

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

Fatores bióticos e abióticos influenciando a mobilidade e aspectos biológicos de  
*Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae)

**Arthur Fernando Tomaseto**

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

Piracicaba  
**2016**

Arthur Fernando Tomaseto  
Engenheiro Agrônomo

Fatores bióticos e abióticos influenciando a mobilidade e aspectos biológicos de *Diaphorina citri*  
Kuwayama (Hemiptera: Liviidae)

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

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

Piracicaba  
2016

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

Tomaseto, Arthur Fernando

Fatores bióticos e abióticos influenciando a mobilidade e aspectos biológicos de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae)/ Arthur Fernando Tomaseto - - Piracicaba, 2016.

105p. : il.

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

1. Huanglongbing 2. Psilídeo-asiático-dos-citros 3. Propensão ao voo  
4. Relação bactéria-vetor I. Título

Aos meus pais **Márcia e Laércio**: por não medirem esforços para me apoiar em todas as fases da minha vida pessoal e acadêmica. Essa conquista profissional só foi possível por causa de vocês. Agradeço por todos os ensinamentos em minha vida.

À minha irmã **Adriane**, meu cunhado **Renato** e minha sobrinha **Sarah**: por estarem presentes em todos os momentos da minha vida, por toda ajuda e companheirismo. Vocês são muito importantes para mim!

À minha namorada **Helena**: por todo amor incondicional e por acreditar no meu potencial na época de grande incerteza do meu doutorado. Obrigado por me fazer tão feliz e por ter me mostrado o verdadeiro significado da palavra amor! Você é um presente de Deus! Amo você!

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Ao professor João Roberto Spotti Lopes, pela orientação e ensinamentos desde 2008, pela paciência, ajuda, amizade, e principalmente por ter me apresentado ao mundo fascinante da entomologia e aos insetos vetores de fitopatógenos.

Ao Dr. Marcelo Pedreira de Miranda, pesquisador do Fundo de Defesa da Citricultura (FUNDECITRUS), pelas oportunidades, orientação, incentivo e principalmente pela amizade e por ter me ajudado no primeiro contato com o inseto *Diaphorina citri*, em 2008.

Ao Dr. Alberto Fereres, pesquisador do Instituto de Ciencias Agrarias (ICA), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid, Espanha, pelas ideias na elaboração do projeto, orientação e interpretação dos resultados.

Ao professor Dr. Eric Wajnberg, professor do INRA (French National Institute for Agricultural Research) Sophia-Antipolis, França, pela orientação e sugestão para as análises de dados da tese.

Ao professor Dr. Idemauro A.R. de Lara e Rafael A. Moral, ambos do Departamento de Ciências Exatas, ESALQ/USP, pela grande contribuição na análise estatística de todos os dados da tese.

Ao professor José Djair Vendramim, pela concessão das câmaras de crescimento para a realização dos ensaios de verificação do efeito da temperatura e fotoperíodo na decolagem de *D. citri*.

Aos professores do Departamento de Entomologia e Acarologia, pelos ensinamentos ministrados e orientações durante as disciplinas e reuniões no Departamento de Entomologia e Acarologia.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsas de estudo.

Ao Fundo de Defesa da Citricultura (FUNDECITRUS) pelo auxílio financeiro para a realização do presente projeto.

Aos companheiros de trabalho e amigos do Laboratório de Insetos Vetores: Anderson, Bel, Carla, Gabriel Frassetto, Gabriel Passos, Gabriela, Isabella, Javier, Joyce, Juliana, Juliana Lopes, Letícia, Luiza, Karen, Maria Cristina, Mariana, Nathalie, Rodrigo Marques, Ricardo, Simone, Taciana, Tatiana, Tiago Sales, Thiago Bucci e Willis, pela grande ajuda, amizade e convivência durante os quatro anos de doutorado.

Àqueles que me ajudaram constantemente nos experimentos: Gabriel Frassetto, Letícia, Tatiana, Thiago Bucci e Willis, pelo grande auxílio na preparação de plantas, criação de *D. citri*, montagem e avaliação dos experimentos.

Às amigas: Mariana e Taciana, pela convivência diária e grande apoio na realização dos ensaios, discussão dos resultados e correção dos textos da tese.

Ao amigo Gustavo R. Alves, por todo apoio na montagem, condução e avaliação do experimento de efeito das bactérias na biologia e voo de *D. citri*

Aos amigos: Aloisio e Odimar, por toda ajuda na elaboração da tabela de vida de fertilidade e revisão do texto da tese.

Aos amigos da pós-graduação, pela convivência, companheirismo e descontração durante os quatro anos de doutorado.

À minha namorada Helena, por todo amor, carinho, compreensão, apoio e companheirismo durante a fase final de meu doutorado.

Aos funcionários do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ-USP pelo auxílio e amizade.

A todos que contribuíram de maneira direta ou indireta para a realização desse trabalho.

“Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil — e, no entanto é a coisa mais preciosa que temos”

*Albert Einstein*

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>9</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>10</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>Referências</b> .....	<b>14</b>
<b>2. CONDIÇÕES AMBIENTAIS PARA O INÍCIO DO VOO DE <i>Diaphorina citri</i> KUWAYAMA (HEMIPTERA: LIVIIDAE)</b> .....	<b>19</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>19</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>19</b>
2.1. INTRODUÇÃO .....	20
2.2. MATERIAL E MÉTODOS .....	22
2.2.1. <i>Insetos e plantas utilizados nos experimentos</i> .....	22
2.2.2. <i>Periodicidade de voo</i> .....	22
2.2.3. <i>Temperatura mínima mediana de voo</i> .....	23
2.2.4. <i>Desenvolvimento e adequação de metodologia para estudos de decolagem de <i>D. citri</i></i> .....	24
2.2.5. <i>Efeito do fotoperíodo e da temperatura na decolagem de <i>D. citri</i></i> .....	25
2.2.6. <i>Análise de dados</i> .....	26
2.3. RESULTADOS .....	28
2.3.1. <i>Periodicidade de voo</i> .....	28
2.3.2. <i>Temperatura mínima mediana para o voo</i> .....	29
2.3.3. <i>Adequação de metodologia para estudos de decolagem de <i>D. citri</i></i> .....	30
2.3.4. <i>Efeito do fotoperíodo e da temperatura na decolagem de <i>D. citri</i></i> .....	31
2.3.4.1. <i>Efeito de diferentes regimes de fotoperíodo e temperatura</i> .....	31
2.3.4.2. <i>Efeito de temperaturas constantes</i> .....	34
2.4. DISCUSSÃO .....	36
2.5. CONCLUSÕES .....	41
<b>Referências</b> .....	<b>42</b>
<b>3. EFEITO DA CONDIÇÃO DA PLANTA DE CITROS NA DECOLAGEM DE <i>Diaphorina citri</i> KUWAYAMA (HEMIPTERA: LIVIIDAE)</b> .....	<b>47</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>47</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>47</b>
3.1. INTRODUÇÃO .....	48
3.2. MATERIAL E MÉTODOS .....	49
3.2.1. <i>Insetos e plantas utilizados nos experimentos</i> .....	49
3.2.2. <i>Avaliação da decolagem de <i>D. citri</i></i> .....	50
3.2.2.1. <i>Efeito do estresse hídrico</i> .....	50
3.2.2.2. <i>Efeito da qualidade nutricional do hospedeiro</i> .....	51
3.2.2.3. <i>Efeito da densidade populacional</i> .....	52
3.2.2.4. <i>Efeito de brotações de plantas cítricas</i> .....	52
3.2.3. <i>Análise de dados</i> .....	53
3.3. RESULTADOS .....	53
3.3.1. <i>Efeito do estresse hídrico na decolagem de <i>Diaphorina citri</i></i> .....	53
3.3.2. <i>Efeito da qualidade nutricional na decolagem de <i>Diaphorina citri</i></i> .....	55
3.3.3. <i>Efeito da densidade de ninfas na decolagem de adultos de <i>Diaphorina citri</i></i> .....	56
3.3.4. <i>Efeito de brotações na decolagem de <i>Diaphorina citri</i></i> .....	58
3.4. DISCUSSÃO .....	60
3.5. CONCLUSÕES .....	64
<b>Referências</b> .....	<b>65</b>



<b>4. EFEITO DE ‘<i>Candidatus Liberibacter americanus</i>’ E ‘<i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>’ EM PARÂMETROS BIOLÓGICOS E COMPORTAMENTAIS DE <i>Diaphorina citri</i> KUWAYAMA (HEMIPTERA: LIVIIDAE)</b> .....	<b>69</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>69</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>69</b>
4.1. INTRODUÇÃO .....	70
4.2. MATERIAL E MÉTODOS .....	72
4.2.1. Criação de psíldeos sadios .....	72
4.2.2. Obtenção e manutenção de plantas-fonte e sadias .....	72
4.2.3. Efeito de Lam e Las na biologia de <i>Diaphorina citri</i> .....	73
4.2.4. Efeito de Lam e Las na decolagem de <i>Diaphorina citri</i> .....	75
4.2.5. Preferência para pouso em plantas Lam, Las e controle .....	76
4.2.6. Extração de DNA das plantas e insetos .....	76
4.2.7. PCR quantitativo em tempo real .....	78
4.2.8. Análise de dados .....	79
4.3. RESULTADOS .....	80
4.3.1. Efeito de Lam e Las na biologia de <i>Diaphorina citri</i> .....	80
4.3.1.1. Avaliação da estrutura etária de ninfas desenvolvidas em plantas fonte .....	80
4.3.1.2. Índices de abortamento de brotações .....	81
4.3.1.3. Efeito de Lam e Las na duração, viabilidade e razão sexual de <i>Diaphorina citri</i> .....	82
4.3.1.4. Efeito de Lam e Las em parâmetros reprodutivos de <i>Diaphorina citri</i> .....	83
4.3.1.5. Efeito de Lam e Las na longevidade de adultos de <i>Diaphorina citri</i> .....	86
4.3.2. Efeito de Lam e Las na decolagem de <i>Diaphorina citri</i> .....	89
4.3.3. Preferência de pouso em plantas sadias e fonte de Lam e Las .....	92
4.4. DISCUSSÃO .....	94
4.5. CONCLUSÕES .....	100
<b>Referências</b> .....	<b>103</b>

## RESUMO

### Fatores bióticos e abióticos influenciando a mobilidade e aspectos biológicos de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae)

Huanglongbing é considerado como o principal obstáculo da indústria produtora de sucos de laranja do mundo. No Brasil, a doença está associada predominantemente às bactérias ‘*Candidatus Liberibacter americanus*’ (Lam) e ‘*Ca. L. asiaticus*’ (Las), as quais são transmitidas pelo psíldeo *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae). Levantamentos mostram um aumento expressivo na incidência de plantas doentes nos pomares brasileiros e esse incremento se deve, em grande parte, à disseminação pelo inseto vetor. Informações na literatura da influência de fatores ambientais e da condição da planta na mobilidade de *D. citri* são escassos ou inexistentes, assim como o efeito de Lam em parâmetros biológicos e comportamentais do inseto. O conhecimento desses fatores pode auxiliar no entendimento da epidemiologia da doença e no desenvolvimento de táticas de controle mais eficientes. Diante disso, os objetivos do presente estudo foram (1) determinar o efeito de fatores ambientais no processo de decolagem de *D. citri*; (2) verificar o efeito da condição da planta no processo de decolagem do inseto; e (3) estudar a possível influência de Lam e Las na biologia, voo e preferência ao pouso de *D. citri*. No estudo em que foi determinado o efeito de fatores ambientais, adultos sadios de *D. citri* foram avaliados quanto à periodicidade diária de voo e ao limiar de temperatura para decolagem. Além disso, verificou-se o efeito de diferentes regimes de fotoperíodo e temperatura e temperaturas constantes na fase inicial de voo a partir da coleta de indivíduos que decolavam de *seedlings* de laranja doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] e entravam em tubos de 50 mL acoplados na tampa de garrafas de garrafa plástica. Usando a mesma metodologia, verificou-se o efeito da condição da planta como estresse hídrico, adubação, brotações e densidade de insetos. Para estudar o efeito das bactérias em parâmetros biológicos e comportamentais, avaliaram-se a duração, viabilidade, longevidade de adultos, razão sexual, período de pré-oviposição, fecundidade e decolagem de adultos que se desenvolveram em plantas infectadas por Lam, Las e plantas sadias. Com os dados de biologia calculou-se uma tabela de vida de fertilidade. Além disso, verificou-se a preferência ao pouso de adultos sadios de *D. citri* em plantas infectadas por Lam, Las e sadias (controle). Os resultados mostraram que uma pequena parcela da população tende a decolar de plantas cítricas e esse comportamento é mais frequente no período da tarde (14:00 e 16:00 h). Insetos que se desenvolveram em regime de temperatura baixa (18 °C) e curto período de luz (10h) apresentaram menor propensão ao voo. Em contraste, após o desenvolvimento em temperatura constante de 27° C, os insetos apresentaram uma maior tendência de decolagem das plantas. Coincidentemente, estimou-se a temperatura limiar de voo de *D. citri* em 27,1° C. Ao serem submetidos a plantas com estresse hídrico, adultos foram menos propensos ao voo quando comparados com insetos confinados em plantas com 70 e 100 % de capacidade de campo. Ninfas desenvolvidas em plantas com baixa qualidade nutricional geraram adultos mais propensos ao voo. O mesmo foi observado após o desenvolvimento em plantas com alta densidade populacional de ninfas. Após o desenvolvimento de imaturos de *D. citri* em plantas infectadas e sadias, observaram-se efeitos negativos induzidos por Lam e Las na viabilidade de ninfas, viabilidade do ciclo total, longevidade de fêmeas e parâmetros reprodutivos. Apesar de estatisticamente semelhante à Las, o efeito negativo de Lam na viabilidade do inseto aparentou ser mais pronunciado. Machos e fêmeas apresentam maior propensão ao voo após o desenvolvimento em plantas Lam. Não foram encontrados efeitos de plantas infectadas no pouso do inseto. Os resultados do presente estudo indicam que o comportamento em voo de *D. citri* pode ser modulado por fatores ambientais e da planta, os quais podem fornecer bases para o desenvolvimento de novas táticas de controle e ajudar a compreender a epidemiologia do HLB dos citros. Além disso, Lam parece afetar com mais intensidade parâmetros biológicos do inseto, o que poderia ser um fator determinando a baixa incidência de Las nos pomares brasileiros.

Palavras-chave: Huanglongbing, Psíldeo-asiático-dos-citros, Propensão ao voo, Relação bactéria-vetor

## ABSTRACT

### **Influence of biotic and abiotic factors on mobility and on biological aspects of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae)**

Huanglongbing (HLB) is considered the major obstacle to the orange juice industry worldwide. In Brazil, the disease is associated mainly to the bacteria '*Candidatus* Liberibacter americanus' (Lam) and '*Ca. L. asiaticus*' (Las), which are transmitted by the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae). Surveys show a significant increase of diseased plants in Brazilian citrus orchards and this increase is mainly due to the movement of the insect vector by flight. Literature information about the influence of environmental and plant condition factors on *D. citri* take-off are incipient or absent, as well as the effect of Lam on biological and behavioral parameters of the insect. Knowledge of these factors could help to understand HLB epidemiology and to develop effective control tactics. Therefore, the objectives of the current study were (1) to determine the effect of environmental factors on *D. citri* take-off; (2) to verify the effect of plant condition on *D. citri* take-off; and (3) to study the possible influence of Lam and Las on the biology, flight propensity and alighting preferences of *D. citri*. In the study in which the effects of environmental factors were tested, healthy adults of *D. citri* were evaluated in relation to the diel flight periodicity and the temperature threshold for flight. Furthermore, the effect of different photoperiod and temperature regimes and constant temperatures on *D. citri* take-off were evaluated considering the number of insects which took off from sweet orange citrus seedlings [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] and entered inside 50 mL tubes located on the cap of plastic bottle cages. Using the same methodology, the effect of water stress, fertilization, shoots of citrus plants and density of insects were evaluated. To study the effect of bacteria on biological and behavioral parameters, we evaluated some life traits, including development time, survival, adult longevity, sex ratio, preoviposition time, female fecundity and take-off from adults that developed on Lam-infected, Las-infected and healthy plants. A fertility life table was calculated with life-trait data. In addition, the alighting and settling preference of healthy adults on infected and healthy plants was evaluated. The results showed that a small portion of tested population tends to take off from citrus plants and this behavior is more prevalent in the afternoon (14:00-16:00 h). Adults that were submitted to lower temperatures (18° C) and short light periods (10h) showed less propensity to flight. In contrast, at constant 27° C the insects were more prone to fly. Coincidentally, the threshold of temperature for flight was 27.1° C. When subjected to water-stressed plants, adults were less prone to fly compared with insects confined on plants with 70 and 100% of field capacity. Nymphs developed on plants with poor nutritional quality generated adults more prone to fly. The same was observed after the development on plants with high population density of nymphs. Negative effects of Lam and Las infections were observed on nymph survival, egg to adult survival, adult longevity and reproductive parameters. Although statistically similar to Las, the negative effect of Lam on viability appeared to be more pronounced than that of Las on *D. citri* populations. Male and female of *D. citri* showed more propensity for flight after development on Lam-infected plants, with the Las treatment showing intermediate behavior between Lam and control plants. There was no effect of infected plants on alighting and settling preferences. Results from current study suggest that the flight behavior of *D. citri* is modulated by environmental and plant conditions factors, which could provide a basis for further development of efficient control tactics and understanding HLB epidemiology. Furthermore, Lam seems to have a more pronounced negative effect on biological parameters of *D. citri*, which could be a factor determining the low incidence of this bacterium in Brazilian orchards.

Keywords: Huanglongbing, Asian citrus psyllid, Flight propensity, Pathogen-vector relationships

## 1. INTRODUÇÃO

Huanglongbing (HLB) é a principal doença da citricultura mundial. Seus danos estão associados a alterações fisiológicas na planta em resposta ao patógeno (Kim et al., 2009; Fan et al., 2010; Folimonova & Achor, 2010), as quais podem contribuir para uma redução significativa da quantidade e qualidade dos frutos colhidos. Essas alterações impactam toda a cadeia produtiva e o manejo onera significativamente os custos de produção (Irey et al., 2008; Belasque Jr. et al., 2010). A doença é considerada como o principal obstáculo da indústria produtora de suco de laranja do mundo (Bové, 2006), sendo o pior e mais devastador problema fitopatológico em citros associado a um patógeno transmitido por insetos vetores (Halbert & Manjunath, 2004). Plantas doentes apresentam folhas mosqueadas (variação de tons verde-claro e verde-escuro) que evoluem para uma clorose generalizada na planta (Da Graça, 1991). Os frutos apresentam tamanho reduzido, assimetria, sementes abortadas, teor elevado de acidez e caem facilmente (Bové, 2006).

Os agentes causais associados ao HLB são bactérias Gram-negativas (Garnier et al., 1984) restritas ao floema, não cultiváveis em meio de cultura e pertencentes à subdivisão alfa de Proteobacteria (Jagoueix et al., 1994). Além disso, esses patógenos têm a capacidade de sobreviver e se multiplicar dentro de artrópodes vetores (Jagoueix et al., 1994). São conhecidas três espécies dessas bactérias, sendo elas: ‘*Candidatus Liberibacter africanus*’ (Laf), ‘*Ca. L. asiaticus*’ (Las) e ‘*Ca. L. americanus*’ (Lam). A primeira está restrita ao continente africano e nesse local é transmitida pelo psilídeo-africano-dos-citros, *Trioza erytrae* (Del Guercio) (Hemiptera: Triozidae) (McClellan & Oberholzer, 1965). A segunda espécie (Las) está distribuída na Ásia, América do Norte e Brasil (Halbert & Manjunath, 2004; Coletta-Filho et al., 2004; Halbert, 2005) e a terceira (Lam) apenas no Brasil (Teixeira, Luc Danet, et al., 2005; Teixeira, Saillard, et al., 2005), sendo ambas transmitidas nesses locais pelo psilídeo-asiático-dos-citros, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) (Capoor et al., 1967; Martinez & Wallace, 1967; Teixeira, Saillard, et al., 2005). Ademais, existem relatos de associação de fitoplasmas com plantas sintomáticas para HLB (Teixeira et al., 2008; Chen et al., 2009; Barbosa, 2010; Arratia-Castro et al., 2014)

A grande problemática da doença está associada a sua alta capacidade de disseminação. No Brasil, o HLB foi relatado pela primeira vez no ano de 2004 em propriedades localizadas na região central do estado de São Paulo (Teixeira, Ayres, et al., 2005). Levantamentos mostram que a incidência da doença aumentou aproximadamente 30 vezes de 2008 para 2015 (FUNDECITRUS, 2016), sendo responsável pela erradicação de

42,6 milhões de árvores cítricas até 2015 (CDA, 2016). O grande incremento na incidência da doença está relacionado, quase em sua totalidade, à capacidade de deslocamento do inseto vetor *D. citri* do ponto de vista local e regional, já que a produção de mudas de citros sadias é regulamentada por lei no Brasil.

Considerando a inexistência de medidas de controle terapêuticas ou mesmo variedades resistentes, o manejo do HLB dos citros deve ser baseado na prevenção, com objetivo de redução da população de *D. citri* através do controle químico, eliminação das fontes de inóculo (plantas sintomáticas e fontes do inseto) e utilização de mudas sadias (Zhao, 1982; Bové, 2006; Belasque Jr. et al., 2010). Para ser efetivo, o manejo do HLB deve se estender a todas as propriedades citrícolas em uma região afetada, atingindo uma proporção regional (Bassanezi et al., 2013). Táticas pontuais em nível de propriedade podem ser efetivas apenas para a redução da disseminação secundária da doença (transmissão “planta a planta” dentro do pomar), porém são ineficazes para impedir que o processo epidemiológico se inicie a partir de psíldeos bacterilíferos oriundos de fontes externas de inóculo (Bassanezi et al., 2010). Essa constatação, juntamente com a preferência do inseto em colonizar plantas da periferia (Sétamou & Bartels, 2015), podem explicar os “efeitos de borda” característicos do HLB nos pomares cítricos.

A disseminação primária é uma das características mais importantes dentro da epidemiologia do HLB dos citros (Bergamin-Filho et al., 2016), a qual está intimamente associada ao deslocamento de *D. citri* em voo. O conhecimento de fatores associados a esse processo torna-se extremamente importante para o entendimento da evolução da doença e para o desenvolvimento de táticas de manejo mais eficientes. Todas as etapas de voo de um inseto vetor podem ser alteradas de acordo com situação que o *habitat* propicia, com implicações sobre a disseminação dos patógenos, reforçando a importância de estudos que relacionem o voo do vetor e os principais fatores envolvidos no processo.

Até o momento, são poucos os estudos que abordam aspectos associados ao voo de *D. citri* e fatores que podem influenciar esse processo. A maioria das inferências à capacidade de deslocamento do inseto é obtida a partir de estudos epidemiológicos em que o movimento de *D. citri* é atrelado ao surgimento de plantas apresentando sintomas de HLB (Gottwald et al., 1991, 2010; Bassanezi et al., 2005). Alguns trabalhos verificaram o efeito de fatores ambientais (Hall, 2009; Hall & Hentz, 2011; Kobori, Nakata, Ohto, et al., 2011; Sétamou et al., 2012; Martini et al., 2016) e da planta (Patt & Sétamou, 2010; Kobori, Nakata, & Ohto, 2011; Tomaseto et al., 2016) no comportamento em voo do inseto. Contudo, nenhum deles considerou o efeito destes na decolagem ou na fase inicial de voo de *D. citri*. O entendimento

de fatores que influenciam a decolagem do inseto forneceriam informações mais detalhadas do comportamento de *D. citri* em voo, além da possibilidade de determinação de épocas favoráveis à chegada desses indivíduos.

Adicionalmente aos fatores ambientais e da planta, a relação patógeno-vetor pode alterar o deslocamento de *D. citri*, assim como observado para insetos que adquiriram Las (Martini et al., 2015). De acordo com os autores, machos que se desenvolveram em plantas infectadas com Las apresentaram maior dispersão a curta distância que indivíduos saudáveis, com eventos de voos a longa distância sendo mais comuns para indivíduos portando altos títulos bacterianos.

Não existem informações sobre possíveis efeitos associados à Lam no deslocamento de *D. citri*. No ano do primeiro relato do HLB dos citros no Brasil, 98% das amostras dos pomares brasileiros eram positivas para Lam (Teixeira, Saillard, et al., 2005) e atualmente a situação se inverteu, apresentando um amplo predomínio de Las (Lopes, Frare, et al., 2009). Estima-se que a relação patógeno-hospedeiro possa explicar essa inversão (Lopes et al., 2010), contudo, não existem estudos que abordem aspectos associados à relação patógeno-vetor e que possam explicar a atual predominância de uma espécie em relação à outra. Diante disso, o conhecimento do efeito das bactérias em parâmetros biológicos e no voo de *D. citri* pode ajudar a entender esse processo e compreender a epidemiologia do HLB dos citros. Sabe-se que Las altera a suscetibilidade do inseto a inseticidas (Tiwari et al., 2011) e aumenta a capacidade reprodutiva com redução da longevidade de adultos (Pelz-Stelinski & Killiny, 2016).

Diante do exposto, considerando a necessidade de conhecimento do efeito de fatores bióticos e abióticos na decolagem de *D. citri*, além de possíveis alterações no inseto associadas à Lam, os objetivos do presente estudo foram: (1) determinar o efeito de fatores ambientais no processo de decolagem de *D. citri*; (2) verificar o efeito da condição da planta no processo de decolagem do inseto; e (3) estudar os possíveis efeitos de Lam e Las na biologia, voo e preferência ao pouso de *D. citri*.

## REFERÊNCIAS

- Arratia-Castro AA, Santos-Cervantes ME, Fernández-Herrera E, Chávez-Medina JA, Flores-Zamora GL, Camacho-Beltrán E, Méndez-Lozano J & Leyva-López NE (2014) Occurrence of “*Candidatus* Phytoplasma asteris” in citrus showing Huanglongbing symptoms in Mexico. *Crop Protection* 62:144–151.
- Barbosa J (2010) Caracterização molecular e diversidade de fitoplasmas em pomares de citros no Estado de São Paulo. PhD Thesis, University of São Paulo, Brazil.
- Bassanezi RB, Busato LA, Filho AB, Amorim L & Gottwald TR (2005) Preliminary spatial pattern analysis of Huanglongbing in São Paulo, Brazil. *Proceedings of the 16th Conference of International Organization of Citrus Virologists, IOCV*. pp 341–354.
- Bassanezi RB, Lopes SA, Belasque Jr. J, Spósito MB, Yamamoto PT, Miranda MP De, Teixeira DDC & Wulff NA (2010) Epidemiologia do huanglongbing e suas implicações para o manejo da doença. *Citrus Research & Technology* 31:11–23.
- Bassanezi RB, Montesino LH, Gimenes-Fernandes N, Yamamoto PT, Gottwald TR, Amorim L & Filho AB (2013) Efficacy of area-wide inoculum reduction and vector control on temporal progress of Huanglongbing in young sweet orange plantings. *Plant Disease* 97:789–796.
- Belasque Jr. J, Bassanezi RB, Yamamoto PT, Ayres AJ, Tachibana A, Violante AR, Tank Jr. A, Giorgi F Di, Tersi FEA, Menezes GM, Dragone J, Jank Jr. RH & Bové JM (2010) Lessons from huanglongbing management in São Paulo state, Brazil. *Journal of Plant pathology* 92:285–302.
- Bergamin-Filho A, Inoue-Nagata AK, Bassanezi RB, Belasque J, Amorim L, Macedo MA, Barbosa JC, Willocquet L & Savary S (2016) The importance of primary inoculum and area-wide disease management to crop health and food security. *Food Security* 8:221–238.
- Bové JM (2006) Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of plant pathology* 88:7–37.
- Capoor S, Rao D & Viswanath S (1967) *Diaphorina citri* Kuway., a vector of the greening disease of citrus in India. *Indian J. Agric. Sci* 37:572–579.
- CDA [Coordenadoria de Defesa Agropecuária] (2016) Dados da citricultura paulista. Available at: <http://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/www/gdsv/index.php?action=dadosCitriculturaPaulista>.

- Chen J, Pu X, Deng X, Liu S, Li H & Civerolo E (2009) A phytoplasma related to “*Candidatus phytoplasma asteri*” detected in citrus showing Huanglongbing (yellow shoot disease) symptoms in Guangdong, P. R. China. *Phytopathology* 99:236–242.
- Coletta-Filho HD, Targon MLPN, Takita MA, De Negri JD, Pompeu J, Machado MA, do Amaral AM & Muller GW (2004) First report of the causal agent of Huanglongbing (“*Candidatus Liberibacter asiaticus*”) in Brazil. *Plant Disease* 88:1382–1382.
- Fan J, Chen C, Brlansky RH, Gmitter FG & Li ZG (2010) Changes in carbohydrate metabolism in *Citrus sinensis* infected with “*Candidatus Liberibacter asiaticus*.” *Plant Pathology* 59:1037–1043.
- Folimonova SY & Achor DS (2010) Early events of citrus greening (Huanglongbing) disease development at the ultrastructural level. *Phytopathology* 100:949–58.
- FUNDECITRUS [Fundo de Defesa da Citricultura] (2016) Levantamentos Greening. Available at: <http://www.fundecitrus.com.br/levantamentos/greening/10>.
- Garnier M, Danel N, Bove JM & Bové J (1984) The greening organism is a Gram negative bacterium. *Proceedings of the 9th Conference of International Organization of Citrus Virologists, Riverside*. pp 115–124.
- Gottwald TR, Aubert B & Long HK (1991) Spatial patterns analysis of citrus greening in Shantou, China. *Proceedings of the 11th Conference of International Organization of Citrus Virologists, IOCV*. pp 421–427.
- Gottwald T, Irey M, Gast T & Parnell S (2010) Spatio-temporal analysis of an HLB epidemic in Florida and implications for spread. *Proceedings of the 17 th Conference of International Organization of Citrus Virologists, IOCV*. pp 1–13.
- Da Graça JV (1991) Citrus Greening disease. *Annual Review of Phytopathology* 29:109–136.
- Halbert S (2005) The discovery of huanglongbing in Florida. *Proceedings of the 2nd International Citrus Canker and Huanglongbing*. Orlando, p 50.
- Halbert S & Manjunath K (2004) Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: a literature review and assessment of risk in Florida. *Florida Entomologist* 87:330–353.
- Hall DG (2009) An assessment of yellow sticky card traps as indicators of the abundance of adult *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in citrus. *Journal of Economic Entomology* 102:446–452.
- Hall DG & Hentz MG (2011) Seasonal flight activity by the Asian citrus psyllid in east central Florida. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 139:75–85.



- Irey MMSM, Gast T & Snively J (2008) Economic impact of managing Huanglongbing in groves at Southern Gardens Citrus. Proceedings of the 1st Taller International sobre Huanglongbing de los cítricos (*Candidatus Liberibacter* spp) y el psílido asiático de los cítricos (*Diaphorina citri*). Hermosillo, pp 1–5.
- Jagoueix S, Bove J-MM & Garnier M (1994) The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the alpha subdivision of the Proteobacteria. International journal of systematic bacteriology 44:379–86.
- Kim J-S, Sagaram US, Burns JK, Li J-L & Wang N (2009) Response of sweet orange (*Citrus sinensis*) to “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” infection: microscopy and microarray analyses. Phytopathology 99:50–57.
- Kobori Y, Nakata T & Ohto Y (2011) Estimation of dispersal pattern of adult Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology 55:177–181.
- Kobori Y, Nakata T, Ohto Y & 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 46:27–30.
- Lopes S, Frare G & Bertolini E (2009) Liberibacters associated with citrus huanglongbing in Brazil: ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ is heat tolerant, ‘*Ca. L. americanus*’ is heat sensitive. Plant Disease 93:257–262.
- Lopes SA, Frare GF, Camargo LEA, Wulff NA, Teixeira DC, Bassanezi RB, Beattie GAC & Ayres AJ (2010) Liberibacters associated with orange jasmine in Brazil: incidence in urban areas and relatedness to citrus liberibacters. Plant Pathology 59:1044–1053.
- Martinez A & Wallace J (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, Hoffmann M, Coy MR, Stelinski LL & Pelz-Stelinski KS (2015) Infection of an insect vector with a bacterial plant pathogen increases its propensity for dispersal. PLoS ONE 10:1–16.
- Martini X, Pelz-Stelinski KS & Stelinski LL (2016) Factors affecting the overwintering abundance of the Asian citrus psyllid (Hemiptera: Liviidae) in Florida citrus (Sapindales: Rutaceae) orchards. Florida Entomologist 99:178–186.
- McClellan APD & Oberholzer PCJ (1965) Citrus psylla, a vector of the greening disease of sweet orange. South African Journal of Science 8:297–298.

- Patt JM & Sétamou M (2010) Responses of the Asian citrus psyllid to volatiles emitted by the flushing shoots of its rutaceous host plants. *Environmental entomology* 39:618–24.
- Pelz-Stelinski KS & 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* 0:1–6.
- Sétamou M & Bartels DW (2015) Living on the edges: spatial niche occupation of Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae), in citrus groves (RP Niedz, Ed. by ). *PLoS ONE* 10:1–21.
- Sétamou M, Sanchez A, Patt JM, Nelson SD, Jifon J & Louzada ES (2012) Diurnal patterns of flight activity and effects of light on host finding behavior of the Asian citrus psyllid. *Journal of Insect Behavior* 25:264–276.
- Teixeira DC, Ayres AJ, Kitajima EW, Tanaka FAO, Danet JL, Jagoueix-Eveillard S, Saillard C & Bové JM (2005) First report of a Huanglongbing-like disease of citrus in Sao Paulo State, Brazil and association of a new *Liberibacter* species, “*Candidatus Liberibacter americanus*”,. *Plant Disease* 89:107.
- Teixeira DDC, Luc Danet J, Eveillard S, Cristina Martins E, de Jesus Junior WC, Takao Yamamoto P, Aparecido Lopes S, Beozzo Bassanezi R, Juliano Ayres A, Saillard C & Bové JM (2005) Citrus huanglongbing in São Paulo State, Brazil: PCR detection of the “*Candidatus*” *Liberibacter* species associated with the disease. *Molecular and cellular probes* 19:173–9.
- Teixeira DDC, Saillard C, Eveillard S, Danet JL, da Costa PI, Ayres AJ & Bové J (2005) “*Candidatus Liberibacter americanus*”, associated with citrus huanglongbing (greening disease) in São Paulo State, Brazil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 55:1857–1862.
- Teixeira DC, Wulff NA, Martins EC, Kitajima EW, Bassanezi R, Ayres AJ, Eveillard S, Saillard C & Bové JM (2008) A phytoplasma closely related to the Pigeon Pea Witches’-Broom Phytoplasma (16Sr IX) is associated with Citrus Huanglongbing symptoms in the State of São Paulo, Brazil. *Phytopathology* 98:977–984.
- Tiwari S, Pelz-Stelinski K & Stelinski LL (2011) Effect of *Candidatus Liberibacter asiaticus* infection on susceptibility of Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, to selected insecticides. *Pest management science* 67:94–9.
- Tomaseto AF, Krugner R & Lopes JRS (2016) Effect of plant barriers and citrus leaf age on dispersal of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). *Journal of Applied Entomology* 140:91–102.

