

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

**Potencial da planta de curry (*Bergera koenigii* L.) como
ferramenta para o manejo de *Diaphorina citri* (Hemiptera:
Psyllidae) e detecção de huanglongbing em pomar de citros**

Julia Gabriela Aleixo Vieira

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

**Piracicaba
2023**

Julia Gabriela Aleixo Vieira
Bacharela em Ciências Biológicas

**Potencial da planta de curry (*Bergera koenigii* L.) como ferramenta para o
manejo de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) e detecção de
huanglongbing em pomar de citros**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

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

Piracicaba
2023

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

Vieira, Julia Gabriela Aleixo Vieira

Potencial da planta de curry (*Berberis koenigii* L.) como ferramenta para o manejo de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) e detecção de huanglongbing em pomar de citros / Julia Gabriela Aleixo Vieira. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2023.

89 p.

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

1. Plantio-isca 2. Sensoriamento hiperespectral 3. Inseticidas sistêmicos 4. Manejo do huanglongbing I. Título

Dedicatória

A minha avó, dona Maria do Carmo, por todo amor e apoio dedicados a mim

Dedico e Ofereço

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer à minha família, que mesmo com a distância nunca pouparam esforços para me apoiarem. Em especial, a minha avó, minha mãe e minha dinda. As minhas afilhadas Helena e Aurora e meu sobrinho Arthur, por me mostrarem o que é amor de verdade.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Pedro Takao Yamamoto, por todo o apoio e suporte durante esses quatro anos de doutorado.

Ao meu amor, companheiro e melhor amigo, Jhonny, por sempre me ouvir e me apoiar em todos os momentos, sejam eles bons ou ruins.

Ao Laboratório de Manejo Integrado de Pragas, por toda a parceria durante esse período, especialmente aos colegas Fernando Iost, Ana Clara Iost, Thaís Matioli, Juliano Pazini e Aline Padilha. A Roberta Rodrigues, meu agradecimento especial, que participou durante a condução de todos os experimentos, sempre me ajudando em tudo que estivesse ao seu alcance. A Emile Santana que mais que colega de laboratório se tornou uma grande amiga durante esses anos, sendo sempre muito querida e alegre, contagiando a todos do Laboratório de Manejo Integrado de Pragas.

Ao Dr. Helvécio Della Coletta-Filho e ao Centro de Citricultura Sylvio Moreira pelo auxílio nas análises moleculares e nos experimentos de transmissão. A Eduarda Fischer que me auxiliou desde o início e me ensinou todas as técnicas moleculares.

A amiga Tamara Moraes, por todo o companheirismo desde as primeiras semanas do doutorado, me acolhendo e me ajudando na minha adaptação quando cheguei em Piracicaba.

A amiga Alexandra Kruger por sempre me apoiar e fazer acreditar que o doutorado era um sonho possível. E a minha amiga de infância Paula Del Fiol, mesmo longe, sempre esteve presente em minha vida me ouvindo e me ajudando sempre que foi necessário.

Ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia e Acarologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP) por todo o conhecimento adquirido nas disciplinas e a oportunidade de realizar meu doutoramento.

Ao Prof. Alberto Soares Corrêa, pela disponibilização do espaço do laboratório para a realização das extrações de DNA.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de pesquisa.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| RESUMO | 8 |
| ABSTRACT | 10 |
| INTRODUÇÃO GERAL | 13 |
| Referências | 18 |
| EFEITO DE INSETICIDAS SISTÊMICOS APLICADOS “VIA DRENCH” SOBRE ADULTOS DE <i>Diaphorina citri</i> EM PLANTAS DE CURRY | 25 |
| Resumo | 25 |
| Abstract | 25 |
| 1. Introdução | 26 |
| 2. Material e Métodos | 29 |
| 2.1. Colônia de manutenção de <i>Diaphorina citri</i> | 29 |
| 2.2. Inseticidas | 29 |
| 2.3. Persistência de inseticidas sistêmicos aplicados “via drench” na mortalidade de <i>D. citri</i> em condições de cultivo protegido e campo | 30 |
| 2.4. Determinação da concentração letal média (CL ₅₀) de inseticidas sistêmicos em plantas de curry em cultivo protegido | 31 |
| 2.5. Efeito subletal de inseticidas sistêmicos sobre a oviposição de <i>D. citri</i> | 31 |
| 2.6. Análises estatísticas | 32 |
| 3. Resultados | 32 |
| 3.1. Persistência de inseticidas sistêmicos aplicados “via drench” na mortalidade de <i>D. citri</i> em condições de cultivo protegido e campo | 32 |
| 3.2. Determinação da concentração letal média (CL ₅₀) de inseticidas sistêmicos em plantas de curry | 34 |
| 3.3. Efeito subletal de inseticidas sistêmicos sobre a oviposição de <i>D. citri</i> | 37 |
| 4. Discussão | 37 |
| 5. Conclusões | 41 |
| Referências | 42 |
| Resumo | 47 |
| Abstract | 47 |
| 1. Introdução | 48 |
| 2. Material e Métodos | 51 |
| 2.1. Colônia de manutenção de <i>Diaphorina citri</i> | 51 |
| 2.2. Efeito de <i>Bergera koenigii</i> sobre a infectividade da bactéria “ <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> ” no psilídeo | 52 |
| 3.2. Diagnóstico e quantificação de CLas | 53 |
| 3.2.1. Extração do DNA total: insetos e plantas | 53 |
| 3.2.2. PCR quantitativo em tempo real (qPCR) | 54 |

| | |
|--|----|
| 3.3. Análises estatísticas | 54 |
| 4. Resultados | 55 |
| 5. Discussão | 58 |
| Referências | 62 |
| Resumo | 71 |
| Abstract | 71 |
| 1. Introdução | 72 |
| 2. Material e Métodos | 75 |
| 2.1. Manutenção de plantas sadias e infectadas | 75 |
| 2.2. Coleta de dados espectrais | 75 |
| 2.3. Análises estatísticas | 77 |
| 3. Resultados | 77 |
| 4. Discussão | 81 |
| Referências | 84 |
| CONSIDERAÇÕES GERAIS | 89 |

RESUMO

Potencial da planta de curry (*Bergera koenigii* L.) como ferramenta para o manejo de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) e detecção de huanglongbing em pomar de citros

Atualmente, o huanglongbing (HLB) ou greening é a principal e mais destrutiva doença que acomete os cultivos de citros. A doença está associada as bactérias "*Candidatus Liberibacter* spp." e é considerada o principal desafio dos produtores, devido à dificuldade no manejo e no controle do inseto vetor, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). A principal ferramenta de controle de *D. citri* é a aplicação de inseticidas, porém, outros métodos de controle vêm sendo buscados, a fim de reduzir os impactos causados pelo uso de agroquímicos, como a utilização do controle cultural veiculada por plantas iscas, principalmente a espécie vegetal *Bergera koenigii* L. que é imune a doença e mais atrativa que plantas de citros, além da agricultura de precisão para a detecção precoce do HLB. Diante do exposto, objetivou-se com este trabalho desenvolver outras estratégias de manejo para o HLB e *D. citri*, utilizando como ferramenta a planta-isca *B. koenigii* e o sensoriamento remoto para a detecção de HLB na cultura dos citros. Primeiramente foram realizados testes de persistência em campo e casa-de-vegetação de três inseticidas sistêmicos: tiametoxam, tiametoxam + clorantraniliprole e imidacloprido a fim de desenvolver um sistema atraí-e-mata para *D. citri*. Posteriormente, testes de concentração letal (CL₁₀ e CL₅₀) e de efeitos subletais dos inseticidas tiametoxam e tiametoxam + clorantraniliprole foram realizados. Foi observado alta mortalidade (>90%) de adultos e um efeito prolongado dos inseticidas após a aplicação em experimentos de campo e casa-de-vegetação, além de verificar que concentrações baixas dos inseticidas causaram inibição de oviposição de *D. citri*. Além disso, foi mensurado a CL₅₀ de dois inseticidas, sendo 0,031 g i.a. por planta para tiametoxam e 0,028 g i.a. por planta para tiametoxam + clorantraniliprole. Posteriormente, visando determinar se a planta de curry apresenta ação antibacteriana contra a bactéria no inseto vetor, foram realizados testes para verificar possíveis efeitos da alimentação sobre *D. citri* infectadas com "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" (CLas) em plantas de curry. Foram confinados psílídeos em plantas-fonte da bactéria, e após dez dias foram retirados para o desenvolvimento da progênie. Após a emergência dos adultos, os insetos foram transferidos para plantas de citros e de curry e permaneceram por quatro, oito e quinze dias. Após isso, os espécimes foram retirados, acondicionados, e posteriormente, submetidos ao PCR em tempo real para a quantificação e diagnose de CLas. Não foram observados efeitos significativos sobre a concentração bacteriana nos períodos de quatro, oito e quinze dias. Entretanto, em relação a proporção de amostras de insetos infectivos, foram observadas diferenças entre os períodos e entre os tratamentos. Quando os insetos permaneceram por quatro dias de alimentação, os insetos que se alimentaram em plantas de citros apresentaram maior proporção de insetos infectivos (100%) que plantas de curry (58,88%). Assim, os resultados obtidos demonstraram que a proporção de amostras de psílídeos positivas pode ser influenciada pelo tempo de alimentação e pelo hospedeiro. Por fim, estudou-se a possibilidade de detecção de plantas assintomáticas utilizando sensoriamento remoto.

