & Technology, Cordeirópolis. 31(1):53-64.

Bergamin-Filho, A., Inoue Nagata, A.K., Bassanezi, R.B., Belasque, Jr, J., Amorim, L., Macedo, M.A., Barbosa, J.C., Willocquet, L., and Savary, S. (2016). The importance of primary inoculum and area/wide disease management to crop health and food security. Food security. 8:221-238.

Boina, D. R., Meyer, W.L., Onagbola, E.O., e Stelinski, L.L. (2009). Quantifying Dispersal of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) by Immunomarking and Potential Impact of Unmanaged Groves on Commercial Citrus Management. Environmental Entomology. 38(4):1250-58.

Bové, J.M. (1986). Greening in the Arabian Peninsula: toward new techniques for its detection and control. FAO Plant Protect B. 34:7-14.

Bové, J.M. (2006). Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of Citrus. Journal of Plant Pathology. 88:7-37.

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. (2008). Several *Liberibacter* and *Phytoplasma* species are individually associated with HLB. Proceedings of the International Research Conference on Huanglongbing, Orlando. 152-155.

Bové, J. (2014). Heat-tolerant Asian HLB meets heat-sensitive African HLB in the Arabian Peninsula! Why?. Journal of Citrus Pathology, 1:1.

Brown, R.G., Hodkinson, I.D. (1988). Taxonomy and ecology of the jumping plant-lice of Panamá (Homoptera Psylloidea). Entomonograph. New York: EJ Brill. 9.

Brown, S.E., Oberheim, A.P., Barrett, A., McLaughlin, W.A. (2011). First Report of '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' associated with huanglongbing in the weeds *Cleome rutidosperma*, *Pisonia aculeata* and *Trichostigma octandrum* in Jamaica. New Disease Reports. 24:25. [http://dx.doi.org/10.5197/j.2044/0588.2011.024.025]

Burckhardt, D., Basset, Y. (2000). The jumping plant-lice (Hemiptera: Psylloidea) associated with *Schinus* (Anacardiaceae): Systematics, biogeography and host plant relationship. Journal Natural History. 34:57-155.

Burckhardt, D. (2005). Biology, ecology and evolution of gall-inducing psyllids (Hemiptera: Psylloidea). Enfield: Science publishers. 143-157.

Burckhardt, D., De Queiroz, L.D. (2012). Checklist and Comments on the Jumping plant-lice (Hemiptera: Psylloidea) from Brazil. Zootaxa. (3571): 26–48.

Burckhardt, D., Ouvrard. (2012). A revised classification of the jumping plant-lice (Hemiptera: Psylloidea). Zootaxa. 3509:1-34

Burckhardt, D., Queiroz, D.L. (2013). Phylogenetic relationships within the subfamily Aphalarinae including revision of *Limataphalara* (Hemiptera: Psylloidea: Aphalaridae). Musei Moraviae. 98(2):35-56.

Burckhardt, D., Queiroz, D.L., Drohojowska, J. (2013). Revision of the neotropical jumping plant-louse genus *Mastigimas* (Hemiptera: Psylloidea) attacking *Cedrela* and *Toona* species (Meliaceae). Zootaxa. 3745:1-18.

Burckhardt, D., Ouvrard, D., Queiroz, D.L., Percy, D. (2014). Psyllid Host-Plants (Hemiptera: Psylloidea): Resolving a Semantic Problem. Florida Entomological Society. 97(1): 242-246.

Burckhardt, D., Queiroz, D.L. (2017). The jumping plant-lice of the Neotropical genus *Tainarys* (Hemiptera: Psylloidea) associated with Anacardiaceae. Zootaxa: 4232(4): 535-567.

Burckhardt, D., Días, F., Queiroz, D.L. (2017). Four new tropical *Trioza* species associated with Loranthaceae (Santalales) and comments on mistletoe inhabiting psyllids (Hemiptera: Psylloidea). Alpine Entomology. 1:91-1078.

Butt, D.J., Royle, D.J. (1980). The importance of terms and definitions for a conceptually unified epidemiology. In J. Palti and J. Kranz (Eds.), Comparative epidemiology. A tool for better disease management. Wageningen: Pudoc. 29-49.

Camerota, C., Raddadi, N., Pizzinat, A., Gonella, E., Crotti, E., Tedeschi, R., Mozes-Daube, N., Ember, I., Ács, Z., Kolber, M., Zchori-Fein, E., Daffonchio, D., Alma, A. (2012). Incidence of '*Candidatus* Liberibacter europaeus' and phytoplasmas in *Cacopsylla* species (Hemiptera: Psyllidae) and their host-shelter plants. Phytoparasitica. 40(3). DOI: 10.1007/s12600/012/0225/5

Canale, M. C., Tomaseto, A. F., Haddad, M. D. L., Coletta-Filho, H. D., Lopes, J. S. (2017). Latency and persistence of *Candidatus* Liberibacter asiaticus in its psyllid vector, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae). Phytopathology. 107:264-272.

Capoor, S.P., Rao, D.G., Viswanath, S.M. (1967). *Diaphorina citri* Kuwayama, a vector of the greening disease of *Citrus* in India. Indian Journal of Agricultural Science. 37:572-576.

Capoor, S.P., Rao, D.G., Viswanath, S.M. (1974). Greening disease of *Citrus* in the Deccan Trap Country and its relationship with the vector, *Diaphorina citri* Kuwayama. In Proceedings of the 6th Conference of the International Organization of Citrus Virologists. Eds L.G. Weathers and M. Cohen. Berkley, CA, USA: University of California. 43-49.

Catling, H.D. (1969). The bionomics of the South African Citrus psylla, *Trioza* erytreae (Del Guercio) (Homoptera: Psyllidae). Journal of Entomology Society South Africa. 33:273-290.

CDA (Coordenadoria de Defesa Agropecuária). (2016). Dados da citricultura paulista. Available at: https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/www/gdsv/index.php?action=dadosCitriculturaPaulista

Cen, Y., Zhang, L., Xia, Y., Guo, J., Deng, X., Zhou, W., Sequeira, R., Gao, J., Wang, Z., Yue, J., Gao, Y. (2012a). Detection of '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' in *Cacopsylla* (Psylla) *citrisuga* (Hemiptera: Psyllidae). Florida Entomologist. 95:304-311.