Zhao XY (1982) Citrus yellow shoot disease (Huanglongbing) in China - a review.  
Proceedings of the international society of citriculture, 1981, Tokyo, Japan. pp 466–469.

## 2. CONDIÇÕES AMBIENTAIS PARA O INÍCIO DO VOO DE *Diaphorina citri* KUWAYAMA (HEMIPTERA: LIVIIDAE)

### Resumo

Fatores ambientais que influenciam a atividade de voo do inseto vetor *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae), podem ter implicações na disseminação e no manejo do Huanglongbing dos citros. Até o momento, pouco se sabe sobre a influência desses fatores na fase inicial de voo do inseto. Por isso, no presente trabalho foram realizados quatro estudos para determinar o efeito de condições ambientais na decolagem de *D. citri*. No primeiro, insetos foram transferidos para *seedlings* sadios de laranja doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Caipira] e confinados em gaiola de acrílico para verificação da decolagem nos diferentes horários do dia e o efeito de fatores ambientais nesse processo. No segundo, foi estimado o limiar de temperatura para decolagem, a partir do registro do número de insetos que iniciavam o voo de uma plataforma quando sujeitos a aumentos graduais de temperatura de 15 a 39° C. Nos demais estudos, verificou-se a proporção de adultos que iniciavam o voo de *seedlings* de citros e entravam em um tubo de 50 ml acoplado em uma gaiola de garrafa de politereftalato de etileno (PET), após o desenvolvimento em diferentes regimes de fotoperíodo e temperatura (terceiro estudo) e temperaturas constantes (quarto estudo). Os resultados mostraram que uma pequena parcela da população (no máximo 10%) tende a decolar das plantas cítricas e que esse comportamento é mais predominante à tarde (entre 14:00 e 16:00 h), coincidindo com horários de menor umidade e maior amplitude térmica. Insetos que foram submetidos a temperaturas baixas (18° C) e fotofase curta (10h) apresentaram menor propensão ao voo. Em contraste, após o desenvolvimento em temperatura constante de 27 °C, os psílídeos apresentaram maior propensão ao voo, o que foi confirmado quando os indivíduos foram submetidos a incrementos de temperatura, indicando que  $27,14 \pm 1,01$  °C é a temperatura limiar de voo para *D. citri*. Esses resultados mostram que a temperatura executa um papel importante na atividade de voo de *D. citri* e sugere que táticas de controle podem ser mais eficientes no período da manhã e em temperaturas mais baixas que 27 °C, quando a probabilidade de decolagem do hospedeiro é menor.

Palavras-chave: Psílídeo asiático dos citros; Huanglongbing; Propensão ao voo; Temperatura; Periodicidade de voo

### Abstract

Environmental factors that influence flight activity of the insect vector *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) may have implications on Huanglongbing spread and management. In the present work four studies were conducted to evaluate the effect of environmental conditions on *D. citri* take-off. In the first study, insects were transferred to sweet orange seedlings [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Caipira] and confined inside an acrylic cage in order to verify the take-off periodicity and the effect of environmental factors on this process. In the second study, the take-off temperature threshold was estimated by recording the number of adults that initiated flight from a platform when subjected to gradual temperature increases from 15 to 39°C. In the other studies, we evaluated the effect of different photoperiods and temperature regimes (third study) and of constant temperatures (fourth study) in the propensity to *D. citri* flight. The insects were confined in clear plastic bottle cages with tubes of 50 ml placed on the cap, in order to collect emerged adults that initiated flights. The results showed that a small portion of the tested population (maximum 10%) tends to take off from citrus plants and this behavior is more prevalent in the afternoon (14:00-16:00 h), coinciding with daytimes of lower humidity and higher thermal amplitude. Adults that were submitted to lower temperatures (18° C) and short light periods (10h) showed less propensity to fly. In contrast, at constant 27 °C the insects were more prone to fly and this result was confirmed when individuals were submitted to increases of

temperature, indicating that  $27,14 \pm 1,01^{\circ}\text{C}$  is the temperature threshold for *D. citri* take-off. The results show that temperature plays an important role on the flight activity of *D. citri* and suggest that control measures of the insect may be more effective in the morning and in temperatures below  $27^{\circ}\text{C}$ , when the probability to take off from a host is lower.

Keywords: Asian citrus psyllid; Huanglongbing; Flight propensity; Temperature; Diel flight periodicity

## 2.1. Introdução

Um dos grandes problemas associados ao Huanglongbing (HLB) dos citros é a sua alta capacidade de disseminação (Gottwald et al., 2010). Levantamentos realizados pelo FUNDECITRUS (2016) mostram que a incidência da doença aumentou aproximadamente 30 vezes de 2008 para 2015, atingindo 17,9% das árvores do parque citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste de Minas Gerais. A alta capacidade de disseminação do HLB provavelmente está associada ao deslocamento do inseto vetor *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae), já que a produção de mudas cítricas é regulamentada no Brasil e até o momento não se conhecem outras espécies vetoras de '*Candidatus Liberibacter*' spp. em citros.

Táticas de manejo da doença no Brasil incluem frequente erradicação de plantas doentes e aplicações de inseticidas para controle do psíldeo vetor (Belasque Jr. et al., 2010). Quando as práticas de manejo são restritas a poucas propriedades numa região afetada, elas são eficientes para a redução do movimento planta-a-planta dentro dos pomares (disseminação secundária), mas não podem prevenir a infecção primária ocasionada pela migração de psíldeos bacterilíferos de propriedades vizinhas (Bassanezi et al., 2010, 2013). Em virtude disso, é recomendado um manejo regional da doença, incluindo eliminações de fontes de inoculo e controle agressivo do inseto vetor em escala regional (Bassanezi et al., 2013).

Mesmo com as recomendações de manejo em escala regional, muitas propriedades ainda são afetadas pela imigração de psíldeos carregando as bactérias associadas ao HLB dos citros, justamente pela dificuldade de coordenação de ações de controle entre os agricultores. A incidência do HLB é tipicamente maior nas bordas das propriedades e o inseto tende a colonizar inicialmente as plantas da periferia de um pomar (Sétamou & Bartels, 2015). Essas constatações são indicativas da grande importância da disseminação primária do HLB dos citros e ressaltam a relevância do conhecimento de fatores que podem influenciar no processo de decolagem de *D. citri* das plantas. O sucesso no manejo de patógenos carregados por

vetores que apresentam disseminação primária necessita de um conhecimento detalhado sobre a origem do inóculo e aspectos relacionados ao comportamento em voo do inseto vetor.

O deslocamento de *D. citri* e sua relação com fatores ambientais são pouco estudadas; a maioria das informações sobre o voo do psilídeo é inferida baseada na distribuição de novas plantas infectadas com HLB como fontes de inóculo (Gottwald et al., 1991, 2010; Bassanezi et al., 2005). Dentre a influência dos fatores ambientais, sabe-se que o vento pode alterar o deslocamento de *D. citri* (Hall & Hentz, 2011; Kobori, Nakata, Ohto, et al., 2011) e que a luz é uma pista muito importante no processo de seleção hospedeira (Sétamou et al., 2012). Além disso, foi mostrado que *D. citri* apresenta um padrão diurno de atividade em voo, concentrado no período da tarde (Sétamou et al., 2012) e que a interação da temperatura com a radiação solar é positivamente correlacionada com a captura do inseto em armadilhas adesivas amarelas (Hall, 2009). Com relação à temperatura, alguns estudos não verificaram correlações desse fator com o número de psilídeos capturados em armadilhas e a umidade relativa pode estar positivamente ou negativamente correlacionada com a atividade de voo de *D. citri* (Hall & Hentz, 2011; Martini et al., 2016).

Apesar de existirem informações na literatura sobre o efeito de fatores ambientais na atividade de voo de *D. citri*, a maioria delas foi estudada em condições de campo para o movimento do inseto, como é o caso das correlações com dados de psilídeos capturados em armadilhas adesivas amarelas. Estudos que considerem a fase inicial do voo ou o processo de decolagem do hospedeiro podem fornecer informações mais detalhadas e confiáveis do estímulo ambiental para a decolagem do inseto. Esses dados poderiam auxiliar no desenvolvimento de táticas de controle mais eficientes de *D. citri* em pomares de citros e na previsão de épocas e condições ambientais que favorecem a chegada de psilídeos bacterilíferos oriundos de fontes externas de inóculo. Considerando a importância desse conhecimento para melhorar o entendimento da epidemiologia do HLB, objetivando reduzir os efeitos da disseminação primária, o presente estudo investigou a periodicidade de voo, o limiar de temperatura para decolagem e os efeitos da temperatura e fotoperíodo na propensão ao voo de *D. citri*.

## 2.2. Material e Métodos

### 2.2.1. Insetos e plantas utilizados nos experimentos

Ninfas e adultos, utilizados nesse estudo, foram obtidos da colônia de *D. citri* do Laboratório de Insetos Vetores de Fitopatógenos da ESALQ/USP, originalmente estabelecida com indivíduos coletados em plantas de murta [*Murraya paniculata* (L.) Jack (Rutaceae)] em Piracicaba, São Paulo, Brasil, em 2008. Essa colônia foi mantida em *seedlings* de murta e os insetos confinados em gaiolas [50 (altura) x 35 (profundidade) x 35 cm (largura)] confeccionadas a partir de estrutura de alumínio, tecido vaporoso do tipo *voile* e porta de acrílico. A sala de criação foi mantida em condições de laboratório [ $25 \pm 2$  °C,  $70 \pm 10\%$  UR, 14:10 h (Luz:Escuro)]. As plantas foram produzidas e mantidas em casa-de-vegetação, sendo periodicamente podadas e adubadas (NPK 4-14-8) para emissão de brotações, as quais são locais preferidos para oviposição do inseto.

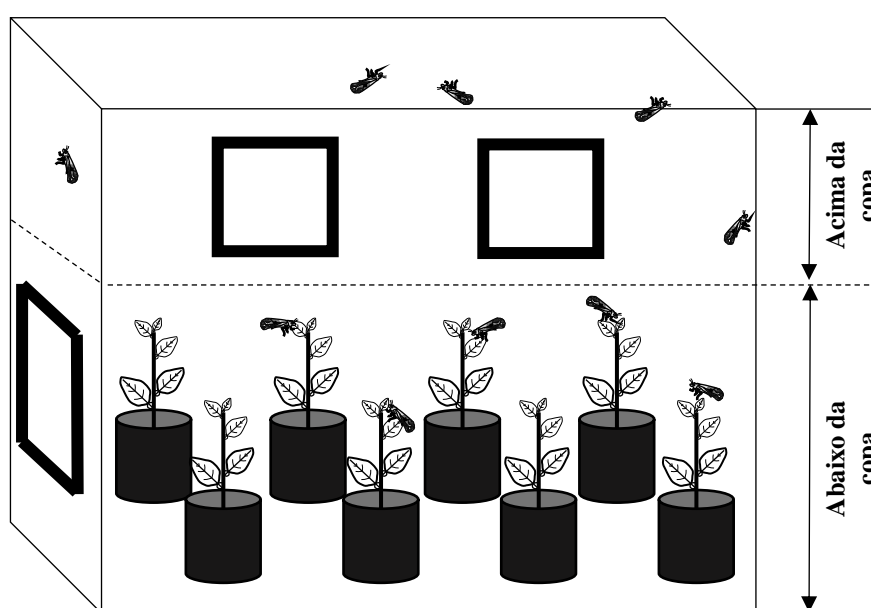
Para todos os ensaios, os insetos foram transferidos para *seedlings* sadios de laranja doce ‘Caipira’ [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck (Rutaceae)], com aproximadamente 10 cm de altura, condicionados em vasos de 1,5 L preenchidos com substrato à base de casca de pinus, turfa e vermiculita expandida (Tropstrato citrus, Vida Verde Indústria e Comércio de Insumos Orgânicos Ltda., Mogi Mirim, SP, Brasil). Esses *seedlings* foram adubados com Osmocote (NPK 20-20-20) (The Scotts Company, Marysville, OH, USA) e podados 21 dias antes da realização dos experimentos para emissão de brotações.

### 2.2.2. Periodicidade de voo

No estudo para se determinar a atividade diária de voo de *D. citri*, insetos adultos foram avaliados quanto ao posicionamento em relação a plantas cítricas de acordo com os diferentes horários do dia. Grupos de 30 ninfas de 4º instar foram transferidos, com auxílio de um pincel umedecido, para brotações de oito *seedlings* de citros, os quais foram uniformemente distribuídos no chão de uma gaiola de observação retangular [60 (altura) x 50 (profundidade) x 80 cm (largura)] construída com acrílico transparente e aberturas para ventilação (Figura 1). Posteriormente à emergência dos adultos, foi avaliado, diariamente, o comportamento de decolagem dos insetos às 8:00, 10:00, 12:00, 14:00, 16:00 e 18:00 h, a partir da contagem do número de indivíduos visualizados abaixo (pousados na planta ou no chão da gaiola) e acima (teto ou paredes da gaiola) da copa dos *seedlings* de citros (Figura 1).

As avaliações foram realizadas até aproximadamente 20-30 dias após a emergência e o experimento repetido em quatro diferentes épocas do ano.

O ensaio foi conduzido em casa de vegetação com controle de temperatura. A intensidade luminosa e a temperatura interna da gaiola foram registrados em cada avaliação utilizando um fotômetro (modelo LI-189, LI-COR, Lincoln, Nebraska, USA) e um *data logger* (modelo 174, TESTO, Campinas, São Paulo, Brasil). Os registros de umidade foram obtidos a partir dos dados da estação meteorológica da ESALQ-USP, localizada aproximadamente 1,2 km da casa de vegetação onde o experimento foi realizado.



**Figura 1.** Ilustração esquemática da gaiola de observação e disposição dos *seedlings* de citros para o experimento de periodicidade de voo de *Diaphorina citri* realizado em casa de vegetação. Foi avaliado o número de insetos acima e abaixo da copa dos *seedlings* de citros em diferentes horários do dia. Os retângulos presentes na ilustração representam as aberturas para ventilação da gaiola

### 2.2.3. Temperatura mínima mediana de voo

O objetivo desse estudo foi estimar o limiar de temperatura mínima para o voo de *D. citri* a partir do cálculo da temperatura em que 50% dos insetos testados foram capazes de voar. Utilizando a metodologia de Morales e Fereres (2008) com adaptações, foi escolhida uma planta de murta oriunda da criação de *D. citri* do Laboratório de Insetos Vetores de Fitopatógenos, contendo aproximadamente 50 psilídeos adultos (3-5 dias de idade). Essa planta foi condicionada por 24 h em uma câmara de crescimento horizontal (BOD), a 15 °C, contendo lâmpadas fluorescentes com uma intensidade luminosa de aproximadamente 1000



lux. Após esse período foi acrescentada, dentro da câmara de crescimento, uma gaiola [50 (altura) x 35 (profundidade) x 35 cm (largura)], contendo uma plataforma de plástico preta [15 (profundidade) x 15 (largura) x 0,5 cm (espessura)], fixada com a utilização de linhas de nylon. Após a aclimação, os insetos foram retirados da planta e transferidos para a plataforma, sendo submetidos a aumentos graduais de 2° C a cada 5 minutos, iniciando-se com 15 até 39 °C. Psilídeos que voavam logo após a transferência foram desconsiderados da análise por terem sido estimulados ao voo provavelmente pelo estresse da manipulação. O experimento foi iniciado apenas quando todos os insetos estavam praticamente imóveis a 15 °C (aproximadamente 30 min após a transferência). Em cada temperatura foi anotado o número de insetos que iniciaram seus voos (visualizados nas paredes, no chão e no teto da gaiola), sendo estes prontamente retirados da gaiola. O experimento foi repetido três vezes, com o registro de voo de 150 indivíduos.

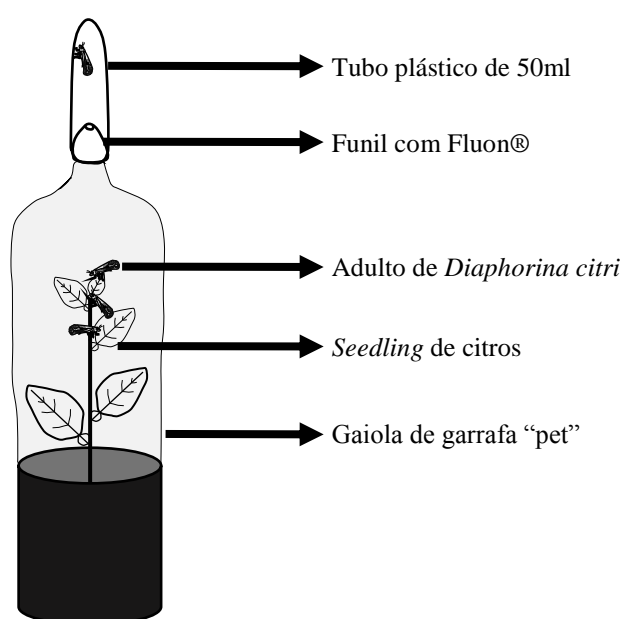
#### **2.2.4. Desenvolvimento e adequação de metodologia para estudos de decolagem de *D. citri***

Para os ensaios de avaliação do efeito de fatores ambientais na decolagem de *D. citri*, foi desenvolvida uma metodologia baseando-se na hipótese que insetos propensos ao voo tendem a abandonar a planta cítrica, movimentando-se verticalmente no sentido da luz. Com o intuito de se coletar esses insetos e tornar possível a quantificação do número destes em relação ao total de indivíduos na planta, foram utilizados tubos plásticos de 50 mL do tipo Falcon (Corning Life Sciences, Tewksbury, Massachusetts, USA) encaixados na tampa de gaiolas confeccionadas com garrafas plásticas de politereftalato de etileno (PET) transparentes e na base do tubo foi colocado um funil (feito com a base de outro tubo de 50 ml) e nele aplicado Fluon® (BioQuip Products, Rancho Dominguez, California, USA), de tal modo que permitisse a entrada do inseto e evitasse seu retorno à planta por caminhamento (Figura 2).

Para testar a metodologia e garantir que os insetos que entrassem no tubo iniciassem o processo de decolagem da planta cítrica saltando do hospedeiro ou voando até a parede da gaiola, foi realizado um teste de validação dessa metodologia. Foram transferidas 400 ninfas de 3° instar para brotações (≈5 cm de comprimento) de 10 *seedlings* de citros. A transferência ocorreu numa proporção de 40 ninfas/*seedling*. Em metade das plantas foi aplicado cola na base do caule para evitar que os insetos entrassem no tubo apenas por caminhamento. A outra metade foi mantida sem aplicação de cola, determinando o tratamento controle. Após a

transferência das ninfas, foi verificada, diariamente, a proporção de adultos que emergiam em relação ao total de ninfas transferidas. Quando essa proporção atingiu 50% em média, iniciaram-se as avaliações do experimento com a alocação dos tubos plásticos na tampa das gaiolas de garrafa PET. Sendo assim, foi avaliado, diariamente, o número de indivíduos que entravam nos tubos até 15 dias após a emergência.

As gaiolas foram mantidas em sala climatizada com quatro lâmpadas fluorescentes (110 W cada) localizadas acima das plantas e temperatura de  $27 \pm 2$  °C, umidade relativa de  $70 \pm 10\%$  e fotoperíodo de 14 h de luz e 10 h de escuro.



**Figura 2.** Ilustração esquemática da metodologia de avaliação da propensão ao voo de adultos de *Diaphorina citri* utilizando tubo plástico de 50 ml do tipo Falcon acoplado na tampa de gaiolas confeccionadas a partir de garrafas PET.

### 2.2.5. Efeito do fotoperíodo e da temperatura na decolagem de *D. citri*

Para verificar o efeito do fotoperíodo e da temperatura na decolagem de *D. citri* foram realizados dois ensaios distintos. Em um deles foi verificado o efeito de diferentes regimes de fotoperíodo e temperatura e no outro foi estudado o efeito de temperaturas constantes, fixando-se o fotoperíodo.

No ensaio de combinação dos diferentes fotoperíodos e temperaturas, foram simuladas as condições das distintas estações do ano, baseando-se nas temperaturas médias oriundas de normais climatológicas de 1961 a 1990, disponíveis no Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) para a cidade de São Carlos (região central do Estado de São Paulo).

As temperaturas para cada estação foram 25 °C (verão), 18 °C (inverno), 20 °C (outono) e 22 °C (primavera). Para o fotoperíodo, assumiram-se as fotofases de 14, 10, 12 e 12 h para as estações verão, inverno, primavera e outono, respectivamente.

Para o experimento de variação da temperatura foi fixado o fotoperíodo de 14 h de luz e 10 h de escuro e os tratamentos foram constituídos pelas temperaturas de 18, 22, 27 e 32 °C.

Nos dois ensaios, grupos de 40 ninfas de 3º instar foram transferidas, com auxílio de um pincel umedecido, para brotações ( $\approx$ 5 cm de comprimento) de *seedlings* de citros. Os insetos foram confinados em gaiolas confeccionadas a partir de garrafas PET e cada tratamento foi constituído de 10 repetições, sendo cada uma representada por um *seedling* de citros, totalizando 40 plantas para cada ensaio. Após a transferência das ninfas, estas foram imediatamente levadas para distintas câmaras de crescimento, previamente programadas para as condições referentes aos tratamentos de cada ensaio. A iluminação das câmaras de crescimento foi modificada através da inserção de raques de luz contendo quatro lâmpadas fluorescentes (15 W cada) logo acima das plantas cítricas. Após sete dias de desenvolvimento em distintas condições de fotoperíodo e temperatura, iniciou-se a contagem do número de adultos emergidos e estes valores foram comparados com o número total de ninfas transferidas, semelhantemente ao que foi realizado no teste de validação da metodologia (item 2.2.4). Assumindo que a propensão ao voo ou o comportamento do inseto podem ser alterados de acordo com a idade e que diferentes temperaturas podem atrasar ou acelerar o desenvolvimento dos mesmos, decidiu-se por padronizar as avaliações. O período em que aproximadamente 50% da população de ninfas já havia emergido para o estágio adulto foi considerado como tempo zero de desenvolvimento, a partir do qual foram encaixados os tubos de 50 ml nas gaiolas e iniciadas as avaliações diárias do número de insetos que entraram no tubo. Os experimentos foram avaliados até completar 10 dias após a emergência e em cada período, todos os psílídeos propensos a voar foram retirados dos tubos.

#### **2.2.6. Análise de dados**

Para o teste de periodicidade de voo foi ajustado um modelo misto do tipo binomial às proporções de insetos que voaram nos diferentes horários do dia, incluindo efeito dos blocos (repetição do experimento nas diferentes épocas do ano) e o horário de voo como fixos e o efeito de cada dia após a emergência como aleatório, pois as observações tomadas no mesmo dia foram correlacionadas. A significância do efeito do horário foi avaliada por meio

de um teste de razão de verossimilhança entre o modelo completo e um modelo desconsiderando esse efeito. A qualidade do ajuste foi avaliada por meio de gráficos meio-normais com envelope de simulação (Demétrio et al., 2014). As médias de insetos visualizados acima da copa nos diferentes horários do dia foram comparadas por meio do cálculo dos intervalos de confiança (95%) para os preditores lineares ( $P < 0,05$ ). Ademais, foi aplicado um teste de correlação de Pearson ( $P < 0,05$ ) considerando os valores médios de temperatura, intensidade luminosa, umidade relativa e amplitude térmica diária e estes comparados com a porcentagem média de insetos que foram visualizados acima da copa dos *seedlings* de citros nos diferentes horários do dia. A amplitude térmica diária foi calculada a partir da diferença da temperatura máxima e mínima registradas nos diferentes horários de avaliação.

Para a determinação da temperatura mínima mediana para voo ( $TV_{50}$ ), os valores acumulados das porcentagens de insetos que iniciaram o voo foram comparados com o logaritmo das temperaturas por meio de ajuste de um modelo linear generalizado (GLM) considerando uma distribuição do tipo PROBIT e aplicada a função “dose.p” do software estatístico R para determinar a temperatura em que 50% dos psilídeos testados haviam iniciado o voo da plataforma inerte.

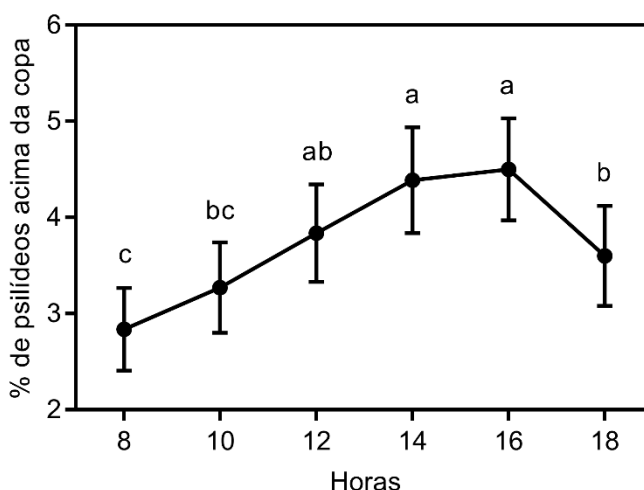
Os dados das proporções de insetos capturados nos tubos de 50 ml (indivíduos propensos ao voo), para os experimentos de validação da metodologia, fotoperíodo e temperatura foram analisados por meio de um ajuste de modelos de equações de estimativas generalizadas (GEE). A análise via GEE realiza a estimativa de equações de correlação de dados longitudinais e discretos (Liang & Zeger, 1986; Zeger & Liang, 1986), sendo uma extensão do procedimento de *quaslikelihood* usado em modelos lineares generalizados (GLM) (Wedderburn, 1974). Foi utilizada a estrutura de correlação do tipo *exchangeable* e os dados analisados considerando o efeito do tratamento, do tempo e a interação entre eles por meio de teste qui-quadrado ( $P < 0,05$ ). Para os resultados dos experimentos de validação da metodologia, fotoperíodo e temperatura e temperatura constante, além da análise por GEE no tempo, foram ajustados modelos lineares generalizados (GLM) do tipo quasibinomial, para as proporções acumuladas de insetos capturados nos tubos após os 10 dias de avaliação. A qualidade do ajuste foi avaliada por meio de gráficos meio-normais com envelope de simulação (Demétrio et al., 2014). Comparações múltiplas das médias foram realizadas a partir da obtenção de intervalos de confiança (95 %) para os preditores lineares.

Todas as análises foram procedidas com auxílio do software estatístico R v.3.2.3 (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

## 2.3. Resultados

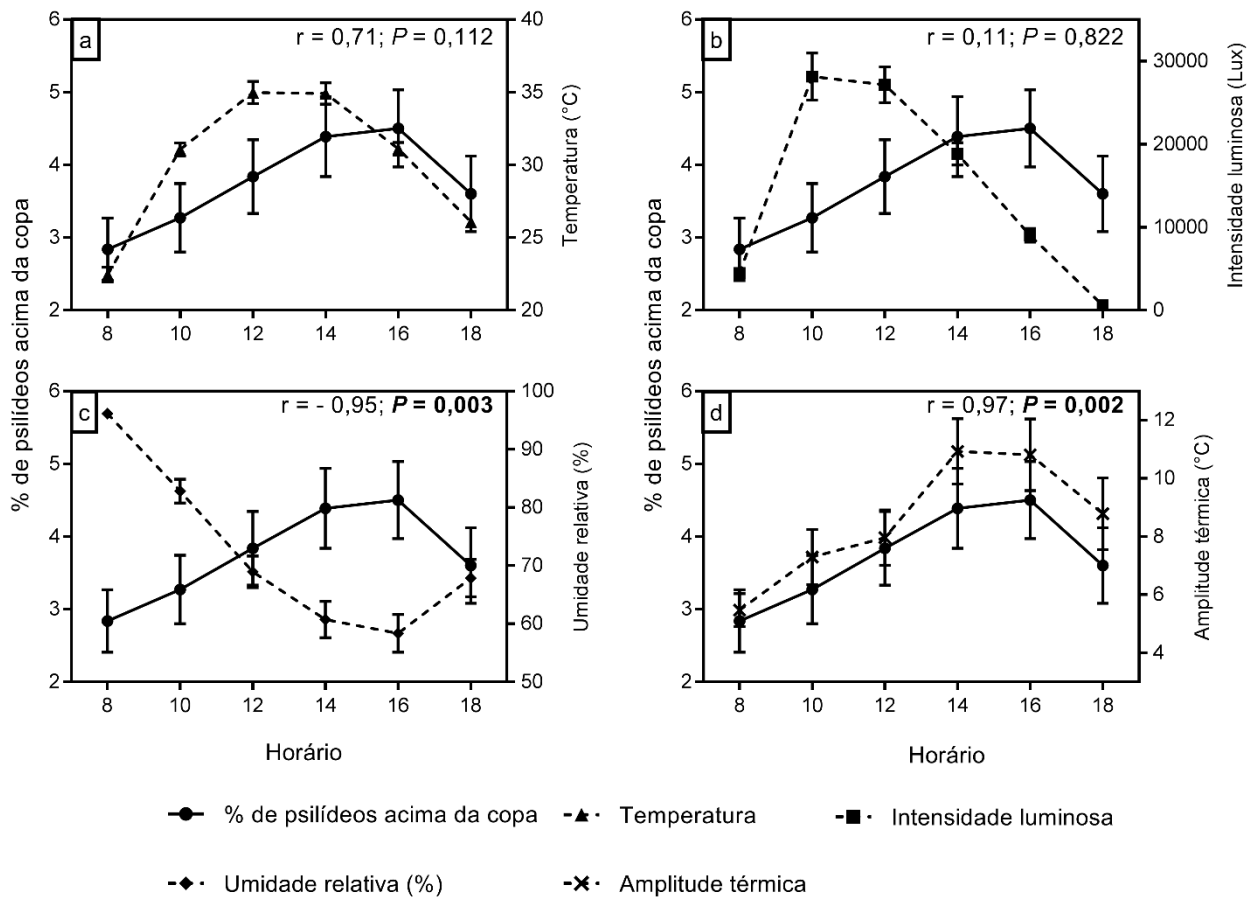
### 2.3.1. Periodicidade de voo

O ensaio de periodicidade de voo mostrou que a grande maioria dos indivíduos apresentou uma tendência de ficar abaixo da copa dos *seedlings* de citros. Aproximadamente 96% dos 960 psíldeos testados nas quatro repetições do experimento, permaneceram abaixo da copa das plantas cítricas em todos os períodos de avaliação. Apesar de poucos indivíduos apresentarem a tendência de sair das plantas cítricas, foi verificado que existe um período do dia pelo qual o inseto está mais propenso ao voo (Razão de Verossimilhança = 46,71; g.l. = 5;  $P < 0,01$ ). De acordo com os resultados, mais adultos de *D. citri* foram visualizados acima da copa dos *seedlings* de citros às 14:00 e 16:00 h, com valores de 4,39 e 4,50 %, respectivamente (Figura 3). O período pelo qual os insetos saíram menos das plantas foi às 8:00 h.



**Figura 3.** Porcentagem média de adultos de *Diaphorina citri*  $\pm$  EPM visualizados acima da copa de plantas cítricas em função dos diferentes horários do dia. Médias seguidas pela mesma letra em cada horário não diferem entre si a 5% de significância

As correlações da porcentagem média de psíldeos acima da copa nos diferentes horários do dia não foram significativas com as variáveis temperatura interna da gaiola ( $r = 0,71$ ; g.l. = 4;  $P = 0,112$ ) (Figura 4-a) e intensidade luminosa ( $r = 0,11$ ; g.l. = 4;  $P = 0,822$ ) (Figura 4-b). Porém, para os valores médios de umidade relativa e amplitude térmica diária, foram observadas correlações negativa ( $r = -0,95$ ; g.l. = 4;  $P = 0,003$ ) (Figura 4-c) e positiva ( $r = 0,97$ ; g.l. = 4;  $P = 0,002$ ) (Figura 4-d), respectivamente.



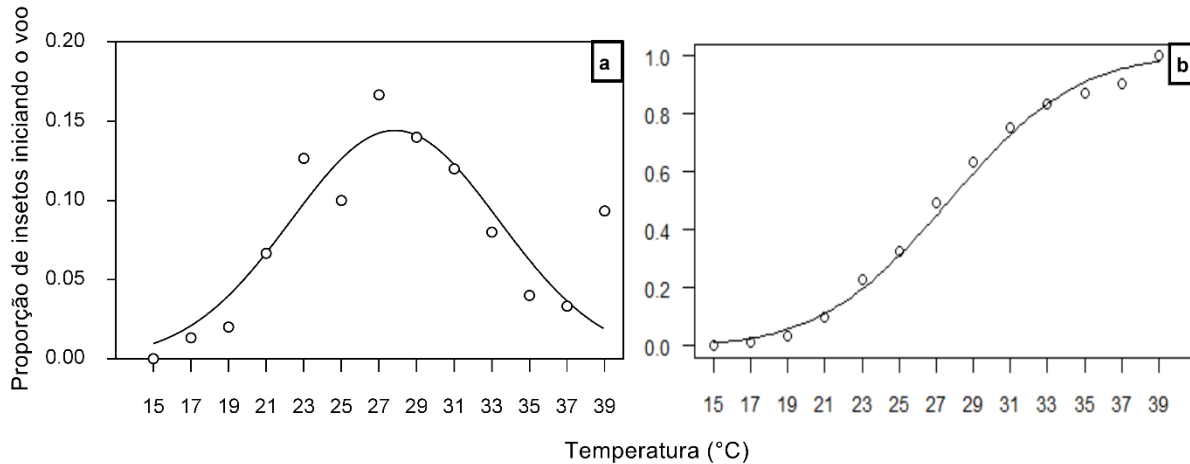
**Figura 4.** Comparação da porcentagem média de adultos de *Diaphorina citri*  $\pm$  EPM visualizados acima da copa de plantas cítricas com valores médios  $\pm$  EPM de temperatura interna da gaiola (a), intensidade luminosa (b), umidade relativa (c) e amplitude térmica (d) em função dos diferentes horários do dia. Os valores do coeficiente de correlação de Pearson (r) e o de probabilidade (P) são apresentados na parte superior direita de cada gráfico. Correlações realizadas considerando valores médios de cada variável ambiental com as porcentagens de insetos visualizados acima da copa

### 2.3.2. Temperatura mínima mediana para o voo

Quando submetidos a aumentos graduais de temperatura, adultos de *D. citri* não voaram na temperatura inicial e apenas dois e três dos 150 indivíduos testados iniciaram seus voos nas temperaturas de 17 e 19 °C, respectivamente (Figura 5 – a). Com o incremento da temperatura, foi observado um aumento do número de insetos decolando da plataforma até atingir um pico a 27 °C (25 indivíduos ou 17% do total testado). Nas temperaturas subsequentes, verificou-se uma tendência de redução do número de insetos decolando da plataforma, atingindo a menor proporção (3,3%) em 37 °C.