Foram conduzidos testes para avaliar imagens espectrais de plantas de citros positivas ao HLB e saudáveis, utilizando-se câmera hiperespectral, a partir de 50 dias após a infecção até o aparecimento visual dos sintomas. Foram verificadas diferenças espectrais na região do vermelho de borda a partir da segunda semana de avaliação e na região do visível a partir da quinta semana de avaliação. O trabalho contemplou a avaliação de diferentes ferramentas de manejo do psilídeo e da doença, como a aplicação de inseticidas sistêmicos “via drench” em plantas de curry utilizadas como planta-isca, além de resultados preliminares sobre o uso de imagens espectrais para a detecção precoce do HLB e a ação antimicrobiana do curry sobre adultos de *D. citri* infectados com a bactéria. Assim, destaca-se a importância de maior aprofundamento e novas pesquisas com novas estratégias de manejo do HLB e do psilídeo.

Palavras-chave: Planta-isca, Sensoriamento hiperespectral, Inseticidas sistêmicos, Manejo do huanglongbing

ABSTRACT

Potential of curry leaf (*Bergera koenigii* L.) as a tool for managing *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) and detecting huanglongbing in citrus orchards

Currently, huanglongbing (HLB) or greening, is the main and most destructive disease that affects citrus crops. The disease is associated with the bacteria "*Candidatus Liberibacter* spp." and is considered the main challenge for producers, due to the difficulty in managing the HLB and the insect vector, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). The main *D. citri* control tool is the application of insecticides, however, other control methods have been sought in order to reduce the impacts caused by the use of agrochemicals, such as the use of cultural control carried out by trap crop, mainly *Bergera koenigii* L. which is immune to the disease and more attractive than citrus plants, in addition to precision agriculture for early detection of HLB. Therefore, the aim of this work was to develop other management strategies for HLB and *D. citri*, using the trap crop *B. koenigii* as a tool and remote sensing for the detection of HLB in citrus crops. First, field and greenhouse persistence tests of three systemic insecticides were carried out: thiamethoxam, thiamethoxam + chlorantraniliprole and imidacloprid in order to develop an attract-and-kill system for *D. citri*. Subsequently, lethal concentration tests (LC₁₀ and LC₅₀) and sublethal effects of the insecticides thiamethoxam and thiamethoxam + chlorantraniliprole were carried out. High mortality (>90%) of adults and a prolonged effect of insecticides after application were observed in field and greenhouse experiments, in addition to verifying that low concentrations of insecticides caused inhibition of oviposition of *D. citri*. In addition, the LC₅₀ of two insecticides was identified, 0.031 g ai per plant for thiamethoxam and 0.028 g ai per plant for thiamethoxam + chlorantraniliprole. Subsequently, in order to determine whether the curry leaf has an antibacterial action against the bacteria in the insect vector, tests were carried out to verify possible effects of feeding on *D. citri* infected with "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" (CLAs) in curry leaf. Psyllids were confined in bacterial source plants, and after ten days they were removed for the development of the progeny. After emergence of adults, insects were transferred to citrus and curry plants and remained there for four, eight and fifteen days. After that, the specimens were removed, packaged, and subsequently submitted to real-time PCR for quantification and diagnosis of CLAs. No significant effects were observed on the bacterial concentration in the periods of four, eight and fifteen days. However, regarding the proportion of samples of infective insects, differences were observed between periods and between treatments. When insects remained for four days of feeding, insects that fed on citrus plants had a higher proportion of infective insects (100%) than curry leaf (58.88%). Thus, the results obtained demonstrated that the proportion of positive psyllid samples can be influenced by feeding time and host. Finally, the possibility of detecting asymptomatic plants using remote sensing was studied. Tests were conducted to evaluate spectral images of HLB-positive and healthy citrus plants, using a hyperspectral camera, from 50 days after infection until the visual appearance of symptoms. Spectral differences were verified in the border red region from the second week of evaluation and in the visible region from the fifth week of evaluation. The work included the evaluation of different tools for managing the psyllid and the disease, such as the application of systemic insecticides "via drench" in curry

leaf used as a trap crop, in addition to preliminary results on the use of spectral images for early detection of HLB and the antimicrobial action of curry leaf on *D. citri* adults infected with the bacteria. Thus, the importance of greater depth and new research with new management strategies for HLB and psyllid is highlighted.

Keywords: Trap cropping, Hyperspectral sensing, Systemic insecticides, Huanglongbing management

INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é o terceiro maior produtor citrícola no mundo, possuindo grande valor comercial e de produção para o mercado interno de frutas frescas e para a exportação de suco (CARVALHO et al., 2019). A safra brasileira de laranja 2023/2024 foi estimada em 305 milhões de caixas de 40,8 kg, equivalente a uma produtividade média de 886 caixas/hectare (FUNDECITRUS, 2023a). Porém, dentre os principais fatores que afetam a citricultura, a diversidade de pragas e doenças que ocorrem no cultivo pode trazer grandes problemas e diminuir o rendimento na produção (GOTTWALD, 2010).

Atualmente, o huanglongbing (HLB), também chamado por greening, é a doença mais destrutiva que acomete a cultura dos citros no Brasil e a maior ameaça à citricultura em nível mundial (FUNDECITRUS, 2023a), devido aos danos causados, pela velocidade de disseminação por *D. citri* e pela dificuldade de controle (LOPES et al., 2015). No Brasil, a incidência de HLB tem sido crescente nos últimos seis anos no cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo Mineiro (FUNDECITRUS, 2023a). No ano de 2016 foi registrado uma incidência média de 16,92% de plantas com sintomas, e no último levantamento realizado pelo Fundecitrus (2023) foi notificada a incidência média de 38,06%, sendo o maior aumento percentual desde o ano de 2008 (Fundecitrus, 2023a).

Essa doença está associada à três bactérias restritas ao floema da planta (BOVÉ, 2006). Uma das bactérias causadoras da doença, "*Candidatus Liberibacter africanus*", possui distribuição restrita ao continente africano, atingindo algumas regiões do Oriente Médio, onde é transmitida pelo psílídeo *Trioza erythrae* (Del Guercio, 1918) (Hemiptera: Triozidae) (BOVÉ, 2006). As outras duas bactérias de ocorrência no Brasil, "*Candidatus Liberibacter americanus*" (CLam) e "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" (CLas) são transmitidas pelo psílídeo-asiático-dos-citros *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) (TEIXEIRA et al., 2005; BOVÉ, 2006). Porém, a bactéria CLas possui maior prevalência e disseminação nas Américas (YAMAMOTO et al., 2014). Além dessas bactérias, há relato de um fitoplasma do grupo 16Sr IX que causa sintomas semelhantes à doença (TEIXEIRA et al., 2008).

Árvores de citros infectadas apresentam redução na quantidade e qualidade de frutos produzidos, causando grande impacto econômico para a produção (BOVÉ, 2006; GOTTWALD et al., 2007). Os principais sintomas do HLB incluem folhas mosqueadas, nervuras coradas e brotos amarelados (GOTTWALD et al., 2007). Os sintomas de HLB foram observados nas duas das maiores regiões produtoras de citros

do mundo, São Paulo/Brasil e Flórida/Estados Unidos em 2004 e 2005, respectivamente (COLETTA-FILHO et al., 2004; BOVÉ, 2006). No Brasil, o HLB foi reportado primeiramente na região central do estado de São Paulo (COLETTA-FILHO et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2005). Atualmente, *D. citri* possui ampla distribuição pelos estados brasileiros, ocorrendo em Minas Gerais, Paraná (LOPES et al., 2015), Rio Grande do Sul (LISBOA; NAVA, 2014), Mato Grosso (BARRETO et al., 2020), Pernambuco, Bahia (NASCIMENTO et al., 2015), Roraima (JÚNIOR et al., 2014) Amazônia (NASCIMENTO et al., 2015) e Pará (NORONHA et al., 2019).

Apesar de possuir importância agrícola para plantas comerciais de citros, *D. citri* possui mais que 50 espécies vegetais da família Rutaceae (ALVES et al., 2014). A planta *Murraya paniculata* (L.) Jack (Rutaceae), conhecida popularmente como murta ou jasmim-laranja, utilizada como planta ornamental, é um dos principais hospedeiros desse inseto (LOPES et al., 2015). Entretanto, nem todos os hospedeiros vegetais conhecidos permitem o desenvolvimento completo do inseto, sendo registrada em alguns casos apenas a alimentação dos insetos adultos (AUBERT, 1987; HALBERT; MANJUNATH, 2004, ALVES et al., 2014). As fêmeas ovipositam em ramos novos, o que é fator determinante para o aumento populacional da espécie (LOPES et al., 2015).