Cen, Y., Yang, C., Holford, P., Beattie, G.A.C., Spooner-Hart, R.N., Liang, G., & Deng, X. (2012b). Feeding behaviour of the Asiatic Citrus psyllid, *Diaphorina citri*, on healthy and huanglongbing-infected Citrus. Entomologia Experimentalis et Applicata. 143(1):13–22. http://doi.org/10.1111/j.1570/7458.2012.01222.x

Center, T.D., Pratt, P.D., Tipping, P.W., Rayamajhi, M.B., Van, T.K., Wineriter, S.A., Dray, F.A., Purcell, M. (2006). Field colonization, population growth, and dispersal of *Boreioglycaspis melaleucae* Moore, a biological control agent of the invasive tree *Melaleuca quinquenervia* (Cav.) Blake. Biol Control. 39:363–374.

Chen, M.R., Miyakawa, T., Matsui, C. (1973). Citrus likubin pathogens in the salivary glands of *Diaphorina citri*. Phytopathology. 63:194-195.

Chakraborty, N.K., Pandey, P.K., Chatterjee, S.N., and Singh, A.B. (1976). Host preference in *Diaphorina citri* Kuwayama, vector of greening disease in India. Indian J. Entomol. 38:196-197.

Chapman, J.W., Reynolds, D.R., and Smith, A.D. (2003). Vertical-looking radar: A new tool for monitoring high/altitude insect migration. Bioscience. 53:503-511.

Chinelato, G.A. (2017). Dinâmica temporal e distribuição espacial de Huanglongbing (HLB, Greening) e seu inseto vetor (*Diaphorina citri*) Kuwayama (Hemiptera: Liviidae). Dissertação de Mestrado. ESALQ. Piracicaba.

Cocuzza, G. E. M., Alberto U., Hernández-Suárez E., Siverio F., Di Silvestro S., Tena A., Carmelo R.. (2016). A review on *Trioza erytreae* (African Citrus psyllid), now in mainland Europe, and its potential risk as vector of huanglongbing (HLB) in Citrus. J. Pest Sci. 1-17. doi:10.1007/s10340-016-0804-1

Coletta-Filho, H.D., Tagon, M.L.P.N., Takita, M.A., De Negri, J.D., Pompeu, J.J., Carvalho, A.S., Machado, M.A. (2004) First report of the causal agent of huanglongbing ("*Candidatus* Liberibacter asiaticus") in Brazil. Plant Disease 88:1382.

Coletta-Filho, H.D., Carlos, E.F., Alves, K.C.S., Pereira, M.A.R., Boscariol-Camargo, R.L., de Souza, A.A., Machado, M.A. (2010). In planta multiplication and graft transmission of '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' revealed by Real-Time PCR. Eur J Plant Pathol. 126:53-60

Coletta-Filho, H.D., Daugherty, M.P., Ferreira, C., Lopes, J.R.S. (2014). Temporal progression of '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' infection in Citrus and acquisition efficiency by *Diaphorina citri*. Phytopathology. 104:416-421.

Coy, M.R., Stelinsky, L.L. (2015). Great Variability in the Infection Rate of 'Candidatus Liberibacter Asiaticus' in Field Populations of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) in Florida. Florida Entomologist, 98(1):356-357.

Damsteegt, V.D., Postnikova, E.N., Stone, A.L., Kuhlmann, M., Wilson, C., Sechler, A., Schaad, N.W., Brlansky, R.H., Schneider, W.L. (2010). *Murraya paniculata* and Related Species as Potential Hosts and Inoculum Reservoirs of '*Candidatus* Liberibacter asiaticus'. Causal Agent of Huanglongbing Plant Disease. 94:5. doi:10.1094/PDIS/94/5/0528

Deng, X., Li, J., Xu, J., Fang, S., Li, H. and Chen, J. (2006). A method for a quick detection of huanglongbing agent from asiatic Citrus psyllid (*Diaphorina citri* Kuwayama). In: Huanglongbing/ Citrus Workshop. Ribeirão Preto. 85.

Deng, X., Zhou, G., Li, H., Chen, J., Civerolo, E.L. (2007). Detection of *Candidatus* Liberibacter asiaticus from wampee (*Clausena lansium* Skeels) by nested PCR. Online. Plant Health Progress doi:10.1094/PHP/2007/0419/01/BR

Dickinson, M. H., Lighton, J.R.B. (1995). Muscle efficiency and elastic storage in the flight motor of *Drosophila*. Science. 268:87–90.

Duan, Y., Zhou, L., Hall, D.G., Li, W., Doddapaneni, H., Lin, H., Liu, L., Vahling, D.M., Gabriel, D.W., Williams, K.P., Dickerman, A., Sun, Y., Gottwald, T. (2009). Complete genome sequence of Citrus huanglongbing bacterium, "*Candidatus* Liberibacter asiaticus" obtained through metagenomics. Mol. Plant Microbe Interact. 22:1011-1020.

Duarte, A. (2017). A situação atual da citricultura na Flórida. Revista da Associação Portuguesa de Horticultura. 46-48.

Das, A.K., Shivankar, V.J., Singh, S. (2002). Presence of Citrus (Citrus species) greening disease (*Candidatus* Liberobacter asiaticum) and its psyllid vector (*Diaphorina citri*) in Maharashtra. Ind. J. Agric. Sci. 72:188-191.

Dingle, H. (1996). Migration: The Biology of Life on the Move. New York: Oxford University Press.

Dingle, H., Drake, A.D. (2007). What Is Migration?. BioScience. 57(2).

Donovan, N.J., Beattie, G.A.C., Chambers, G.A., Holford, P., Englezou, A., Hardy, S., Dorjee, W.P, Thinlay, O.N. (2012). First report of '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' in *Diaphorina communis*. Australasian Plant Disease Notes. 7:1-4.

Drake, V.A., Farrow, R.A. (1988). The influence of atmospheric structure and motions on insect migration. Ann. Rev. Entomol. 33:183-210

Duan, Y., Zhou, L., Hall, D.G., Li, W., Doddapaneni, H., Lin, H., Liu, L., Vahling, C.M., Gabriel, D.W., Williams, K.P., Dickerman, A., Sun, Y., Gottwald, T. (2009). Complete genome sequence of Citrus huanglongbing bacterium, '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' obtained through metagenomics. Molecular Plant–Microbe Interactions. 22:1011-1020.

EPPO. (2018). EPPO A1 List of pests recommended for regulation as quarantine pests. https://gd.eppo.int/taxon/LIBEAM. Consutado em. 05/01/2019.

Étienne, J., Quilici, S., Marival, D., Franck, A. (2001). Biological control of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in Guadeloupe by imported *Tamarixia radiate* (Hymenoptera: Eulophidae). Fruits. 56:307-315.