Considerando os valores acumulados (Figura 5 – b), 50 % da população testada já havia iniciado seus voos na temperatura próxima a 27 °C, o que foi reforçado pelo ajuste

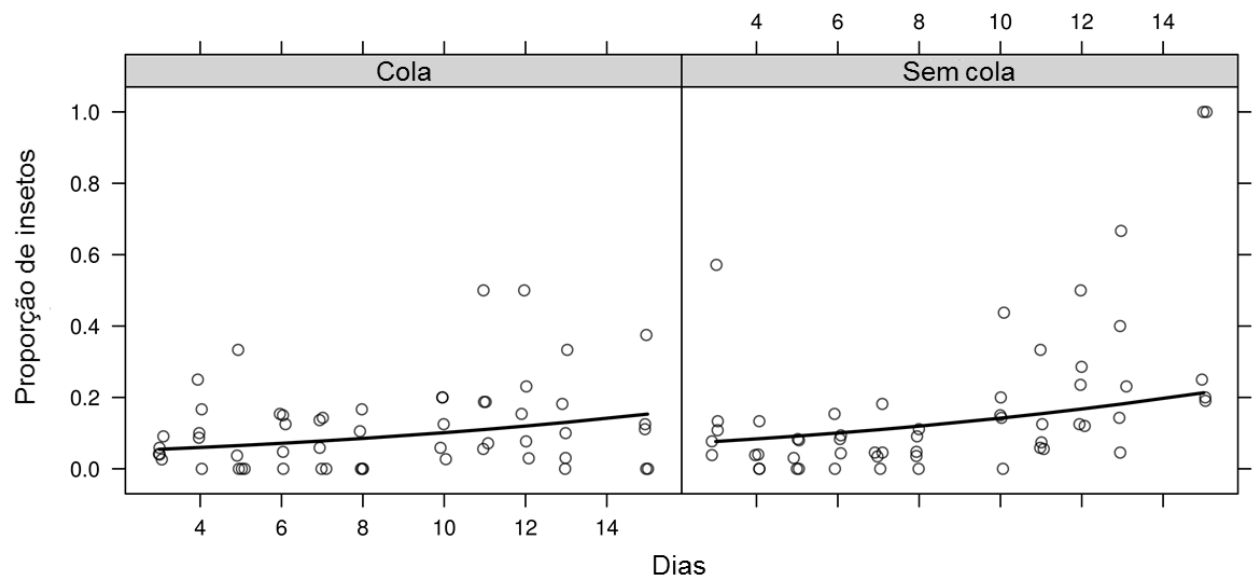
GLM do tipo PROBIT, indicando que a temperatura mediana de voo ( $TV_{50}$ ) ( $\pm$  EPM) foi  $27,14 \pm 1,01$  °C.



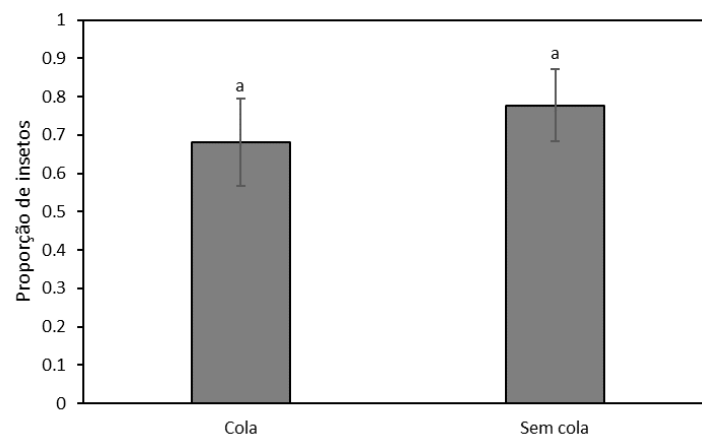
**Figura 5.** Proporção de adultos de *Diaphorina citri* que iniciaram o voo ( $n = 150$ ) em plataforma inerte, após incrementos de temperatura de 2 °C, iniciando-se com 15 até 39 °C. **(a)** Proporção observada (círculos abertos) e ajuste por modelo Gaussiano (linha contínua) ( $R^2 = 0,74$ ). **(b)** Proporção acumulada (círculos abertos) e estimada por GLM PROBIT (linha contínua). Teste para verificação da temperatura mínima necessária para o voo de *D. citri* realizado em câmara de crescimento. Temperatura mediana de voo ( $TV_{50}$ ) ( $\pm$  EPM) =  $27,14 \pm 1,01$  °C.

### 2.3.3. Adequação de metodologia para estudos de decolagem de *D. citri*

A validação da metodologia para estudos de decolagem de *D. citri* com utilização de gaiolas do tipo PET e tubos de 50 mL indicou que a presença de cola no caule dos *seedlings* de citros não influenciou na porcentagem de *D. citri* propensos ao voo ( $\chi^2 = 0,53$ ; g.l. = 1;  $P = 0,47$ ), o que pode ser reforçado ao se observar as curvas de cada tratamento geradas a partir do ajuste por GEE (Figura 6). O fator tempo influenciou nos resultados ( $\chi^2 = 7,81$ ; g.l. = 1;  $P = 0,01$ ), indicando aumento do número de insetos que entraram nos tubos com o incremento dos dias após a emergência dos adultos, e a interação tratamento e tempo não foi significativa ( $\chi^2 < 0,01$ ; g.l. = 1;  $P = 0,96$ ). Os mesmos resultados foram observados comparando-se os valores acumulados de insetos que entraram nos tubos após 15 dias de avaliação (Figura 7), indicando ausência de efeito do tratamento ( $F = 0,96$ ; g.l. = 1;  $P = 0,36$ ).



**Figura 6.** Ajuste por modelos de equações de estimativas generalizadas (GEE) (linhas) e nuvem de pontos indicando a proporção de adultos de *Diaphorina citri* que saíram de plantas cítricas em função dos dias após a emergência. Insetos coletados em tubos de 50 mL, acoplados em gaiolas do tipo PET, e submetidos às condições de ausência e presença de cola no caule de *seedlings* de citros



**Figura 7.** Proporção média acumulada de adultos de *Diaphorina citri* que saíram de plantas cítricas  $\pm$  (EPM) ( $n=5$ ) após 15 dias da emergência. Insetos coletados em tubos de 50 mL, acoplados em gaiolas do tipo PET, e submetidos às condições de ausência e presença de cola no caule *seedlings* de citros. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5% de significância.

### 2.3.4. Efeito do fotoperíodo e da temperatura na decolagem de *D. citri*

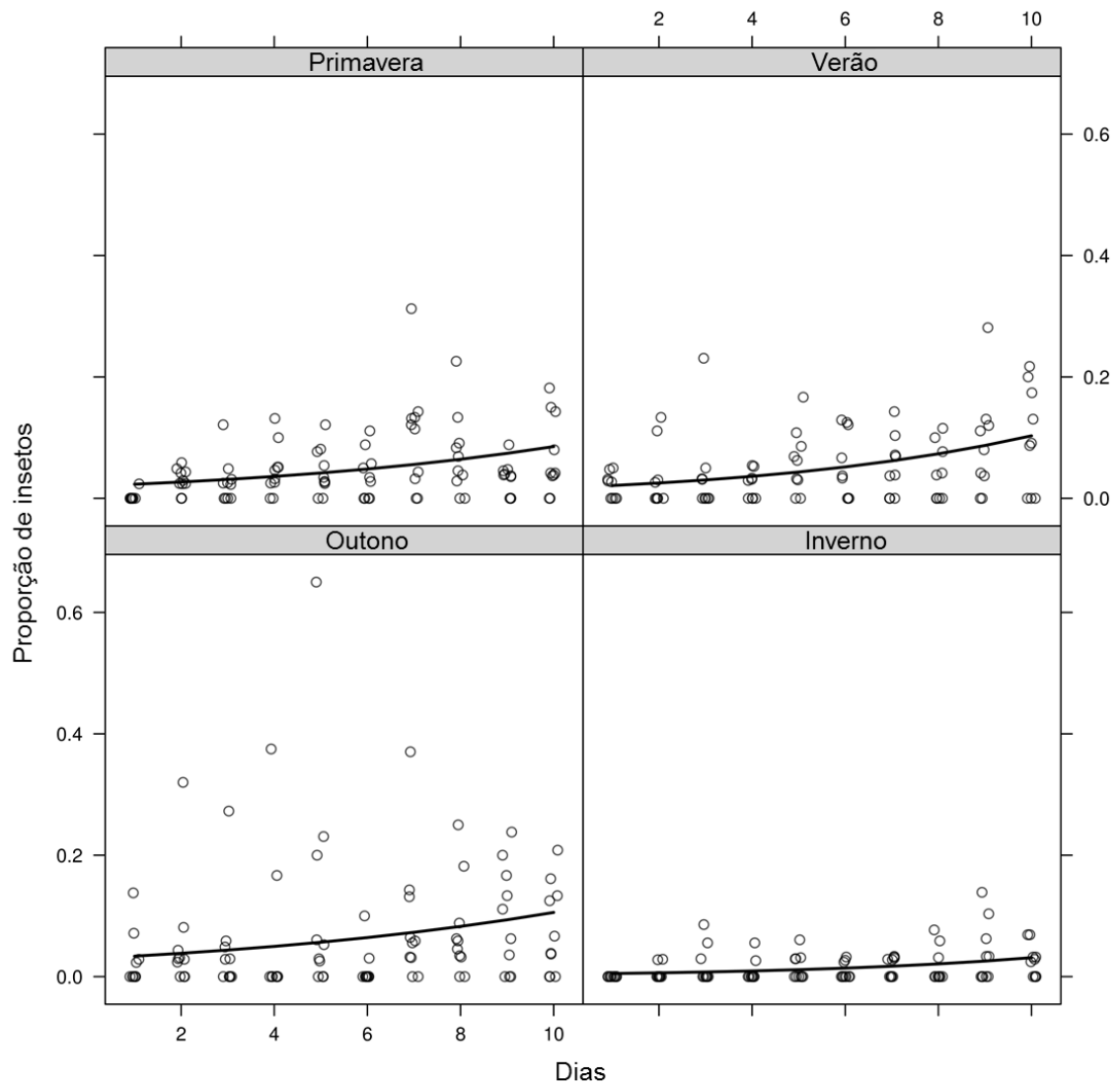
#### 2.3.4.1. Efeito de diferentes regimes de fotoperíodo e temperatura

No estudo em que foi verificado o efeito de diferentes condições de fotoperíodo e temperatura (que simularam as diferentes estações do ano) na propensão ao voo de *D. citri*, a

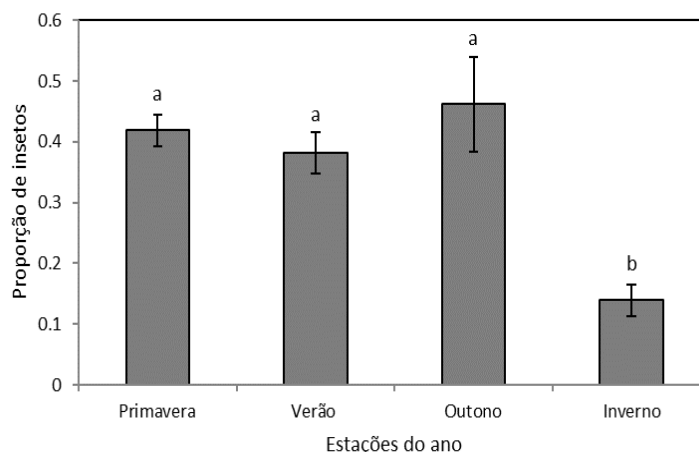


porcentagem de insetos que entraram no tubo foi afetada pelos diferentes tratamentos ( $\chi^2 = 43,40$ ; g.l. = 3;  $P < 0,01$ ) e pelo tempo após a emergência ( $\chi^2 = 31,30$ ; g.l. = 1;  $P < 0,01$ ), indicando que a simulação das diferentes estações do ano influenciou no número de insetos coletados nos tubos e que os indivíduos tornam-se mais propensos ao voo com o incremento do tempo, respectivamente. A interação tratamento e tempo não foi significativa ( $\chi^2 = 0,90$ ; g.l. = 3;  $P = 0,83$ ), indicando independência dos fatores. Os resultados do ajuste por GEE mostram que insetos desenvolvidos nas condições de verão, primavera e outono apresentaram comportamento semelhante quanto à propensão ao voo em função do tempo ( $\chi^2 = 0,44$ ; g.l. = 3;  $P = 0,80$ ) (Figura 8), diferenciando-se apenas do tratamento inverno, no qual os insetos decolaram menos dos *seedlings* de citros. Os mesmos resultados foram observados comparando-se os valores acumulados de insetos que entraram nos tubos após 10 dias de avaliação (Figura 9), indicando efeito do tratamento ( $F = 11,45$ ; g.l. = 3;  $P < 0,01$ ) e menor propensão ao voo para os indivíduos que se desenvolveram na condição de inverno.

Com relação às proporções de insetos que entraram nos tubos, os valores indicados pelas nuvens de pontos da Figura 8 mostram que no mínimo 80% das observações de todos os tratamentos encontram-se abaixo de 0,10, o que significa dizer que a maioria dos insetos permaneceu pousada nas plantas hospedeiras. Para o tratamento inverno, apenas em duas observações a proporção esteve acima de 0,10.



**Figura 8.** Ajuste por modelos de equações de estimativas generalizadas (GEE) (linhas) e nuvem de pontos indicando a proporção de adultos de *Diaphorina citri* que saíram de plantas cítricas em função dos dias após a emergência. Insetos coletados em tubos de 50 mL acoplados em gaiolas do tipo PET que se desenvolveram desde o estágio de ninfa (3º instar) em *seedlings* de citros em diferentes câmaras de crescimento nas condições de primavera (12L/12E e 22 °C), verão (14L/10E e 25 °C), outono (12L/12E e 20 °C) e inverno (10L/14E e 18 °C),. L = luz e E = escuro.



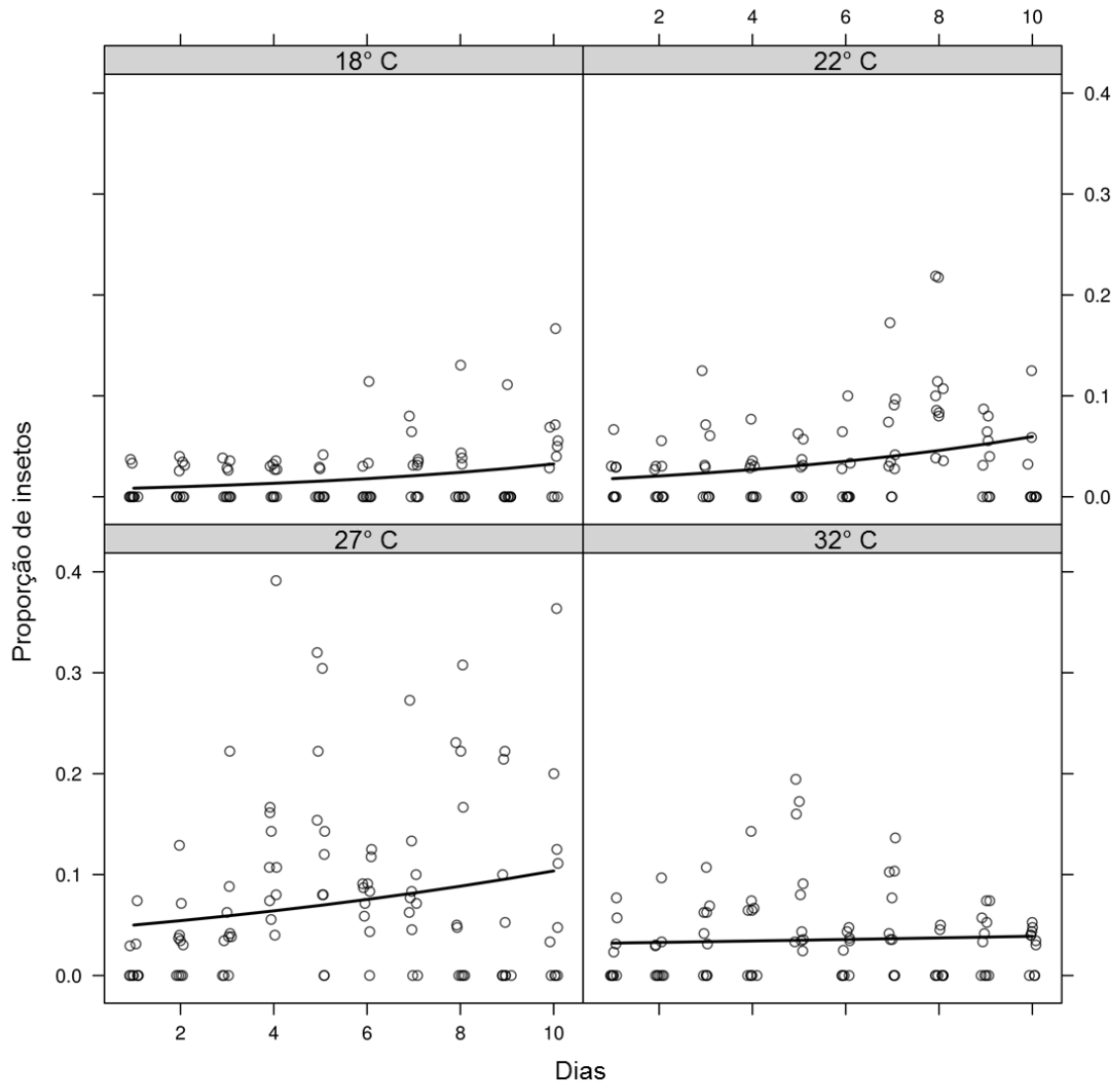
**Figura 9.** Proporção média acumulada de adultos de *Diaphorina citri* que saíram de plantas cítricas  $\pm$  (EPM) (n=10) após 10 dias da emergência. Insetos coletados em tubos de 50 mL acoplados em gaiolas do tipo PET que se desenvolveram desde o estágio de ninfa (3º instar) em *seedlings* de citros em diferentes câmaras de crescimento nas condições de outono (12L/12E e 20 °C), inverno (10L/14E e 18 °C), primavera (12L/12E e 22 °C) e verão (14L/10E e 25 °C). L = luz e E = escuro. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5% de significância.

#### 2.3.4.2. Efeito de temperaturas constantes

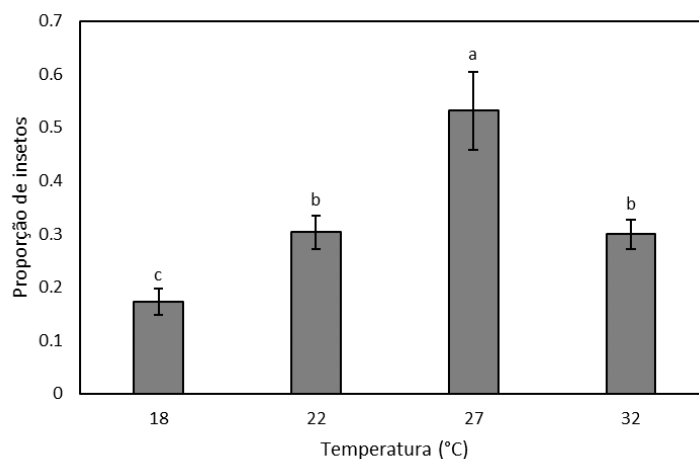
Os resultados das proporções de insetos capturados nos tubos mostraram efeito das diferentes temperaturas ( $\chi^2 = 36,70$ ; g.l. = 3;  $P < 0,01$ ) e do incremento do tempo ( $\chi^2 = 17,00$ ; g.l. = 1;  $P < 0,01$ ) na proporção de insetos coletados nos tubos. A interação tratamento e tempo não foi significativa ( $\chi^2 = 8,10$ ; g.l. = 3;  $P = 0,05$ ), indicando independência dos fatores. De acordo com o ajuste por GEE, é possível observar que em todos os períodos de avaliação, a proporção de insetos que saíram das plantas na temperatura de 27 °C foi superior em relação aos outros tratamentos (Figura 10). Ao contrário, na temperatura de 18 °C, a curva gerada pelo ajuste GEE mostra que a proporção de insetos é menor que os demais tratamentos. Quando desenvolvidos nas temperaturas de 22 e 32 °C, a proporção de insetos que saíram das plantas foi intermediária em relação aos demais tratamentos, sendo 22 °C superior à 32 °C. A análise dos dados acumulados após 10 dias da avaliação indicou efeito dos tratamentos na proporção de insetos coletados nos tubos ( $F = 11,83$ ; g.l. = 3;  $P < 0,01$ ) e indivíduos que desenvolveram nas temperaturas de 18 e 27 °C apresentaram menor e maior propensão ao voo, respectivamente (Figura 11). Nessa análise, as temperaturas de 22 e 32 °C não diferiram, mostrando um comportamento intermediário aos demais tratamentos.

Com relação às proporções de insetos que entraram nos tubos, os valores indicados pelas nuvens de pontos da Figura 10 mostram que no mínimo 90% das observações dos tratamentos 18, 22 e 32 °C encontram-se abaixo de 0,10, o que significa dizer que a maioria

dos insetos, nessas condições, permaneceu pousada nas plantas hospedeiras. Para o tratamento 27 °C, contudo, 30% das observações encontram-se acima de 0,10.



**Figura 10.** Ajuste por modelos de equações de estimativas generalizadas (GEE) (linhas) e nuvem de pontos indicando a proporção de adultos de *Diaphorina citri* que saíram de plantas cítricas em função dos dias após a emergência. Insetos coletados em tubos de 50 mL acoplados em gaiolas do tipo PET que se desenvolveram desde o estágio de ninfa (3º instar) em *seedlings* de citros em diferentes câmaras de crescimento nas temperaturas de 18, 22, 27 e 32 °C e fotoperíodo de 14L/10E. L = luz e E = Escuro



**Figura 11.** Proporção média acumulada de adultos de *Diaphorina citri* que saíram de plantas cítricas  $\pm$  (EPM) (n=10) após 10 dias da emergência. Insetos coletados em tubos de 50 mL acoplados em gaiolas do tipo PET que se desenvolveram desde o estágio de ninfa (3º instar) em *seedlings* de citros em diferentes câmaras de crescimento nas temperaturas de 18, 22, 27 e 32 °C e fotoperíodo de 14L/10E. L = luz e E = Escuro. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5% de significância.

## 2.4. Discussão

Os resultados do presente estudo deixaram claro que a atividade de voo de *D. citri* é grandemente influenciada por fatores ambientais, e que a temperatura desempenha um papel importante na atividade de voo do inseto, reafirmando a hipótese sugerida por Sétamou et al. (2012). Este é o primeiro relato do efeito da temperatura na fase inicial de voo de *D. citri*. Além disso, os dados obtidos fornecem evidências para suportar a hipótese de que existe um período do dia pelo qual o inseto está mais predisposto a decolar das plantas.

No estudo em que foi verificado o posicionamento de insetos adultos em relação à copa das plantas cítricas, foi observado que apenas uma pequena parcela da população (até 4,5 % em média) dos 960 insetos testados, encontrava-se acima da copa dos *seedlings* de citros em todas as avaliações. O mesmo foi observado para os ensaios em que foi testado o efeito das diferentes condições que simularam as estações do ano e das temperaturas constantes na decolagem de *D. citri*. A grande maioria das observações desses ensaios apresentaram proporções de insetos menores que 0,10, ou seja, aproximadamente 90% dos indivíduos não decolaram das plantas cítricas. Essas informações sugerem que a grande maioria dos psíldeos tende a permanecer em seu hospedeiro, realizando atividades que não estão associadas à saída da planta. Esse comportamento parece ser muito semelhante ao observado para *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae), em um estudo em que populações do inseto foram testadas quanto à decolagem de plantas de poinsettia [*Euphorbia pulcherrima* (Wild.) (Euphorbiaceae)] (Blackmer & Byrne, 1993). De acordo com os autores,

menos de 5% da população de moscas-brancas decolava das plantas e pousava no teto de uma estufa de vidro. O mesmo comportamento foi observado para estudos de campo, em que foi verificado que populações de *B. tabaci* respondem de maneira distinta quanto ao surgimento de pistas do ambiente, ou seja, a grande maioria realiza voos triviais dentro do habitat e uma pequena parcela tende a abandonar o hospedeiro a partir de voos verticais orientados pela luz do Sol, caracterizando um comportamento migratório (Byrne et al., 1996). Estudos que confirmem a realização de voos verticais por *D. citri* associados à decolagem de uma pequena parcela dos indivíduos, como observado pelos resultados do presente estudo, podem ser evidências indiretas de um comportamento migratório em populações do inseto, assim como sugerido por Sakamaki (2005). O elevado potencial biótico de *D. citri* (Tsai & Liu, 2000; Alves et al., 2014) e o alto risco de mortalidade de indivíduos migratórios, associado ao aumento de exposição dos mesmos, poderia explicar o pequeno número de psilídeos decolando do hospedeiro, assim como sugerido para *B. tabaci* (Blackmer & Byrne, 1993). Convém ressaltar que a metodologia utilizada nos ensaios de periodicidade de voo e efeito da temperatura e fotoperíodo na propensão ao voo de *D. citri* não permitiu a distinção entre indivíduos migratórios de não migratórios e estudos adicionais devem ser realizados para comprovar a hipótese desse comportamento em populações do inseto.

Com relação aos psilídeos visualizados acima da copa das plantas cítricas, para o estudo de periodicidade de voo, foi verificado que *D. citri* tende a decolar do hospedeiro no período compreendido entre 14:00 e 16:00 h. Esses resultados assemelham-se àqueles presentes na literatura, com picos de atividade do inseto ocorrendo principalmente no período da tarde a partir do monitoramento por armadilhas adesivas (Aubert & Hua, 1990; Sétamou et al., 2012; Paris et al., 2015). Outros hemípteros também foram estudados quanto à periodicidade de voo, como é o caso das cigarrinhas *Homalodisca vitripennis* (Germar) e *Graminella nigrifrons* (Forbes) (Hemiptera: Cicadellidae) e o afídeo *Phorodon humuli* (Schrank) (Hemiptera: Aphididae). Para *H. vitripennis*, foi verificada uma atividade de voo nos horários da manhã, com picos de capturas em armadilhas adesivas amarelas, localizadas em pomares de citros, no período compreendido entre 10:00 e 14:00 h (Blackmer et al., 2006). Para *G. nigrifrons* é conhecido um comportamento bem característico, apresentando uma periodicidade de voo crepuscular que pode ser realizada por mais de 50% da população (Rodriguez et al., 1992; Lopes et al., 1995). Para o afídeo *P. humuli*, foi relatado que o inseto apresenta uma atividade de voo diurna com picos de capturas em armadilhas de sucção ocorrendo aproximadamente às 12:00 e 17:00 h (Campbell & Muir, 2005).

Os períodos de maior atividade de *D. citri* foram correlacionados com os horários de menor umidade e maior amplitude térmica diária. Informações da literatura são inconsistentes quanto a influência da umidade na atividade de voo do inseto, podendo estar positivamente (Martini et al., 2016) ou negativamente (Hall & Hentz, 2011) correlacionada ao número de adultos coletados em armadilhas adesivas amarelas. Os dados do presente estudo fornecem evidências para suportar a hipótese que em períodos do dia em que a umidade estiver baixa, o inseto estará mais propenso ao voo. Com relação à amplitude térmica, sabe-se que plantas cítricas sujeitas a variações de temperatura de 15 °C alteram seu metabolismo de carbono e promovem a biossíntese de estruturas vegetativas, tais como folhas e ramos (Bueno et al., 2012). Considerando que a biologia reprodutiva de *D. citri* é intimamente associada a ramos jovens de seus hospedeiros (Yasuda et al., 2005; Wenninger & Hall, 2007), é provável que o inseto possua a capacidade de regular suas respostas comportamentais (principalmente associadas ao deslocamento e busca de novos hospedeiros) baseando-se na percepção de estímulos de fatores abióticos, como é o caso da relação da amplitude térmica com a indução de brotações em plantas cítricas.

Os horários de maior atividade do inseto não foram correlacionados com a temperatura e intensidade luminosa. Hall e Hentz (2011) não observaram correlações significativas entre temperatura do ar e radiação solar com capturas de *D. citri* em armadilhas adesivas amarelas. O mesmo foi observado por Martini et al. (2016), que estudou a abundância de *D. citri* no inverno e verificou que a temperatura não foi correlacionada com a captura de insetos também em armadilhas. Contudo, Hall (2009) observou correlação da temperatura média diária em pomar com árvores jovens e da interação temperatura e radiação solar com a coleta de insetos em armadilhas. Apesar da inconsistência desses resultados da literatura, comparações são difíceis de serem realizadas porque os autores utilizaram dados de temperatura média diária, diferenciando-se dos registros de temperatura e intensidade luminosa por horário do dia, como realizado no presente experimento. Mesmo não sendo correlacionado com a temperatura interna da gaiola, o período de maior atividade de *D. citri*, compreendido entre 14:00 e 16:00 h, ocorreu próximo ao pico de temperatura diário, que ocorreu sempre nos horários de 12:00 e 14:00 h. De acordo com Aubert e Hua (1990), as atividades de salto e voo do inseto ocorrem em tardes de dias quentes e ensolarados. Nos períodos do dia em que a temperatura é mais elevada, o surgimento de correntes convectivas de ar é mais frequente, as quais podem carregar verticalmente pequenas estruturas, incluindo insetos do tamanho de *D. citri*, para a camada limite planetária convectiva, e estes, conseqüentemente, são transportados por correntes de vento a longas distâncias (Drake &

Farrow, 1988; Bell et al., 2013). Essas constatações poderiam ser mais uma evidência de um comportamento migratório em populações de *D. citri*.

A metodologia para avaliação da decolagem de *D. citri* usando gaiolas do tipo PET e tubos de 50 ml mostrou-se adequada para a verificação do efeito de fatores ambientais no comportamento do inseto. Os resultados do teste aplicando-se cola no caule dos *seedlings* de citros garantiu que os psilídeos que entraram no tubo, iniciaram o movimento em direção à luz a partir de um salto da planta cítrica e não apenas por caminhar.

No estudo em que ninfas foram submetidas a diferentes regimes de fotoperíodo e temperatura, simulando as diferentes estações do ano, insetos que se desenvolveram na condição de inverno apresentaram menor propensão ao voo que nos demais tratamentos, tanto para análise no tempo via GEE como para valores acumulados via GLM. Após o desenvolvimento em temperaturas constantes e fotoperíodo de 14 h de luz e 10 h de escuro, também foi observado que a temperatura mais baixa (18 °C) gerou indivíduos menos propensos ao voo. Isso significa dizer, que numa condição de pouco período de luz (10 h) e temperatura de 18° C, o inseto tende a decolar menos de seu hospedeiro. Esses resultados fornecem evidências adicionais para explicar a flutuação populacional de *D. citri* no campo, onde quedas nas capturas do inseto são observadas nos meses mais frios do ano, como relatado por Hall e Hentz (2011) e Lewis-Rosenblum et al. (2015).

Além do efeito da temperatura no comportamento de *D. citri*, a análise por GEE mostrou que o tempo após a emergência pode alterar a propensão ao voo do inseto, com um ligeiro aumento ocorrendo aproximadamente a partir do 5° dia de avaliação (Figuras 6 e 7). Esse efeito pode estar associado a alterações comportamentais induzidas pela idade de *D. citri*, como a maturidade sexual ou o desenvolvimento dos músculos alares, caracterizando o período teneral do inseto. Sabe-se que a maturidade sexual de *D. citri* pode ser atingida de dois a três (Wenninger & Hall, 2007) até oito a 10 dias após a emergência (Nava et al., 2007; Alves et al., 2014) e que *D. citri* parece se movimentar de uma planta para outra após quatro a cinco dias da emergência (Kobori, Nakata, & Ohto, 2011). Além disso, machos e fêmeas com quatro dias de idade podem atingir distâncias de voo superiores a indivíduos recém-emergidos (Arakawa & Miyamoto, 2007). Essas constatações, juntamente com o efeito do tempo nas proporções de insetos que saíram dos *seedlings* de citros a partir do ajuste por GEE, sugerem que *D. citri* pode apresentar maior propensão ao voo a partir de quatro a cinco dias após a emergência.

Adicionalmente ao efeito das temperaturas amenas e do tempo após a emergência, ficou claro, nos ensaios do presente estudo, que existe uma temperatura ideal para o voo de *D.*



*citri*. Ao verificar os resultados do ensaio de temperaturas constantes, a temperatura de 27° C gerou mais indivíduos propensos ao voo, tanto para a análise no tempo por GEE quanto por GLM considerando as proporções acumuladas de insetos após 10 dias do início do experimento. Além dos tratamentos 18 e 22 °C, os indivíduos que se desenvolveram na temperatura de 32 °C apresentaram menor propensão ao voo que aqueles desenvolvidos à 27 °C, indicando que temperaturas elevadas também podem reduzir a propensão ao voo do inseto. É conhecido que temperaturas de 30 a 45 °C reduzem drasticamente a sobrevivência de *D. citri* (El-Shesheny et al., 2016), atingindo uma viabilidade do ciclo de vida próxima a 7 % a partir de 32 °C (Nava et al., 2007). O efeito deletério de altas temperaturas pode explicar a menor propensão ao voo do inseto a 32 °C. O estudo de incrementos de temperatura indicou que 50% da população testada havia iniciado o voo de uma plataforma inerte na temperatura de 27,14 °C. Em estudos semelhantes para verificação da temperatura mediana de voo de afídeos pragas do cultivo de alface, foi verificado que 50% da população de *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas) (Hemiptera: Aphididae) havia sido capturada em armadilha de tela vertical em 14,7 °C (Morales & Fereres, 2008). Para o afídeo *P. humuli*, foi determinado que a temperatura mínima para voo foi de 13,5 e 14,9 °C para emigrantes capturados no campo por armadilhas de sucção e em estudo de laboratório, respectivamente (Campbell & Muir, 2005). O maior valor obtido para populações de *D. citri* pode ser explicado pelos pulgões acima mencionados estarem adaptados às condições da Europa e *D. citri* ser um inseto tipicamente de origem tropical (sul da Ásia, provavelmente Índia) (Hall, 2008).

Em conclusão, os resultados do presente estudo mostram que a temperatura pode ter um papel essencial na decolagem de *D. citri*. Além disso, existe uma periodicidade de voo do inseto, concentrada principalmente no período da tarde, coincidindo com horários de menor umidade e maior amplitude térmica. O conhecimento da temperatura e do período de maior atividade de voo pode sugerir que táticas de controle terão maiores chances de sucesso quando utilizadas na manhã e com temperaturas menores que 27 °C, considerando que nessas condições, o inseto estará menos ativo e a probabilidade de decolagem de seu hospedeiro será menor. Esses dados poderão fornecer bases para o desenvolvimento de modelos de previsão de chegada de *D. citri* oriundos de fontes externas de inóculo, auxiliando no manejo do HLB dos citros.