Atualmente, o controle químico é a principal tática ou ferramenta para o manejo do HLB em pomares no Brasil (MIRANDA et al., 2016). Predominantemente se utilizam inseticidas com ação de contato em aplicação foliar, mas também tem sido utilizados inseticidas com ação sistêmica, aplicados no solo (Drench) ou no tronco de plantas de citros ainda não produtivas (MIRANDA et al., 2016). Apesar do controle químico ser um método efetivo na redução da população do inseto vetor e, conseqüentemente, da doença, pode causar impactos no ambiente, como desequilíbrio biológico, surtos de pragas secundárias, resistência e o ressurgência de pragas (BELASQUE et al., 2010; BELOTI et al., 2018). Em alguns países, há relatos de populações resistentes devido ao uso intensivo de inseticidas (TIWARI et al., 2011; VÁZQUEZ-GARCÍA et al., 2013). Recentemente, foi confirmada a presença de populações resistentes de *D. citri* aos inseticidas pertencentes aos grupos químicos piretroides e neonicotinoides (FUNDECITRUS, 2023b).

Por esses fatores, outros métodos que sejam sustentáveis e sinérgicos ao uso de químicos têm sido buscados. A utilização de plantas-isca tem como objetivo a atração de insetos-praga ou outros organismos deletérios para a proteção das

culturas-alvo do ataque de pragas agrícolas, assim, concentrando-as onde serão controladas com outros métodos, impedindo que estas causem danos significativos a um menor custo de controle (HOKKANEN, 1991). A espécie vegetal escolhida geralmente é plantada para cercar a cultura principal, e na maioria das vezes, limitando o uso de químicos na bordadura, onde os insetos encontram-se em maior abundância (SARKAR et al., 2018).

Apesar do controle cultural com o uso de plantas-isca ser um método efetivo, o principal desafio é reter os insetos no cultivo, evitando uma nova dispersão para a cultura comercial (HOLDEN et al., 2012). Portanto, o uso de inseticidas adequados para o controle do inseto alvo em plantas-isca, e em plantas de citros, podem ajudar a diminuir a propagação da doença HLB, reduzindo a densidade populacional de *D. citri* em campo (BELOTI et al., 2017). Os inseticidas sistêmicos proporcionam um maior período de controle do psilídeo em árvores jovens, além de causar um menor impacto em insetos benéficos que a aplicação de contato (ROGERS; SHAWER, 2007). Assim, podem ser aliados ao uso do plantio-isca de campo, atuando na segunda parte do sistema atrai-e-mata, eliminando o inseto vetor (TOMASETO et al., 2019). Dessa forma, a utilização da cultura-armadilha tem grande potencial para o manejo do HLB em pomares de citros de pequeno e médio porte, devido ao tamanho da área da borda, pois encontram-se mais expostos à infecção primária do HLB (EDUARDO et al., 2023).

Estudos recentes demonstraram que a utilização de plantas-isca vem demonstrando grande potencial como ferramenta para o manejo de *D. citri* (BELOTI et al., 2018; TOMASETO et al., 2019). A planta de murta (*M. paniculata*) utilizada como plantio-isca demonstrou redução na incidência do HLB em 43% (TOMASETO et al., 2019). Essa espécie vegetal pode ser infectada com CLas em baixos títulos bacterianos, não exercendo papel principal na transmissão do patógeno para plantas de citros (LOPES et al., 2015; CIFUENTES-ARENAS et al., 2019). Entretanto, em condições altamente favoráveis à infecção e transmissão de CLas e sem que haja procedimentos de quarentena, é possível que eventualmente essas plantas sirvam como transporte para outras áreas livres da bactéria (CIFUENTES-ARENAS et al., 2019). Desta forma, outra espécie vegetal também vem demonstrando potencial no seu uso como cultura-armadilha. O curry [*Berbera koenigii* L. (Rutaceae)] é um hospedeiro adequado para o desenvolvimento de *D. citri*, além de ser mais atrativa que plantas de citros e ser imune a “Ca. L. asiaticus” e ao desenvolvimento do HLB

(BELOTI et al., 2017; BELOTI et al., 2018). O número de espécimes de *D. citri* observado nos citros com a utilização de *B. koenigii* como cultura armadilha foi 69% menor quando comparada com a área de citros sem a instalação do plantio-isca (EDUARDO et al., 2023). Esta diferença pode estar relacionada com os voláteis liberados pela planta de curry que contribuem para o movimento dos insetos em direção ao cultivo-armadilha (EDUARDO et al., 2023).

Além disso, a planta de curry é amplamente estudada pela área médica por suas características fitoquímicas e atividades farmacológicas (NINGAPPA et al., 2010; HANDRAL et al., 2012; BALAKRISHNAN et al., 2020). A espécie apresenta diversas propriedades químicas que apresentam atividades antioxidantes, antidiabéticas, anticarcinogênicas, estimulantes e atividades antimicrobianas (KHANUM et al., 2000; YADAV et al., 2002; NINGAPPA et al., 2008; HANDRAL et al., 2012). A folha de curry possui alto teor de fenólicos, além de uma classe incomum de alcaloides carbazol, que é conhecida por propriedades antimicrobianas que pode estar relacionado com a imunidade da planta de curry a CLas (HIJAZ et al., 2020). As propriedades da planta hospedeira, como metabólitos primários, podem afetar o desempenho e a aptidão de vetores de α -proteobactérias entre espécies de plantas hospedeiras ou genótipos (STOCKTON et al., 2016; GROSS et al., 2021). Devido a isso, sugere-se que a utilização da espécie como planta-isca para *D. citri*, pode apresentar redução na infectividade de adultos sobre “*Ca. L. asiaticus*”, porém, os trabalhos sobre o tema são escassos até o momento.

Outro método que poderia auxiliar no manejo do HLB é a agricultura de precisão (AP), pois um dos problemas relacionados ao HLB é a detecção tardia dos sintomas da doença em plantas de citros (MISHRA et al., 2009). Atualmente, a detecção de HLB é feita por inspeções visuais no campo; porém, os sintomas começam a aparecer tardiamente, o que retarda a remoção de plantas infectadas em campo, além de ser um método trabalhoso, demorado e sujeito a erros (MISHRA et al., 2009; GOTTWALD, 2010). Outro método utilizado é o PCR em tempo real para a detecção da doença, e apesar de eficaz, é demorado e possui um custo elevado (LI et al., 2011).

Desta forma, os avanços tecnológicos em imagens e de sensores têm demonstrado novas oportunidades de uso no monitoramento automatizado de pragas de insetos e/ou os danos a elas associados, otimizando o uso de produtos fitossanitários e reduzindo as perdas de rendimento na agricultura de grande escala

(IOST FILHO et al., 2022). Além de que, o uso de drones pode reduzir os gastos envolvidos no monitoramento da lavoura, além de reduzir os impactos gerados ao meio ambiente, por meio da detecção rápida de organismos alvo e, pela localização da área onde são necessárias à aplicação de inseticidas ou de outros métodos de controle (IOST FILHO et al., 2020). Em relação à cultura dos citros, alguns estudos preliminares apontam o potencial desta ferramenta para o manejo do HLB (MISHRA et al., 2009; LI et al., 2011). Além de ter sido relatado que é possível a utilização de tecnologias de imagem para a detecção de doenças em diferentes estádios de infecção e cultivares de citros (HE et al., 2022).

Portanto, frente a necessidade de diminuir a utilização de inseticidas e a incidência de HLB, destaca-se a importância de estudos relacionados a métodos mais sustentáveis de controle, como a utilização de plantas-isca em campo. O curry possui potencial para ser utilizado como ferramenta para implantar um sistema atrai-e-mata para *D. citri*, com o uso de inseticidas sistêmicos na planta-isca, reduzindo as aplicações no cultivo comercial e aumentando a eficácia de controle do psílídeo. Desta forma, o curry como planta-isca irá atrair os insetos e o inseticida atuar na mortalidade, evitando com que os indivíduos retornem a cultura principal. Além disso, é importante a realização de estudos acerca dos efeitos da alimentação do psílídeo em plantas de curry, e se, a utilização dessa planta como hospedeiro pode afetar a infecção de CLas. Outras estratégias podem ser utilizadas no manejo integrado do HLB e de *D. citri*, como a tecnologia de precisão para detectar e monitorar a doença em campo, sendo necessário aprofundar os conhecimentos acerca do sensoriamento remoto aliado às práticas de monitoramento na cultura dos citros.

Assim, o objetivo geral com este trabalho foi estudar e propor novas estratégias de manejo integrado do Huanglongbing e do inseto vetor da bactéria, *D. citri*, na cultura dos citros. Os objetivos específicos foram: (1) avaliar os efeitos letais e subletais de inseticidas sistêmicos, aplicados via “drench”, na mortalidade de adultos de *D. citri* em plantas de curry (*Berbera koenigii*) em estufas-de-vegetação e no campo; (2) determinar se a utilização da planta de curry (*B. koenigii*) pode afetar a infectividade de *D. citri* por “Ca. L. asiaticus” e (3) coletar dados espectrais de plantas de *Citrus sinensis* (variedade ‘Valência’) infectadas com “Ca. L. asiaticus” na fase assintomática.