Fagen, J.R., Leonard, M.T., Coyle, J.F., McCullough, C.M., Davis/Richardson, A.G., Davis, M.J., Triplett, E.W. (2014). *Liberibacter crescens* gen. nov., sp. nov., the first cultured member of the genus *Liberibacter*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 64:2461-2466.

Ferreira, R.V. (2014). Influência do tipo de controle de Huanglongbing em áreas citrícolas na dispersão de *Diaphorina citri* e na disseminação da doença para pomares próximos. Dissertação Mestrado. FundeCitrus.

Flores, D., Hall, D.G., Jenkins, D.A., Setamou, M. (2009). Abundance of Asian Citrus Psyllid on Yellow Sticky Traps in Florida, Puerto Rico, and Texas Citrus Groves. Southwestern Entomologist. 34(1):1-11.

Folimonova, S.Y., Achor, D.S. (2010). Early events of Citrus greening (Huanglongbing) disease development at the ultrastructural level. Phytopathology. 100(9):949-58. doi: 10.1094/PHYTO-100-9-0949.

Fujikawa, T.,&Iwanami, T. (2012). Sensitive and robust detection of Citrus greening (huanglongbing) bacterium "*Candidatus* Liberibacter asiaticus" by DNA amplification with new 16S rDNA-specific primers. Molecular and Cellular Probes. 26:194-197.

Fundecitrus. (2018). Porcentual das árvores com incidência de sintomas de HLB. Available at: http://www.FundeCitrus.com.br/levantamentos/greening

Gandarilla-Pacheco, F.L., Galán-Wong, L.J., López, J.I., Rodríguez, R., Quintero-Zapata, I. (2013). Optimization of Pathogenicity Tests for Selection of Native Isolates of Entomopathogenic Fungi Isolated from Citrusgrowing Areas of México on Adults of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae). Florida Entomologist. 96(1):187-195.

Gatehouse, A.G. (1997). Behavior and ecological genetics of wind/borne migration by insects. Ann. Rev. Entomol. 42:475-502.

Gatineau, F., Bonnot, F., Yen, T.T.H., Tuan, D.H., Tuyen, N.D., and Truc, N.T.N. (2010). Effects of imidacloprid and fenobucarb on the dynamics of the psyllid *Diaphorina citri* Kuwayama and on the incidence of *Candidatus* Liberibacter asiaticus. Fruits. 65:209-220.

Garnier, M., Danel, N., Bové, J.M. (1984). The greening organism is a Gram negative bacterium. In Proceedings of the 9th Conference of the International Organization of Citrus Virologists, Riverside. 115-124.

Garnier, M., Jagoueix-Eveillard, S., Cronje, P., Le Roux, H., Bové, J.M. (2000). Genomic characterization of a liberibacter present in an ornamental Rutaceous tree, *Calodendrum capense*, in theWestern Cape Province of South Africa. Proposal for a "*Candidatus* Liberibacter africanus subsp. capensis". International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 50:2119-2125.

Gill, T.A., Chu1, C., Pelz‐Stelinski, K.S. (2016). Comparative proteomic analysis of hemolymph from uninfected and *Candidatus* Liberibacter asiaticus-infected *Diaphorina citri*. Amino acids. DOI 10.1007/s00726/016/2373/2.

Goodenough, J.L., P.C. Jank, L.E., Carroll, W.L., Sterling, E.J., Redman, and J.A., Witz. (1983). Collecting and preserving airborne arthropods in liquid at timed intervals with a Johnson-Taylor type suction trap. J. Econ. Entomol. 76:960-963.

Gottwald, T.R., Aubert, B., & Zhao, X.Y. (1989). Preliminary analysis of Citrus greening (Huanglongbing) epidemics in the People's Republic of China and French Reunion Island. Phytopathology. 79:687-693.

Gottwald, T.R., Aubert, B., & Huang, K.L. (1991). Spatial pattern analysis of Citrus greening in Shantou, China. In: Brlansky RH, Lee RF & Timmer LW (Eds.) Proceedings of the 11th Conference of the International Organization of Citrus Virologist, Univ. California, Riverside. 421-427.

Gottwald, T.R., Da Graça, J.V., Bassanezi, R.B. (2007). Citrus Huanglongbing: the pathogen and its impact. Plant Health Progress. DOI:10.1094/PHP/2007/0906/01/RV.

Gottwald, T., Irey, M., Gast, T., Bergamin-Filho, A., Bassanezi, R., Gilligan, C.A. (2008a). A stochastic spatiotemporal analysis of the contribution of primary versus secondary spread of HLB. Proc. Int. Res. Conf. Huanglongbing. 285–90.

Gottwald, T.R., Irey, M., Taylor, E. (2008b). HLB survival analysis: a spatiotemporal assessment of the threat of an HLB-positive tree to its neighbors. Proc. Int. Res. Conf. Huanglongbing. 291–95.

Gottwald, T.R. (2010a). Current epidemiological understanding of Citrus huanglongbing. Annu. Rev. Phytopathol. 48:119-139.

Gottwald, T.R., Irey, M.S., Gast, T., Parnell, S.R., Taylor, E.L., Hilf, M.E. (2010b). Spatio-temporal Analysis of an HLB Epidemic in Florida and Implications for Spread. Proceedings, 17th Conference IOCV. Insect-Transmitted Procaryotes.

Haapalainen, M. (2014). Biology and Epidemics of *Candidatus* Liberibacter Species, Psyllid-Transmitted Plant-Pathogenic Bacteria. Annals of Applied Biology. 165(2):172-98.

Halberth, S.E., Manjunath, K.L. (2004). Asian Citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of Citrus: a literature review and assessment of risk in Florida. Florida Entomologist. 87(3):330-353.

Halbert, S.E. (2005). The discovery of huanglongbing in Florida. Proceedings 2nd International Citrus Canker and Huanglongbing Research Workshop, Orlando FL. 50(3).

Hall, D.G., Hentz, M.G., Ciomperlik, M.A. (2007). A comparison of traps and stem tap sampling for monitoring adult Asian Citrus psyllid (Hemiptera: Psyllidae) in Citrus. Florida Entomologist. 90(2):327-334.

Hall, D.G., Sétamou, M., Mizell, R.F. (2010). A comparison of sticky traps for monitoring Asian Citrus psyllid (*Diaphorina citri* Kuwayama). Crop Protection. 29:1341-1346.

Hall, D.G., Hentz, M.G. (2010). Sticky Trap and Stem-Tap Sampling Protocols for the Asian Citrus Psyllid (Hemiptera: Psyllidae). Journal of Economic Entomology. 103(2):541-549.