## 2.5. Conclusões

- A utilização de gaiolas de garrafa PET com tubos de 50 ml encaixados na tampa é uma metodologia adequada para avaliação da propensão ao voo de *D. citri*;
- Existe uma periodicidade de voo em populações de *D. citri*, com picos de atividade coincidindo com horários (14:00-16:00 h) de menor umidade e maior amplitude térmica;
- A temperatura mínima mediana de voo (TV<sub>50</sub>) de *D. citri* é  $27,14 \pm 1,01$  °C;
- Insetos que se desenvolvem em condição de baixa temperatura (18 °C) e curto período de luz (10 h) apresentam menor propensão ao voo que indivíduos que se desenvolvem em condição de temperaturas mais elevadas e maiores períodos de luz;
- Após o desenvolvimento em temperaturas constantes, adultos de *D. citri* apresentam menor e maior propensão ao voo nas temperaturas de 18 e 27 °C, respectivamente.

## REFERÊNCIAS

- Alves G, Diniz A & Parra J (2014) Biology of the Huanglongbing vector *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) on different host plants. *Journal of Economic Entomology* 107:691–696.
- Arakawa K & Miyamoto K (2007) Flight ability of Asiatic citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera; Psyllidae), measured by a flight mill. *Research Bulletin of the Plant Protection* 43:23–26.
- Aubert B & Hua X (1990) Monitoring flight activity of *Diaphorina citri* on citrus and *Murraya* canopies. *Rehabilitation of Citrus Industry in the Asia Pacific Chiang Mai*, pp 181–187.
- Bassanezi RB, Busato LA, Filho AB, Amorim L & Gottwald TR (2005) Preliminary spatial pattern analysis of Huanglongbing in São Paulo, Brazil. *Proceedings of the 16th Conference of International Organization of Citrus Virologists, IOCV*. pp 341–354.
- Bassanezi RB, Lopes SA, Belasque Jr. J, Spósito MB, Yamamoto PT, Miranda MP De, Teixeira DDC & Wulff NA (2010) Epidemiologia do Huanglongbing e suas implicações para o manejo da doença. *Citrus Research & Technology* 31:11–23.
- Bassanezi RB, Montesino LH, Gimenes-Fernandes N, Yamamoto PT, Gottwald TR, Amorim L & Filho AB (2013) Efficacy of area-wide inoculum reduction and vector control on temporal progress of Huanglongbing in young sweet orange plantings. *Plant Disease* 97:789–796.
- Belasque Jr. J, Bassanezi RB, Yamamoto PT, Ayres AJ, Tachibana A, Violante AR, Tank Jr. A, Giorgi F Di, Tersi FEA, Menezes GM, Dragone J, Jank Jr. RH & Bové JM (2010) Lessons from Huanglongbing management in São Paulo state, Brazil. *Journal of Plant Pathology* 92:285–302.
- Bell JR, Aralimarad P, Lim K-SS & Chapman JW (2013) Predicting insect migration density and speed in the daytime convective boundary layer. *PLoS ONE* 8:1–10.
- Blackmer JL & Byrne DN (1993) Environmental and physiological factors influencing phototactic flight of *Bemisia tabaci*. *Physiological Entomology* 18:336–342.
- Blackmer JL, Hagler JR, Simmons GS & Henneberry TJ (2006) Dispersal of *Homalodisca vitripennis* (Homoptera: Cicadellidae) from a point release site in citrus. *Environmental Entomology* 35:1617–1625.

- Bueno ACR, Prudente DA, Machado EC & Ribeiro R V. (2012) Daily temperature amplitude affects the vegetative growth and carbon metabolism of orange trees in a rootstock-dependent manner. *Journal of Plant Growth Regulation* 31:309–319.
- Byrne D, Rathman R, Orum T & Palumbo J (1996) Localized migration and dispersal by the sweet potato whitefly, *Bemisia tabaci*. *Oecologia* 105:320–328.
- Campbell CAM & Muir RC (2005) Flight activity of the damson-hop aphid, *Phorodon humuli*. *Annals of Applied Biology* 147:109–118.
- Demétrio CGB, Hinde J & Moral RA (2014) Models for overdispersed data in entomology. *Ecological Modelling Applied to Entomology*. Springer, pp 219–259.
- Drake VA & Farrow RA (1988) The influence of atmospheric structure and motions on insect migration. *Annals of Rev. Entomology* 33:183–210.
- El-Shesheny I, Hijaz F, El-Hawary I, Mesbah I & Killiny N (2016) Impact of different temperatures on survival and energy metabolism in the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 192:28–37.
- FUNDECITRUS [Fundo de Defesa da Citricultura] (2016) Levantamentos Greening. Available at: <http://www.fundecitrus.com.br/levantamentos/greening/10>.
- Gottwald TR, Aubert B & Long HK (1991) Spatial patterns analysis of citrus greening in Shantou, China. *Proceedings of the 11th Conference of International Organization of Citrus Virologists, IOCV*. pp 421–427.
- Gottwald T, Irej M, Gast T & Parnell S (2010) Spatio-temporal analysis of an HLB epidemic in Florida and implications for spread. *Proceedings of the 17 th Conference of International Organization of Citrus Virologists, IOCV*. pp 1–13.
- Hall DG (2008) Biology, history and world status of *Diaphorina citri*. I Taller Internacional sobre Huanglongbing de los cítricos (*Candidatus Liberibacter* spp) y el psílido asiático de los cítricos (*Diaphorina citri*). pp 1–11.
- Hall DG (2009) An assessment of yellow sticky card traps as indicators of the abundance of adult *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in citrus. *Journal of Economic Entomology* 102:446–452.
- Hall DG & Hentz MG (2011) Seasonal flight activity by the Asian citrus psyllid in east central Florida. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 139:75–85.
- Kobori Y, Nakata T & Ohto Y (2011) Estimation of dispersal pattern of adult Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). *Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology* 55:177–181.

- Kobori Y, Nakata T, Ohto Y & 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* 46:27–30.
- Lewis-Rosenblum H, Martini X, Tiwari S & Stelinski LL (2015) Seasonal movement patterns and long-range dispersal of Asian citrus psyllid in Florida citrus. *Journal of Economic Entomology* 108:3–10.
- Liang K-Y & Zeger SL (1986) Longitudinal data analysis using generalized linear models. *Biometrika* 73:13–22.
- Lopes JRS, Nault LR & Phelan PL (1995) Periodicity of diel activity of *Graminella nigrifrons* (Homoptera: Cicadellidae) and implications for leafhopper dispersal. *Annals of the Entomological Society of America* 88:227–233.
- Martini X, Pelz-Stelinski KS & Stelinski LL (2016) Factors affecting the overwintering abundance of the Asian citrus psyllid (Hemiptera: Liviidae) in Florida citrus (Sapindales: Rutaceae) orchards. *Florida Entomologist* 99:178–186.
- Morales I & Fereres A (2008) Umbral de temperatura para el inicio del vuelo de los pulgones de la lechuga, *Nasonovia ribisnigri* y *Macrosiphum euphorbiae* (Hemiptera: Aphididae). *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas* 34:275–285.
- Nava DE, Torres MLG, Rodrigues MDL, Bento JMS & Parra JRP (2007) Biology of *Diaphorina citri* (Hem., Psyllidae) on different hosts and at different temperatures. *Journal of Applied Entomology* 131:709–715.
- Paris TM, Croxton SD, Stansly PA & Allan SA (2015) Temporal response and attraction of *Diaphorina citri* to visual stimuli. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 155:137–147.
- Rodriguez CM, Madden L V & Nault LR (1992) Diel flight periodicity of *Graminella nigrifrons* (Homoptera: Cicadellidae). *Annals of the Entomological Society of America* 85:792–798.
- 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 for the Pacific Islands* 42:121–125.
- Sétamou M & Bartels DW (2015) Living on the edges: spatial niche occupation of Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae), in citrus groves. *PLoS ONE* 10:1–21.
- Sétamou M, Sanchez A, Patt JM, Nelson SD, Jifon J & Louzada ES (2011) Diurnal patterns of flight activity and effects of light on host finding behavior of the Asian citrus psyllid. *Journal of Insect Behavior* 25:264–276.

- Tsai J & Liu Y (2000) Biology of *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) on four host plants. *Journal of economic entomology* 93:1721–1725.
- Wedderburn RWM (1974) Quasi-likelihood functions, generalized linear models, and the Gauss-Newton method. *Biometrika* 61:439–447.
- Wenninger E & Hall D (2007) Daily timing of mating and age at reproductive maturity in *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). *Florida Entomologist* 90:715–722.
- Yasuda K, Kawamura F & Oishi T (2005) Location and preference of adult Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) on Chinese box orange jasmine, *Murraya exotica* L. and Flat Lemon, *Citrus depressa*. *Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology* 49:146–149.
- Zeger SL & Liang K-Y (1986) Longitudinal data analysis for discrete and continuous outcomes. *Biometrics*:121–130.



### 3. EFEITO DA CONDIÇÃO DA PLANTA DE CITROS NA DECOLAGEM DE *Diaphorina citri* KUWAYAMA (HEMIPTERA: LIVIIDAE)

#### Resumo

A condição da planta de citros pode influenciar a propensão ao voo do inseto vetor *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) com implicações na disseminação e no manejo do Huanglongbing. Até o momento, pouco se sabe sobre a influência de fatores da planta na fase inicial de voo do inseto. Por isso, foram testados os efeitos do estresse hídrico, da adubação, da densidade de insetos no desenvolvimento e de brotações na decolagem de *D. citri*. A propensão ao voo foi estudada a partir do confinamento dos insetos em gaiolas de garrafa plástica do tipo PET contendo tubos de 50 mL na tampa, para coletar adultos recém-emergidos propensos ao voo. Para verificar o efeito do estresse hídrico, grupos de 30 adultos foram confinados em *seedlings* sadios de laranja doce (*Citrus sinensis* cv. Caipira) nas condições de 30, 50, 70 e 100 % da capacidade de campo. O efeito da adubação foi verificado a partir da transferência de grupos de 40 ninfas de terceiro instar para *seedlings* sadios de laranja doce nas condições de alta e baixa qualidade nutricional. Adicionalmente, foram geradas as condições de alta e baixa densidade de ninfas com a transferência de grupos de 60-100 e 10 ninfas de terceiro instar para brotações de *seedlings* de citros, respectivamente. Finalmente, o efeito das brotações foi verificado a partir da adição de *seedlings* com e sem brotações em vasos contendo adultos recém-emergidos. Adultos de *D. citri* foram menos propensos ao voo quando submetidos a plantas cítricas sob estresse hídrico acentuado do que quando confinados em plantas com 70 e 100 % de capacidade de campo. Ninfas desenvolvidas em plantas com baixa qualidade nutricional geraram adultos mais propensos ao voo. O mesmo foi observado após o desenvolvimento em plantas com alta densidade populacional de ninfas. A adição de plantas com ou sem brotações não interferiu na propensão ao voo de *D. citri*. Os resultados do presente estudo mostram que a fase inicial de voo de *D. citri* pode ser alterada de acordo com a condição do hospedeiro, e essas alterações parecem ser grandemente afetadas pela qualidade nutricional das plantas. Esses dados deixam clara a importância de pomares abandonados como fonte de psíldeos para propriedades comerciais que manejam o HLB dos citros, exigindo ações imediatas para eliminação dos mesmos.

Palavras-chave: Psíldeo-asiático-dos-citros; Propensão para voo; Estresse hídrico; Adubação; Densidade populacional; Brotações

#### Abstract

The host plant condition can affect flight propensity of the insect vector *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae), with implications on Huanglongbing (HLB) spread and management. Little is known about the influence of plant factors on the initial phase of the insect flight. Thus, we tested the effect of water stress, fertilization, insect density, and shoots of citrus plants on *D. citri* take-off. The flight propensity was measured from the confinement of psyllids in clear plastic bottle PET cages with 50 ml tubes on the cap, in order to collect emerged adults that initiated flights. To evaluate the effect of citrus water stress, groups of 30 adults were confined on healthy sweet orange seedlings (*Citrus sinensis* cv. Caipira) in the conditions of 30, 50, 70 and, 100% of field capacity. The effect of fertilization was studied after the transfer of groups of 40 third instar nymphs to healthy sweet orange seedlings in the conditions of poor and high nutritional quality. To verify the effect of population density, groups of 60-100 and 10 nymphs were transferred to shoots of healthy sweet orange citrus seedlings, creating the conditions of high and low densities, respectively. Finally, we tested the effect of shoots by the addition of seedlings with or without shoots in pots containing newly emerged adults. When submitted to water-stressed



plants, adults were less prone to take off compared with insects confined on plants with 70 and 100% of field capacity. Nymphs that developed on plants with poor nutritional quality generated adults more prone to fly. The same was observed after the development on plants with high population density of nymphs. Surprisingly, the addition of plants with or without shoots did not interfere in the take-off frequency. These results show that the initial phase of *D. citri* flight may be changed according to the condition of the host, and these changes appear to be greatly affected by the nutritional quality of the plants. Factors such as water stress, fertilization, and population density modulate the insect behavior and probably are associated with its movement in the field. The clear influence of these factors increases the importance of abandoned orchards as source of psyllids to commercial orchards that manage HLB, requiring immediate actions for their removal.

Keywords: Asian citrus psyllid; Flight propensity; Water stress; Fertilization; Population density; Citrus shoots

### 3.1. Introdução

Huanglongbing (HLB) é a doença mais ameaçadora da citricultura mundial (Bové, 2006). Sua importância aumentou consideravelmente a partir do momento em que plantas sintomáticas foram encontradas no continente americano (Coletta-Filho et al., 2004; Halbert, 2005; Teixeira, Ayres, et al., 2005). No Brasil, a doença se disseminou rapidamente, com aumento da incidência de aproximadamente 30 vezes de 2008 para 2015 (FUNDECITRUS, 2016). Estando associada a bactérias (*Candidatus Liberibacter americanus* e *Ca. L. asiaticus*) restritas ao floema de plantas de citros, a disseminação natural do HLB é dependente de um organismo capaz de adquirir, carregar e inocular os patógenos em plantas saudáveis. Nos pomares do continente americano, o psilídeo-asiático-dos-citros, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae), é conhecido como o vetor dessas bactérias e consequentemente a disseminação da doença se deve, em grande parte, ao deslocamento do inseto em voo.

As táticas atuais de controle do HLB no Brasil visam principalmente reduzir os efeitos causados pela disseminação primária da doença, quando os patógenos são trazidos por psilídeos bacterilíferos oriundos de fontes externas de inoculo. O efeito da disseminação secundária, quando o patógeno é transmitido de planta a planta dentro do pomar, é irrelevante em propriedades bem manejadas, já que o controle químico pode resultar em reduções superiores a 80% da população do inseto (Bassanezi et al., 2013). Contudo, esse controle em nível de propriedade é incapaz de reduzir os efeitos de fontes externas de inoculo e a epidemia, consequentemente, resulta em grande parte, de um processo monocíclico, aumentando a importância do manejo em escala regional (Bassanezi et al., 2010, 2013; Bergamin-Filho et al., 2016).

No Brasil, uma das ferramentas utilizadas para o manejo regional é o sistema de alerta desenvolvido pelo FUNDECITRUS (<http://www.fundecitrus.com.br/alerta-fitossanitario>) para o controle coordenado do inseto vetor. O sistema basicamente utiliza dados resultantes do monitoramento de populações de *D. citri* em áreas estratégicas com a utilização de armadilhas adesivas amarelas. Além disso, informações da presença de brotações em plantas cítricas também são consideradas para definir as épocas de maior incidência de *D. citri* e riscos de contaminação das plantas pela doença, bem como os momentos mais adequados para a realização do manejo do inseto vetor. Sabe-se que as brotações possuem grande importância como fator atuante no comportamento (Patt & Sétamou, 2010; Kobori, Nakata, & Ohto, 2011) e na dispersão do inseto (Tomaseto et al., 2016) e, por isso, é uma das variáveis consideradas no alerta fitossanitário.

Além das brotações, estima-se que existam diversos outros fatores que possam interferir na propensão ao voo e deslocamento de *D. citri*. No entanto, as informações da literatura sobre o assunto são escassas e a maioria delas consideram estudos epidemiológicos (Gottwald et al., 1991, 2010; Bassanezi et al., 2005) e o efeito de fatores ambientais como vento (Hall & Hentz, 2011; Kobori, Nakata, Ohto, et al., 2011), umidade relativa (Hall & Hentz, 2011; Martini et al., 2016) e luminosidade (Sétamou et al., 2012). Excetuando-se as brotações, não existem relatos do efeito da condição da planta na propensão ao voo do inseto. Estudos considerando esses fatores poderiam auxiliar no entendimento do papel de pomares abandonados na epidemiologia do HLB dos citros, com consequente melhoria das atuais táticas de controle da doença. Além disso, o conhecimento gerado por esses estudos forneceria ferramentas adicionais para o desenvolvimento de modelos de previsão do deslocamento do inseto com o intuito de se adotar ações de manejo antes de sua chegada à borda de pomares manejados. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do estresse hídrico, da qualidade nutricional, da densidade populacional de *D. citri* e de brotações de plantas cítricas na decolagem do inseto.

## **3.2. Material e Métodos**

### **3.2.1. Insetos e plantas utilizados nos experimentos**

Ninfas e adultos de *D. citri* foram obtidos de uma colônia mantida em condições laboratoriais [ $26 \pm 2$  °C;  $70 \pm 10$  % UR e 14:10 h (L:E)] no Laboratório de Insetos Vetores de Fitopatógenos do Departamento de Entomologia e Acarologia, da Escola Superior de

Agricultura "Luiz de Queiroz"/Universidade de São Paulo (ESALQ-USP), São Paulo, Brasil. Os insetos foram criados em gaiolas [50 (altura) x 35 (profundidade) x 35 cm (largura)] confeccionadas com estrutura metálica (alumínio) e revestidas com tecido tipo *voile*. Como substrato de alimentação das ninfas e adultos e de oviposição das fêmeas de *D. citri* foram utilizadas plantas de murta [*Murraya paniculata* (L.) Jack (Rutaceae)] livres de ‘*Ca. Liberibacter spp*’, as quais foram periodicamente podadas, adubadas com NPK (4-14-8) e mantidas em estufa para desenvolvimento de brotações adequadas à oviposição do inseto.

As diferentes condições da planta influenciando a propensão ao voo de *D. citri* foram criadas a partir da utilização de *seedlings* de laranja doce ‘Caipira’ [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck (Rutaceae)], cultivadas em vasos de 1,5 L contendo substrato à base de casca de pinus, turfa e vermiculita expandida (Tropstrato citrus, Vida Verde Indústria e Comércio de Insumos Orgânicos Ltda., Mogi Mirim, SP, Brasil). Para o experimento de verificação da qualidade nutricional, os *seedlings* foram condicionados em sacos plásticos de aproximadamente 1,2 L e preenchidos com areia (substrato inerte).

### **3.2.2. Avaliação da decolagem de *D. citri***

Para todos os ensaios do presente estudo (estresse hídrico, qualidade nutricional, densidade populacional e brotações), a propensão ao voo de *D. citri* foi determinada a partir da contagem do número de insetos que entravam em tubos de 50 ml acoplados na tampa de gaiolas confeccionadas com garrafas plásticas de politereftalato de etileno (PET) transparentes, conforme descrito no capítulo anterior (item 2.2.4). Os bioensaios foram realizados em sala climatizada [ $26 \pm 2$  °C;  $70 \pm 10$  % UR e 14:10 h (L:E)]. Considerando a importância da luz no comportamento do inseto (Sétamou et al., 2012), foi fixado a 100 cm acima do dossel dos *seedlings*, uma raque contendo quatro lâmpadas fluorescentes de 110 W cada. O número de adultos capturados nos tubos foi registrado a cada 24 h durante sete dias. Todos os tratamentos foram repetidos 10 vezes, sendo cada repetição representada por um *seedling* de citros.

#### **3.2.2.1. Efeito do estresse hídrico**

Para verificar o efeito do estresse hídrico em plantas de citros na decolagem de *D. citri*, foi realizado um experimento baseando-se no peso dos vasos contendo os *seedlings* de

laranjeira doce 'Caipira'. Foram adotadas quatro condições de disponibilidade hídrica para as plantas: 100, 70, 50 e 30% da capacidade de campo. Inicialmente padronizou-se o peso dos 40 vasos destinados ao experimento. Esses vasos foram levados para casa de vegetação e irrigados no final da tarde. Assumindo que o consumo de água pelas plantas em período noturno é praticamente nulo, na manhã seguinte foram escolhidos aleatoriamente 10 vasos e estes foram pesados novamente para determinação do peso médio na capacidade de campo. A cada três dias foi realizada a pesagem desses mesmos vasos e calculado o consumo diário de água, sendo posteriormente repostos 100, 70, 50 e 30% de água, determinando os diferentes tratamentos. Essas reposições ocorreram até aproximadamente 60 dias do início das pesagens e nesse período, as plantas já apresentavam diferenças visíveis quanto à disponibilidade/déficit hídrico, como o início do murchamento das folhas, principalmente para o tratamento 30%. Após a definição dos tratamentos, grupos de 30 adultos recém-emergidos foram transferidos para cada gaiola (unidade experimental). Considerando um possível estresse devido à manipulação, o que poderia alterar os resultados do experimento, a contagem diária do número de insetos nos tubos iniciou-se 24 h após a transferência dos adultos.

### **3.2.2.2. Efeito da qualidade nutricional do hospedeiro**

Para verificar o efeito da condição nutricional de plantas de citros na decolagem de *D. citri*, 20 seedlings de laranjeira doce 'Caipira' foram transplantados em vasos de plástico de aproximadamente 2 L contendo areia como substrato e mantidos em casa de vegetação sem adubação por aproximadamente 60 dias. Após esse período, 10 plantas foram irrigadas com solução nutritiva e 10 plantas irrigadas com água. A solução nutritiva foi formada por nitrato de cálcio (0,0450%), nitrato de potássio (0,0150%), sulfato de magnésio (0,0195%), fosfato monoamônico (0,0035%), ferro EDTA (0,0050%), Zinco EDTA (0,0010%), Cobre EDTA (0,0020%), manganês EDTA (0,0008%) e ácido bórico (0,0002%), apresentando condutividade elétrica de 1,0 mS. A fertirrigação foi realizada numa frequência de três vezes por semana durante aproximadamente 60 dias. Após esse período, as plantas foram podadas para o desenvolvimento de brotações. Posteriormente, grupos de 40 ninfas de 3º instar foram transferidas para brotações ( $\approx$  5cm de comprimento), sendo estes confinados nas gaiolas (unidade experimental). A contagem dos insetos nos tubos foi iniciada no período em que 50% da população, em média, havia emergido, sendo este, considerado como o tempo zero das avaliações.

### 3.2.2.3. Efeito da densidade populacional

Baseando-se na hipótese de que alta densidade populacional aumenta a proporção de indivíduos propensos ao voo, assim como é observado para pulgões no surgimento de insetos alados dentro da população (An et al., 2012), foi verificado o efeito da densidade de ninfas na proporção de psilídeos adultos propensos ao voo. Para isso, grupos de ninfas de 3º instar foram transferidas para brotações ( $\approx 5$  cm de comprimento) de *seedlings* de citros e confinados nas gaiolas (unidade experimental). Para os tratamentos com alta e baixa densidades, foram transferidas de 60 a 100 e 10 ninfas, respectivamente. Uma brotação com alta densidade foi definida como sendo aquela em que todos os espaços da estrutura vegetativa foram colonizados por ninfas de *D. citri*, sendo transferidas 60 e 100 ninfas para brotações com tamanho ligeiramente inferior a 5 cm ou igual/superior a 5 cm, respectivamente. Assim como descrito no item anterior, foram realizadas contagens do número de adultos emergidos, estabelecendo-se o tempo zero como sendo aquele em que 50 % da população havia emergido. A partir desse período, os tubos foram acoplados nas gaiolas e as avaliações iniciadas.

### 3.2.2.4. Efeito de brotações de plantas cítricas

Para verificação da influência de brotações na propensão ao voo de *D. citri*, insetos adultos entraram em contato com plantas cítricas em duas condições de fenologia (presença ou ausência de brotações). Considera-se como hipótese que na presença de brotações o inseto tende a ficar mais tempo no hospedeiro, ou seja, menos propenso ao voo, assim como observado em condições de campo por Tomaseto et al. (2016). Independente do tratamento, grupos de 30 ninfas de 3º instar foram transferidas para duas ou três brotações ( $\approx 5$  cm de comprimento) de 20 *seedlings* de citros. Após a transferência, os insetos foram confinados nas gaiolas (unidade experimental). Semelhantemente ao que foi descrito nos itens anteriores, foram realizadas contagens do número de adultos emergidos e definido o tempo zero quando 50% da população havia emergido. Nesse período, além do encaixe dos tubos de 50 mL e início das avaliações, foi adicionado, junto com a planta de desenvolvimento, um *seedling* de citros sem brotações em cada uma das 10 plantas destinadas ao tratamento ausência de brotações e um *seedling* de citros com brotações ( $\approx 5$  cm de comprimento) em cada uma das 10 plantas destinadas ao tratamento presença de brotações. O experimento foi repetido duas vezes.

### 3.2.3. Análise de dados

Os dados de proporção de insetos capturados nos tubos de 50 ml (indivíduos propensos ao voo) para os experimentos de estresse hídrico, qualidade nutricional, densidade populacional e brotações foram analisados por meio de ajuste de modelos de equações de estimativas generalizadas (GEE). A análise via GEE realiza a estimativa de equações de correlação de dados longitudinais, especialmente quando eles são binários ou em forma de contagem (Liang & Zeger, 1986; Zeger & Liang, 1986), sendo uma extensão do procedimento de *quaslikelihood* usado em modelos lineares generalizados (GLM) (Wedderburn, 1974). Foi utilizada a estrutura de correlação do tipo *exchangeable* e os dados analisados considerando o efeito do tratamento, tempo e a interação entre eles por meio de teste qui-quadrado ( $P < 0,05$ ). Além da análise por GEE no tempo, foram ajustados modelos lineares generalizados (GLM) do tipo quasibinomial, para as proporções acumuladas de insetos capturados nos tubos após os sete dias de avaliação. A qualidade do ajuste foi avaliada por meio de gráficos meio-normais com envelope de simulação (Demétrio et al., 2014). Comparações múltiplas de médias foram realizadas a partir da obtenção dos intervalos de confiança (95 %) para os preditores lineares.

Todas as análises foram realizadas com auxílio do software estatístico R v.3.2.3 (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

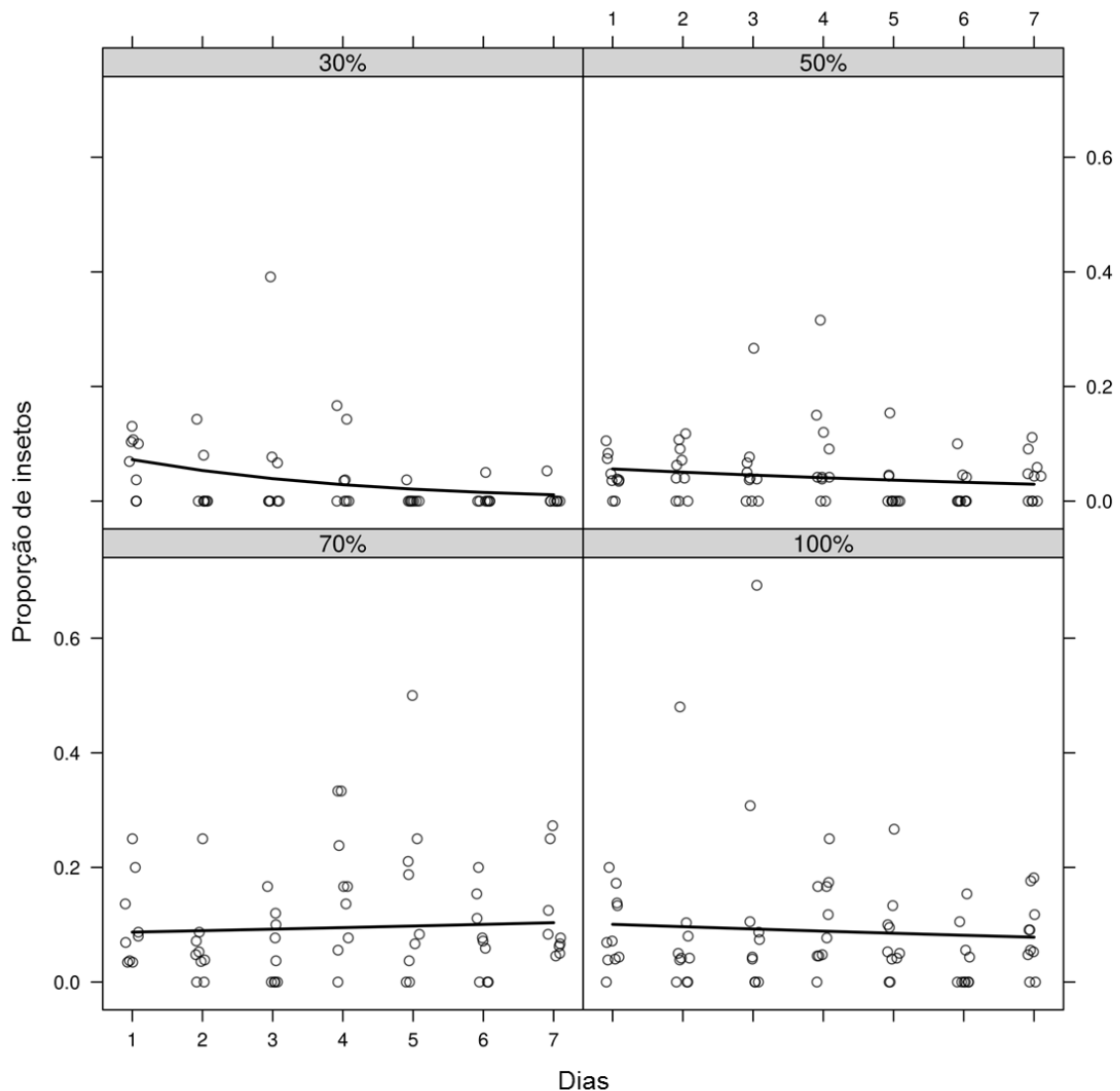
## 3.3. Resultados

### 3.3.1. Efeito do estresse hídrico na decolagem de *Diaphorina citri*

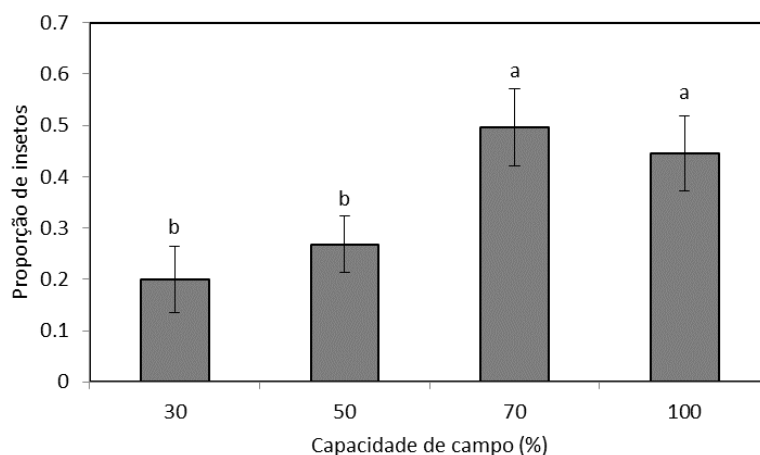
Os resultados do experimento mostraram efeito do estresse hídrico ( $\chi^2 = 10,60$ ; g.l. = 3;  $P = 0,01$ ) e do incremento do tempo ( $\chi^2 = 4,65$ ; g.l. = 1;  $P = 0,03$ ) na proporção de insetos coletados nos tubos. Além disso, interação significativa foi observada entre tratamento e tempo ( $\chi^2 = 14,92$ ; g.l. = 3;  $P < 0,01$ ). De acordo com as curvas geradas pelo ajuste GEE, foi possível observar que a proporção de insetos que decolaram das plantas não estressadas (70 e 100%) foi superior aos demais tratamentos em todos os períodos de avaliação (Figura 12). Ao contrário, no tratamento com menor disponibilidade hídrica às plantas, os insetos apresentaram baixa propensão ao voo, com tendência de diminuição do número de psilídeos capturados nos tubos com o incremento do tempo, como observado na curva do tratamento 30% (Figura 12). Os mesmos resultados foram observados comparando-se os valores acumulados após os sete dias de avaliação (Figura 13). De acordo com a análise, foi

verificado efeito do estresse hídrico ( $F = 4,05$ ; g.l. = 3;  $P = 0,01$ ) na propensão ao voo de *D. citri*, com menor e maior propensão ao voo quando os insetos entraram em contato com plantas estressadas (30 e 50%) e não estressadas (70 e 100%), respectivamente.

Com relação às proporções de insetos que foram capturados nos tubos, os valores indicados pelos pontos da Figura 12 mostraram que no mínimo 86% das observações dos tratamentos 30 e 50% encontram-se abaixo de 0,10, indicando que a maioria dos insetos nessas condições permaneceu pousada nas plantas hospedeiras. Para os tratamentos 70 e 100%, contudo, 63 e 69% das observações, respectivamente, encontram-se abaixo de 0,10.



**Figura 12.** Ajuste por modelos de equações de estimativas generalizadas (GEE) (linhas) e nuvem de pontos indicando a proporção de adultos de *Diaphorina citri* que saíram de plantas cítricas em função dos dias após a emergência. Insetos capturados em tubos de 50 mL, acoplados em gaiolas do tipo PET, que entraram em contato com *seedlings* de citros nas condições de 30, 50, 70 e 100% da capacidade de campo



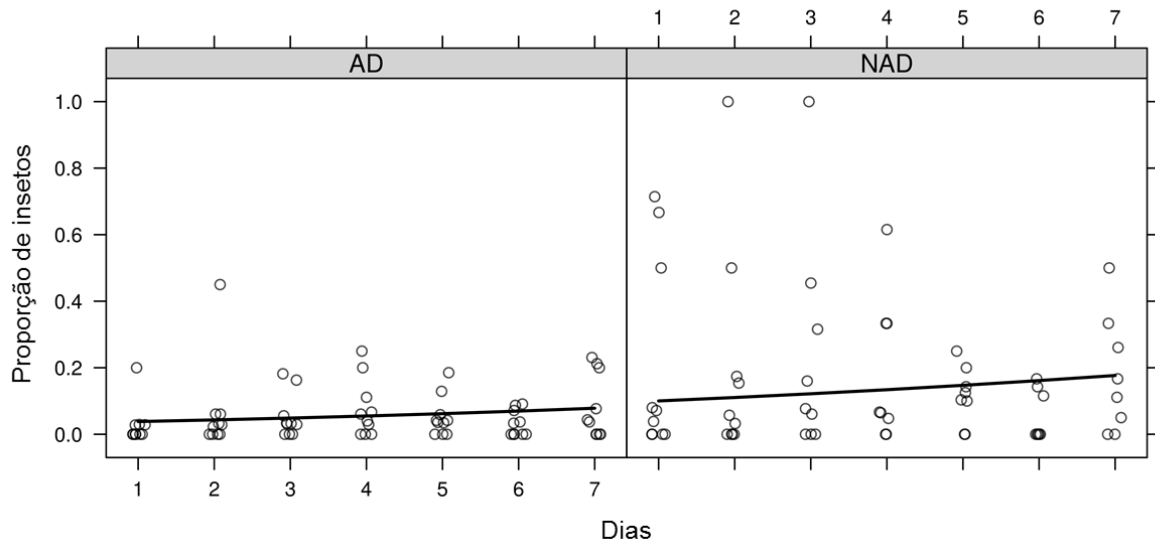
**Figura 13.** Proporção média acumulada de adultos de *Diaphorina citri* que saíram de plantas cítricas  $\pm$  (EPM) (n=10) após sete dias de avaliação. Insetos capturados em tubos de 50 mL, acoplados em gaiolas do tipo PET, que entraram em contato com *seedlings* de citros nas condições de 30, 50, 70 e 100% da capacidade de campo. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5% de significância.