Referências

AUBERT, B. *Trioza erytreae* Del Guercio and *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psylloidea) the two vectors of citrus greening disease: Biological aspects and possible control strategies. **Fruits**, v. 42, n. 3, p. 149-162, 1987.

ALVES, G.R.; DINIZ, A.J.F.; PARRA, J.R.P. Biology of the huanglongbing vector *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) on different host plants. **Journal of Economic Entomology**, v. 107, n. 2, p. 691-696, 2014.

BALAKRISHNAN, R., VIJAYRAJA, D., JO, S. H., GANESAN, P., SU-KIM, I., CHOI, D. K. Medicinal profile, phytochemistry, and pharmacological activities of *Murraya koenigii* and its primary bioactive compounds. **Antioxidants**, v. 9, n. 2, p. 101, 2020.

BARRETO, M.R.; QUEIROZ, D.L.; BURCKHARDT, D.; AMILTON, L.F. Checklist of jumping plant-lice (Hemiptera, Sternorrhyncha, Psyllidae) from Mato Grosso, Brazil. **Ciência Florestal**, v. 30, n. 3, p. 873-884, 2020.

BELASQUE, J.; BASSANEZI, R.B.; YAMAMOTO, P.T.; AYRES, A.J.; TACHIBANA, A.; VIOLANTE, A.R.; TANK Jr, A.; DI GIORGI, F.; TERSI, F.E.A.; MENEZES, G.M.; DRAGONE, J.; JANK Jr, R.H.; BOVÉ, J.M. Lessons from Huanglongbing management in São Paulo State, Brazil. **Journal of Plant Pathology**, v. 92, n. 2, p. 285-302, 2010.

BELOTI, V.H.; SANTOS, F.; ALVES, G.R.; BENTO, J.M.S.; YAMAMOTO, P.T. Curry leaf smells better than citrus to females of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). **Arthropod-Plant Interactions**, v. 11, p. 709-716, 2017.

BELOTI, V.H.; ALVES, G.R.; COLETTA-FILHO, H.D.; YAMAMOTO, P.T. The Asian Citrus Psyllid host *Murraya koenigii* is immune to citrus Huanglongbing pathogen 'Candidatus Liberibacter asiaticus'. **Ecology e Epidemiology**, v. 108, p. 1089-1094, 2018.

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

CARVALHO, S.A.; GIRARDI, E.A.; FILHO, F.A.A.M.; FERRAREZI, R.S.; COLETTA-FILHO, H.D. Advances in citrus propagation in Brazil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 41, n. 6, e-422, 2019.

CIFUENTES-ARENAS, J.C.; BEATTIE, G.A.C.; PENA, L.; LOPES, S.A. *Murraya paniculata* and *Swinglea glutinosa* as short-term transient hosts of 'Candidatus Liberibacter asiaticus' and implications for the spread of huanglongbing. **Phytopathology**, v. 109, n. 12, p. 2064-2073, 2019.

COLETTA-FILHO, H.D.; TARGON, M.L.P.N.; TAKITA, M.A.; DE NEGRI, J.D.; POMPEU, J.; MACHADO, M.A.; DO AMARAL, A.M.; MULLER, G.W. First report of the causal agent of huanglongbing ("Candidatus Liberibacter asiaticus") in Brazil. **Plant Disease**, v. 88, p. 1382–1382, 2004.

EDUARDO, W.I., SILVA, A.C., VOLPE, H.X.L., ALQUÉZAR, B., PENA, L., MIRANDA, M.P. Push-pull and kill strategy for *Diaphorina citri* control in citrus orchards. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 171, n. 4, p. 287-299, 2023.

FUNDECITRUS. Disponível em: <https://www.fundecitrus.com.br/levantamentos>. Acesso em: 31 ago. 2023a.

FUNDECITRUS. Disponível em: <https://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/noticias/integra/pesquisa-confirma-resistencia-de-psilideos-a-piretroides-e-neonicotinoides/1324>. Acesso em: 18 ago. 2023b.

GOTTWALD, T.R.; GRAÇA, J.V.; BASSANEZI, R.B. Citrus Huanglongbing: The pathogen and its impact. **Plant Health Progress**, v. 8, n. 1, p. 31, 2007.

GOTTWALD, T.R. Current epidemiological understanding of citrus huanglongbing. **Annual review of phytopathology**, v. 48, p. 119-139, 2010.

GROSS, J.; GALLINGER, J.; GÖRG, L.M. Interactions between phloem-restricted bacterial plant pathogens, their vector insects, host plants, and natural enemies, mediated by primary and secondary plant metabolites. **Entomologia Generalis**, v. 42, p. 185-215, 2021.

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

HANDRAL, H.K.; PANDITH, A.; SHRUTHI, S.D. A review on *Murraya Koenigii*: Multipotential medicinal plant. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 5, n. 1, p. 5-14, 2012.

HE, C.; LI, X.; LIU, Y.; YANG, B.; WU, Z.; TAN, S.; YE, D.; WENG, H. Combining multicolor fluorescence imaging with multispectral reflectance imaging for rapid citrus Huanglongbing detection based on lightweight convolutional neural network using a handheld device. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 194, 106808, 2022.

HIJAZ, F.; AL-RIMAWI, F.; MANTHEY, J.A.; KILLINY, N. Phenolics, flavonoids and antioxidant capacities in Citrus species with different degree of tolerance to Huanglongbing. **Plant Signaling & Behavior**, v. 15, n. 5, e-1752447, 2020.

HOLDEN, M.H.; ELLNER, S.P.; LEE, D.H.; NYROP, J.P.; SANDERSON, J. P. Designing an effective trap cropping strategy: the effects of attraction, retention and plant spatial distribution. **Journal of Applied Ecology**, v. 49, n. 3, p. 715-722, 2012.

HOKKANEN, H.M.T. Trap cropping in pest management. **Annual Review of Entomology**, v. 36, p. 119-138, 1991.

IOST FILHO, F.H.; HELDENS, W.B.; Kong, Z.; LANGE, E.S. Drones: innovative technology for use in precision pest management. **Journal of economic entomology**, v. 113, n. 1, p. 1-25, 2020.

IOST FILHO, F.H.; PAZINI, J.B.; MEDEIROS, A.D.; ROSALEN, D.L.; YAMAMOTO, P.T. Assessment of Injury by Four Major Pests in Soybean Plants Using Hyperspectral Proximal Imaging. **Agronomy**, v, 12, n. 7, p. 1516, 2022.

JÚNIOR, A.L.M.; GUIDOLIN, A.S.; CÔNSOLI, F.L.; FREITAS, J.A. Primeiro registro de *Diaphorina citri* Kuwayama, 1908 (Hemiptera: Liviidae) para o estado de Roraima, Brasil. **Revista de Agricultura**, v. 89, n. 3, p. 183-186, 2014.

KHANUM, F.; ANILAKUMAR, K.R.; SUDARSHANA KRISHNA, K.R.; VISWANATHAN, K.R.; SANTHANAM, K. Anticarcinogenic effects of curry leaves in dimethylhydrazine-treated rats. **Plant Foods for Human Nutrition**. v. 55, p. 347–355, 2000.

LI, X.; LEE, W.S.; LI, M.; EHSANI, R.; MISHRA, A.R.; YANG, C.; MANGAN, R.L. Comparison of different detection methods for citrus greening disease based on airborne multispectral and hyperspectral imagery. **American Society of Agricultural and Biological Engineers**, p. 1, 2011.

LISBOA, H.; NAVA, D.E. Ocorrência de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) no Estado do Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, v. 25, Goiânia, GO. Resumos... Embrapa Arroz e Feijão: Universidade Federal de Goiás, 2014.

LOPES, J.R.S.; PARRA, J.R.P.; YAMAMOTO, P.T.; BENTO, J.M.S. Psilídeo-asiático-dos-citros, *Diaphorina citri* Kuwayama. In: **Pragas introdutivas no Brasil**, 2015.

MIRANDA, M.P.; YAMAMOTO, P.T.; GARCIA, R.B.; LOPES, J.P. Thiamethoxam and imidacloprid drench applications on sweet orange nursery trees disrupt the feeding and settling behaviour of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). **Pest Management Science**, v. 72, n. 9, p. 1785-1793, 2016.

MISHRA, A.R.; EHSANI, R.E.Z.A.; KARIMI, D.; ALBRIGO, L.G. Potential applications of multiband spectroscopy and hyperspectral imaging for detecting HLB infected orange trees. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, v. 122, p. 147-151, 2009.

NASCIMENTO, A.; SILVA, S.; LARANJEIRA, F.F. Densidade populacional de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae), vetor do huanglongbing (ex-greening), em quatro regiões indenes no Brasil. **Seminário de Intensificação Ecológica da Fruticultura**, v. 4, p. 128-134, 2015.

NINGAPPA, M.B.; DINESHA, R.; SRINIVAS, L. Antioxidant and free radical scavenging activities of polyphenol-enriched curry leaf (*Murraya koenigii* L.) extracts. **Food Chemistry**. v. 106, p. 720–728, 2008.