Hall, D.G., Hentz, M.G. (2011). Seasonal Flight Activity by the Asian Citrus Psyllid in East Central Florida. Entomologia Experimentalis et Applicata. 139(1):75-85.

Hall, D.G., Richardson, M.L., Ammar, E.L., Halbert, S.E. (2013). Asian Citrus psyllid, *Diaphorina citri*, vector of Citrus huanglongbing disease. Entomologia Experimentalis et Applicata. 146(2):207-223.

Hibino, H., Kaloostian, G.H., and Schneider, H. (1971). Mycoplasma-like bodies in the pear psylla vector of pear decline. Virology. 43:34-40.

Hodkinson, ID. (1972). Long range dispersal of certain species of Psyllidae in the Northern Pennines. Entomol Mon Mag. 108:21-22.

Hodkinson, (1974). A contribution to the knowledge of some little known British psyllids (Homoptera: Psylloidea). Entomologist's Gazette. 25(76):76-84.

Hodkinson, I.D. (1980). Present-day distribution patterns of the holarctic psylloidea (Homoptera: Insecta) with particular reference to the origin of the nearctic fauna. Journal of Biogeography. 7:127-146.

Hodkinson, ID. (1983). Psyllids (Homoptera: Psylloidea) collected in yellow water trays in northern Italy. Entomol Gaz. 34:279-280.

Hodkinson, ID. (1988). The Nearctic Psylloidea (Insecta: Homoptera): an annotated check list. J Nat Hist. 22:1179-1244.

Hodkinson, I.D., Casson, D. (2000). Patterns within patterns: abundance-size relationships within the Hemiptera of tropical rain forest or why phylogeny matters. Oikos. 88:509-514.

Hodkinson, I.D. (2009). Life cycle variation and adaptation in jumping plant lice (Insecta: Hemiptera: Psylloidea): a global synthesis. Journal of Natural History. 43:65179.

Hollis, D. (2004). Australian Psylloidea: Jumping Plantlice and Lerp Insects. Australian Biological Resources Study, Canberra, Australia. 216.

Hung, T.H., Wu, M.L., Su, H.J. (2000). Identification of alternative hosts of the fastidious bacterium causing Citrus greening disease. J. Phytopathol. 148:321-326.

Hung, T.H., Wu, M.L., Su, H.J. (2001). Identification of the Chinese Box Orange (*Severinia buxifolia*) as an Alternative Host of the Bacterium Causing Citrus Huanglongbing. European Journal of Plant Pathology. 107(2):183-189. DOI: 10.1023/A:1011283906502

Hung, T.H., Hung, S.C., Chen, C.N., Hsu, M.H., Su, H.J. (2004). Detection by PCR of *Candidatus* Liberibacter asiaticus, the bacterium causing Citrus huanglongbing in vector psyllids: application to the study of vector–pathogen relationships. Plant Pathology. 53:96-102.

Inoue, H., Ohnishi, J., Ito, T., Tomimura, K., Miyara, S., Miyata, S., Iwanami, T., Ashihara,W. (2009). Enhanced proliferation and efficient transmission of *Candidatus* Liberibacter asiaticus by adult *Diaphorina citri* after acquisition feeding in the nymphal stage. Annals of Applied Biology. 155:29-36.

INMET. (2019). Instituto Nacional de Metereologia. Estações automáticas. www.inmet.gov.br/. Consultado: 08/02/2019.

Instituto Florestal do Estado de São Paulo. (2019). Data. www.iflorestal.sp.gov.br. Consultado: 6/01/2019.

Irey, M., Gadea, P., Hall, D. (2011). Detection of *Candidatus* Liberibacter asiaticus (Las) on yellow sticky traps by real-time PCR. Proceedings of the 2nd International Research Conference on Huanglongbing. Orlando.

Jagoueix, S., Bové, J.M., Garnier, M. (1994). The phloem-limited bacterium of greening disease of Citrus is a member of the α subdivision of the Proteobacteria. International Journal of Systematic Bacteriology. 44:379-386.

Jagoueix, S., Bové, J.M., Garnier, M. (1997). Comparison of the 16S/23S Ribosomal Intergenic Regions of "*Candidatus* Liberobacter asiaticum" and "*Candidatus* Liberobacter africanum", the two species associated with Citrus Huanglongbing (Greening) Disease. International Journal of Systematic Bacteriology. 47:224–227.

Johnson, C.G. (1950a). A suction trap for small airborne insects which automatically segregates the catch into successive hourly samples. Ann. Appl. BioI. 37: 80-91.

Johnson, C.G. (1950b). The comparison of suction trap, sticky trap and tow-net for the quantitative sample of small airborne insects. Ann. Appl. BioI. 37:268-285.

Johnson, C.G., e Taylor, L.R. (1955). The development of large suction traps for airborne insects. Ann. Appl. BioI. 43:5161.

Johnson, C.G. (1969). Migration and Dispersal of Insects by Flight. Methuen, London.

Kennedy, J.S. (1985). Migration, behavioural and ecological. In Migration: Mechanisms and Adaptive Significance"(M. A. Rankin, ed.), Contrib. Marine Sci. 27(Suppl.). 5–26.

Killiny, N., Jones, S.E. (2017). Profiling of volatile organic compounds released from individual intact juvenile and mature Citrus leaves. Journal of Plant Physiology. 208:47-51.

Kim, J.S., Sagaram, U.S., Burns, J.K., Li, J.L., & Wang, N. (2009). Response of Sweet Orange (Citrus sinensis) to " *Candidatus* Liberibacter asiaticus" Infection: Microscopy and Microarray Analyses. Phytopathology. 99(1): 50–57. http://doi.org/10.1094/PHYTO/99/1/0050

Kobori, Y., Nakata, T., Ohto, Y., e Takasu, F. (2011). Dispersal of Adult Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae), the Vector of Citrus Greening Disease, in Artificial Release Experiments.”Applied Entomology and Zoology. 46(1):27-3

Kogenaru, S., Yan, Q., Riera, N., Roper, M. C., Deng, X., Ebert, T. A., Rogers, M., Irey, M. E., Pietersen, G., Rush, C. M., Wang, N. (2014). Repertoire of novel sequence signatures for the detection of *Candidatus* Liberibacter asiaticus by quantitative real-time PCR. BMC Microbiology, 14:39.

Koh, E.J., Zhou, L., Williams, D.S., Park, J., Ding, N., Duan, Y.P., Kang, B.H. (2012). Callose deposition in the phloem plasmodesmata and inhibition of phloem transport in Citrus leaves infected with “*Candidatus* Liberibacter asiaticus.” Protoplasma. 249(3): 687-697. http://doi.org/10.1007/s00709/011/0312/3

Korsten, L., Jagoueix, S., Bod, J.M., Garnier, M. (1996). Huanglongbing (Greening) Detection in South Africa. Thirteenth ZOCV Conference.