### 3.3.2. Efeito da qualidade nutricional na decolagem de *Diaphorina citri*

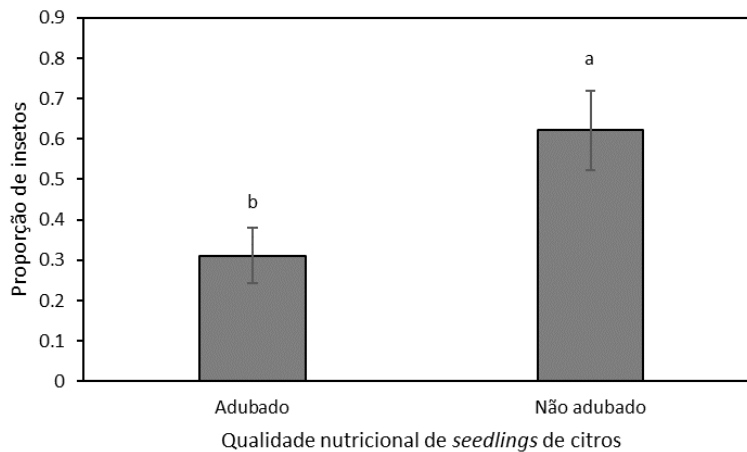
Os resultados mostraram efeito da adubação de *seedlings* de citros ( $\chi^2 = 5,06$ ; g.l. = 1;  $P = 0,02$ ) na proporção de insetos capturados nos tubos. Não foi verificado efeito do tempo ( $\chi^2 = 3,19$ ; g.l. = 1;  $P = 0,07$ ) nem da interação tratamento e tempo ( $\chi^2 = 0,02$ ; g.l. = 1;  $P = 0,90$ ), indicando independência dos fatores testados. O ajuste por GEE mostrou que a curva gerada para o tratamento sem adubação (NAD) é significativamente superior à do tratamento com adubação (AD) (Figura 14), indicando maior propensão ao voo para adultos que se desenvolveram em plantas com baixa qualidade nutricional. Além disso, as observações do tratamento com adubação, representadas pelos pontos, parecem estar muito mais próximas de zero que as observações do tratamento com plantas sem adubação (Figura 14). As diferenças entre os tratamentos ficaram mais claras considerando as proporções acumuladas após sete dias de avaliação (Figura 15). A análise mostrou efeito da qualidade nutricional da planta na proporção de insetos capturados nos tubos ( $F = 4,81$ ; g.l. = 1;  $P = 0,04$ ), indicando maior propensão ao voo após o desenvolvimento em *seedlings* de laranja-doce 'Caipira' com baixa qualidade nutricional.

Com relação às proporções de insetos que entraram nos tubos, os valores indicados pelos pontos mostraram que 83 e 60% das observações dos tratamentos com e sem adubação, respectivamente, encontram-se abaixo de 0,10, o que significa dizer que a maioria dos insetos permaneceu pousada nas plantas hospedeiras (Figura 14).





**Figura 14.** Ajuste por modelos de equações de estimativas generalizadas (GEE) (linhas) e nuvem de pontos indicando a proporção de adultos de *Diaphorina citri* que saíram de plantas cítricas em função dos dias após a emergência. Insetos capturados em tubos de 50 mL, acoplados em gaiolas do tipo PET, que se desenvolveram desde o estágio de ninfa (3º instar) em *seedlings* de citros adubados e não adubados



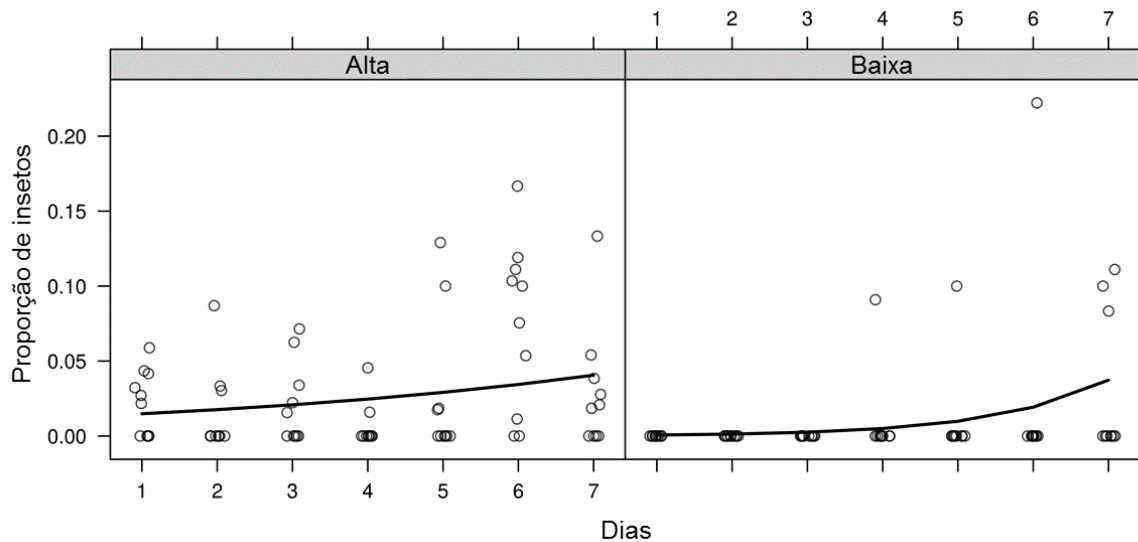
**Figura 15.** Proporção média acumulada de adultos de *Diaphorina citri* que saíram de plantas cítricas  $\pm$  (EPM) (n=10) após sete dias de avaliação. Insetos capturados em tubos de 50 mL, acoplados em gaiolas do tipo PET, que se desenvolveram desde o estágio de ninfa (3º instar) em *seedlings* de citros adubados e não adubados. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5% de significância.

### 3.3.3. Efeito da densidade de ninfas na decolagem de adultos de *Diaphorina citri*

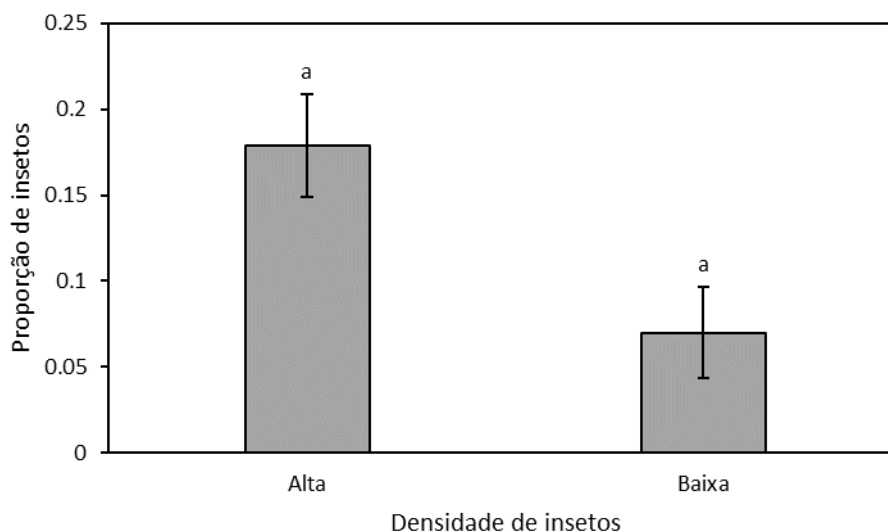
Os resultados mostraram efeito da densidade populacional ( $\chi^2 = 3,88$ ; g.l. = 1;  $P = 0,048$ ) e do incremento do tempo ( $\chi^2 = 5,90$ ; g.l. = 1;  $P = 0,02$ ) na proporção de insetos

capturados nos tubos. Além disso, foi verificada interação significativa entre tratamento e tempo ( $\chi^2 = 4,74$ ; g.l. = 1;  $P = 0,03$ ). De acordo com o ajuste GEE, é possível verificar que a curva gerada para o tratamento de alta densidade é superior à de baixa densidade, a qual apresentou um ligeiro aumento principalmente no sexto e sétimo dias de avaliação (Figura 16). Considerando as proporções acumuladas após os sete dias de avaliação, a análise mostrou ausência de efeito da densidade populacional na proporção de insetos capturados nos tubos ( $F = 2,51$ ; g.l. = 1;  $P = 0,13$ ) (Figura 17).

Semelhantemente aos experimentos anteriores, os pontos indicam que a grande maioria dos insetos permaneceram na copa das plantas cítricas, com apenas 8 (11,4%) e 4 (5,7%) pontos acima de 0,10 de proporção para os tratamentos de alta e baixa densidades, respectivamente (Figura 16).



**Figura 16.** Ajuste por modelos de equações de estimativas generalizadas (GEE) (linhas) e nuvem de pontos indicando a proporção de adultos de *Diaphorina citri* que saíram de plantas cítricas em função dos dias após a emergência. Insetos capturados em tubos de 50 mL, acoplados em gaiolas do tipo PET, que se desenvolveram desde o estágio de ninfa (3º instar) em *seedlings* de citros com alta (60-100 indivíduos) e baixa (10 indivíduos) densidade de ninfas

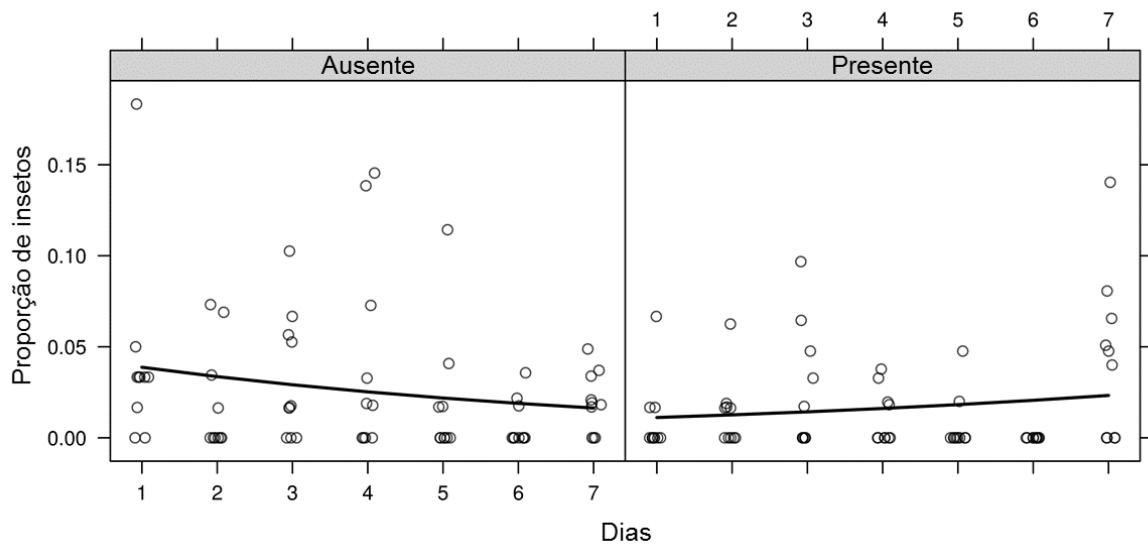


**Figura 17.** Proporção média acumulada de adultos de *Diaphorina citri* que saíram de plantas cítricas  $\pm$  (EPM) (n=10) após sete dias de avaliação. Insetos capturados em tubos de 50 mL, acoplados em gaiolas do tipo PET, que se desenvolveram desde o estágio de ninfa (3º instar) em *seedlings* de citros com alta (60-100 indivíduos) e baixa (10 indivíduos) densidade de ninfas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5% de significância.

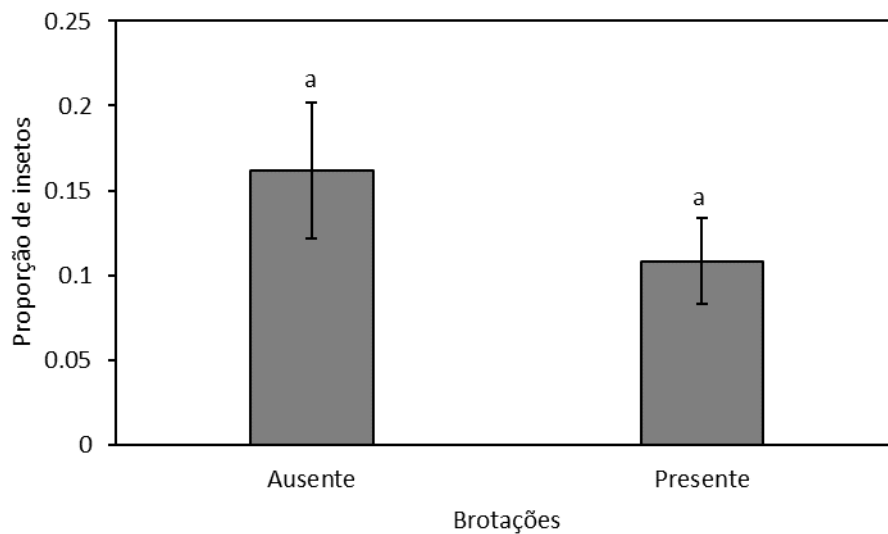
### 3.3.4. Efeito de brotações na decolagem de *Diaphorina citri*

Os resultados indicaram que a proporção de insetos capturados nos tubos não foi afetada pela adição de hospedeiros com ou sem brotações ( $\chi^2 = 1,88$ ; g.l. = 1;  $P = 0,17$ ) e pelo incremento do tempo ( $\chi^2 = 0,42$ ; g.l. = 1;  $P = 0,52$ ). No entanto, interação significativa foi observada entre tratamento e tempo ( $\chi^2 = 8,84$ ; g.l. = 1;  $P < 0,01$ ). De acordo com os resultados obtidos, é possível verificar que as curvas geradas pelo ajuste GEE são semelhantes, apesar da tendência de decréscimo e acréscimo para os tratamentos com e sem brotação, respectivamente (Figura 18). Os mesmos resultados foram obtidos considerando as proporções acumuladas após sete dias de avaliação. De acordo com a análise, não foi verificado efeito do tratamento ( $F = 1,33$ ; g.l. = 1;  $P = 0,26$ ) na propensão ao voo de *D. citri*, indicando que a adição de plantas com e sem brotação não alterou a propensão ao voo do inseto (Figura 19).

Assim como nos outros bioensaios do presente estudo, é possível verificar que a grande maioria das observações se encontra abaixo de 0,10, ou seja, poucos insetos tendem a decolar dos *seedlings* de laranja-doce 'Caipira' (Figura 18).



**Figura 18.** Ajuste por modelos de equações de estimativas generalizadas (GEE) (linhas) e nuvens de pontos indicando a proporção de adultos de *Diaphorina citri* que saíram de plantas cítricas em função dos dias após a emergência. Insetos capturados em tubos de 50 mL, acoplados em gaiolas do tipo PET, que desenvolveram desde o estágio de ninfa (3º instar) em *seedlings* de citros e no estágio adulto entraram em contato com *seedlings* de citros com e sem brotações.



**Figura 19.** Proporção média acumulada de adultos de *Diaphorina citri* que saíram de plantas cítricas  $\pm$  (EPM) (n=10) após sete dias de avaliação. Insetos capturados em tubos de 50 mL acoplados em gaiolas do tipo PET que desenvolveram desde o estágio de ninfa (3º instar) em *seedlings* de citros e no estágio adulto entraram em contato com *seedlings* de citros com e sem brotações. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5% de significância.

### 3.4. Discussão

Os resultados do presente estudo deixaram claro que a fase inicial do voo de *D. citri* pode ser alterada de acordo com a condição de seu hospedeiro. Fatores como estresse hídrico, qualidade nutricional e densidade populacional modulam o comportamento do inseto e provavelmente estão associados ao deslocamento do mesmo no campo. Esse é o primeiro relato da influência desses fatores na fase inicial de voo de *D. citri*.

Além dos resultados acima mencionados, os estudos para verificação da influência da condição da planta na decolagem de *D. citri* mostraram que a grande maioria dos insetos tende a permanecer na planta hospedeira em todos os períodos de avaliação, independente do tratamento testado. As proporções de insetos que decolaram das plantas cítricas sempre se mantiveram próximas de 10%, sugerindo a existência de poucos indivíduos destinados a abandonar o hospedeiro em busca de novos sítios de alimentação e/ou oviposição. Esse comportamento parece ser semelhante àquele observado para *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae), em estudos realizados em casa de vegetação (Blackmer & Byrne, 1993) e campo (Byrne et al., 1996). De acordo com os autores, existe um comportamento bimodal em populações de *B. tabaci*, ou seja, a grande maioria tende a se movimentar menos e permanecer próxima ao hospedeiro e uma pequena parcela dos indivíduos é destinada a realizar voos verticais e abandonar a planta hospedeira. Os resultados do presente trabalho fornecem evidências para suportar a hipótese de que populações de *D. citri* apresentam comportamento em voo semelhante ao observado para *B. tabaci*. A diferenciação intraespecífica no deslocamento pode aumentar as chances de sobrevivência e perpetuação da espécie e o engajamento de poucos indivíduos a abandonar o hospedeiro pode ser explicado pelo alto risco de exposição aos agentes de biocontrole desses indivíduos.

Com relação ao efeito da condição da planta na decolagem de *D. citri*, no estudo de estresse hídrico foi observada menor propensão ao voo quando insetos adultos foram confinados em plantas com 30 e 50% da capacidade de campo. Informações da literatura mostram que plantas em estresse hídrico apresentam alteração na síntese proteica e aumento no teor de aminoácidos livres (Hsiao, 1973; Büssis & Heineke, 1998; Showler, 2002; Nachappa et al., 2016). Aumentos populacionais de insetos fitófagos podem ocorrer associados ao estresse hídrico de plantas (Mattson & Haack, 1987), como é o caso do psilídeo *Cardiaspina deusitexta* Taylor (Hemiptera: Aphalaridae), em árvores de eucalipto [*Eucalyptus fasciculosa* (Myrtaceae)] na Austrália (White, 1969). A explicação para esses resultados seria justamente no aumento dos níveis de aminoácidos livres nas plantas,

tornando-as mais ricas para a dieta dessas pragas. Sabe-se que existem nove aminoácidos que não são produzidos pelos insetos e que, portanto, são essenciais para o desenvolvimento, reprodução e sobrevivência, e estes devem ser obrigatoriamente adquiridos na dieta ou fornecidos por bactérias simbiotes (Douglas, 2006). Provavelmente os *seedlings* de citros utilizados no presente estudo apresentaram uma alteração nos níveis de aminoácidos induzida pelo estresse hídrico, o que explicaria a menor propensão ao voo em plantas estressadas. Relatos da literatura mostram que plantas de citros Satsuma [*Citrus unshiu* cv. Owari (Rutaceae)] apresentam alterações no teor de aminoácidos livres após serem submetidas ao estresse hídrico (Malik et al., 2014). De acordo com os autores, os níveis de leucina, metionina e treonina aumentaram em plantas estressadas, sendo esses aminoácidos essenciais aos insetos (Douglas, 2006). Essas constatações fornecem evidências para suportar a hipótese de que plantas de citros em estresse hídrico reduzem a propensão ao voo de *D. citri* devido a maior disponibilidade de nutrientes essenciais ao inseto.

Alterações no comportamento em voo de *D. citri* induzidas por aspectos nutricionais da planta hospedeira, como sugerido para explicar os resultados do estudo de estresse hídrico, também foram observadas para o bioensaio em que a decolagem do inseto foi avaliada após o desenvolvimento em plantas com ou sem adubação. Os resultados mostraram que ninfas desenvolvidas em plantas com baixa qualidade nutricional geraram adultos mais propensos ao voo. O efeito da nutrição do hospedeiro no comportamento em voo de insetos vetores é conhecido para cigarrinhas (Northfield et al., 2009), tripes (Rhains & Shipp, 2003) e pulgões (Wilson & Leather, 2012). Além disso, muitos trabalhos relataram alterações comportamentais no vetor ocasionadas pelas diferenças nutricionais entre plantas saudáveis e plantas doentes, como é o caso de pulgões (Carmo-Sousa et al., 2014), moscas-brancas (Su et al., 2015), cigarrinhas (Daugherty et al., 2011) e *D. citri* (Mann et al., 2012). Sabe-se que plantas de citros infectadas com '*Ca. Liberibacter asiaticus*' são deficientes em nitrogênio, fósforo, magnésio, zinco e ferro (Mann et al., 2012). De acordo com os autores, *D. citri* inicialmente pousa em plantas doentes, porém, após um determinado período apresenta uma tendência de se deslocar em direção a plantas saudáveis, provavelmente em busca de um hospedeiro bem nutrido. Relatos de alterações no comportamento de insetos estimuladas pela deficiência de nutrientes no hospedeiro, juntamente com os resultados obtidos no presente estudo suportam a hipótese de que *D. citri* estará mais propenso ao voo após o desenvolvimento em um hospedeiro com baixa qualidade nutricional, ajudando a explicar porque pomares abandonados são fontes importantes de psílídeos para pomares devidamente manejados.

Outro efeito observado no presente estudo, dessa vez associado indiretamente à disponibilidade de nutrientes na alimentação, foi a densidade populacional. A competição intraespecífica devido ao excesso populacional pode gerar indivíduos mais propensos ao voo, os quais irão buscar novos hospedeiros para suprir a falta de alimento. A densidade populacional é o principal fator indutor da geração de indivíduos alados de *Schizaphis graminum* (Rondani) (Hemiptera: Aphididae) (An et al., 2012). De acordo com os autores, um incremento de 32 para 64 afídeos por folha promove um aumento de 5 para 75% de indivíduos alados dentro da população. O mesmo acontece com a geração de indivíduos macrópteros das cigarrinhas *Prokelisia marginata* e *Prokelisia dolus* (Hemiptera: Delphacidae) (Denno & Roderick, 1992). Após o desenvolvimento em diferentes densidades de ninfas, adultos de *D. citri* apresentaram maior propensão ao voo quando provenientes de brotações com alta densidade de ninfas. Contudo, os resultados do ajuste por GLM das proporções acumuladas indicou a inexistência de efeito do tratamento na propensão ao voo do inseto, embora as diferenças entre os tratamentos sejam evidentes. Provavelmente a análise de variância considerando valores acumulados teve grande influência do aumento na proporção de insetos que decolaram das plantas cítricas no sexto e no sétimo dia após a emergência, como observado para a curva gerada pelo ajuste GEE para o tratamento de baixa densidade de ninfas. Mesmo assim, considerando um efeito significativo da densidade de insetos em função do tempo pelo ajuste GEE, pode-se sugerir uma correlação positiva entre o aumento da densidade de insetos e a propensão ao voo de *D. citri*. Martini et al. (2015) verificaram que a dispersão a curta distância (15 cm) de *D. citri* foi maior quando adultos foram confinados nas densidades de 125 e 175 indivíduos por planta. Contudo, os autores não verificaram o efeito da densidade desde o desenvolvimento no estágio de ninfa, verificando o efeito apenas no estágio adulto. Assim, ambos os estudos são complementares e reforçam a necessidade de se controlar o inseto em áreas abandonadas, considerando que altas densidades populacionais podem gerar indivíduos mais propensos ao voo.

Apesar da grande importância das brotações na biologia reprodutiva (Yasuda et al., 2005; Wenninger & Hall, 2007) e na dispersão (Tomaseto et al., 2016) de *D. citri*, a adição de um hospedeiro com ou sem brotações não afetou a propensão ao voo do inseto. Esses resultados podem ser explicados pela incapacidade do método utilizado em detectar mudanças comportamentais, já que a adição de um hospedeiro pode não ter sido forte o suficiente para estimular ou não a decolagem de *D. citri*. Além disso, 50% da população havia emergido após 10 dias da transferência das ninfas e provavelmente esse período não tenha sido suficiente para o amadurecimento completo das brotações de desenvolvimento, diminuindo o efeito da

adição das plantas com e sem brotações no comportamento do inseto. Sendo assim, novos estudos devem ser realizados considerando o efeito desse fator diretamente no estágio adulto para confirmar a hipótese de que brotações podem alterar a decolagem de *D. citri*. Outra possibilidade para explicar os resultados obtidos, seria pelo fato da brotação isoladamente não ser suficiente para alterar a decolagem do inseto, sendo necessária a participação de outros fatores em conjunto para que o inseto seja estimulado a sair da planta. A realização de estudos considerando a interação de variáveis ambientais e diferentes condições da planta podem auxiliar na determinação da ordem de importância dos fatores atuantes na decolagem de *D. citri*.

Diante do exposto, a condição da planta hospedeira parece alterar o comportamento em voo de *D. citri*, e essas mudanças provavelmente ocorrem devido a disponibilidade de nutrientes no hospedeiro. Em ecologia, insetos tendem a economizar energia quando encontram um hospedeiro de alta qualidade nutricional, caracterizando a teoria do forrageamento ótimo (Pyke et al., 1977). Isso poderia justificar a menor propensão ao voo de *D. citri* em plantas com estresse hídrico, assumindo que a falta de água aumenta a concentração de aminoácidos livres no floema das plantas. Além disso, o aumento da densidade populacional de ninfas está associado ao incremento na propensão ao voo de *D. citri*, sendo explicado provavelmente devido à redução na disponibilidade de alimento nas plantas de citros. Plantas de citros com baixa qualidade nutricional e com altas densidades populacionais são comuns em pomares abandonados. De acordo com levantamento realizado pelo Fundecitrus em 2015, 7,5% do parque citrícola do estado de São Paulo e Minas Gerais estão abandonados ou em mau estado, totalizando aproximadamente 35000 ha. Assumindo que esses pomares abandonados apresentam deficiências nutricionais e altas populações do inseto vetor, é muito provável que a geração de psíldeos propensos ao voo nessas condições seja relativamente grande, aumentando ainda mais a importância desses locais na epidemiologia do HLB dos citros e exigindo ações imediatas para a eliminação dos mesmos.



### 3.5. Conclusões

- *Diaphorina citri* apresenta menor propensão ao voo quando confinado em *seedlings* de citros com estresse hídrico (30 e 50% da capacidade de campo) em relação a plantas com 70 e 100% da capacidade de campo;
- Plantas com baixa e alta qualidade nutricional geram adultos de *D. citri* com maior e menor propensão ao voo, respectivamente;
- Alta e baixa densidades populacionais de ninfas geram adultos de *D. citri* mais e menos propensos ao voo, respectivamente;

## REFERÊNCIAS

- An C, Fei X, Chen W & Zhao Z (2012) The integrative effects of population density, photoperiod, temperature, and host plant on the induction of alate aphids in *Schizaphis graminum*. *Archives of insect biochemistry and physiology* 79:198–206.
- Bassanezi RB, Busato LA, Filho AB, Amorim L & Gottwald TR (2005) Preliminary spatial pattern analysis of Huanglongbing in São Paulo, Brazil. *Proceedings of the 16th Conference of International Organization of Citrus Virologists, IOCV*. pp 341–354.
- Bassanezi RB, Lopes SA, Belasque Jr. J, Spósito MB, Yamamoto PT, Miranda MP De, Teixeira DDC & Wulff NA (2010) Epidemiologia do huanglongbing e suas implicações para o manejo da doença. *Citrus Research & Technology* 31:11–23.
- Bassanezi RB, Montesino LH, Gimenes-Fernandes N, Yamamoto PT, Gottwald TR, Amorim L & Filho AB (2013) Efficacy of area-wide inoculum reduction and vector control on temporal progress of Huanglongbing in young sweet orange plantings. *Plant Disease* 97:789–796.
- Bergamin-Filho A, Inoue-Nagata AK, Bassanezi RB, Belasque J, Amorim L, Macedo MA, Barbosa JC, Willocquet L & Savary S (2016) The importance of primary inoculum and area-wide disease management to crop health and food security. *Food Security* 8:221–238.
- Blackmer JL & Byrne DN (1993) Environmental and physiological factors influencing phototactic flight of *Bemisia tabaci*. *Physiological Entomology* 18:336–342.
- Bové JM (2006) Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of plant pathology* 88:7–37.
- Büßis D & Heineke D (1998) Acclimation of potato plants to polyethylene glycol-induced water deficit II. Contents and subcellular distribution of organic solutes. *Journal of Experimental Botany* 49:1361–1370.
- Byrne D, Rathman R, Orum T & Palumbo J (1996) Localized migration and dispersal by the sweet potato whitefly, *Bemisia tabaci*. *Oecologia* 105:320–328.
- Carmo-Sousa M, Moreno A, Garzo E & Fereres A (2014) A non-persistently transmitted-virus induces a pull-push strategy in its aphid vector to optimize transmission and spread. *Virus Research* 186:38–46.
- Coletta-Filho HD, Targon MLPN, Takita MA, De Negri JD, Pompeu J, Machado MA, do Amaral AM & Muller GW (2004) First report of the causal agent of Huanglongbing (“*Candidatus Liberibacter asiaticus*”) in Brazil. *Plant Disease* 88:1382–1382.

- Daugherty MP, Rashed A, Almeida RPP & Perring TM (2011) Vector preference for hosts differing in infection status: Sharpshooter movement and *Xylella fastidiosa* transmission. *Ecological Entomology* 36:654–662.
- Demétrio CGB, Hinde J & Moral RA (2014) Models for overdispersed data in entomology. *Ecological Modelling Applied to Entomology*. Springer, pp 219–259.
- Denno RF & Roderick GK (1992) Density-related dispersal in planthoppers: effects of interspecific crowding. *Ecology* 73:1323–1334.
- Douglas AE (2006) Phloem-sap feeding by animals: Problems and solutions. *Journal of Experimental Botany* 57:747–754.
- FUNDECITRUS [Fundo de Defesa da Citricultura] (2016) Levantamentos Greening. Available at: <http://www.fundecitrus.com.br/levantamentos/greening/10>.
- Gottwald TR, Aubert B & Long HK (1991) Spatial patterns analysis of citrus greening in Shantou, China. Eleventh IOCV Conference. pp 421–427.
- Gottwald T, Irej M, Gast T & Parnell S (2010) Spatio-temporal analysis of an HLB epidemic in Florida and implications for spread. Proceedings of the 17 th Conference of International Organization of Citrus Virologists, IOCV. pp 1–13.
- Halbert S (2005) The discovery of huanglongbing in Florida. Proceedings of the 2nd International Citrus Canker and Huanglongbing. Orlando, p 50.
- Hall DG & Hentz MG (2011) Seasonal flight activity by the Asian citrus psyllid in east central Florida. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 139:75–85.
- Hsiao TC (1973) Plant responses to water stress. *Annual Review of Plant Physiology* 24:519–570.
- Kobori Y, Nakata T & Ohto Y (2011) Estimation of dispersal pattern of adult Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). *Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology* 55:177–181.
- Kobori Y, Nakata T, Ohto Y & 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* 46:27–30.
- Liang K-Y & Zeger SL (1986) Longitudinal data analysis using generalized linear models. *Biometrika* 73:13–22.
- Malik NSA, Perez JL, Kunta M, Patt JM & Mangan RL (2014) Changes in free amino acids and polyamine levels in Satsuma leaves in response to Asian citrus psyllid infestation and water stress. *Insect Science* 21:707–716.

- Mann RS, Ali JG, Hermann SL, Tiwari S, Pelz-Stelinski KS, Alborn HT & Stelinski LL (2012) Induced release of a plant-defense volatile “deceptively” attracts insect vectors to plants infected with a bacterial pathogen. *PLoS Pathogens* 8:1–13.
- Martini X, Hoffmann M, Coy MR, Stelinski LL & Pelz-Stelinski KS (2015) Infection of an insect vector with a bacterial plant pathogen increases its propensity for dispersal. *PLoS ONE* 10:1–16.
- Martini X, Pelz-Stelinski KS & Stelinski LL (2016) Factors affecting the overwintering abundance of the Asian citrus psyllid (Hemiptera: Liviidae) in Florida citrus (Sapindales: Rutaceae) orchards. *Florida Entomologist* 99:178–186.
- Mattson WJ & Haack RA (1987) The role of drought in outbreaks of plant-eating insects. *Bioscience* 37:110–118.
- Nachappa P, Culkin CT, Saya PM, Han J & Nalam VJ (2016) Water stress modulates soybean aphid performance, feeding behavior, and virus transmission in soybean. *Frontiers in Plant Science* 7:552.
- Northfield TD, Mizell RF, Paini DR, Andersen PC, Brodbeck B V., Riddle TC & Hunter WB (2009) Dispersal, patch leaving, and distribution of *Homalodisca vitripennis* (Hemiptera: Cicadellidae). *Environmental Entomology* 38:183–191.
- Patt JM & Sétamou M (2010) Responses of the Asian citrus psyllid to volatiles emitted by the flushing shoots of its rutaceous host plants. *Environmental entomology* 39:618–24.
- Pyke G, Pulliam H & Charnov E (1977) Optimal foraging: a selective review of theory and tests. *Quarterly Review of Biology* 52:137–154.
- Rhains M & Shipp L (2003) Dispersal of adult western flower thrips (Thysanoptera: Thripidae) on chrysanthemum plants: impact of feeding-induced senescence of inflorescences. *Environmental entomology* 32:1056–1065.
- Sétamou M, Sanchez A, Patt JM, Nelson SD, Jifon J & Louzada ES (2011) Diurnal patterns of flight activity and effects of light on host finding behavior of the Asian citrus psyllid. *Journal of Insect Behavior* 25:264–276.
- Showler AT (2002) Effects of water deficit stress, shade, weed competition, and kaolin particle film on selected foliar free amino acid accumulations in cotton, *Gossypium hirsutum* (L.). *Journal of Chemical Ecology* 28:631–651.
- Su Q, Preisser EL, Zhou XM, Xie W, Liu BM, Wang SL, Wu QJ & Zhang YJ (2015) Manipulation of host quality and defense by a plant virus improves performance of whitefly vectors. *Journal of economic entomology* 108:11–19.