NINGAPPA, M.B.; DHANANJAYA, B.L.; DINESHA, R.; HARSHA, R.; SRINIVAS, L. Potent antibacterial property of APC protein from curry leaves (*Murraya koenigii* L.). **Food chemistry**, v. 118, n. 3, p. 747-750, 2010.

NORONHA, A.C.D.S.; BLANCO, D.G.; ISHIDA, A.K.N.; MORAES, R.F.; SAMPAIO, Sampaio, S.M.N. Occurrence and distribution of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) and *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae) in Pará state, Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 86, p. 1-5, e0302018, 2019.

ROGERS, M.E.; SHAWER, D.B. Effectiveness of several soil-applied systemic insecticides for managing the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae). **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, v. 120, p. 116-119, 2007.

SARKAR, S.C.; WANG, E.; WU, S.; LEI, Z. Application of trap cropping as companion plants for the management of agricultural pests: a review. **Insects**, v. 128, n. 9, p. 1-16, 2018.

STOCKTON, D.G.; MARTINI, X.; PATT, J.M.; STELINSKI, L.L. The influence of learning on host plant preference in a significant phytopathogen vector, *Diaphorina citri*. **PLoS One**, v. 11, n. 3, e0149815, 2016.

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

TEIXEIRA, D.C.; WULFF, N.A.; MARTINS, E.C.; KITAJIMA, E.W.; BASSANEZI, R.; AYRES, A.J.; EVEILLARD, S.; SAILLARD, C.; BOVÉ, J.M. A Phytoplasma closely related to the Pigeon Pea Witches'-Broom Phytoplasma (16Sr IX) is associated with citrus Huanglongbing symptoms in the State of São Paulo, Brazil. **Phytopathology**, v. 98, n. 9, p. 977-984, 2008.

TIWARI, S.; MANN, R.S.; ROGERS, M.E.; STELINSKI, L.L. Insecticide resistance in field populations of Asian citrus psyllid in Florida. **Pest Management Science**, v. 67, p. 1258-1268, 2011.

TOMASETO, A.F.; MARQUES, R.N.; FERERES, A.; ZANARDI, O.Z.; VOLPE, H.X.L.; ALQUÉZAR, B.; PENA, L.; MIRANDA, M.P. Orange jasmine as a trap crop to control *Diaphorina citri*. **Scientific Reports**, v. 9, p. 1-11, 2019.

VÁZQUEZ-GARCÍA, M.; VELÁZQUEZ-MONREAL, J.; MEDINA-URRUTIA, V.M.; CRUZ-VARGAS, C.J.; SANDOVAL-SALAZAR, M.; VIRGEN-CALLEROS, H.; TORRES-MÓRAN, J.P. Insecticide resistance in adult *Diaphorina citri* Kuwayama from lime orchards in Central West Mexico. **Southwestern Entomologist**, v. 38, n. 4, p. 579-596, 2013.

YADAV, S.; VATS, V.; DHUNNOO, Y.; GROVER, J.K. Hypoglycemic and antihyperglycemic activity of *Murraya koenigii* leaves in diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 82, p. 111–116, 2002.

YAMAMOTO, P.T.; ALVES, G.R.; BELOTI, V.H. Manejo e controle do huanglongbing (HLB) dos cítricos. **Investigación Agraria**, v. 16, n. 2, p. 69-82, 2014.

EFEITO DE INSETICIDAS SISTÊMICOS APLICADOS “VIA DRENCH” SOBRE ADULTOS DE *Diaphorina citri* EM PLANTAS DE CURRY

Vieira, J.G.A.; Santana, E.D.R.; Thiesen, L.V.; Matioli, T.F.; Yamamoto, P.T. Effect of Systemic Insecticides Applied via Drench on the Mortality of *Diaphorina citri* on Curry Leaf. *Insects* **2023**, *14*, 422. <https://doi.org/10.3390/insects14050422>

Resumo

O Huanglongbing (HLB) é a doença de maior relevância na cultura dos citros associada as bactérias “*Candidatus Liberibacter spp.*” que são transmitidas pelo psilídeo, *Diaphorina citri*. Seu controle ocorre principalmente pela aplicação de inseticidas, portanto, é necessária a validação de outros métodos alternativos, como a utilização de plantas-isca como o curry, *Bergera koenigii*, que é altamente atrativa ao psilídeo. Assim, objetivou-se com este trabalho avaliar os efeitos dos principais inseticidas sistêmicos aplicados “via drench” sobre adultos de *D. citri* em plantas de curry. Para isto, foram realizados testes para avaliar a persistência de três produtos, tiametoxam, tiametoxam + clorantraniliprole e imidacloprido em casa-de-vegetação e campo em plantas de curry após 7, 14, 28, 42, 56, 70, 98 e 154 dias da aplicação. Com os inseticidas contendo o ingrediente ativo tiametoxam, isolado ou me mistura com outro inseticida, foram realizados testes com diferentes concentrações sobre os adultos para determinar a CL₁₀ e a CL₅₀. Por fim, foi desenvolvido um teste para verificar o efeito subletal sobre a oviposição e desenvolvimento de *D. citri*. Foi possível observar um efeito prolongado dos inseticidas no controle de adultos, porém, no experimento de campo foi observado uma redução na mortalidade a partir de 42 dias após a aplicação “via drench”, enquanto, no teste de casa de vegetação não houve declínio até o último dia de avaliação. A concentração letal média (CL₅₀) encontrada para tiametoxam foi de 0,031 g de ingrediente ativo por planta e para o produto em mistura de 0,028 g de i.a. por planta. No experimento com doses subletais não foi observado oviposição nas plantas tratadas. Nossos resultados sugerem que o sistema atrai-mata utilizando a planta de curry e inseticidas sistêmicos são eficazes para o controle de *D. citri* e contribuem para o manejo integrado do HLB.

Palavras-chave: Inseticidas sistêmicos; neonicotinoides; controle químico; toxicidade; plantio-isca; sistema atrai-mata; tiametoxam; citros.

Abstract

Huanglongbing (HLB) is the most relevant disease in citrus crop associated with the bacteria “*Candidatus Liberibacter spp.*” which are transmitted by the psyllid, *Diaphorina citri* (ACP). ACP is mainly controlled with insecticides, requiring the development of alternative methods, e.g., the use of trap plants such as curry leaf, *Bergera koenigii*, which is highly attractive to the ACP. Thus, the objective of this study was to evaluate the effects of the main systemic insecticides applied “via drench” on adults of *D. citri* in curry leaf. We tested the persistence of three pesticides: thiamethoxam, thiamethoxam + chlorantraniliprole, and imidacloprid in greenhouse and field condition at 7, 14, 28, 42, 56, 70, 98, and 154 days after the application. Different concentrations of insecticides containing the active ingredient thiamethoxam were tested on adults to determine the LC₁₀ and LC₅₀. Finally, we assessed the sublethal effects on the oviposition and development of *D. citri*. The insecticides controlled the adults for long periods. However, in the field experiment, after 42 days

from application there was a decrease in mortality caused by pesticides applied via drench, while in the greenhouse mortality did not decline until the last day of evaluation. The median lethal concentration (LC₅₀) for thiamethoxam was 0.031 g of a.i. per plant, and for thiamethoxam in a mixture, the LC₅₀ was 0.028 g a.i. per plant. In the experiment with sublethal doses, *D. citri* did not oviposit on the treated plants. Our findings suggest that the attract-and-kill system using the curry leaf tree and systemic insecticides is effective for the control of *D. citri* and contributes to the integrated management of HLB.

Keywords: systemic insecticides; neonicotinoid; chemical control; toxicity; trap plant; attract-and-kill system; thiamethoxam; citrus.

1. Introdução

O psílideo-asiático-dos-citros, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) é o inseto vetor das bactérias restritas ao floema “*Candidatus Liberibacter spp.*” que estão associadas à principal e mais destrutiva doença da citricultura, o huanglongbing (HLB) ou também chamado de greening [1,2]. Nas Américas, “*Ca. Liberibacter asiaticus*” (CLAs) é a bactéria mais disseminada nos cultivos de citros [3].

Não existem métodos capazes de curar as plantas ou reduzir os sintomas e os danos causados pela doença, portanto, o manejo do HLB é realizado empregando-se métodos preventivos, evitando a infecção das plantas de citros [4,3,5]. Atualmente, o controle químico é a principal ferramenta para o manejo do inseto vetor, com aplicação de inseticidas de contato em pulverização foliar tratorizada ou aérea e aplicação sistêmica no solo e no tronco de árvores de citros jovens, ainda não produtivas [6]. A aplicação sistêmica proporciona um maior período de controle do psílideo, além de causar um menor impacto em insetos benéficos, sendo a principal ferramenta para o controle de *D. citri* em árvores jovens [7,8].

Entretanto, apesar do uso de inseticidas ser um método efetivo, pode ocasionar uma série de consequências ambientais resultando na mortalidade de organismos não-alvo, incluindo polinizadores e inimigos naturais [9]. O uso indiscriminado de produtos químicos pode favorecer a seleção de populações resistentes, ocasionar surtos de pragas secundárias e o ressurgimento da praga alvo de controle [10,11,12,13,14]. Além disso, pode trazer riscos para a saúde humana, comprometendo a segurança do alimento por meio da contaminação de alimentos por agroquímicos [15].