Kristoffersen, L., Anderbrant, O. (2007). Carrot psyllid (*Trioza apicalis*) winter habitats-insights in shelter plant preference and migratory capacity. J Appl Entomol. 131:174-178.

Lallemand, J., A. Fos, and J.M. Bové. (1986). Transmission de la bacterie associé a la forme africaine de la maladie du “greening” par le psylle asaitique *Diaphorina citri* Kuwayama. Fruits. 41:341-343.

Land, M.F. (1997). Visual acuity in insects. Annu. Rev. Entomol. 42:147-77

Leonard, M.T., Fagen, J.R., Davis-Richardson, A.G., Davis, M.J., Triplett, E.W. (2012). Complete genome sequence of *Liberibacter crescens* BT/1. Stand Genomic Sci. 7:271-283.

Lewis-Rosenblum, H., Martini, X., Tiwari, S., Stelinski, L.L. (2015). Seasonal Movement Patterns and Long-Range Dispersal of Asian Citrus Psyllid in Florida Citrus. Journal of Economic Entomology. 108(1):3-10.

Li, W., Hartung, J.S., Levy, L. (2006). Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus* Liberibacter species associated with Citrus huanglongbing. Journal of Microbiological Methods. 66:104-115.

Lin, H., Chen, C., Doddapaneni, H., Duan, Y., Civerolo, E.L., Bai, X., Zhao, Z. (2010). New diagnostic system for ultra-sensitive and specific detection and quantification of *Candidatus* Liberibacter asiaticus, the bacterium associated with Citrus Huanglongbing. 81:17-25.

Lin, H., Coletta-Filho, H.D., Han, C.S., Lou, B., Civerolo, E.L., Machado, M.A., Gupta, G. (2013). Draft genome sequence of "*Candidatus* Liberibacter americanus" bacterium associated with Citrus huanglongbing in Brazil. Genome Announc. 1(3):e00275-13. doi:10.1128/genomeA.00275/13.

Liu, T.X., Zhang, Y.M., Peng, L.N., Rojas, P., Trumble, J.T. (2012). Risk Assessment of Selected Insecticides on *Tamarixia triozae* (Hymenoptera: Eulophidae), a Parasitoid of *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Trizoidae). Journal of Economic Entomology. 105(2):490-496. https://doi.org/10.1603/EC11295

Lopes, S.A., Martins, E.C., Frare, G.F. (2005). Detecção de *Candidatus* Liberibacter americanus em *Murraya paniculata*. Summa Phytopathol. 31:48-49.

Lopes, S.A., Martins, E.C., Frare, G.F. (2006). Detecção de *Candidatus* Liberibacter asiaticus em *Murraya paniculata*. Fitopatol. Bras. 31:303.

Lopes, S.A., Frare, G.F., Yamamoto, P.T., Ayres, A.J., Barbosa, J.C. (2007). Ineffectiveness of pruning to control Citrus huanglongbing caused by *Candidatus* Liberibacter americanus. European Journal of Plant Pathology. 119:463-468.

Lopes, S.A., Frare, G.F., Bertolini, E., Cambra, M., Fernandes, N.G., Ayres, A.J., Marin, D. R., Bové, J.M. (2009). Liberibacters associated with Citrus huanglongbing in Brazil: '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' is heat tolerant, '*Ca*. L. americanus' is heat sensitive. Plant Dis. 93:257/262.

Machado, L.M., Burckhardt, D., Queiroz, D.L., Costa, E.C., Machado, D.N., Pedron, L. (2017). First record of *Heteropsylla caldwelli* Burckhardt (Hemiptera: Psyllidae) from Brazil and its population dynamics on earpod tree in Rio Grande do Sul. Revista Brasileira de Entomologia. 61:290-293.

Malenovský, I., Burckhardt, D., Queiroz, D.L., Isaias, R.M.S. Oliveira, D.C. (2015). Descriptions of two new *Pseudophacopteron* species (Hemiptera: Psyllidae: Phacopteronidae) inducing galls on Aspidosperma (Apocynaceae) in Brazil. Entomologica Musei Nationalis Pragae. 55(2):513-538.

Manjunath, K.L., Halbert, S.E., Ramadugu, C., Webb, S., Lee, R.F. (2008). Detection of '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' in *Diaphorina citri* and its importance in the management of Citrus huanglongbing in Florida. Phytopathology. 98:387-396

Martinez, AL., Wallace, JM. (1967). Citrus leaf mottle-yellows disease in the Philippines and transmission of the causal virus by a psyllid, *Diaphorina citri*. Plant Disease Reporter. 51:692-695

Martini, X., Hoyte, A., Stelinski, L.L. (2014). Abdominal Color of the Asian Citrus Psyllid (Hemiptera: Liviidae) Is Associated With Flight Capabilities. Annals of the Entomological Society of America. 107(4):842–847. http://doi.org/10.1603/AN14028

Martini, X., Hoffmann, M., Coy, M.R., Stelinski, L.L., Pelz-Stelinski, K.S. (2015). Infection of an Insect Vector with a Bacterial Plant Pathogen Increases Its Propensity for Dispersal. PLoS ONE. 10(6).

Martini, X., Stelinski, L.L. (2017). Influence of Abiotic Factors on Flight Initiation by Asian Citrus Psyllid (hemiptera: Liviidae). Environmental Entomology. 46(2):369-75.

Massonié, G., Garnier, M., Bové, J.M. (1976). Transmission of Indian Citrus decline by *Tryoza erytreae* (Del G.), the vector of South African greening. In: Calavan EC, ed. Proceedings of the 7th Conference of the International Organization of Citrus Virologists. University of California, Riverside, USA: IOCV. 18-20.

Mazzardo, T., Barreto, M.R., de Queiroz, D., Burckhardt, D. (2017). Diversity and distribution of jumping plant-lice (Hemiptera: Psylloidea) along edges of Amazon–Cerrado transitional forests in Sorriso, Mato Grosso, Brazil. Check List. 13(3):2131.

McClean, A.P.D., Oberholzer, P.C.J. (1965). Greening disease of sweet orange: evidence that it is caused by a transmissible virus. South Africa Journal of Agricultural Science. 8:253-276.

McClean, A.P.D., Schwarz, R. E. (1970). Greening or blotchy-moult: disease of Citrus. Phytophylactica. 2:177-194.