- Teixeira DC, Ayres AJ, Kitajima EW, Tanaka FAO, Danet JL, Jagoueix-Eveillard S, Saillard C & Bové JM (2005) First report of a Huanglongbing-like disease of citrus in Sao Paulo State, Brazil and association of a new *Liberibacter* species, “*Candidatus Liberibacter americanus*”,. *Plant Disease* 89:107.
- Tomaseto AF, Krugner R & Lopes JRS (2016) Effect of plant barriers and citrus leaf age on dispersal of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). *Journal of Applied Entomology* 140:91–102.
- Wedderburn RWM (1974) Quasi-likelihood functions, generalized linear models, and the Gauss-Newton method. *Biometrika* 61:439–447.
- Weninger E & Hall D (2007) Daily timing of mating and age at reproductive maturity in *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). *Florida Entomologist* 90:715–722.
- White TCR (1969) An index to measure weather-induced stress of trees associated with outbreaks of psyllids in Australia. *Ecology* 50:905–909.
- Wilson MR & Leather SR (2012) The effect of past natural enemy activity on host-plant preference of two aphid species. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 144:216–222.
- Yasuda K, Kawamura F & Oishi T (2005) Location and preference of adult Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) on Chinese box orange jasmine, *Murraya exotica* L. and Flat Lemon, *Citrus depressa*. *Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology* 49:146–149.
- Zeger SL & Liang K-Y (1986) Longitudinal data analysis for discrete and continuous outcomes. *Biometrics*:121–130.

#### 4. EFEITO DE ‘*Candidatus Liberibacter americanus*’ E ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ EM PARÂMETROS BIOLÓGICOS E COMPORTAMENTAIS DE *Diaphorina citri* KUWAYAMA (HEMIPTERA: LIVIIDAE)

##### Resumo

No estado de São Paulo, Brasil, o Huanglongbing dos citros é uma séria doença associada às bactérias ‘*Candidatus Liberibacter americanus*’ (Lam) e ‘*Ca. L. asiaticus*’ (Las), as quais são transmitidas para plantas saudáveis pelo psíldeo *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae). No ano de seu primeiro relato, a maioria das plantas sintomáticas estava infectada com Lam, contudo, após determinado período, a situação se inverteu, e a incidência de Las passou a predominar nos pomares brasileiros. Estima-se que aspectos associados à relação patógeno-hospedeiro possam explicar tal predominância. Porém, o conhecimento do efeito das liberibactérias no inseto vetor poderia fornecer evidências adicionais para explicar esse processo. Diante disso, o objetivo deste estudo foi verificar o efeito da infecção de Lam e Las na biologia, decolagem e preferência ao pouso de *D. citri*. Para estudar o efeito das bactérias em parâmetros biológicos, foram avaliados duração (ovo, ninfa e ciclo total), viabilidade (ovo, ninfa e ciclo total), longevidade de adultos, razão sexual, período de pré-oviposição e fecundidade de fêmeas. Além disso, foram determinados os índices de abortamento das plantas fonte utilizadas no experimento e construída uma tabela de vida de fertilidade. O efeito das bactérias no voo de *D. citri* foi verificado a partir do confinamento de insetos bacterilíferos em *seedlings* saudáveis de citros em gaiolas de garrafa plástica contendo tubos de 50 ml na tampa, para coletar indivíduos propensos ao voo. No ensaio para verificação da preferência ao pouso, adultos de *D. citri* foram confinados em gaiolas e submetidos a um teste de livre escolha, onde podiam escolher entre duas plantas para pouso (Lam x sadia, Las x sadia ou Lam x Las). Efeitos negativos induzidos por Lam e Las foram observados na viabilidade de ninfas, viabilidade do ciclo total e longevidade de fêmeas. Apesar de estatisticamente semelhante à Las, o efeito negativo de Lam na viabilidade aparentou ser mais pronunciado em populações de *D. citri*. A redução na viabilidade parece ter sido muito influenciada por aspectos relacionados à condição das plantas fonte, as quais apresentaram 91 e 78% das brotações abortadas para plantas Lam e Las, respectivamente. De acordo com a tabela de vida de fertilidade, insetos bacterilíferos que foram transferidos para *seedlings* de murta apresentaram redução na taxa líquida de reprodução, taxa intrínseca de crescimento e razão finita de crescimento. Além disso, o tempo necessário para duplicação da população foi maior para insetos que se desenvolveram em plantas-fonte Lam. Machos e fêmeas de *D. citri* apresentam maior propensão ao voo após o desenvolvimento em plantas Lam, com Las apresentando comportamento intermediário em relação à Lam e controle. Não foram encontrados efeitos das plantas fonte no pouso do inseto. Os resultados mostram que Lam induz alterações biológicas e comportamentais em *D. citri*. As alterações negativas na biologia de *D. citri* associadas a Lam sugerem que a relação patógeno-vetor pode ser um fator adicional condicionando a baixa incidência dessa bactéria nos pomares brasileiros.

Palavras-chave: Psíldeo-asiático-dos-citros; Huanglongbing; Relação bactéria-vetor

##### Abstract

In São Paulo State, Brazil, citrus Huanglongbing is a serious disease associated with the bacteria ‘*Candidatus Liberibacter americanus*’ (Lam) and ‘*Ca. L. asiaticus*’ (Las), which are transmitted to healthy plants by the Asian citrus psyllid *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae). In the year of HLB first report, most of symptomatic plants were Lam-infected, but,

after some time, the incidence changed, with Las being prevalent in the Brazilian orchards. It has been proposed that pathogen-host relationship aspects can explain Las prevalence. However, knowledge on the effect of liberibacteria on the insect vector could provide additional evidences to explain this process. Therefore, the objective of this study was to verify the effect of Lam and Las infection on the biology, take-off and settling preference of *D. citri*. To study bacterial effect on biological parameters, we evaluated some life-history traits, including development time (egg, nymph and egg to adult), survival (egg, nymph and egg to adult), adult longevity, sex ratio, preoviposition time and female fecundity. Furthermore, we determined shoots abortion index of the source plants used in the experiment and calculated a fertility life table. The effect of bacteria on the *D. citri* take-off was verified by confining individuals on healthy sweet orange seedlings inside clear plastic bottle cages with tubes of 50ml placed on the cap, in order to collect insects that initiated flights. In the test to evaluate settling preference, *D. citri* adults were confined inside cages and subjected to a free choice experiment, where they could choose between two plants to settle (Lam x healthy, Las x healthy and Lam x Las). Negative effects of Lam and Las were observed on nymph survival, egg to adult survival and adult longevity. Although nymphs viability between Lam and Las was statistically the same, the effect associated to Lam was apparently more pronounced on *D. citri* population. Viability decrease seems to be more influenced by aspects related to the source plants condition, which showed 91 and 78% of aborted shoots in Lam and Las, respectively. According to the fertility life table, bacteriferous insects that were transferred to orange jasmine seedlings showed decrease in the net reproductive rate, the intrinsic rate of increase and the finite rate of increase. Furthermore, the doubling time was higher for Lam-positive insects. Male and female of *D. citri* showed higher propensity to fly after development on Lam source plants, with Las showing intermediate behavior between Lam and control plants. Effect of source plants on settling preference was not observed. The results show that Lam induces biological and behavioral changes in *D. citri*. The negative effects of Lam on *D. citri* biology suggest that the pathogen-vector relationship may be an additional factor determining the low incidence of this bacterium in Brazilian orchards.

Keywords: Asian citrus psyllid; Huanglongbing; Pathogen-vector relationships

#### 4.1. Introdução

Huanglongbing (HLB) é a principal doença da citricultura mundial. Seus danos estão relacionados diretamente à queda de rendimento e produtividade da planta, além dos expressivos custos associados ao seu manejo, o que representa prejuízos econômicos consideráveis ao setor. De acordo com relatórios apresentados por citricultores do estado de São Paulo para a Coordenadoria de Defesa Agropecuária (CDA, 2016), 42,6 milhões de árvores cítricas foram erradicadas de 2005 até 2015 e a incidência aumentou aproximadamente 30 vezes de 2008 para 2015, atingindo 17,9% das árvores do parque citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste de Minas Gerais (FUNDECITRUS, 2016). Esses dados mostram o grande impacto da doença na cadeia produtiva citrícola do país e ressaltam a importância de estudos que possam contribuir para o entendimento da epidemiologia do HLB dos citros.

No Brasil, o HLB está associado predominantemente a bactérias candidatas ao gênero *Liberibacter*, sendo elas ‘*Candidatus Liberibacter americanus*’ (Lam) e ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ (Las) (Coletta-Filho et al., 2004; Teixeira, Ayres, et al., 2005; Teixeira,

Saillard, et al., 2005). O ciclo da doença ocorre a partir da aquisição, retenção e inoculação desses patógenos em plantas sadias por meio do inseto vetor *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae).

O primeiro relato do HLB nos pomares brasileiros ocorreu no ano de 2004, em propriedades localizadas na região central do estado de São Paulo (Coletta-Filho et al., 2004; Teixeira, Ayres, et al., 2005). Nesse ano, 98% das amostras de árvores sintomáticas eram positivas para Lam (Teixeira, Saillard, et al., 2005). Quatro anos depois, a situação se inverteu, sendo observada a predominância de Las (Lopes, Frare, et al., 2009; Lopes, Bertolini, et al., 2009). As informações na literatura sugerem que o predomínio de Las poderia estar associado à maior concentração desta em árvores sintomáticas (Lopes, Bertolini, et al., 2009), o que aumentaria as chances de aquisição pelo vetor. Outra hipótese para o predomínio desta espécie bacteriana seria a sensibilidade de Lam a temperaturas superiores a 32 °C (Lopes, Frare, et al., 2009), semelhantemente ao que ocorre com ‘*Candidatus Liberibacter africanus*’ (bactéria associada ao HLB no continente africano) (Bové et al., 1974). Sabe-se que os sintomas causados por Lam em plantas de citros são muito mais severos que aqueles causados por Las, sugerindo uma vantagem adaptativa da espécie asiática em comparação com a americana (Lopes & Frare, 2008; Lopes, Frare, et al., 2009).

Além das hipóteses associadas à relação patógeno-hospedeiro, as diferenças nas predominâncias das bactérias nos pomares brasileiros poderiam também ser explicadas por aspectos associados à relação patógeno-vetor. Considerando a íntima relação dessas bactérias com células eucarióticas e a capacidade delas em sobreviver e crescer dentro de artrópodes vetores (Jagoueix et al., 1994), uma relação menos específica ou menos favorável com o vetor poderia alterar a epidemiologia da doença e conseqüentemente desfavorecer a perpetuação de um dos agentes causais, o que explicaria também as diferenças no número de plantas infectadas com Lam e Las no Brasil. Os relatos de interações das bactérias com o inseto vetor no âmbito de possíveis mudanças no comportamento e biologia são escassos ou não existem (como é o caso da relação Lam/*D. citri*). Para Las, sabe-se que a bactéria pode alterar a suscetibilidade do inseto a inseticidas (Tiwari et al., 2011), melhorar parâmetros reprodutivos com redução da sobrevivência (Pelz-Stelinski & Killiny, 2016) e alterar a capacidade de voo (Martini et al., 2015). A partir dessas constatações é relevante considerar que Lam possa mediar também alterações em parâmetros biológicos e comportamentais do inseto, o que poderia fornecer hipóteses adicionais para explicar a atual predominância de uma bactéria em relação à outra.



Considerando a grande importância do conhecimento da relação fitopatógeno-vetor com o intuito de se explicar a evolução da predominância dos agentes causais associados ao HLB dos citros, os objetivos deste estudo foram avaliar comparativamente o efeito da infecção de Lam e Las na biologia, decolagem e preferência ao pouso de *D. citri*.

## **4.2. Material e Métodos**

### **4.2.1. Criação de psíldeos sadios**

Os insetos utilizados nos ensaios de verificação do efeito das bactérias na biologia, propensão ao voo e preferência ao pouso foram obtidos da colônia de *D. citri* do Laboratório de Insetos Vetores de Fitopatógenos da ESALQ/USP, originalmente estabelecida com indivíduos coletados em plantas de murta [*Murraya paniculata* (L.) Jack (Rutaceae)] em Piracicaba, São Paulo, Brasil, em 2008. Essa colônia foi mantida em *seedlings* de murta em gaiolas [50 (altura) x 35 (profundidade) x 35 cm (largura)] confeccionadas com perfis de alumínio, tecido vaporoso do tipo *voile* e porta de acrílico, em sala climatizada [ $25 \pm 2$  °C,  $70 \pm 10\%$  UR, 14:10 h (claro: escuro)]. As plantas foram produzidas e mantidas em casa-de-vegetação, sendo periodicamente podadas e adubadas (NPK 4-14-8) para emissão de brotações, as quais são locais preferidos para oviposição do inseto. Para garantir a utilização de insetos sadios, amostras da população foram constantemente submetidas à extração de DNA e teste qPCR.

### **4.2.2. Obtenção e manutenção de plantas-fonte e sadias**

A obtenção de plantas-fonte para os ensaios de biologia, propensão ao voo e preferência ao pouso foi realizada a partir da enxertia de gemas (oriundas de plantas sintomáticas e qPCR positivas para Lam e Las) em mudas de laranja doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck (Rutaceae)] ‘Pêra’ enxertadas sobre limão cravo [*Citrus limonia* Osbeck (Rutaceae)]. Para o controle negativo, o mesmo procedimento de enxertia foi realizado, porém com a utilização de gemas oriundas de plantas sadias. Foram enxertadas 70, 50 e 30 plantas com gemas infectadas com Lam, Las e controle, respectivamente. Após a enxertia, as plantas foram mantidas em estufa com controle de temperatura para garantir o desenvolvimento bacteriano na planta [considerando que Lam é sensível a temperaturas superiores a 32° C (Lopes, Frare, et al., 2009)] e adubadas periodicamente com Osmocote (NPK 20-20-20) (The

Scotts Company, Marysville, OH, USA). Aproximadamente cinco meses após a enxertia, as plantas foram avaliadas quanto à expressão de sintomas e posteriormente realizada a extração de DNA e teste de qPCR. Foram escolhidas para os bioensaios de biologia, propensão ao voo e preferência ao pouso, plantas que apresentavam ramos sintomáticos e eram qPCR positivas para Lam e Las, considerando valores de *Cycle threshold* (Ct) menores que 35.

As plantas de murta (*M. paniculata*) oferecidas aos casais no ensaio de biologia de *D. citri*, foram obtidas a partir do desenvolvimento de sementes e as mudas transplantadas para tubetes de plástico de 290 cm<sup>3</sup>. Essas plantas foram podadas periodicamente e adubadas com Osmocote (NPK 20-20-20) para obtenção de brotações adequadas à postura, considerando que a biologia reprodutiva do inseto é dependente de brotos não expandidos (Yasuda et al., 2005; Wenninger & Hall, 2007).

Para o ensaio de verificação do efeito das bactérias na propensão ao voo do inseto, após a aquisição em plantas fonte, insetos adultos foram transferidos para *seedlings* de laranja doce 'Caipira', condicionados em tubetes de plástico com volume de 55 cm<sup>3</sup>, para completar a latência da bactéria no inseto. Após esse período, os psilídeos foram transferidos novamente para *seedlings* de laranja doce, porém condicionados em vasos de 1,5 L para realização do teste de propensão ao voo. Em ambos os casos, as plantas foram adubadas com Osmocote (NPK 20-20-20) e podadas três semanas antes da realização do experimento para obtenção ramos jovens, considerando a preferência do inseto por planta com brotações (Patt & Sétamou, 2010; Kobori, Nakata, & Ohto, 2011).

#### **4.2.3. Efeito de Lam e Las na biologia de *Diaphorina citri***

Para testar a hipótese que Lam e Las alteram a biologia de *D. citri*, indivíduos que se desenvolveram em plantas-fonte das bactérias foram comparados com indivíduos sadios, considerando os seguintes parâmetros: duração (ovo, ninfa e ciclo total), viabilidade (ovo, ninfa e ciclo total), longevidade de adultos, razão sexual, período de pré-oviposição e fecundidade de fêmeas.

Grupos de cinco casais sadios de *D. citri* com aproximadamente 15 dias de idade foram transferidos para duas ou três brotações (5-10 cm de comprimento) de ramos sintomáticos de cinco e sete plantas-fonte de Lam e Las, respectivamente. O mesmo foi realizado com sete plantas sadias. Após um período de oviposição de 24 h, os insetos foram retirados das plantas, sendo realizada a contagem do número de ovos com auxílio de um microscópio estereoscópico, permitindo a determinação da duração e viabilidade do estágio

de ovo nas plantas-fonte. A partir da eclosão das ninfas, foi acompanhado o desenvolvimento dos imaturos, determinando-se a duração e viabilidade ninfal. Com o intuito de se verificar o efeito das bactérias no ciclo de desenvolvimento das ninfas, foi realizada uma análise de estrutura etária após oito e 15 dias da postura, a partir da contagem do número de indivíduos por instar em cada planta-fonte.

Após o desenvolvimento ninfal, foi avaliada, diariamente, a emergência dos adultos, permitindo a determinação da duração e viabilidade do ciclo de desenvolvimento e razão sexual.

Para verificar os efeitos diretos e indiretos das bactérias nos parâmetros reprodutivos e longevidade de *D. citri*, após a emergência, foram formados casais e estes transferidos para dois grupos de hospedeiros: murta e plantas de citros. Na utilização de murta como hospedeiro, foram formados 12 casais de cada tratamento e estes confinados em brotações de *seedlings* da planta. Para as transferências em plantas de citros, foram formados oito casais de insetos oriundos apenas das plantas-fonte Las e sadias e estes confinados em brotações de novas plantas Las e sadias. Não foi possível avaliar os efeitos de Lam em casais transferidos novamente para plantas-fonte Lam devido à baixa disponibilidade de mudas de citros infectadas com essa bactéria. O confinamento dos casais ocorreu a partir da utilização de gaiolas confeccionadas com tecido do tipo *voile*. Foi considerado o período de pré-oviposição, o momento em que se visualizaram os primeiros ovos nas plantas testes. Após esse período, as plantas foram trocadas a cada dois dias (*seedlings* de murta) e a cada quatro dias (plantas de citros fonte de Las e sadias) para tornar possível a contagem dos ovos e a disponibilização de brotações adequadas à oviposição. A contagem do número de ovos foi realizada novamente com a ajuda de um microscópio estereoscópico. Os casais foram mantidos nessa condição até a morte, permitindo a determinação da longevidade dos mesmos. Após a morte dos insetos, estes foram armazenados em álcool absoluto e desse grupo foram retiradas amostras de 10 indivíduos que se desenvolveram em cada planta fonte e procedida a extração de DNA com posterior teste de qPCR para verificação da infectividade dos mesmos. O experimento foi conduzido em condições de laboratório [ $25 \pm 1$  °C e 14:10 h (claro:escuro)].

Após a determinação dos valores de razão sexual, viabilidade de ovo a adulto, período de pré-oviposição, longevidade de adultos e ritmo diário de postura, foi construída uma tabela de vida de fertilidade considerando os seguintes parâmetros:  $R_0$  = taxa líquida de reprodução,  $r_m$  = taxa intrínseca de crescimento,  $T$  = intervalo médio entre gerações (dias),  $\lambda$  = razão finita de crescimento e  $T_d$  = tempo de duplicação (dias) (Southwood, 1978).

Considerando os efeitos negativos das bactérias na planta hospedeira, o que indiretamente poderia afetar a biologia do inseto, foi determinado, após seis dias da postura, a porcentagem de brotações abortadas em cada planta teste. Consideraram-se como brotações abortadas aquelas que apresentavam a parte apical de cor mais escura (indicando necrose do tecido), com região de abortamento bem caracterizada e intensa queda dos primórdios foliares.

#### **4.2.4. Efeito de Lam e Las na decolagem de *Diaphorina citri***

Para verificar o efeito das bactérias na propensão ao voo de *D. citri*, foi procedida a transferência, com auxílio de um pincel umedecido, de grupos de 500 ninfas de 3<sup>o</sup>/4<sup>o</sup> instares para brotações (5-10 cm de comprimento) oriundas de ramos sintomáticos de plantas-fonte Lam, Las e sadias. As ninfas foram confinadas em gaiolas confeccionadas a partir de copo plástico de 500 ml e cobertas com tecido vaporoso do tipo *voile*. Para cada tratamento os insetos foram distribuídos em três plantas-fonte. Após um período de acesso à aquisição (PAA) de sete dias, transferiu-se os adultos para *seedlings* de laranja doce ‘Caipira’ (também confinados em gaiolas de copos plásticos de 500ml), para um período de latência de aproximadamente 15 dias (Canale et al., 2016). Após esse período, procedeu-se a transferência de grupos de 25 insetos, com auxílio de um aspirador entomológico, para *seedlings* de laranja doce ‘Caipira’ contendo brotações e estes foram confinados em gaiolas construídas a partir de garrafas PET. Para avaliar a propensão ao voo, foram realizadas contagens do número de insetos que entravam em tubos plásticos de 50 ml acoplados na tampa dessas gaiolas, assim como descrito no item 2.2.4. O objetivo dos tubos de 50 ml foi coletar indivíduos dispostos a abandonar a planta hospedeira, assumindo que esse comportamento está associado à propensão ao voo do inseto. As avaliações se iniciaram no dia seguinte após a transferência dos insetos (para aclimação em planta), com contagens diárias dos indivíduos que entraram nos tubos, de acordo com cada tratamento, até completar sete dias após o início do experimento. Em cada período de avaliação, foi verificado o sexo de todos os psíldeos propensos a voar coletados nos tubos. Para cada tratamento foram realizadas 10 repetições, sendo cada uma representada por um *seedling* de citros. O experimento foi mantido em sala climatizada [ $27 \pm 1$  °C e 14:10 h (Luz:Escuro)] com raques de luz fluorescentes alocadas acima das gaiolas.

#### 4.2.5. Preferência para pouso em plantas Lam, Las e controle

Adicionalmente aos ensaios de verificação do efeito das bactérias na biologia e na propensão ao voo de *D. citri*, foi realizado um estudo comportamental para avaliar a preferência ao pouso em plantas Lam, Las e sadias. O experimento foi caracterizado por um teste de livre escolha, onde adultos de *D. citri* podiam escolher entre duas plantas teste para pouso. Plantas sintomáticas e qPCR positivas tanto para Lam quanto para Las, além de plantas sadias, foram utilizadas no experimento. Os tratamentos consistiram de três diferentes combinações de plantas: Lam x Sadia, Las x Sadia e Lam x Las. Cada combinação foi colocada em uma gaiola distinta, nas dimensões de 75 (largura) x 75 (profundidade) x 115 cm (altura) (Bugdorm, modelo BF2400F, MegaView Science Co., Ltda, Taiwan). Grupos de 40 insetos adultos, com aproximadamente 15 dias de idade, foram transferidos para tubos de vidro com 7,07 cm<sup>3</sup> de volume e mantidos nesse recipiente por aproximadamente 30 min. Após esse período, os tubos foram encaixados no centro de plataformas de plástico [15 (largura) x 15 (profundidade) x 0,5 cm (espessura)] penduradas na parte superior das três gaiolas destinadas ao estudo. O experimento iniciou-se com a abertura dos tubos, permitindo a saída dos insetos para a escolha de uma planta hospedeira. Foram realizadas avaliações visuais a partir da contagem do número de indivíduos em cada planta teste após 2, 6 e 24 h da liberação. O ensaio foi conduzido em condições de laboratório [25 ± 2 °C e 14:10 h (Luz:Escuro)]. Foram realizadas 12 repetições em diferentes dias com a utilização de distintos grupos de insetos. Devido à baixa disponibilidade de plantas-fonte, estas foram trocadas a cada 4 repetições. Para garantir a casualização, o posicionamento das plantas dentro de cada gaiola e entre as gaiolas foi alterado em cada repetição.

#### 4.2.6. Extração de DNA das plantas e insetos

Após avaliação da expressão de sintomas de plantas previamente inoculadas através de enxertia de gemas oriundas de plantas positivas para Lam e Las, procedeu-se a coleta de cinco folhas para posterior realização da extração do DNA. O DNA total das folhas de citros foi extraído seguindo o método brometo cetil trimetil amônio (CTAB) com modificações (Murray & Thompson, 1980; Coletta-Filho et al., 2014). Com auxílio de lâminas, foi realizada a excisão dos pecíolos e procedido o corte em pedaços pequenos para posterior maceração usando almofarizes e pistilos (ambos de cerâmica). Os pedaços foram macerados em 1000 µL de tampão de extração (100 mM Tris-HCl pH 7,5; 50 mM NaCl). Cada amostra foi transferida

individualmente para microtubos de 2,0 mL e foi adicionado 500 µL do tampão CTAB (CTAB 5%; PVP 10%; 140mM Mercaptoetanol). A mistura foi mantida a 65° C por 30 min e depois centrifugada a 3500 rpm por 5 min. Posteriormente 700 µL do sobrenadante foi transferido para microtubos de 1,5 mL e acrescentado o mesmo volume de CIA (Clorofórmio/Álcool Isoamílico 24:1). A mistura foi centrifugada a 11700 rpm por 5 min e em seguida adicionado isopropanol. Após esse período, as amostras foram condicionadas em freezer (-20 °C) por 24 h, e posteriormente realizou-se a centrifugação das mesmas nas condições de 11700 rpm por 20 min, sendo em seguida descartado o sobrenadante. Os tubos então, foram lavados com álcool 70% e centrifugados a 11700 rpm por 5 min. O sobrenadante foi novamente descartado e os tubos colocados em estufa a 55 °C por 30 min para secagem do *pellet*. Após secos, foi acrescentado 50 µL de água MilliQ para reidratar o DNA. As amostras foram mantidas em freezer (-20 °C) até a realização da análise de qPCR.

Para extração do DNA total dos insetos, psilídeos foram individualizados e tiveram seu DNA extraído de acordo com o protocolo de Deng et al. (2006), modificado por Coletta-Filho et al. (2014). As amostras foram colocadas em microtubos de 1,5 mL com 50 µL de tampão STE (10 mM Tris HCl; 1 mM EDTA; 25 mM NaCl). Os insetos foram macerados com auxílio de pistilos de plástico previamente autoclavados e em seguida foi adicionado 10 µL de Proteinase K (200 µg/mL) e mantidos a 56 °C por 30 min. Posteriormente, os tubos foram centrifugados brevemente e o sobrenadante (≈40 µL) retirado cuidadosamente e transferido para outro microtubo de 1,5 mL. Com a utilização do Kit Wizard (DNA Purification, Kit Wizard Genomic, Promega®, CA cat# A1125), foram adicionados 100 µL de *Nucleic Lysis Solution* às amostras, agitando-se vigorosamente e posteriormente mantidas a 80 °C por 5 min. Após esse período foi acrescentado 30 µL de *Protein Precipitation Solution* à temperatura ambiente, agitado vigorosamente e mantidos a 0 °C por 5 min. Após esse período, os microtubos foram centrifugados a 13000 rpm por 5 min e em seguida retirado ≈140 µL do sobrenadante, sendo este transferido para novos microtubos de 1,5 mL. Acrescentou-se 100 µL de Álcool Isopropílico e os tubos mantidos a -20 °C por 2 h. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por 5 min e em seguida o sobrenadante foi descartado (≈230 µL), e acrescentou-se 150 µL de álcool 70% ao *pellet* no microtubo. Centrifugou-se a 14000 rpm por 5 min e em seguida o sobrenadante foi descartado novamente. Após, os microtubos foram colocados abertos por aproximadamente 15 min a 50 °C. Posteriormente foi acrescentado 50 µL de TE + RNase e as amostras colocadas novamente em estufa a 37 °C por 30 min para ação da RNase. Depois do DNA extraído, as amostras ficaram acondicionadas em freezer -20 °C até a realização da análise molecular.

#### 4.2.7. PCR quantitativo em tempo real

Utilizou-se a técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) para detecção e quantificação do DNA de Lam e Las nas amostras de insetos e plantas.

Foram utilizados os primers e sonda desenhados a partir da região 16S do rDNA de Las (Coletta-Filho et al., 2010). Foi feita a seguinte mistura para amplificação do DNA: 1,08 µL dos oligonucleotídeos iniciadores (AS84F, 5'-TCACCGGCAGTCCCTATAAAAGT-3' e AS180R, 5'-GGGTAAAGTCCCGCAACGA-3') e da sonda FAM (AS111T, 5'-ACATCTAGGTAAAAACC-3'); 6,75 µL de TaqMan Universal MasterMix (Applied Biosystems); 3 µL do DNA (planta ou inseto); e completando com água MilliQ para o volume final de 13 µL. A amplificação foi realizada no aparelho ABI PRISM 7500 Fast Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, USA) de acordo com o seguinte protocolo padrão: 2 min a 50 °C e 10 min a 95 °C seguido de 40 ciclos de amplificação (15 s a 95 °C e 1 min a 60 °C). Os resultados foram analisados com o software 7500 versão 2.0.5 (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, USA). As reações foram procedidas em placa de 96 poços e as amostras realizadas em duplicatas. Foi utilizado um controle positivo oriundo de amostras de DNA de planta ou de insetos previamente positivos para a bactéria. Água MilliQ e insetos ou plantas sadios foram utilizados como controle negativo. Através do software, foram obtidos valores de *Cycle threshold* (Ct), calculados pelo número de ciclos necessários para a detecção da fluorescência da sonda, sendo consideradas positivas amostras com valores menores ou iguais a 35.

Para detecção de Lam em amostras de DNA de plantas e insetos, utilizou-se o par de primers Ame-67F (5' – CACCTTCCTCCGGCTTATCA – 3') e Ame-144R (5' – GCGCAACCCCTGCCTAT – 3') e a sonda Ame-FAM6-MGB (5' – CCTATAAAGTTCCCAACTTA – 3'). Os oligonucleotídeos e a sonda foram desenhados a partir da sequência da região 16S rDNA de Lam. A solução submetida ao teste por amostra constituiu-se de 0,8 µL de cada *primer* e da sonda FAM; 6,5 µL de TaqMan Universal MasterMix (Applied Biosystems Foster City, Califórnia, USA); 4 µL do DNA (planta ou inseto); e completando com água MilliQ para o volume final de 13 µL. A amplificação foi realizada nas mesmas condições descritas para Las.

#### 4.2.8. Análise de dados

No estudo do efeito das bactérias na biologia de *D. citri*, os tratamentos dos dados de duração (ovo, ninfa e ciclo total), período de pré-oviposição e longevidade foram comparados por meio de testes Log-rank, considerando  $P < 0,05$ . Para os dados de longevidade, inicialmente foi aplicado o teste considerando todo o período de desenvolvimento, contudo, verificou-se que a partir de 50% da mortalidade, para os casais que se desenvolveram em plantas de murta, as curvas comportavam-se de maneira distintas, justificando a realização do teste em duas partes, considerando indivíduos que viveram até 14 dias e indivíduos que viveram mais que 14 dias.

Para os parâmetros: razão sexual, viabilidade e número de ovos, foram ajustados modelos lineares generalizados (GLM) com distribuições do tipo binomial, quasi-binomial e quasi-poisson, respectivamente. Para esses dados, foi realizada uma análise de variância (ANOVA) aplicando-se um teste qui-quadrado ( $P < 0,05$ ) para os dados de razão sexual e teste F ( $P < 0,05$ ) para os dados de viabilidade e número de ovos. Comparações múltiplas das médias foram realizadas a partir da obtenção de intervalos de confiança (95 %) para os preditores lineares.

A estimativa dos parâmetros da tabela de vida de fertilidade foi realizada pelo método Jackknife e as médias dos parâmetros de cada tratamento comparadas dois a dois por meio de teste T bilateral ( $P < 0,05$ ), assim como descrito por Maia et al. (2000).

Para os dados de avaliação da estrutura etária de ninfas desenvolvidas em plantas fonte, foi procedida uma análise de tabela de contingência para verificação estatística do efeito das plantas fonte no número de indivíduos visualizados por instar. Foram ajustados modelos log-lineares com preditor linear saturado e aditivo e realizado um teste de diferença de desvios (d.d.) ( $P < 0,05$ ) para avaliar a significância da interação entre planta fonte e instares ninfais. Ademais, para o número de ninfas visualizadas após 15 dias da postura, foram calculadas as razões de chances (*odds ratio*) comparando a soma do número de indivíduos observados do 2º ao 4º instar com os indivíduos do 5º instar. As razões de chances foram realizadas para Lam x Las, Ctr x Lam e Ctr x Las aplicando-se novamente o teste de diferença de desvios (d.d.) ( $P < 0,05$ ).

No estudo para verificação do efeito das bactérias na propensão ao voo de *D. citri*, os resultados das proporções de insetos propensos e não propensos ao voo foram analisados por meio do ajuste de modelos de equações de estimativas generalizadas (GEE), assumindo uma estrutura de correlação do tipo *exchangeable*. A análise via GEE realiza a estimativa de



equações de correlação de dados longitudinais, especialmente quando eles são binários ou em forma de contagem (Liang & Zeger, 1986; Zeger & Liang, 1986), sendo uma extensão do procedimento de *quasilielihood* usado em modelos lineares generalizados (GLM) (Wedderburn, 1974). Foi verificado o efeito do tratamento, do sexo, do tempo e a interação entre eles por meio de teste qui-quadrado ( $P < 0,05$ ).

Para o ensaio de preferência ao pouso, os dados de proporção de insetos foram ajustados a modelos mistos lineares generalizados do tipo binomial incluindo um intercepto aleatório por unidade experimental e efeito fixo do tempo. Testes de razão de verossimilhança [*Likelihood-ratio* (L.R.)] foram realizados para comparar as diferenças entre as proporções de insetos em cada tipo de planta entre os períodos de observação ( $P < 0,05$ ). Para avaliar se as proporções diferiram de 50 %, foi procedido um teste Wald baseando-se nas estimativas dos parâmetros e erros padrões ( $P < 0,05$ ).

Todas as análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software estatístico R v. 3.2.3 (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria), com exceção da estimativa e comparação dos parâmetros da tabela de vida de fertilidade, os quais foram realizados com a utilização do software SAS Studio 3.5 (SAS Institute Inc., Cary, Carolina do Norte, USA).