O manejo do HLB necessita de uma abordagem integrada visando o controle de *D. citri* e da doença, uma vez que, métodos alternativos são imprescindíveis para reduzir os impactos da doença na indústria de citros [16]. Entre as estratégias

testadas, a tática de plantio-isca tem demonstrado excelente potencial para a redução do inseto vetor e para o manejo da doença [17,18,13,19].

A utilização de plantas-isca consiste na atração de insetos ou outros organismos para a proteção das culturas-alvo do ataque de pragas, impedindo que elas causem danos significativos, concentrando-as em uma determinada parte do campo onde as pragas podem ser controladas com outros métodos e com um baixo custo [20,21,22]. As plantas hospedeiras adequadas para a alimentação e desenvolvimento de *D. citri* pode funcionar como armadilha para atrair, interceptar ou reduzir o movimento dos indivíduos para a cultura comercial [17]. A espécie vegetal escolhida geralmente é plantada ao entorno da cultura principal, muitas vezes concentrando o uso de químicos na bordadura, onde os insetos encontram-se em maior número [21].

As principais vantagens do uso de plantas-isca para o controle de pragas, são: redução do uso de inseticidas, redução de custos, preservação dos inimigos naturais, melhorando a qualidade e produtividade da colheita [20,22]. Além disso, para insetos vetores de fitopatógenos, a cultura armadilha contribui para redução da disseminação primária da doença, quando instalada na bordadura, evitando que o inseto ingresse para o interior da lavoura, visto que os adultos do psílídeo preferem colonizar plantas presentes na borda do pomar [23].

A utilização de plantas-isca tem sido estudada para o manejo de *D. citri* e do HLB [17,18,13,19]. Estudos de campo foram desenvolvidos e demonstraram que o uso de *Murraya paniculata* L. (Rutaceae) como plantio-isca possui capacidade de reduzir a densidade populacional de *D. citri* [17]. Porém, há relatos que essa planta possui capacidade de ser infectada com CLas, mesmo que o título bacteriano seja inferior ao encontrado nas espécies comerciais de citros [24].

Assim, a espécie vegetal *Berbera koenigii* L. (Rutaceae), popularmente conhecida como curry, vem demonstrando potencial para sua utilização como cultura armadilha em lavouras comerciais de citros [13,18]. Essa espécie é um hospedeiro adequado para o desenvolvimento de *D. citri*, além de ser mais atrativa do que a planta de citros e imune à doença [13,18]. As brotações produzidas continuamente por *B. koenigii* podem desempenhar um papel importante na manutenção de altas populações do psílídeo, servindo como importante reservatório desses insetos [18]. Recentemente foi relatado o primeiro trabalho com o sucesso de introdução de uma proteína Bt (Cry1Ba1) em plantas de curry, demonstrando efeitos expressivos na

mortalidade de *D. citri* [16], podendo ser uma ferramenta alternativa para o manejo de HLB e do inseto vetor nos para o setor citrícola.

Entretanto, o principal fator que acarreta falhas no controle de pragas utilizando as culturas-armadilhas, é a incapacidade de reter os insetos no cultivo [25]. Dessa maneira, são necessárias práticas que impeçam a dispersão dos insetos para a cultura comercial [25]. Medidas de controle com inseticidas adequados nesses hospedeiros alternativos, e em plantas de citros, podem ajudar a diminuir a propagação da doença HLB, reduzindo a incidência de *D. citri* em campo [18].

Os inseticidas neonicotinoides são frequentemente utilizados e aplicados diretamente no solo em plantas de citros jovens, através da técnica chamada “via drench”, onde o inseticida transloca pelos vasos do xilema das raízes até as folhas após ser aspergido no solo ou no tronco da planta [26], garantindo uma ótima cobertura de aplicação. Dentre os produtos utilizados na aplicação “via drench”, os inseticidas sistêmicos tiametoxam e imidacloprido apresentam maior eficácia e são frequentemente usados na redução populacional de *D. citri* em plantas de citros [7]. A utilização dos inseticidas sistêmicos permite a implementação de um sistema atrai-mata e apresentam impacto reduzido a inimigos naturais, podendo ser utilizado em conjunto com agentes de controle biológico quando aplicados no solo [27,7,8]. Assim, a utilização de *B. koenigii* como planta-isca em culturas comerciais de citros pode contribuir para a redução da incidência da doença, o que pode ser potencializado quando aliado a outros métodos de controle como a transgenia [16], controle biológico com o uso de parasitoides [28] e a utilização de inseticidas sistêmicos [8,6].

A utilização de *B. koenigii* como planta isca em campo num sistema atrai-e-mata depende da eficácia em eliminar o inseto vetor que foi atraído para as plantas. Assim, se faz necessário a realização de pesquisas com os principais produtos químicos utilizados na cultura dos citros e os seus efeitos letais e subletais sobre *D. citri*, quando aplicados na planta-isca. Portanto, o objetivo com este estudo foi verificar os efeitos letais e subletais e a persistência dos inseticidas sistêmicos aplicados “via drench” em plantas de curry como um potencial método alternativo de planta-isca em campo visando o manejo do inseto vetor e da doença.

2. Material e Métodos

2.1. Colônia de manutenção de *Diaphorina citri*

A criação de *D. citri* foi mantida em salas climatizadas (Temperatura: 25 ± 2 °C, U.R.: $60 \pm 10\%$, Fotofase: 14 h) no Laboratório de Manejo Integrado de Pragas, localizado no Departamento de Entomologia e Acarologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo (ESALQ/USP). Mudanças de murta (*M. paniculata*) adquiridas comercialmente foram utilizadas para a criação do inseto [29,30].

Primeiramente, as plantas foram podadas em aproximadamente 25 cm de altura e, quando produziram brotos (2 a 3 cm de comprimento) foram colocadas em gaiolas de criação (45 x 45 x 50 cm), servindo como substrato para oviposição das fêmeas e para alimentação de *D. citri* [28].

Aproximadamente trezentos espécimes adultos, no início do período reprodutivo (12 dias após a eclosão) foram colocados no interior de cada gaiola. Os indivíduos permaneceram no interior das gaiolas por sete dias, a fim de permitir a oviposição dos insetos. Após o período de oviposição, os adultos foram retirados por meio de um succionador manual, e as plantas contendo os ovos permaneceram nas gaiolas para garantir seu desenvolvimento.

2.2. Inseticidas

Para realização do trabalho foram escolhidos inseticidas comerciais que são registrados para o controle de *D. citri* na cultura dos citros no Brasil e com ação sistêmica (Tabela 1). O tratamento controle foi constituído apenas por água destilada.

Tabela 1. Ingrediente ativo, nome comercial, grupo químico, fabricante, IRAC MoA e concentração (g i.a./planta) dos principais inseticidas aplicados “via drench” na cultura dos citros para o controle de *Diaphorina citri*.

| Ingrediente Ativo | Nome comercial | Grupo químico | Fabricante | IRAC MoA | Concentração (g i.a./planta) |
|-------------------------------------|-------------------|-----------------------------|--------------------------------------|------------|------------------------------|
| Tiametoxam | Actara® 250 WG | Neonicotinoide | Syngenta® São Paulo, SP–Brasil | 4A | 0,25 |
| Tiametoxam + Clorantraniliprole* | Durivo® 300 SC | Neonicotinoide + Diamida | Syngenta® São Paulo, SP–Brasil | 4A + 28 | 0,2 + 0,1 |
| Imidacloprido | Provado 200 SC | Neonicotinoide | Bayer® São Paulo, SP–Brasil | 4A | 0,3 |

*Tiametoxam + clorantraniliprole = produto em mistura.

2.3. Persistência de inseticidas sistêmicos aplicados “via drench” na mortalidade de *D. citri* em condições de cultivo protegido e campo

Os inseticidas foram aplicados “via drench”, com volume de 50 mL de calda por planta/vaso, sendo o mesmo procedimento utilizado pelos citricultores [31]. Para o teste de casa-de-vegetação, os vasos onde foram transplantadas as mudas de curry possuíam o mesmo peso de solo (6,5 a 7 kg) e altura de aproximadamente 60 cm. Após a aplicação, as plantas permaneceram em casa de vegetação, e foram irrigadas três vezes na semana, com cerca de 150 mL de água por vaso, durante todo o período do experimento. Para o teste de campo, as plantas foram tratadas com os inseticidas e após sete dias foram plantadas na área experimental da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, Brasil (Latitude de 22°42’16” W e longitude de 47°37’23” S).

No teste em condições de cultivo protegido, utilizou-se o delineamento experimental em blocos com parcelas casualizadas com seis repetições por tratamento (inseticidas), enquanto, no teste em campo, o delineamento foi inteiramente ao acaso constituído de cinco repetições por tratamento. Foram utilizados dez insetos de até sete dias de idade por repetição (planta), que foram trocados a cada período de confinamento.