McLean, G.D., Garret, R.G., Ruesink, W.G. (1986). Plant virus epidemics. Monitoring, modeling and predicting outbreaks. 4:59-63.

Michaud, J.P. (2004). Natural mortality of Asian Citrus psyllid (Homoptera: Psyllidae) in central Florida. Biological Control. 29:260-269.

Mifsud, D. (1997). The jumping plant-lice (Hemiptera: Psylloidea) of the Maltese Islands University of Malta. 84.

Moghbeli-Gharaei, A., Ziaaddini, M., Jalali, M.A., Michaud, J.P. (2014). Sex-specific responses of Asian Citrus psyllid to volatiles of conspecific and host-plant origin. Journal of Applied Entomology. 138(7):500-509. http://doi.org/10.1111/jen.12107.

Moraes, R.C.B., Haddad, M.L., Silveira-Neto, S., Reyes, A.E.L. (2003). Software para análise faunística. In: Simpósio de encontro biológico, São Pedro. Anais. São Pedro: Sinpobiol. 8:195.

Morris, J., Shiller, J., Mann, R., Smith, G., Yen, A., Rodoni, B. (2017). Novel '*Candidatus* Liberibacter' species identified in the Australian eggplant psyllid, *Acizzia solanicola*. Microbial Biotechnology. 10: 833-844.

Muirhead-Thomson, R.C. (1991). Trap Responses of Flying Insects: The Influence of Trap Design on Capture Efficiency. (Royal Holloway and Bedford New College, Egham, Surrey (United Kingdom). Academic Press.

Munyaneza, J.E., Fisher, T.W., Sengoda, V.G., Garczynski, S.F., Nissinen, A., Lemmetty, A. (2010). Association of '*Candidatus* Liberibacter solanacearum' with the psyllid, *Trioza apicalis* (Hemiptera: Triozidae) in Europe. Journal of Economic Entomology. 103:1060-1070.

Nadarasah, G., Stavrinides, J. (2011). Insects as Alternative Hosts for Phytopathogenic Bacteria. FEMS Microbiology Reviews. 35(3):555-575.

NCBI, (2018). Lineage: Liberibacter. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=34019).

Nelson, W.R., Munyaneza, J.E., McCue, K.F., Bové, J.M. (2013). The Pangaean origin of "*Candidatus* liberibacter" species. Journal of Plant Pathology. 95(3):455-461.

Noda, T., Kiritani, K. (1989). Landing places of migratory planthoppers, *Nilaparvata lugens* (Stål) and *Sogatella furcifera* (Horvath) (Homoptera: Delphacidae) in Japan. Appl. Ent. Zool. 24:59-65.

Nwugo, C.C., Lin, H., Duan, Y., & Civerolo, E.L. (2013). The effect of "*Candidatus* Liberibacter asiaticus" infection on the proteomic profiles and nutritional status of pre-symptomatic and symptomatic grapefruit (*Citrus paradisi*) plants. BMC Plant Biology. 13(1):59. http://doi.org/10.1186/1471/2229/13/59

Osborne, J.L., Loxdale, H.D., Woiwod, I.P. (2002). Monitoring insect dispersal: Methods and approaches. In "Dispersal Ecology: The 42nd Symposium of the British Ecological Society Held at the University of Reading, 2–5 April 2001" (J. M. Bullock, R. E. Kenward, and R. S. Hails, eds.). Blackwell Science Malden, USA. 24-49.

Ouvrard, D., Bourgoin, T., Campbell, B.C. (2002). Comparative morphological assessment of the psyllid pleuron (Insecta, Hemiptera, Sternorrhyncha). J Morpho.l. 252(3):276-290

Ouvrard, D., Burckhardt, D., Soulier-Perkins, A., Bourgoin, T. (2008). Comparative morphological assessment and phylogenetic significance of the wing base articulation in Psylloidea (Insecta, Hemiptera, Sternorrhyncha). Zoomorphology. 127:37-47 DOI 10.1007/s00435/007/0049/x

Ouvrard, D. (2018). Psyl'list – The World Psylloidea Database. http://www.hemiptera/databases.com/psyllist.

Pedgley, D.E. (1999). Weather influences on pest movement. In "Handbook of Pest Management" (J. R. Ruberson, ed.). Marcel Dekker, New York. 57–78.

Percy, D.M. (2003). Radiation, diversity, and host/plant interactions among island and continental legume-feeding psyllids. Evolution. 57:2540-2556.

Percy, D.M., Page, R.D.M., Cronk, Q.C.B. (2004). Plant–insect interactions: double-dating associated insect and plant lineages reveals asynchronous radiations. Systems Biology. 53:120-127.

Pelz-Stelinski, K.S., Brlansky, R.H., Ebert, T.A., Rogers, M.E. (2010). Transmission parameters for *Candidatus* Liberibacter asiaticus by Asian Citrus psyllid (Hemiptera: Psyllidae). Journal of Economic Entomology. 103:1531-1541.

Pelz-Stelinski, K.S., Killiny, N. (2016). Better Together: Association with "*Candidatus* Liberibacter Asiaticus" Increases the Reproductive Fitness of Its Insect Vector, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). Annals of the Entomological Society of America. 109(3):371-376. http://doi.org/10.1093/aesa/saw007

Purcell, A.H. (1982). Insect vector relationships with procaryotic plant pathogens. Phytopathology. 20:397-417.

Que, S., Yu, L., Xin, T., Zou, Z., Hu, L., Xia, B. (2015). Complete mitochondrial genome of *Cacopsylla coccinae* (Hemiptera: Psyllidae). Mitochondrial DNA. 3169-3170.

Raddadi, N., Gonella, E., Camerota, C., Pizzinat, A., Tedeschi, R., Crotti, E., Mandrioli, M., Bianco, P.A., Daffonchio, D., Alma, A. (2011). '*Candidatus* Liberibacter europaeus' sp. nov. that is associated with and transmitted by the psyllid *Cacopsylla pyri* apparently behaves as an endophyte rather than a pathogenemi. Environmental Microbiology. 13(2): 414-426.

Ramsey, J.S., Johnson, R.S., Hoki, J.S., Kruse, A., Mahoney, J., Hilf, M.E., Cilia, M. (2015). Metabolic interplay between the asian Citrus psyllid and its profftella symbiont: An achilles' heel of the Citrus greening insect vector. PLoS ONE. 10(11):1–21. http://doi.org/10.1371/journal.pone.0140826

Raychaudhuri, S.P., Nariani, T.K., Lele, V.C., Singh, G.R. (1972). Greening and Citrus decline in India. In Proceedings of the 5th Conference of the International Organization of Citrus Virologists. 35-37.