### **4.3. Resultados**

#### **4.3.1. Efeito de Lam e Las na biologia de *Diaphorina citri***

##### **4.3.1.1. Avaliação da estrutura etária de ninfas desenvolvidas em plantas fonte**

Os resultados observados mostram que após oito dias da postura em plantas-fonte, as ninfas em estágio inicial de desenvolvimento ainda não haviam sido afetadas direta ou indiretamente pelas bactérias (d.d. = 8,83; g.l. = 4;  $P = 0,065$ ) (Tabela 1), ocorrendo um predomínio superior a 80% de indivíduos do 2º instar, independente da planta-fonte de desenvolvimento. O restante de ninfas encontrava-se semelhantemente distribuído entre primeiro e terceiro instares. Situação oposta foi observada após 15 dias da postura, sendo observadas alterações no número de indivíduos por instar de acordo com os diferentes tratamentos (d.d. = 72,5; g.l. = 6;  $P < 0,01$ ) (Tabela 2). Utilizando os dados da tabela 2, ao comparar a soma de insetos do primeiro ao quarto instar com o número de ninfas de quinto instar, verificou-se que ninfas que se desenvolveram em plantas sadias apresentavam 11,4

vezes mais chances de chegar ao quinto instar que aquelas que se desenvolveram em plantas Las (d.d. = 52,75; g.l. = 1;  $P < 0,01$ ). Em comparação com Lam, ninfas desenvolvidas em plantas sadias apresentaram 1,9 vezes mais chances de chegar ao quinto instar, contudo, a diferença não foi significativa (d.d. = 1,31; g.l. = 1;  $P = 0,25$ ). Quando comparados os indivíduos que se desenvolveram nas plantas-fonte, foi verificado que a chance de ninfas atingirem o quinto instar em planta-fonte Lam foi 6,1 vezes maior do que aquelas em Las (d.d. = 17,93; g.l. = 1;  $P < 0,01$ ).

**Tabela 1.** Número e porcentagem de ninfas de *Diaphorina citri* visualizadas, após oito dias da postura, em plantas sadias e fonte de ‘*Candidatus Liberibacter americanus*’ (Lam) e ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’ (Las). Avaliação do efeito das bactérias associadas ao HLB dos citros nos diferentes instares do inseto (estrutura etária)

Planta-fonte	n <sup>1</sup>	Ínstares ninfais			Total	d.d. <sup>2</sup>	g.l.	P
		1º	2º	3º				
Sadia	7	19 (11,9 % <sup>3</sup> )	135 (84,9 %)	5 (3,1 %)	159			
Lam	5	9 (9,0 %)	89 (89,0 %)	2 (2,0 %)	114	<b>8,8</b>	<b>4</b>	<b>0,065</b>
Las	7	20 (17,5 %)	94 (82,5 %)	0 (0,0 %)	100			

<sup>1</sup>Número de plantas-fonte avaliadas

<sup>2</sup>Diferença de desvios

<sup>3</sup>Porcentagem de ninfas visualizadas por instar em relação ao total de cada tratamento

**Tabela 2.** Número e porcentagem de ninfas de *Diaphorina citri* visualizadas, após 15 dias da postura, em plantas sadias e fonte de ‘*Candidatus Liberibacter americanus*’ (Lam) e ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’ (Las). Avaliação do efeito das bactérias associadas ao HLB dos citros nos diferentes instares do inseto (estrutura etária)

Planta-fonte	n <sup>1</sup>	Ínstares ninfais				Total	d.d. <sup>2</sup>	g.l.	P
		2º	3º	4º	5º				
Sadia	7	0 (0,0% <sup>3</sup> )	0 (0,0%)	11 (6,6%)	155 (93,4%)	166			
Lam	5	1 (2,0%)	4 (7,8%)	1 (2,0%)	45 (88,2%)	51	<b>72,5</b>	<b>6</b>	<b>&lt;0,01</b>
Las	7	6 (6,4%)	15 (16,0%)	21 (22,3%)	52 (55,3%)	94			

<sup>1</sup>Número de plantas-fonte avaliadas

<sup>2</sup>Diferença de desvios

<sup>3</sup>Porcentagem de ninfas visualizadas por instar em relação ao total de cada tratamento

#### 4.3.1.2. Índices de abortamento de brotações

De acordo com os resultados da Tabela 3, verificou-se, após seis dias da postura em plantas-fonte, índices de abortamento das brotações de 20,0, 90,9 e 64,3 nas plantas sadias, Lam e Las, respectivamente.

**Tabela 3.** Número de brotações abortadas em função do total avaliado e determinação dos índices de abortamento (%), após seis dias da postura de *Diaphorina citri*, de planta sadias (Ctr) e fonte de ‘*Candidatus Liberibacter americanus*’ (Lam) e ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’ (Las)

Planta-fonte	Brotações		Planta-fonte	Brotações		Planta-fonte	Brotações	
	Abortadas	Total		Abortadas	Total		Abortadas	Total
Ctr 1	0	2	Lam 1	2	2	Las 1	0	3
Ctr 2	1	2	Lam 2	2	2	Las 2	2	2
Ctr 3	0	2	Lam 3	1	2	Las 3	3	3
Ctr 4	0	2	Lam 4	2	2	Las 4	3	3
Ctr 5	1	2	Lam 5	3	3	Las 5	0	1
Ctr 6	1	3	-	-	-	Las 6	1	1
Ctr 7	0	2	-	-	-	Las 7	0	1
<b>Soma</b>	<b>3</b>	<b>15</b>	<b>Soma</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>Soma</b>	<b>9</b>	<b>14</b>
<b>%<sup>1</sup></b>	<b>20</b>	<b>%</b>	<b>90,9</b>	<b>%</b>	<b>64,3</b>			

<sup>1</sup>Índice de abortamento de brotações (%) calculado a partir do número de brotações abortadas em função do total avaliado

#### 4.3.1.3. Efeito de Lam e Las na duração, viabilidade e razão sexual de *Diaphorina citri*

A duração média de ovo, ninfa e ciclo total (ovo a adulto) de *D. citri* não foi afetada pelo desenvolvimento em plantas-fonte de Lam e Las em comparação com plantas sadias (Tabela 4). A inexistência de efeito das plantas-fonte também foi observada para os parâmetros viabilidade de ovos e razão sexual de adultos (Tabela 5). Efeitos significativos foram observados para as viabilidades de ninfa e de ovo a adulto. De acordo com os resultados, o desenvolvimento em plantas-fonte reduziu o número de ninfas e ovos que chegaram ao estágio adulto.

**Tabela 4.** Duração média  $\pm$  EPM de *Diaphorina citri* criados em plantas sadias e fonte de ‘*Candidatus Liberibacter americanus*’ (Lam) e ‘*Ca. L. asiaticus*’ (Las)

Planta-fonte	n	Duração (dias)		
		Ovo	Ninfa	Ovo a adulto
Sadia	7	4,78 $\pm$ 0,20 a <sup>1</sup>	17,90 $\pm$ 0,46 a	22,70 $\pm$ 0,45 a
Lam	5	4,44 $\pm$ 0,12 a	18,10 $\pm$ 0,90 a	22,40 $\pm$ 0,40 a
Las	7	4,57 $\pm$ 0,16 a	19,50 $\pm$ 0,90 a	24,10 $\pm$ 1,04 a
<i>Log-rank</i>		1,56	2,54	2,53
<i>g.l.</i>		2	2	2
<i>P</i>		0,46	0,28	0,28

<sup>1</sup>Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si a 5% de significância

**Tabela 5.** Viabilidade média  $\pm$  EPM e razão sexual de *Diaphorina citri* criados em plantas sadias e fonte de ‘*Candidatus Liberibacter americanus*’ (Lam) e ‘*Ca. L. asiaticus*’ (Las)

Planta- fonte	n	Viabilidade (%) <sup>1</sup>			Razão sexual <sup>2</sup>
		Ovo	Ninfa	Ovo a adulto	
Sadia	7	92,67 $\pm$ 1,68 a	77,97 $\pm$ 10,70 a	77,20 $\pm$ 9,91 a	0,54 $\pm$ 0,05
Lam	5	78,07 $\pm$ 11,28 a	17,23 $\pm$ 10,72 b	16,30 $\pm$ 10,05 b	0,38 $\pm$ 0,02
Las	7	90,69 $\pm$ 4,28 a	33,04 $\pm$ 12,61 b	30,91 $\pm$ 12,57 b	0,64 $\pm$ 0,08
<i>F</i>		0,93	5,27	5,67	
<i>g.l.</i>		2	2	2	
<i>P</i>		0,41	<b>0,02</b>	<b>0,01</b>	

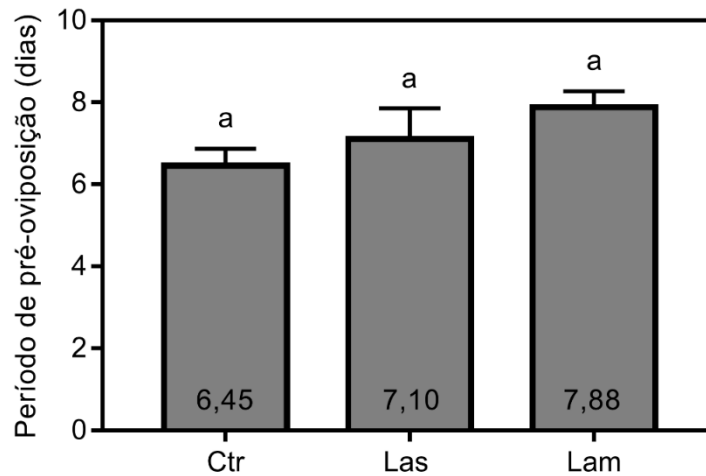
<sup>1</sup> Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si a 5% de significância

<sup>2</sup> Dados não significativos (*g.l.* = 2; *P* = 0,20) por teste qui-quadrado após ajuste por GLM binomial

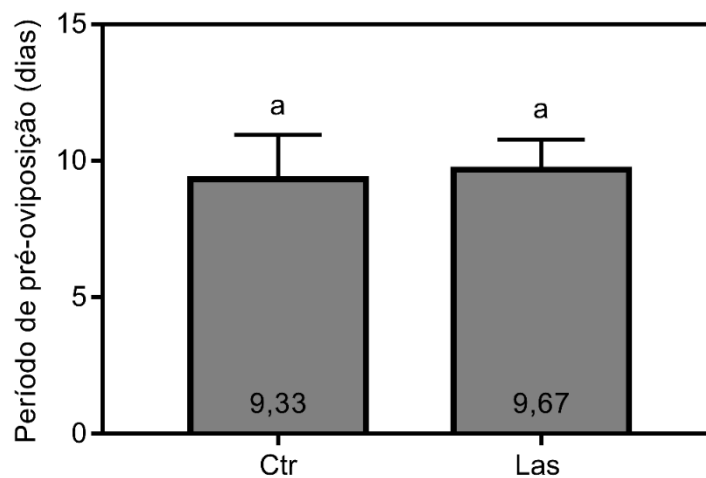
#### 4.3.1.4. Efeito de Lam e Las em parâmetros reprodutivos de *Diaphorina citri*

Dos insetos utilizados para formar os casais, foi retirada uma amostra de 10 indivíduos, que se desenvolveram em cada planta fonte, para verificação da infectividade dos mesmos por qPCR. Destes, sete (70%) e nove (90%) encontravam-se positivos para Lam e Las, respectivamente, apresentando valores de Ct menores que 35. Além disso, nenhum inseto que se desenvolveu em planta sadia foi positivo para o teste.

Ao avaliar o efeito das bactérias no período de pré-oviposição das fêmeas que se desenvolveram em plantas sadias e fonte, foi verificado que o parâmetro variou de 6,4 a 7,9 e 9,3 a 9,7 dias para os insetos transferidos para *seedlings* de murta e plantas de citros (sadias e Las), respectivamente. Quando os casais foram confinados em *seedlings* de murta, o período de pré-oviposição das fêmeas não diferiu entre os tratamentos (Log-rank global = 2,56; *g.l.* = 1; *P* = 0,28) (Figura 20), atingindo valores médios de 6,45, 7,10 e 7,88 dias para insetos que se desenvolveram em plantas sadias, Las e Lam, respectivamente. O mesmo resultado foi observado quando os casais foram confinados em brotações de plantas de citros sadias e fonte de Las, não ocorrendo efeito da planta de desenvolvimento no período de pré-oviposição (Log-rank global = 0,19; *g.l.* = 1; *P* = 0,66) (Figura 21). Os valores médios foram 9,33 e 9,67 dias para fêmeas que se desenvolveram em plantas de citros sadias e fonte de Las, respectivamente.



**Figura 20.** Período de pré-oviposição (dias)  $\pm$  EPM (n=12), em *seedlings* de murta (*Murraya paniculata*), de adultos de *Diaphorina citri* criados em plantas de citros sadias (Ctr) e fonte de ‘*Candidatus Liberibacter americanus*’ (Lam) e ‘*Ca. L. asiaticus*’ (Las). Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5% de significância



**Figura 21.** Período de pré-oviposição (dias)  $\pm$  EPM (n=8), em plantas de citros, de *Diaphorina citri* criados em plantas de citros sadias (Ctr) e fonte de ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ (Las). Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5% de significância

O número de ovos colocados por fêmeas dos casais confinados em *seedlings* de murta e plantas de citros (sadia e fonte de Las) mostrou grande variação. Quando confinadas em *seedlings* de murta, tanto as fêmeas que se desenvolveram em plantas sadias quanto fêmeas que se desenvolveram em plantas-fonte (Lam e Las) não diferiram estatisticamente com relação ao número de ovos produzidos ( $F = 2,13$ ; g.l. = 2;  $P = 0,14$ ) (Tabela 6). O mesmo resultado foi observado quando os insetos foram confinados em plantas de citros. Apesar das

fêmeas que se desenvolveram em plantas saudias e fonte de Las terem produzido em média 175,17 e 275,67 ovos, respectivamente, os valores não diferiram estatisticamente ( $F = 0,38$ ; g.l. = 1;  $P = 0,55$ ) (Tabela 6).

**Tabela 6.** Número médio de ovos  $\pm$  EPM de *Diaphorina citri* criados em diferentes plantas-fonte e transferidos, após a emergência, para *seedlings* de murta ou plantas de citros saudias (insetos que se desenvolveram em plantas saudias) e fonte de Las (insetos que se desenvolveram em plantas-fonte de Las)

Planta-fonte	n <sup>1</sup>	Murta	n	Citros
		Nº ovos $\pm$ (EPM)		Nº ovos $\pm$ (EPM)
Sadia	11	232,45 $\pm$ 63,87 a <sup>2</sup>	6	175,17 $\pm$ 120,75 a
Lam	9	171,33 $\pm$ 59,96 a	-	-
Las	10	80,80 $\pm$ 36,25 a	6	275,67 $\pm$ 87,59 a
<i>F</i>		2,13		0,37
<i>g.l.</i>		2		1
<i>P</i>		0,14		0,55

<sup>1</sup> Número de casais que colocaram pelo menos 1 ovo durante seu ciclo de vida

<sup>2</sup> Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si a 5% de significância

Para os casais que foram transferidos para plantas de murta, a estimativa dos parâmetros da tabela de vida de fertilidade indicou que os insetos que se desenvolveram em plantas saudias apresentam índices superiores para taxa líquida de reprodução ( $R_0$ ), taxa intrínseca de crescimento ( $r_m$ ) e razão finita de crescimento ( $\lambda$ ) quando comparados com os adultos que se desenvolveram em plantas-fonte de Lam e Las (Tabela 7), sugerindo um efeito negativo associado ao carregamento de Lam e Las. O tempo necessário para duplicação da população ( $T_d$ ) foi superior para insetos que se desenvolveram em plantas-fonte Lam em comparação com insetos saudios. O intervalo médio entre gerações não diferiu entre os tratamentos. O efeito do desenvolvimento em plantas-fonte nos parâmetros da tabela de vida de fertilidade não foi significativo para os casais que foram transferidos novamente para plantas de citros saudias e fonte de Las (tabela 8).

**Tabela 7.** Tabela de vida de fertilidade para adultos de *Diaphorina citri* desenvolvidos em diferentes plantas-fonte e transferidos, após a emergência, para *seedlings* de murta (*Murraya paniculata*).

Planta-fonte	Parâmetros da tabela de vida de fertilidade <sup>1</sup>				
	$R_0$	$r_m$	T	$\lambda$	$T_d$
Sadia	88,83 $\pm$ 26,64 a <sup>2</sup>	0,107 $\pm$ 0,007 a	42,35 $\pm$ 1,82 a	1,113 $\pm$ 0,008 a	6,45 $\pm$ 0,41 a
Lam	7,96 $\pm$ 3,07 b	0,048 $\pm$ 0,009 b	45,18 $\pm$ 1,47 a	1,049 $\pm$ 0,009 b	13,84 $\pm$ 3,13 b
Las	13,32 $\pm$ 6,19 b	0,069 $\pm$ 0,011 b	40,12 $\pm$ 3,01 a	1,071 $\pm$ 0,012 b	9,73 $\pm$ 1,94 ab

<sup>1</sup>  $R_0$  = taxa líquida de reprodução;  $r_m$  = taxa intrínseca de crescimento; T = intervalo médio entre gerações (dias);  $\lambda$  = razão finita de crescimento;  $T_d$  = tempo de duplicação (dias)

<sup>2</sup> Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si por teste T bilateral ( $P < 0,05$ )

**Tabela 8.** Tabela de vida de fertilidade para adultos de *Diaphorina citri* desenvolvidos em diferentes plantas-fonte e transferidos, após a emergência, para plantas de citros sadias (insetos que se desenvolveram em plantas sadias) e fonte de Las (insetos que se desenvolveram em plantas-fonte de Las).

Planta-fonte	Parâmetros da tabela de vida de fertilidade <sup>1</sup>				
	R0	$r_m$	T (d)	$\lambda$	Td (d)
Sadia	54,77 ± 38,73 a <sup>2</sup>	0,091 ± 0,014 a	50,41 ± 8,01 a	1,095 ± 0,015 a	7,40 ± 1,47 a
Las	86,19 ± 36,14 a	0,098 ± 0,009 a	46,33 ± 1,41 a	1,103 ± 0,010 a	6,99 ± 0,64 a

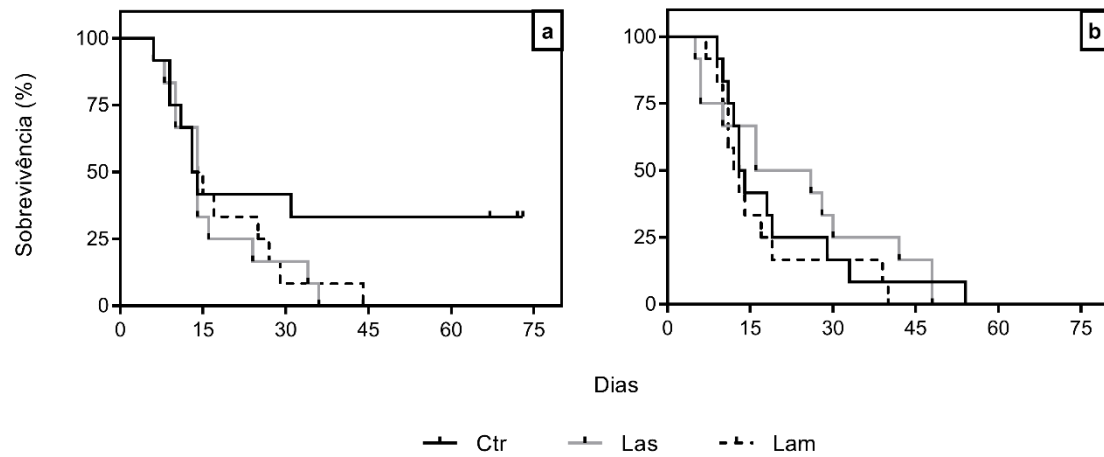
<sup>1</sup>R0 = taxa líquida de reprodução;  $r_m$  = taxa intrínseca de crescimento; T = intervalo médio entre gerações (dias);  $\lambda$  = razão finita de crescimento; Td = tempo de duplicação (dias)

<sup>2</sup>Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si por teste T bilateral ( $P < 0,05$ )

#### 4.3.1.5. Efeito de Lam e Las na longevidade de adultos de *Diaphorina citri*

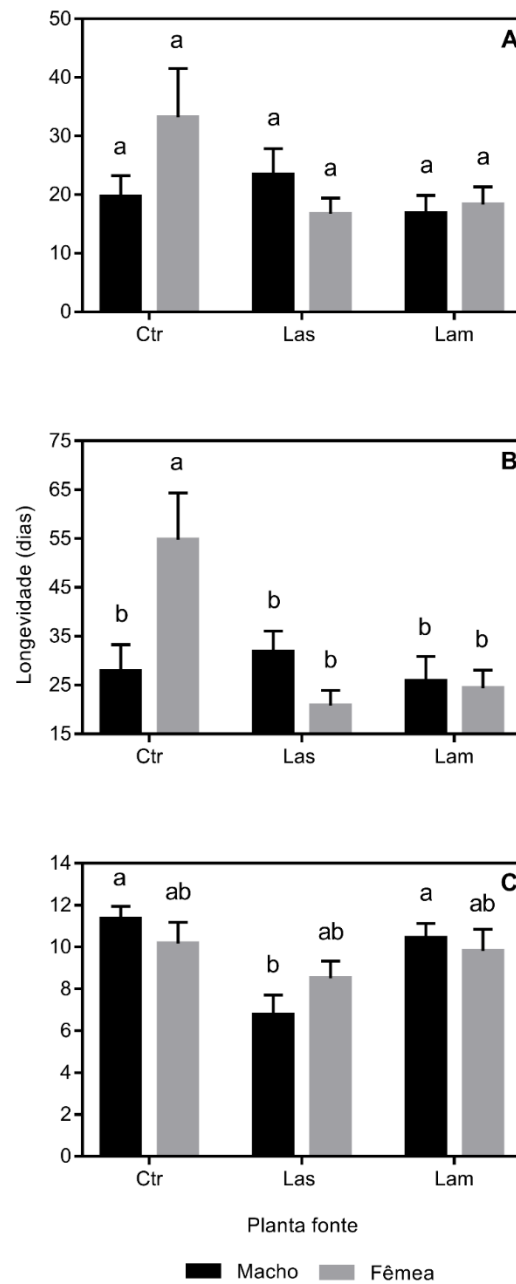
Na avaliação do parâmetro longevidade de adultos, ao considerar todo o período de sobrevivência, os tratamentos não diferiram estatisticamente quando machos e fêmeas foram confinados em *seedlings* de murta (Log-rank Global = 6,73; g.l. = 5;  $P = 0,24$ ) (Figuras 22 e 23 – A) e plantas de citros (Log-rank Global = 2,49; g.l. = 3;  $P = 0,48$ ) (Figuras 24 e 25). De acordo com as curvas de sobrevivência geradas a partir da análise Log-rank, é possível perceber, para os insetos confinados em murta, que a partir de 14 dias (aproximadamente 50% de mortalidade nos tratamentos), as curvas parecem se comportar de maneira distinta, com maior sobrevivência para fêmeas sadias, embora o teste estatístico não detecte essa alteração ao fazer a análise dos dados totais (Figura 23 –A). Diante disso, decidiu-se por proceder a mesma análise, porém dividindo-a em duas partes, ou seja, considerando os insetos que viveram até e após 14 dias. Para os insetos que viveram mais que 14 dias, foi verificado efeito das bactérias na longevidade (Log-Rank Global = 14,29; g.l. = 5;  $P = 0,01$ ). Fêmeas sadias apresentaram um tempo médio de sobrevivência superior aos demais tratamentos, os quais não diferiram entre si (Figura 23 – B). Para os insetos que viveram menos que 14 dias, também foi verificado efeito das bactérias na longevidade (Log-Rank Global = 12,41; g.l. = 5;  $P = 0,03$ ). Nesse caso, psilídeos machos oriundos de plantas-fonte Las apresentaram menor tempo médio de sobrevivência em comparação com os demais tratamentos, que não diferiram estatisticamente entre si (Figura 23 – C).

A observação das curvas de sobrevivência para os insetos que foram transferidos para plantas de citros não apresentou qualquer diferença no comportamento com o tempo (Figura 24), e por isso, a análise não foi dividida, como realizado para os insetos transferidos para plantas de murta.

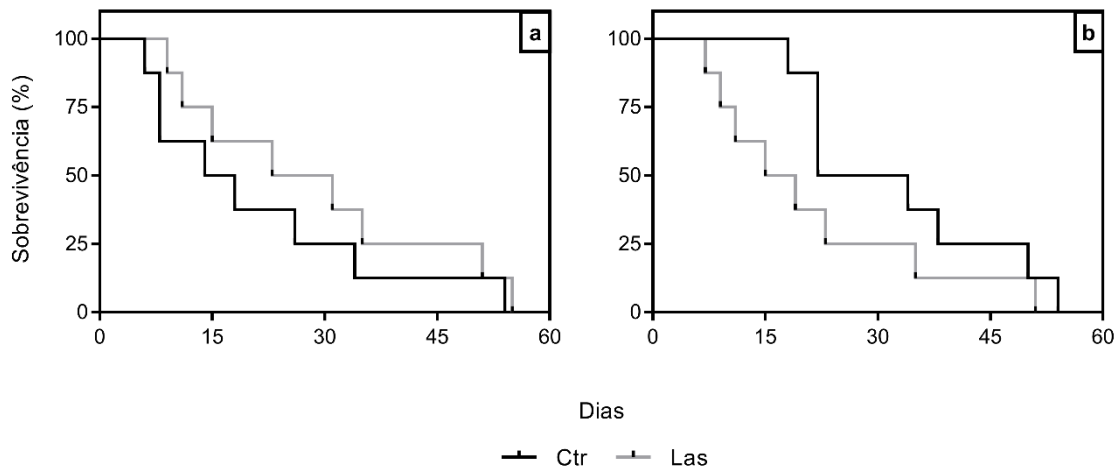


**Figura 22.** Curvas de sobrevivência, geradas a partir de análise Log-rank, de fêmeas (a) e machos (b) de *Diaphorina citri* criados em diferentes plantas-fonte e transferidos, após a emergência, para *seedlings* de murta (*Murraya paniculata*). Ctr = plantas saudas; Las = plantas sintomáticas e qPCR positivas para '*Candidatus* Liberibacter asiaticus'; Lam = plantas sintomáticas e qPCR positivas para '*Ca. L. americanus*' (Lam)

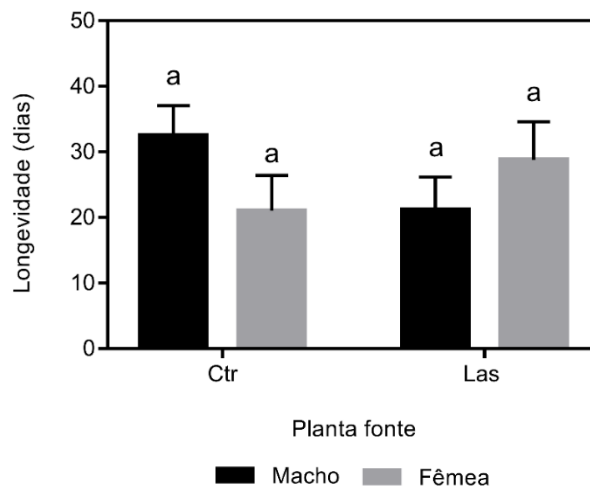




**Figura 23.** Longevidade média (dias)  $\pm$  EPM de machos e fêmeas de *Diaphorina citri* criados em diferentes plantas-fonte e transferidos, após a emergência, para *seedlings* de murta (*Murraya paniculata*). Longevidade total (A) e dividida entre insetos que viveram mais (B) e menos que 14 dias (C). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si a 5% de significância. Ctr = plantas saudias; Las = plantas sintomáticas e qPCR positivas para ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’; Lam = plantas sintomáticas e qPCR positivas para ‘*Ca. L. americanus*’ (Lam)



**Figura 24.** Curvas de sobrevivência, geradas a partir de análise Log-rank, de fêmeas (a) e machos (b) de *Diaphorina citri* criados em diferentes plantas-fonte e transferidos, após a emergência, para plantas de citros saudáveis (insetos que se desenvolveram em plantas saudáveis) e fonte de Las (insetos que se desenvolveram em plantas-fonte de Las). Ctr = plantas saudáveis; Las = plantas sintomáticas e qPCR positivas para ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’



**Figura 25.** Longevidade média (dias)  $\pm$  EPM de machos e fêmeas de *Diaphorina citri* criados em diferentes plantas-fonte e transferidos, após a emergência, para plantas de citros saudáveis (insetos que se desenvolveram em plantas saudáveis) e fonte de Las (insetos que se desenvolveram em plantas-fonte de Las). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si a 5% de significância. Ctr = plantas saudáveis; Las = plantas sintomáticas e qPCR positivas para ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’

#### 4.3.2. Efeito de Lam e Las na decolagem de *Diaphorina citri*

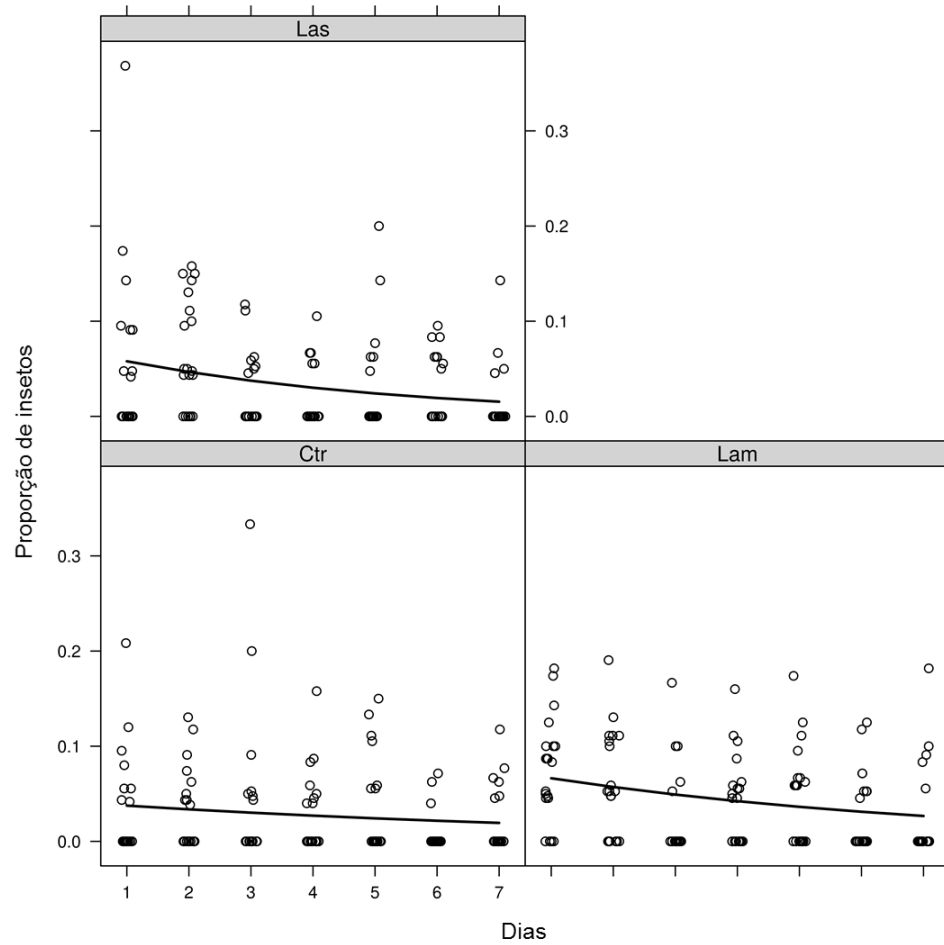
A análise nos diferentes períodos de avaliação via GEE indicou que a proporção de insetos que entraram nos tubos foi afetada pelo tratamento ( $\chi^2 = 7,36$ ; g.l. = 2;  $P = 0,03$ ) e pelo tempo após o início do experimento ( $\chi^2 = 30,42$ ; g.l. = 1;  $P < 0,01$ ) (Tabela 9). Machos e fêmeas não apresentaram diferenças quanto a decolagem de plantas cítricas ( $\chi^2 = 1,94$ ; g.l. =

1;  $P = 0,16$ ) e todas as interações dos fatores testados não foram significativas (Tabela 9). De acordo com a análise GEE, é possível observar que as curvas geradas para os tratamentos Lam e Las são superiores à gerada para o tratamento controle, principalmente nos quatro primeiros dias de avaliação (Figura 26). A partir do quinto dia, as proporções de insetos coletados nos tubos parecem ser semelhantes, independentemente do tratamento. Essa semelhança nos períodos finais de avaliação provavelmente ocorreu devido ao efeito do tempo, como comentado acima, com tendência de decréscimo da curva com o incremento dos períodos de avaliação.

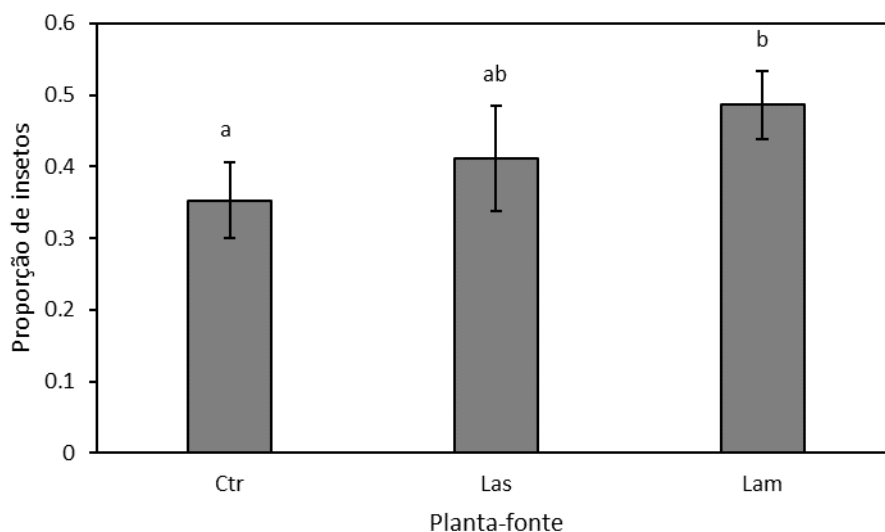
Ao comparar as proporções acumuladas após sete dias do experimento, machos e fêmeas apresentaram maior propensão ao voo após o desenvolvimento em plantas-fonte Lam em comparação com insetos que se desenvolveram em plantas sadias ( $F = 3,32$ ; g.l. = 2;  $P = 0,04$ ) (Figura 27). O desenvolvimento em Las gerou indivíduos com propensão ao voo intermediária aos demais tratamentos, não diferindo dos demais tratamentos. Ademais, a análise das proporções acumuladas mostrou ausência de efeito do sexo ( $F = 1,30$ ; g.l. = 1;  $P = 0,26$ ) e da interação tratamento e sexo ( $F = 1,35$ ; g.l. = 2;  $P = 0,27$ ).