Os confinamentos de adultos de *D. citri* foram realizados aos 7, 14, 28, 42, 56, 70, 98 e 154 dias após a aplicação (DAA), utilizando gaiolas de “voile” para o aprisionamento dos insetos. No experimento de campo, os confinamentos iniciaram ao 14º DAA, devido ao tratamento prévio com os inseticidas e a posterior instalação das mudas de curry na área. Após o confinamento, foi avaliada a mortalidade ao terceiro dia.

2.4. Determinação da concentração letal média (CL₅₀) de inseticidas sistêmicos em plantas de curry em cultivo protegido

As plantas de curry foram tratadas com os inseticidas tiametoxam + clorantraniliprole e tiametoxam, pois foram os inseticidas que apresentam melhor performance no bioensaio 1 (Tabela 1). Diferentes concentrações que proporcionaram mortalidades entre 5 e 95% dos indivíduos foram diluídas em 50 mL de água destilada e aplicadas “via drench” em cada planta de curry. Após sete dias, dez insetos foram confinados em cada planta, utilizando gaiolas confeccionadas com tecido “voile”. A mortalidade de *D. citri* foi avaliada com 1, 2, 3, 5 e 7 dias do confinamento, com o intuito de verificar qual é o melhor tempo para avaliação dos efeitos dos inseticidas. O delineamento foi inteiramente ao acaso, onde cada tratamento (concentrações) foi constituído de quatro repetições de dez insetos adultos cada. As concentrações utilizadas foram determinadas utilizando-se a equação de Finney (1971) [32], onde as concentrações mínima e máxima foram determinadas em testes preliminares realizados.

2.5. Efeito subletal de inseticidas sistêmicos sobre a oviposição de *D. citri*

As plantas de curry foram transplantadas para vasos, e posteriormente, foram podadas a fim de obter folhas novas e brotações para o confinamento dos psilídeos. Com os dados obtidos no bioensaio de casa de vegetação, foi utilizado a CL₁₀ dos inseticidas tiametoxam e tiametoxam + clorantraniliprole para avaliar os efeitos subletais sobre *D. citri* e o seu desenvolvimento.

As caldas foram feitas com um volume de 50 mL de água destilada. A CL₁₀ dos produtos utilizados foi: 0,002 + 0,001 g de i.a. para tiametoxam + clorantraniliprole e 0,0025 g de i.a. para tiametoxam. As plantas foram tratadas com os inseticidas

(tratamentos) “via drench” e o tratamento controle foi constituído por apenas água destilada.

Foram confinados vinte adultos em cada planta de curry, por meio de uma gaiola confeccionada de tule que cobria a extensão completa da planta. Após sete dias do confinamento, os insetos expostos às plantas foram retirados, e posteriormente, contabilizado o número de ovos depositados em cada planta de curry.

O delineamento foi em blocos com parcelas casualizadas, constituído de três tratamentos (inseticidas + controle) e cinco repetições (plantas de curry) com vinte insetos.

2.6. Análises estatísticas

Um modelo linear generalizado (GLM) com distribuição binomial e função de ligação probit (corrigida para superdispersão quando necessário) foi desenvolvido usando dados de mortalidade de cada concentração. O ajuste do modelo foi verificado usando gráficos de simulação de plot semi-normal ('hnp') [33] e pelo teste χ^2 . Para estimar as concentrações letais (CL) em cultivo protegido, foram desenvolvidos ensaios de curva concentração-resposta usando dados de mortalidade de sete dias e submetidos à análise Probit [32]. A CL₁₀ e CL₅₀ para cada inseticida, bem como seus intervalos de confiança de 95% (IC 95%), foram calculados usando o pacote 'MASS' [34]. Para ensaios de campo e de cultivo protegido, os gráficos de persistência da atividade inseticida foram construídos usando modelos polinomiais de segundo grau. As curvas de persistência foram comparadas pelo teste Tukey ($p < 0,05$). Para determinar os efeitos subletais dos inseticidas, os dados foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e comparados pelo teste Dunn (95% de probabilidade).

3. Resultados

3.1. Persistência de inseticidas sistêmicos aplicados “via drench” na mortalidade de *D. citri* em condições de cultivo protegido e campo

Quando realizado o ensaio de persistência dos inseticidas aplicados “via drench” nas plantas de curry em condições de cultivo protegido, foi observado uma elevada mortalidade 3 dias após o contato do inseto com a planta tratada ao longo de 154 dias. Não houve diferenças significativas entre os inseticidas testados, apenas

entre o tratamento controle e os tratamentos contendo algum inseticida ($F = 105,57$; $gl = 3$; $p < 0,001$) (Figura 1). A mortalidade dos insetos confinados nas plantas tratadas foi constante ao longo das épocas de avaliação, apresentando uma média de mortalidade acima de 80% em todos os períodos avaliados (Figura 1).

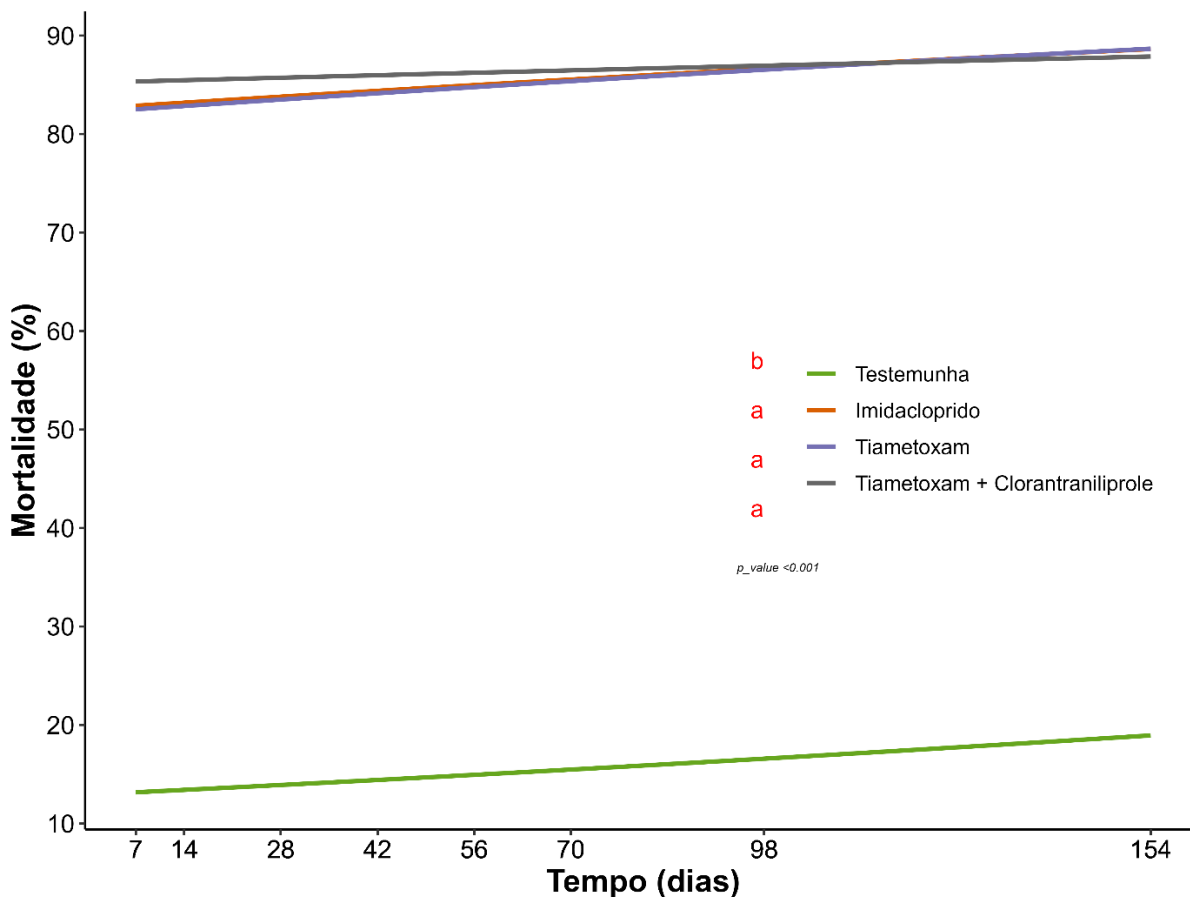


Figura 1. Persistência dos inseticidas aplicados via “drench” em plantas de curry mantidas em condições de casa de vegetação ao longo dos 154 dias. As médias dos tratamentos descritas na legenda, seguidas de diferentes letras, diferem significativamente pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Em campo, os resultados foram diferentes em relação ao observado em casa-de-vegetação. Similar ao bioensaio anterior houve diferenças entre as plantas contendo os inseticidas e o tratamento controle ($F = 24,50$, $df = 3$, $p < 0,001$). Entretanto, a eficiência de controle foi acima de 90% até os 42 dias após a aplicação, sendo observado um declínio gradual da atividade biológica dos inseticidas ao longo dos 154 dias avaliados (Figura 2). Não foi possível observar diferenças entre os tratamentos aos 154 dias após a aplicação ($\chi^2 = 3,89$; $gl = 3$; $p = 0,1976$), indicando o

residual final dos inseticidas aplicados “via drench”. Para o inseticida imidacloprido, a persistência da atividade biológica em campo apresentou um declínio acentuado a partir dos 70 dias pelo método de aplicação “via drench” (Figura 2).