Reynolds, D.R., Riley, J.R., Armes, N.J., Cooter, R.J., Tucker, M.R., Colvin, J. (1997). Techniques for quantifying insect migration. In "Methods in Ecological and Agricultural

Entomology" (D. R. Dent and M. P. Walton, eds.). CAB International, Wallingford, UK. 111–145.

Reynolds, D.R., Chapman, J.W., Harrington, R. (2006). The Migration of Insect Vectors of Plant and Animal Viruses. Advances in Virus Research. 67: 453–517.

Rogers, M.E., Stansly, P.A. (2012). Biology and management of the asian Citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama, in Florida Citrus. Gainesville, University of Florida, (IFAS Extension, ENY/739). 6.

Sakamaki, Y. (2005). Possible migration of the Asian Citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae) between and within islands. Occasional Papers of the Kagoshima University Research Center. 42:121-125.

Sala, I. (2013). Avaliação do tempo de exposição em armadilha adesiva amarela e das condições de armazenamento de adultos de *Diaphorina citri* na detecção de *Candidatus* Liberibacter asiaticus. Dissertação Fundecitrus.

Sales, T.M. (2015). Dinâmica populacional de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) em pomares cítricos do Estado de São Paulo. Tese Doutorado. ESALQ. Piracicaba.

Sallé, G. (1983). Germination and establishment of *Viscum album* L. In M. Calder and P. Bernhardt [eds.], The Biology of Mistletoes. Academic Press, Sidney. 348.

Santivañez, T., Mora, G., Díaz, G., López, J.I., Vernal, P. (2013). Marco Estratégico para la Gestión Regional del Huanglongbing en América Latina y el Caribe. Santiago de Chile. FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 13-76.

Schneider, H. (1968). Anatomy of greening-diseased sweet oranges shoots. Phytopathology. 58(1):155-1160.

Seraphim, H.A., Rodrigues, G., Yamamoto, P. (2017). Feeding and Oviposition of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) on Helietta apiculata (Sapindales: Rutaceae): a Potential Host?. Florida Entomologist. 100(2):476-477.

Serbina, L., Burckhardt, D. (2017). Systematics, biogeography and host-plant relationships of the Neotropical jumping plant-louse genus *Russelliana* (Hemiptera: Psylloidea). Zootaxa. 4266(1):1-114.

Service, M.W. (1969). The use of insect suction traps for sampling mosquitoes. Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 63(5):656-663. https://doi.org/10.1016/0035/9203(69)90187/4

Sétamou, M., Sanchez, A., Patt, J.M., Nelson, S.D., Jifon, J., Louzada, E.S. (2012). Diurnal Patterns of Flight Activity and Effects of Light on Host Finding Behavior of the Asian Citrus Psyllid. Journal of Insect Behavior. 25(3):264-76.

Sétamou, M., Bartels, D.W. (2015). Living on the Edges: Spatial Niche Occupation of Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae), in Citrus Groves. PLoS ONE. 10(7).

Sétamou, M., Da Graça, J.V., Sandoval, J.L. (2016). Suitability of native North American Rutaceae to serve as host plants for the Asian Citrus psyllid (Hemiptera: Liviidae). J. Appl. Entomol. 140:645-654.

Shin, K., van Bruggen, A.H.C. (2017). *Bradyrhizobium* isolated from huanglongbing (HLB) affected Citrus trees reacts positively with primers for *Candidatus* Liberibacter asiaticus. Eur J Plant Pathol. https://doi.org/10.1007/s10658-017-1372-9

Silveira, S., Nakano, O., Barbin, D., Villa, N.A. (1976). Manual de Ecologia de insetos. Agronômica Ceres. XV. São Paulo.

Silveira-Neto, S., Monteiro, R.C., Zucchi, R. A., e Moraes, R.C.B. (1995). Uso da análise faunística de insetos na avaliação do impacto ambiental. Science Agricultural. 52(1):9-15. http://doi.org/10.1590/S0103/90161995000100003

Southwood, T.R.E., Henderson. P.A. (2000). Ecological Methods. 3rd Ed. Blackwell Science, Oxford.

Tanaka, F.A., Coletta-Filho, H., Alves, K.C., Spinelli, M.O., Machado, M.A., Kitajima, E.W. (2007). Detection of the "*Candidatus* Liberibacter americanus" in Phloem Vessels of Experimentally Infected Cataranthus roseus by Scanning Electron Microscopy. Fitopatol. Bras. 32(6).

Taylor, L.R. (1951). An improved suction trap for insects. Ann. Appl. BioI. 38: 582-591.

Taylor, L.R. (1974). Insect Migration, Flight Periodicity and the Boundary Layer. Journal of Animal Ecology. British Ecological Society Stable. 43(1):225-238.

Teixeira, D.C., Ayres, A.J., Kitajima, E.W., Tanaka, F.A.O., Danet, J.L., Jagoueix-Eveillard, S., Saillard, C., Bové, J.M. (2005a). First report of a huanglongbing-like disease of Citrus in São Paulo State, Brazil, and association of a new liberibacter species, "*Candidatus* Liberibacter americanus", with the disease Plant Disease. 89(107).

Teixeira, D.C., Danet, J.L., Eveillard, S., Martins, E.C., de Jesus, Jr, W.C., Yamamoto, P.T., Lopes, S.A., Bassanezi, R.B., Ayres, A.J., Saillard, C., Bové, J.M. (2005b). Citrus huanglongbing in São Paulo State, Brazil: PCR detection of the '*Candidatus*' Liberibacter species associated with the disease. Molecular and Cellular Probes. 19:173-179.

Teixeira, D.C., Eveillard, S., Sirand-Pugnet, P., Wulff, A., Saillard, C., Ayres, A.J., Bové, J.M. (2008). The tufB–secE–nusG–rplKAJL–rpoB gene cluster of the liberibacters: sequence comparisons, phylogeny and speciation. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 58:1414-1421.

Teixeira, D.C., Wulff, N.A., Lopes, S,A., Yamamoto, P.T., Miranda, M.P.,Belasque, J., Bassanezi, R.B. (2010). Caracterização e etiologia das bactérias associadas ao huanglongbing. Citrus Research & Technology 31:115-128.

Thao, M.L., Moran, N.A., Abbot, P., Brennan, E.B., Burckhardt, D.H., Baumann, P. (2000). Cospeciation of Psyllids and Their Primary Prokaryotic Endosymbionts. Applied and Environmental Microbiology. 66(7):2898-2905.