**Tabela 9.** Análise via Equações de Estimativas Generalizadas (GEE) considerando o efeito dos tratamentos (Lam, Las e Ctr), do sexo (macho e fêmea) e do tempo (dias após o início do experimento) para o experimento em que foi avaliado o efeito das bactérias associadas ao HLB dos citros na decolagem de adultos de *Diaphorina citri*

<b>Causas de Variação</b>	<b>g.l.</b>	<b><math>\chi^2</math></b>	<b>Valor de P</b>
Tratamento	2	7.36	0.03
Sexo	1	1.94	0.16
Tempo	1	30.42	< 0.01
Tratamento x Sexo	2	3.95	0.14
Tratamento x Tempo	2	3.33	0.19
Sexo x Tempo	1	1.41	0.24
Tratamento x Sexo x Tempo	2	0.44	0.80



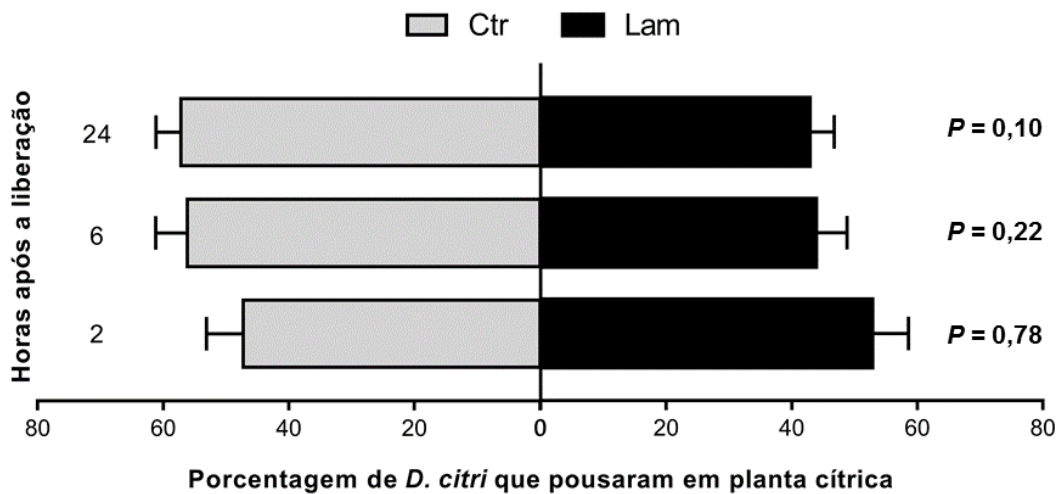
**Figura 26.** Ajuste por modelos de equações de estimativas generalizadas (GEE) (linhas) e nuvem de pontos indicando a proporção de adultos de *Diaphorina citri* que saíram de plantas saudas de citros em função dos dias após o início do experimento. Insetos coletados em tubos de 50 mL, acoplados em gaiolas do tipo PET, que se desenvolveram em plantas saudas (Ctr) e fonte de ‘*Candidatus Liberibacter americanus*’ (Lam) e ‘*Ca Liberibacter asiaticus*’ (Las)



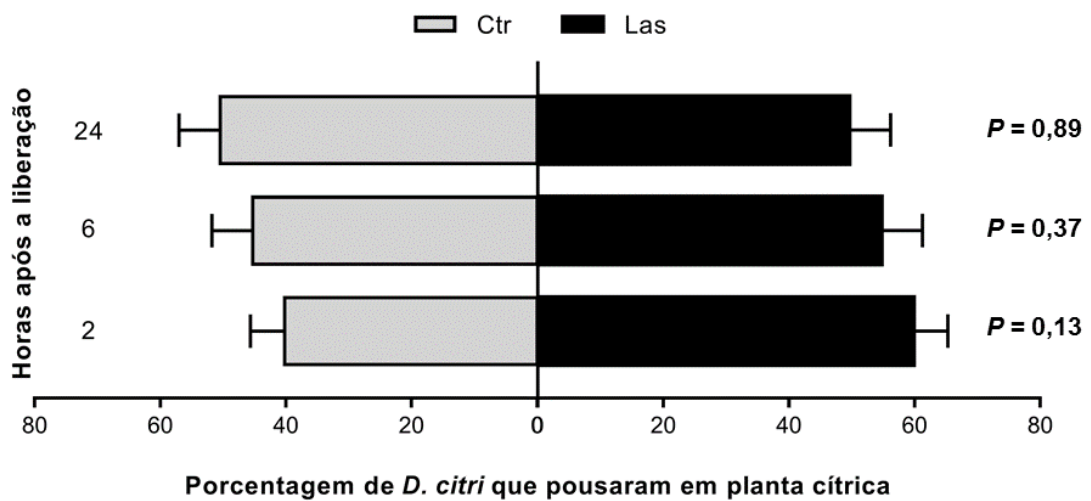
**Figura 27.** Proporção média acumulada de adultos de *Diaphorina citri* que saíram de plantas sadias de citros ± (EPM) (n=10) após sete dias de avaliação. Insetos coletados em tubos de 50 mL, acoplados em gaiolas do tipo PET, que se desenvolveram em plantas sadias (Ctr) e fonte de ‘*Candidatus Liberibacter americanus*’ (Lam) e ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’ (Las). Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5% de significância

#### 4.3.3. Preferência de pouso em plantas sadias e fonte de Lam e Las

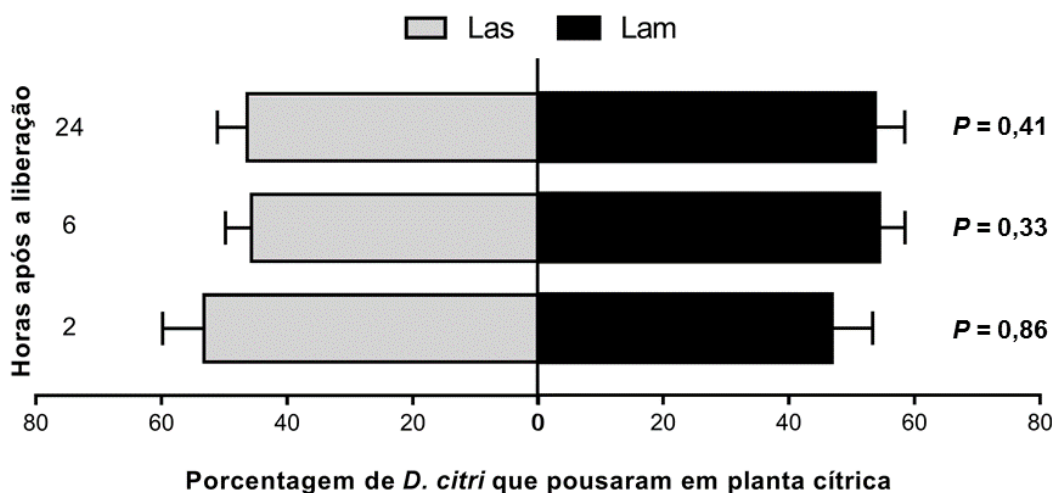
No estudo para verificação da preferência ao pouso em plantas sadias e fonte de Lam e Las, adultos de *D. citri* não apresentaram um comportamento direcionado para um hospedeiro em específico. Quando liberados em gaiola contendo plantas sadia e Lam, os tratamentos não diferiram entre as observações no tempo (L.R. = 1,71; g.l = 2;  $P = 0,43$ ), sendo iguais a 50% após 2 h ( $P = 0,78$ ), 6 h ( $P = 0,22$ ) e 24 h ( $P = 0,10$ ) (Figura 28) da liberação. O mesmo foi observado para plantas sadia e Las, com proporções semelhantes entre as observações no tempo (L.R. = 5,98; g.l = 2;  $P = 0,05$ ) e após 2 h ( $P = 0,13$ ), 6 h ( $P = 0,37$ ) e 24 h ( $P = 0,89$ ) (Figura 29) da liberação. Por último, também não houve uma predominância de pouso quando comparadas plantas Lam e Las no tempo (L.R. = 0,68; g.l. = 2;  $P = 0,71$ ), não diferindo de 50% após 2 h ( $P = 0,86$ ), 6 h ( $P = 0,33$ ) e 24 h ( $P = 0,41$ ) (Figura 30) da liberação.



**Figura 28.** Porcentagem média de adultos de *Diaphorina citri* (+ EPM) (n = 12) que pousaram em plantas sadias (Ctr) ou fonte de ‘*Candidatus Liberibacter americanus*’ (Lam) em função das diferentes horas após a liberação. Para cada período após a liberação, foram acrescentados, à frente das barras, os valores de probabilidade obtidos a partir do teste de Wald ( $P < 0,05$ )



**Figura 29.** Porcentagem média de adultos de *Diaphorina citri* (+ EPM) (n = 12) que pousaram em plantas sadias (Ctr) ou fonte de ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ (Las) em função das diferentes horas após a liberação. Para cada período após a liberação, foram acrescentados, à frente das barras, os valores de probabilidade obtidos a partir do teste de Wald ( $P < 0,05$ )



**Figura 30.** Porcentagem média de adultos de *Diaphorina citri* (+ EPM) (n = 12) que pousaram em plantas fonte de ‘*Candidatus Liberibacter americanus*’ (Lam) ou ‘*Ca. L. asiaticus*’ (Las) em função das diferentes horas após a liberação. Para cada período após a liberação, foram acrescentados, à frente das barras, os valores de probabilidade obtidos a partir do teste de Wald ( $P < 0,05$ )

#### 4.4. Discussão

O objetivo central do presente estudo foi verificar, de maneira geral, aspectos relacionados à relação Lam e *D. citri* com o intuito de se encontrar evidências adicionais para explicar a atual predominância de Las nos pomares brasileiros. De acordo com os resultados, foi possível observar que Lam está relacionada a alterações biológicas e comportamentais de *D. citri*. Esse é o primeiro relato de efeito induzido por Lam em populações do inseto. As alterações negativas na biologia do inseto associadas à Lam indicam que a relação patógeno-vetor pode ter papel importante para explicar a atual predominância de Las nos pomares brasileiros.

Apesar de estatisticamente semelhante a Las, o efeito negativo de Lam aparentemente foi mais pronunciado em populações de *D. citri*, principalmente com relação às viabilidades de ninfa e de ovo a adulto. Os valores de 33,04 e 30,91% de viabilidade média de ninfas e de ovo a adulto, respectivamente, para insetos que se desenvolveram em plantas infectadas por Las representam aproximadamente duas vezes os valores médios obtidos em plantas com Lam. Em relação ao tratamento controle (plantas sadias), insetos que se desenvolveram em plantas infectadas por Lam apresentaram taxas de viabilidade muito baixas (4,5 a 4,7 vezes menores), ocorrendo, em média, mortalidade de aproximadamente 85% da população de ninfas que chegariam até a fase adulta. Essa não diferenciação estatística entre os tratamentos de Las e Lam pode ser explicada pelo número baixo de plantas-fonte de Lam

disponíveis aos experimentos, considerando a alta dificuldade para obtenção das mesmas (de 70 plantas inoculadas por enxertia, apenas cinco apresentaram resultados positivos por qPCR). O baixo número de plantas-fonte de Lam e a alta variabilidade dos dados poderia explicar a semelhança estatística com Las, a despeito dos valores médios discrepantes entre os dois tratamentos. Taxas reduzidas de transmissão por enxertia de Lam em comparação com Las foram relatadas na literatura e isso se deve provavelmente aos menores títulos de Lam (Lopes, Bertolini, et al., 2009), ressaltando a dificuldade de se obter plantas fonte para essa bactéria.

Na avaliação do efeito das bactérias na estrutura etária de ninfas, foi possível verificar que alguns indivíduos ainda se encontravam no segundo e terceiro instares após 15 dias de desenvolvimento em plantas Lam e Las. Nesse caso, ninfas em plantas sadias apresentaram maiores chances de chegar ao quinto instar, principalmente quando comparados com indivíduos que se desenvolveram em plantas Las. Essas alterações podem ser indicativas do efeito negativo das bactérias tanto no tempo de desenvolvimento quanto na viabilidade de ninfas, o que foi confirmado com as avaliações do efeito de Lam e Las na biologia de *D. citri*. Apesar de não terem sido observadas alterações nas durações dos períodos embrionário, ninfal e do ciclo total, as viabilidades da fase ninfal e de ovo a adulto foram muito reduzidas, tanto em plantas-fonte de Lam quanto para plantas-fonte de Las, indicando que existe um efeito das bactérias no desenvolvimento do inseto.

Dados da literatura mostram que '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' pode afetar negativamente a sobrevivência de ninfas de *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae) em plantas de tomate [*Solanum lycopersicum* L. (Solanaceae)] (Nachappa et al., 2012). Para a relação Las e *D. citri*, estudos de campo mostraram que as viabilidades de ninfa e de ovo a adulto foram significativamente reduzidas após o desenvolvimento em brotações qPCR positivas para a bactéria (Ren et al., 2016). Os autores observaram também que as fases imaturas (ovos e ninfas) se desenvolveram mais rapidamente em brotações de plantas-fonte de Las. Pelz-Stelinski & Killiny (2016), por sua vez, não verificaram efeito negativo da aquisição de Las na viabilidade de ninfas oriundas de postura em plantas assintomáticas e positivas por qPCR para Las. A presença e nível de severidade de sintomas em plantas de citros infectadas por Las pode alterar o comportamento alimentar de *D. citri* (Cen et al., 2012), influenciando diretamente o desenvolvimento do inseto. A utilização de plantas assintomáticas por Pelz-Stelinski & Killiny (2016) poderia explicar a não observação de efeito de Las em ninfas de *D. citri*. Pelz-Stelinski & Killiny (2016) também observaram efeito de Las nas viabilidades de ovo e adulto do inseto; estes com desenvolvimento mais lento em



relação aos indivíduos que se desenvolveram em plantas saudias. Contudo, em estudo realizado no México, o ciclo de ovo a adulto foi mais rápido em plantas de laranja infectadas com Las (Ramírez-Sánchez et al., 2016). Além de diferenças na sintomatologia das plantas-fonte, as variações de resultados podem ser explicadas pela possibilidade de existência de diferentes estirpes de Las, biótipos de *D. citri* e variedades de plantas de citros nas populações do Brasil, China, Flórida (Estados Unidos) e México.

A redução na viabilidade parece ter sido muito influenciada por aspectos relacionados à condição das plantas-fonte. Ao verificar o abortamento de brotações, foi possível notar que a maioria dos ramos jovens (90,9 e 64,3 % dos brotos para Lam e Las, respectivamente) das plantas-fonte estava abortada após seis dias da postura. Esse abortamento do fluxo vegetativo, juntamente com uma condição nutricional desfavorável associado à infecção por Las (Mann et al., 2012) e possivelmente por Lam, explicariam a alteração no desenvolvimento do inseto. Ademais, estudos de avaliação da composição química do *honeydew* do inseto sugerem que o floema de plantas infectadas por Las são pobres em nutrientes (Hijaz et al., 2016). Além disso, adultos de *D. citri* reduzem o tempo gasto em atividades alimentares no vaso do floema quando confinados em plantas com sintomas severos de HLB (Cen et al., 2012), diminuindo a ingestão de nutrientes essenciais ao desenvolvimento dos mesmos. Essas evidências podem suportar a hipótese de que existe um efeito indireto das bactérias no inseto, com destaque para a infecção por Lam, a qual pode gerar sintomas mais agressivos em plantas de citros (Lopes, Bertolini, et al., 2009). Estudos adicionais para verificar a análise química do floema de plantas infectadas com Lam e do *honeydew* de *D. citri* após alimentação nessas plantas devem ser realizados para explicar o efeito aparentemente mais pronunciado de Lam no desenvolvimento do inseto.

O número de machos e fêmeas no estágio adulto não foi alterado de acordo com o desenvolvimento em plantas-fonte Lam e Las, embora tenha apresentado valores numericamente diferentes. A inexistência de alteração na razão sexual de *D. citri* induzida por Las foi observada por Ren et al. (2016). De acordo com os autores, após a postura de fêmeas saudias ou bacterilíferas em brotações saudias ou positivas para Las, a razão sexual da prole oriunda dessas fêmeas foi próxima a 50%. O mesmo foi observado para *B. cockerelli* com a geração de 55 e 54,8% de fêmeas oriundas das linhagens positivas e negativas para ‘*Ca. L. solanacearum*’, respectivamente (Nachappa et al., 2012). De acordo com esses resultados é possível assumir que o efeito induzido por Lam e Las em *D. citri* não altera a razão sexual do inseto. O efeito de bactérias fitopatogênicas na razão sexual do vetor foi observado para o patossistema envolvendo o fitoplasma (*maize bushy stunt phytoplasma*) associado ao

enfazamento vermelho do milho [*Zea mays* (Poaceae)] e a cigarrinha *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae) (González, 2016).

Embora a amostra da população tenha indicado alta eficiência de aquisição de Lam e Las, o período de pré-oviposição e o número de ovos colocados por fêmeas não diferiu entre os tratamentos. Contudo, os valores da tabela de vida de fertilidade indicaram efeito das bactérias em parâmetros reprodutivos do inseto, quando casais foram transferidos para plantas de murta após o desenvolvimento em plantas saudas e fonte de Lam e Las. De acordo com os resultados, indivíduos bacterilíferos apresentaram índices menores para taxa líquida de reprodução, taxa intrínseca de crescimento e razão finita de crescimento. Além disso, o tempo para duplicação da população de insetos que se desenvolveram em plantas Lam foi superior ao tratamento de insetos saudos. Essas constatações sugerem que tanto Lam quanto Las podem reduzir a capacidade reprodutiva de *D. citri* quando adultos são confinados em um hospedeiro ótimo para o desenvolvimento, como é o caso da murta. Efeitos neutros foram observados após a formação dos casais em plantas de citros. Esses resultados diferem daqueles observados na literatura, os quais mostram que a aquisição de Las pode aumentar a fecundidade de *D. citri*, para estudos de laboratório (Pelz-Stelinski & Killiny, 2016) e campo (Ren et al., 2016). Vale ressaltar que em nenhum desses estudos foi verificado o efeito das bactérias na biologia do inseto com a transferência dos casais para plantas de murta. Diante disso, os resultados da tabela de vida de fertilidade podem sugerir a existência de um custo associado ao carregamento de Lam e Las em aspectos reprodutivos do inseto, e os relatos de aumento da fecundidade apresentados na literatura podem estar associados a aspectos da planta de citros ou mesmo a variações em estirpes da bactéria ou biótipos do inseto entre as populações do Brasil, México e Estados Unidos. Efeito negativo do fitopatógeno em parâmetros reprodutivos do psíldeo vetor foi observado para o patossistema envolvendo ‘*Ca. L. solanacearum*’ e *B. cockerelli* (Nachappa et al., 2012, 2014).

É conhecido o efeito de bactérias fitopatogênicas (‘*Ca. L. solanacearum*’, ‘*Ca. Phytoplasma spp*’ e *Spiroplasma kunkelii*) na longevidade de psíldeos e cigarrinhas, o qual pode ser negativo, positivo ou neutro (Beanland et al., 2000; Ebbert & Nault, 2001; Bressan, Clair, et al., 2005; Bressan, Girolami, et al., 2005; D’Amelio et al., 2008; Malagnini et al., 2010; Nachappa et al., 2012; Arismendi & Carrillo, 2015). De acordo com os dados do presente trabalho, foi possível verificar que fêmeas que se desenvolveram em plantas-fonte de Lam e Las e confinadas em plantas de murta apresentaram menor sobrevivência em comparação com fêmeas que se desenvolveram em plantas saudas. Apesar do método estatístico não ter mostrado diferenças, foi muito claro que fêmeas saudas apresentaram uma

sobrevivência maior que fêmeas bacterilíferas. De acordo com as avaliações, quatro das 12 fêmeas sadias utilizadas no ensaio sobreviveram mais de 67 dias após a emergência. Para os tratamentos Lam e Las, o período máximo de sobrevivência para fêmeas foi 44 e 36 dias, respectivamente, para apenas um indivíduo de cada tratamento. Considerando essa diferença clara, optou-se por realizar a mesma análise, contudo, considerando as longevidades antes e após 50% de mortalidade. Quando transferidos novamente para plantas de citros, o método utilizado não conseguiu detectar diferenças na longevidade do inseto em relação às plantas de desenvolvimento (Las e sadias). Provavelmente o número baixo de casais possa explicar a não diferenciação entre os tratamentos.

O efeito negativo de Las na sobrevivência de *D. citri* foi observado por Pelz-Stelinski & Killiny (2016). De acordo com os autores, apesar da redução na longevidade, o efeito positivo em parâmetros reprodutivos associados ao desenvolvimento em planta infectada por Las tem papel mais forte na biologia do inseto e compensaria o efeito negativo associado à redução do tempo de desenvolvimento. Ramírez-Sanchez et al. (2016) também verificaram efeito negativo da infecção de Las na longevidade de fêmeas de *D. citri* após o desenvolvimento em plantas de lima mexicana [*Citrus aurantifolia* var. Colimex (Rutaceae)] infectadas com Las. De acordo com os autores, a espécie de citros pode ter influência no efeito em *D. citri*, já que não foram observadas alterações associadas à bactéria na longevidade de adultos que se desenvolveram em laranja doce (*C. sinensis* “Valência”) infectadas com Las. Sendo assim, os dados do presente estudo mostram que o carregamento de Lam pode estar associado a um custo em *D. citri*, assim como já conhecido para Las. Esse é o primeiro relato do efeito de Lam na longevidade de fêmeas de *D. citri*. O custo associado a Lam pode sugerir que a relação com *D. citri* envolve mudanças fisiológicas que podem estar associadas à multiplicação da bactéria no inseto, assim como ocorre para Las (Ammar et al., 2011) e sugerido por Pelz-Stelinski et al. (2016).

Além dos efeitos na biologia, é conhecido que Las pode aumentar a capacidade potencial de voo de *D. citri* (Martini et al., 2015). Contudo, não existe nenhum relato que relacione o efeito de Lam ou de Las com a fase inicial de voo do inseto. Os resultados do presente estudo mostraram que Lam pode induzir machos e fêmeas a decolar de seu hospedeiro, o que contribuiria positivamente para a disseminação do patógeno. Isso significa dizer que a baixa incidência de Lam no campo não deve estar relacionada a alguma redução na capacidade de deslocamento do inseto e provavelmente fatores associados à aquisição do patógeno, presença de inóculo e disponibilidade de vetores (Lam reduz drasticamente a viabilidade, como observado nesse estudo) poderiam explicar esse processo. Além disso, o

ajuste por GEE indicou efeito do tempo na proporção de insetos coletados nos tubos, independente do tratamento testado, ou seja, foi observada uma tendência de redução na decolagem com o passar do tempo. Provavelmente essa redução deve ter ocorrido devido ao efeito da idade na propensão ao voo de *D. citri* (foram utilizados adultos com 15 dias de idade, aproximadamente), sugerindo a existência de um período ideal para voo do inseto. O efeito da idade na capacidade de voo de *D. citri* foi observado por Arakawa & Miyamoto (2007).

O método utilizado no presente estudo não foi suficiente para encontrar diferenças comportamentais quanto à preferência ao pouso em plantas Lam, Las e sadias. Dados da literatura mostram que *D. citri* apresenta uma tendência inicial de colonizar plantas de citros infectadas com Las, porém, após sete dias essa tendência se inverte, com os insetos direcionando-se a plantas sadias (Mann et al., 2012). De acordo com os autores, o comportamento do inseto foi avaliado após três e sete dias do início dos experimentos, diferenciando-se dos períodos de avaliação do presente estudo (2, 6 e 24 h). Apesar de não diferir estatisticamente, a tendência inicial de escolher uma planta-fonte e posteriormente pousar em uma planta sadia pôde ser observada no presente estudo. É provável que avaliações superiores a três ou sete dias mostrariam diferenças significativas. Insetos submetidos a plantas Lam e controle apresentaram comportamento semelhante daquele observado para plantas Las e controle. Provavelmente, alterações na liberação de voláteis que inicialmente atraem *D. citri*, como mostrado para Las (Mann et al., 2012), devem ser semelhantes para Lam.

Em conclusão, os resultados do presente estudo forneceram evidências adicionais para explicar a atual predominância de Las nos pomares brasileiro. Em conjunto com o reduzido título bacteriano, sintomatologia mais agressiva e sensibilidade a altas temperaturas (Lopes & Frare, 2008; Lopes, Frare, et al., 2009; Lopes, Bertolini, et al., 2009), alterações negativas na viabilidade, nos parâmetros reprodutivos e longevidade de *D. citri* e altos índices de abortamento de brotações nas plantas-fonte podem contribuir para a redução da incidência de Lam no campo. Os maiores índices de decolagem de insetos que se desenvolveram em plantas Lam indicam que a baixa incidência da bactéria não deve estar relacionada com a redução da capacidade de deslocamento de *D. citri*.

#### 4.5. Conclusões

- Lam e Las alteram negativamente a viabilidade de ninfas e do ciclo total de *D. citri*;
- As durações (ovo, ninfa e ciclo total ) e razão sexual de *D. citri* não são afetadas pelo desenvolvimento em plantas-fonte de Lam e Las em comparação com plantas sadias.
- Lam e Las reduzem a longevidade de fêmeas de *D. citri*;
- Plantas infectadas com Lam e Las apresentam altas taxas de abortamento de brotações;
- Lam e Las alteram parâmetros reprodutivos de *D. citri* desenvolvidos em plantas-fonte e transferidos para plantas de murta, com reduções da taxa líquida de reprodução ( $R_0$ ), taxa intrínseca de crescimento ( $r_m$ ) e razão finita de crescimento ( $\lambda$ );
- Insetos que se desenvolvem em plantas-fonte Lam e são transferidos para plantas de murta necessitam de mais tempo para duplicação da população em comparação com insetos desenvolvidos em plantas sadias;
- Machos e fêmeas de *D. citri* apresentam maior propensão ao voo após o desenvolvimento em plantas Lam, com Las apresentando comportamento intermediário entre Lam e controle;
- Não há efeito das plantas-fonte de Lam e Las no pouso de *D. citri* após 2, 6 e 24 h da liberação dos insetos.

## REFERÊNCIAS

- Alves G, Diniz A & Parra J (2014) Biology of the huanglongbing vector *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) on different host plants. *Journal of economic entomology* 107:691–696.
- Ammar E-D, Shatters RG, Lynch C & Hall DG (2011) 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* 104:526–533.
- Arakawa K & Miyamoto K (2007) Flight ability of Asiatic citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera; Psyllidae), measured by a flight mill. *Research Bulletin of the Plant Protection* 43:23–26.
- Arismendi NL & Carrillo R (2015) Survival, fecundity, and body mass of *Amplicephalus curtulus* influenced by “*Candidatus Phytoplasma ulmi*” (16SrV-A) infection. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 155:176–183.
- Beanland L, Hoy CW, Miller SA & Nault LR (2000) Influence of aster yellows phytoplasma on the fitness of aster leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). *Annals of the Entomological Society of America* 93:271–276.
- Bové JMJ, Calavan EC, Capoor SPS, Cortez RER & Schwarz RE (1974) Influence of temperature on symptoms of California stubborn, South Africa greening, India citrus decline and Philippines leaf mottling diseases. *Sixth International Organization of Citrus Virologists IOCV*. pp 12–15.
- Bressan A, Clair D, Sémétey O & Boudon-Padieu É (2005) Effect of two strains of Flavescence dorée phytoplasma on the survival and fecundity of the experimental leafhopper vector *Euscelidius variegatus* Kirschbaum. *Journal of Invertebrate Pathology* 89:144–149.
- Bressan A, Girolami V & Boudon-Padieu E (2005) Reduced fitness of the leafhopper vector *Scaphoideus titanus* exposed to Flavescence dorée phytoplasma. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 115:283–290.
- Canale MC, Tomaseto AF, Haddad M de L, Coletta-Filho H Della & Lopes JS (2016) Latency and Persistence of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” in its Psyllid Vector, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae). *Phytopathology*.

- CDA [Coordenadoria de Defesa Agropecuária] (2016) Dados da citricultura paulista. Available at: <http://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/www/gdsv/index.php?action=dadosCitriculturaPaulista>.
- Cen Y, Yang C, Holford P, Beattie GAC, Spooner-Hart RN, Liang G & Deng X (2012) Feeding behaviour of the Asiatic citrus psyllid, *Diaphorina citri*, on healthy and huanglongbing-infected citrus. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 143:13–22.
- Coletta-Filho HD, Carlos EF, Alves KCS, Pereira MAR, Boscariol-Camargo RL, de Souza AA & Machado MA (2010) In planta multiplication and graft transmission of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” revealed by Real-Time PCR. *European Journal of Plant Pathology* 126:53–60.
- Coletta-Filho HD, Daugherty MP, Ferreira C & Lopes JRS (2014) Temporal progression of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” infection in citrus and acquisition efficiency by *Diaphorina citri*. *Phytopathology* 104:416–421.
- Coletta-Filho HD, Targon MLPN, Takita MA, De Negri JD, Pompeu J, Machado MA, do Amaral AM & Muller GW (2004) First report of the causal agent of Huanglongbing (“*Candidatus Liberibacter asiaticus*”) in Brazil. *Plant Disease* 88:1382–1382.
- D’Amelio R, Palermo S, Marzachi C & Bosco D (2008) Influence of chrysanthemum yellows phytoplasma on the fitness of two of its leafhopper vectors, *Macrostelus quadripunctulatus* and *Euscelidius variegatus*. *Bulletin of Insectology* 61:349–354.
- Deng X, Li J, Xu J, Fang S, Li H & Chen J (2006) A method for a quick detection of huanglongbing agent from asiatic citrus psyllid (*Diaphorina citri* Kuwayama). Huanglongbing-Greening International Workshop. (ed by AJ Ayres, E Nogueira, JRP Parra, MA Machado & O Bergamashi) Ribeirão Preto, SP, Brazil, p 85.
- Ebbert MA & Nault LR (2001) Survival in *Dalbulus leafhopper* vectors improves after exposure to maize stunting pathogens. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 100:311–324.
- FUNDECITRUS [Fundo de Defesa da Citricultura] (2016) Levantamentos Greening. Available at: <http://www.fundecitrus.com.br/levantamentos/greening/10>.
- González JG (2016) Interaction of maize bushy stunt phytoplasma with the leafhopper vector, *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae) and associated microbiota. PhD Thesis, University of São Paulo, Brazil.

- Hijaz F, Lu Z & Killiny N (2016) Effect of host-plant and infection with “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” on honeydew chemical composition of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 158:34–43.
- Jagoueix S, Bove J-MM & Garnier M (1994) The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the alpha subdivision of the Proteobacteria. *International journal of systematic bacteriology* 44:379–86.
- Kobori Y, Nakata T & Ohto Y (2011) Estimation of dispersal pattern of adult Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). *Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology* 55:177–181.
- Liang K-Y & Zeger SL (1986) Longitudinal data analysis using generalized linear models. *Biometrika* 73:13–22.
- Lopes SA, Bertolini E, Frare GF, Martins EC, Wulff NA, Teixeira DC, Fernandes NG & Cambra M (2009) Graft transmission efficiencies and multiplication of “*Candidatus Liberibacter americanus*” and “*Ca. Liberibacter asiaticus*” in citrus plants. *Phytopathology* 99:301–306.
- Lopes S & Frare G (2008) Graft Transmission and Cultivar Reaction of Citrus to ‘*Candidatus Liberibacter americanus*’. *Plant Disease* 92:21–24.
- Lopes S, Frare G & Bertolini E (2009) Liberibacters associated with citrus huanglongbing in Brazil: ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ is heat tolerant, ‘*Ca. L. americanus*’ is heat sensitive. *Plant Disease* 93:257–262.
- Maia AHN, Luiz AJB & Campanhola C (2000) Statistical inference on associated fertility life table parameters using jackknife technique: computational aspects. *Journal of economic entomology* 93:511–518.
- Malagnini V, Pedrazzoli F, Gualandri V, Forno F, Zasso R, Pozzebon A & Ioriatti C (2010) A study of the effects of “*Candidatus Phytoplasma mali*” on the psyllid *Cacopsylla melanoneura* (Hemiptera: Psyllidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 103:65–67.
- Mann RS, Ali JG, Hermann SL, Tiwari S, Pelz-Stelinski KS, Alborn HT & Stelinski LL (2012) Induced release of a plant-defense volatile “deceptively” attracts insect vectors to plants infected with a bacterial pathogen. *PLoS Pathogens* 8:1–13.
- Martini X, Hoffmann M, Coy MR, Stelinski LL & Pelz-Stelinski KS (2015) Infection of an insect vector with a bacterial plant pathogen increases its propensity for dispersal. *PLoS ONE* 10:1–16.
- Murray MG & Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic acids research* 8:4321–4325.



- Nachappa P, Levy J, Pierson E & Tamborindeguy C (2014) Correlation between “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” infection levels and fecundity in its psyllid vector. *Journal of invertebrate pathology* 115:55–61.
- Nachappa P, Shapiro AA & Tamborindeguy C (2012) Effect of “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” on fitness of its insect vector, *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae), on tomato. *Phytopathology* 102:41–6.
- Nava DE, Torres MLG, Rodrigues MDL, Bento JMS & Parra JRP (2007) Biology of *Diaphorina citri* (Hem., Psyllidae) on different hosts and at different temperatures. *Journal of Applied Entomology* 131:709–715.
- Patt JM & Sétamou M (2010) Responses of the Asian citrus psyllid to volatiles emitted by the flushing shoots of its rutaceous host plants. *Environmental entomology* 39:618–24.
- Pelz-Stelinski KS & 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* 0:1–6.
- Ramírez-Sánchez AK, Ortega-Arenas LD, Velázquez-Monreal JJ & Valdez-Carrasco JM (2016) Supervivencia y reproducción de *Diaphorina citri* en plantas de naranja y lima Mexicana sanas e infectadas con *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Southwestern Entomologist* 41:801–812.
- Ren S-L, Li Y-H, Zhou Y-T, Xu W-M, Cuthbertson AGS, Guo Y-J & Qiu B-L (2016) Effects of *Candidatus Liberibacter asiaticus* on the fitness of the vector *Diaphorina citri*. *Journal of Applied Microbiology*.
- Southwood TRE (1978) The construction, description and analysis of age-specific life-tables. *Ecological Methods*. Springer, pp 356–387.
- Teixeira DC, Ayres AJ, Kitajima EW, Tanaka FAO, Danet JL, Jagoueix-Eveillard S, Saillard C & Bové JM (2005) First report of a Huanglongbing-like disease of citrus in Sao Paulo State, Brazil and association of a new *Liberibacter* species, “*Candidatus Liberibacter americanus*”,. *Plant Disease* 89:107.
- Teixeira DDC, Saillard C, Eveillard S, Danet JL, da Costa PI, Ayres AJ & Bové J (2005) “*Candidatus Liberibacter americanus*”, associated with citrus huanglongbing (greening disease) in São Paulo State, Brazil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 55:1857–1862.
- Tiwari S, Pelz-Stelinski K & Stelinski LL (2011) Effect of *Candidatus Liberibacter asiaticus* infection on susceptibility of Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, to selected insecticides. *Pest management science* 67:94–9.

- Wedderburn RWM (1974) Quasi-likelihood functions, generalized linear models, and the Gauss-Newton method. *Biometrika* 61:439–447.
- Wenninger E & Hall D (2007) Daily timing of mating and age at reproductive maturity in *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). *Florida Entomologist* 90:715–722.
- Yasuda K, Kawamura F & Oishi T (2005) Location and preference of adult Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) on Chinese box orange jasmine, *Murraya exotica* L. and Flat Lemon, *Citrus depressa*. *Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology* 49:146–149.
- Zeger SL & Liang K-Y (1986) Longitudinal data analysis for discrete and continuous outcomes. *Biometrics*:121–130.