Thao, M.L., Baumann, L., Baumann, P. (2004). Organization of the mitochondrial genomes of whiteflies, aphids, and psyllids (Hemiptera, Sternorrhyncha). BMC Evol. Biol. 4(25).

Thompson, S., Fletcher, J.D., Ziebell, H., Beard, S., Panda, P., Jorgensen, N., Fowler, S.V., Liefting, L.W., Berry, N., Pitman, A.R. (2013). First report of '*Candidatus* Liberibacter europaeus' associated with psyllid infested Scotch broom. New Disease Reports. 27(6).

Tiwari, S., Lewis-Rosenblum, H., Pelz-Stelinski, K., Stelinski, L.L. (2010). Incidence of *Candidatus* Liberibacter Asiaticus Infection in Abandoned Citrus Occurring in Proximity to Commercially Managed Groves. Journal of Economic Entomology. 103(6):1972-78. https://academic.oup.com/jee/article/lookup/doi/10.1603/EC10149.

Tomaseto, A.F., Miranda, M.P., Moral, R.A., Lara, I.A.R., Fereres, A., Lopes, J.R.S. (2017). Environmental conditions for *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) take-off. Journal of applied entomology. 142(1):104-113.

Tsai, J.H., Liu, Y.H. (2000). Biology of *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) on Four Host Plants. Journal of Economic Entomology. 93(6):1721-1725.

USDA. (2018). Statistics Florida Citrus. http://www.nass.usda.gov/Sta/tistics_by_State/Florida/Publications/Citrus/fcs/2013/14/fcs1314.pdf.

Van den Berg, M.A., Van Vuuren, S.P., Deacon, V.E. (1987). Cross-breeding and greening disease transmission of different populations of the Citrus psylla *Trioza erytreae* (Hemiptera: Triozidae). Phytophylactica. 19:353-354.

Van den Berg, M. A., Anderson, S.H., Deacon, V.E. (1991). Population Studies of the Citrus Psylla, *Trioza erytreae*: Factors Influencing Population Size. Phytoparasitica 19(3):183-93.

Van den Berg, M.A., VanVuuren, S.P., Deacon, V.E. (1992). Studies on greening disease transmission by the Citrus psylla, *Trioza* erytreae (Hemiptera: Triozidae). Isr.J. Entomol. 25:51-56.

Van Der Horst, D.J. (2003). Insect adipokinetic hormones: Release and integration of flight energy metabolism. Comparative Biochemistry and Physiology / B Biochemistry and Molecular Biology. 136(2):217-226. http://doi.org/10.1016/S1096/4959(03)00151/9

Vyas, M., Fisher, T.W., He, R., Nelson, W., Yin, G., Cicero, J.M., Brown, J.K. (2015). Asian Citrus psyllid expression profiles suggest *Candidatus* liberibacter asiaticus-mediated alteration of adult nutrition and metabolism, and of nymphal development and immunity. PLoS ONE. 10(6):1-31. http://doi.org/10.1371/journal.pone.0130328

Wallis, RL. (1946). Seasonal occurrence of the potato psyllid in the North Platte Valley. J Econ. Entomol. 39:689-694.

Walter, A.J., Duan, Y.P., Hall, D.G. (2012). Titers of '*Ca*. Liberibacter asiaticus' in *Murraya paniculata* and Murraya reared *Diaphorina citri* Are Much Lower than in Citrus and Citrus reared Psyllids. HortScience. 47(10):1449-1452.

Wang, LY; Hung, SC; Hung, TH; Su, HJ. 1996. Population fluctuation of *Diaphorina citri* Kuwayama and incidence of Citrus likubin in Citrus orchards in Chiayi area. Plant Protection Bulletin 38:355-365.

Wenninger, E.J., Stelinski, L.L., Hall, D.G. (2009). Relationships Between Adult Abdominal Color and Reproductive Potential in *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). Annals of the Entomological Society of America. 102(3):476-483. http://doi.org/10.1603/008.102.0318

Woiwod, I.P., Harrington, R. (1994). Flying in the face of change: The Rothamsted Insect Survey. In "Long-Term Experiments in Agricultural and Ecological Sciences" (R. A. Leigh and A. E. Johnson, eds.). CAB International, Wallingford, UK. 321-342.

Wu, F., Cen, Y., Wallis, C., Trumble, J.T., Prager, S., Yokomi, R., Zheng, Z., Deng, X., Chen, J., Liang, G. (2016). The complete mitochondrial genome sequence of *Bactericera cockerelli* and comparison with three other Psylloidea species. PLoS One. 11 (5).

Wulff, N.A., Zhang, S., Setubal, J.C., Almeida, N.F., Martins, E.C., Harakava, R., Kumar, D., Rangel, L.T., Foissac, X., Bové, J.M., Gabriel, D.W. (2014). The Complete Genome Sequence of '*Candidatus* Liberibacter americanus', Associated with Citrus Huanglongbing. MPMI. 27(2):163-176. http://dx.doi.org/10.1094/MPMI/09/13/0292/R.

Xiong, X., Wu, L., Xin, T., Wang, J., Zou, Z., Xia, B. (2017). The complete mitochondrial genome of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) and phylogenetic analysis. Biochemical Systematics and Ecology. 70:230-238.

Xu, C.F., Xia, Y.H., Li, K.B., Ke, C. (1988). Further study of the transmission of Citrus huanglongbing by a psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama. In Proceedings of the 10th Conference of the International Organization of Citrus Virologists, 17–21 November 1986, Valencia, Spain. Eds L.W. Timmer, S.M. Garnsey and L. Navarro. Riverside, CA, USA: International Organization of Citrus Virologists, University of California. 243-248.

Yamamoto, P.T., Paiva, P.E.B., Gravena, S. (2001). Flutuação populacional de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) em pomares de citros na região norte do estado de São Paulo. Neotropical Entomology. 30(1):165-170.

Yamamoto, P.T., Felippe, M.R., Garbim, L.F., Coelho, J.H.C., Ximenes, N.L., Martins, E.C., Leite, A.P.R., Sousa, M.C., Abrahão, D.P., Braz, J.D. (2006). *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae): vector of the bacterium *Candidatus* Liberibacter americanus. Proceedings of Huanglongbing Greening International Workshop, Ribeirão Preto. 96.

Zhang, W.C. (1981). Development and outlook of Citrus industry in China. Proc. of the Intl. Soc. Citricult. 2:987-990.

Zhang, Q.L., Guo, Z.L., Yuan, M.L. (2014). The complete mitochondrial genome of *Paratrioza sinica* (insecta: Hemiptera: Psyllidae). Mitochondrial DNA. http://dx.doi.org/10.3109/19401736.2014.913164.

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