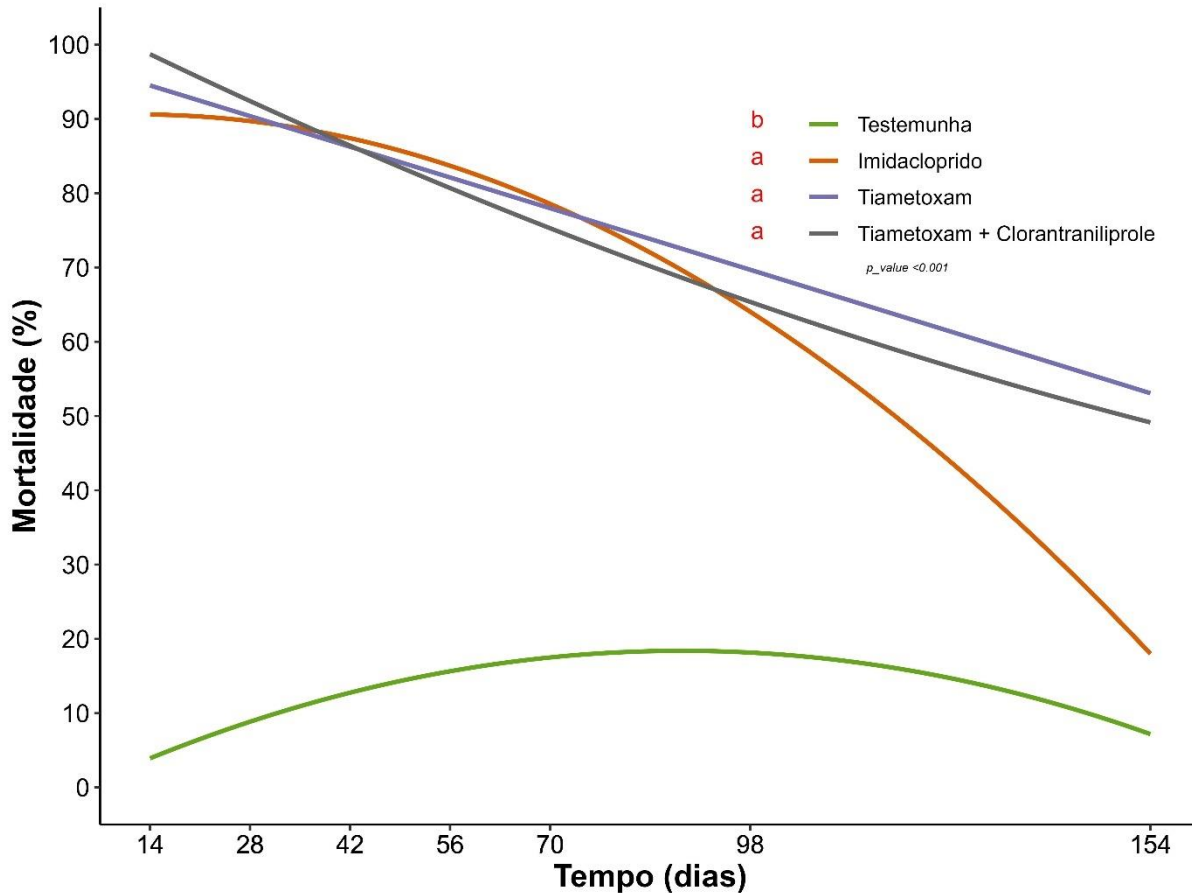


Figura 2. Persistência dos inseticidas aplicados “via drench” em plantas de curry transplantadas em campo ao longo de 154 dias. A área experimental localiza-se em Piracicaba, SP, Brasil. A avaliação do experimento ocorreu de março a agosto de 2022. As médias dos tratamentos descritas na legenda, seguidas de diferentes letras, diferem significativamente pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

3.2. Determinação da concentração letal média (CL₅₀) de inseticidas sistêmicos em plantas de curry

Para ambos os inseticidas, verificou-se que o tempo de avaliação no terceiro dia (curvas em coloração azul) foi o que apresentou melhor distribuição dos dados de mortalidade nas concentrações testadas, indicando bons parâmetros de ajuste de modelo (Figura 3, Tabelas 2 e 3).

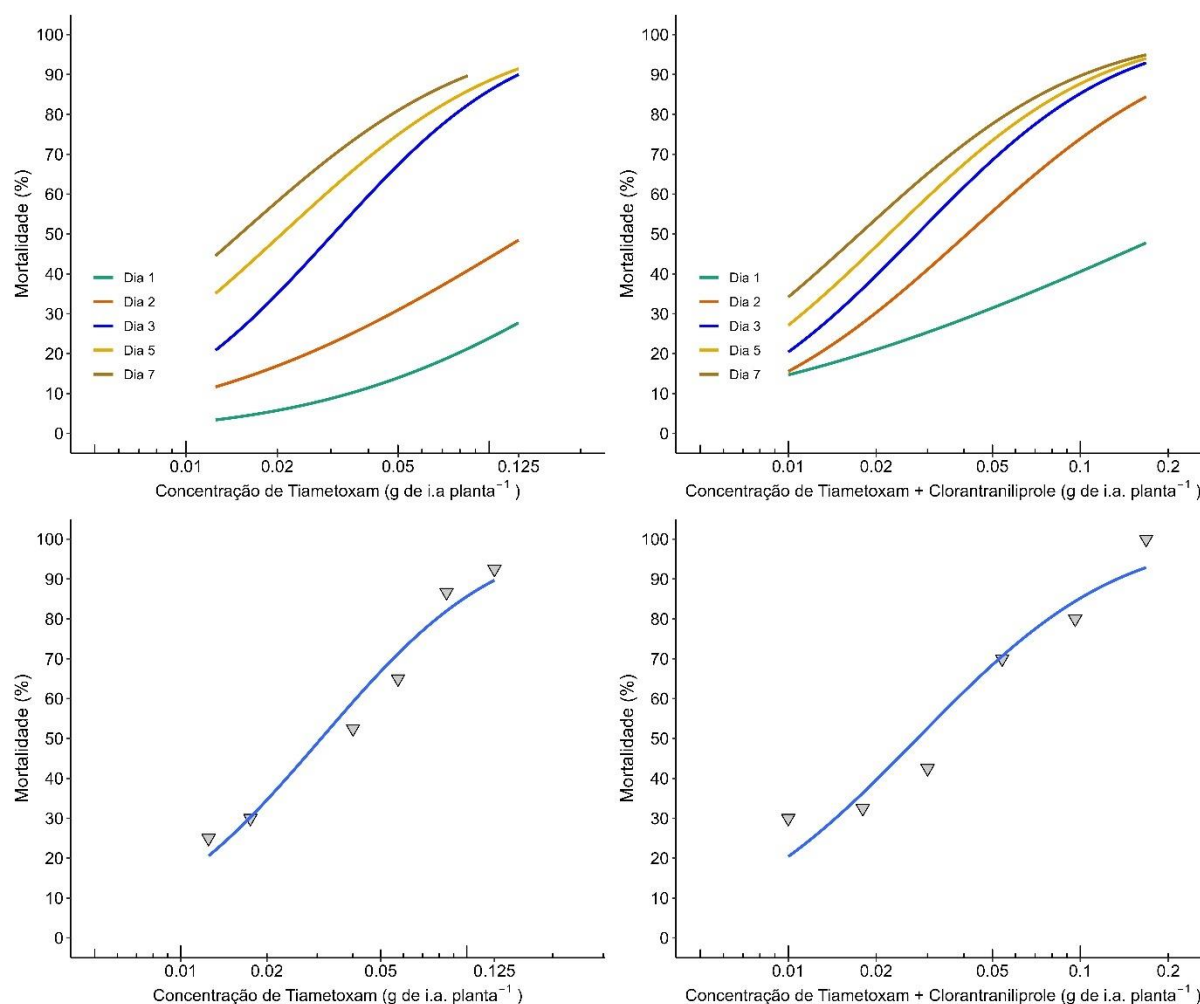


Figura 3. Curva concentração-resposta dos efeitos do tiametoxam e da mistura tiametoxam + clorantraniliprole na mortalidade de *Diaphorina citri* ao longo de sete dias de avaliação. Abaixo, as curvas azuis isoladas representam a distribuição dos dados de mortalidade avaliados no terceiro dia, indicando um bom ajuste do modelo. A ponta do triângulo para baixo significa a mortalidade observada após três dias.

Os dados de mortalidade para o inseticida tiametoxam isolado demonstrou que a CL₁₀ aos três dias de avaliação foi de 0,007 g de ingrediente ativo planta⁻¹ enquanto para a CL₅₀ foi de 0,031 g de i.a. planta⁻¹ ($\chi^2 = 2,39$; gl = 4; $p > 0.05$). Para a mistura de tiametoxam e clorantraniliprole, a CL₁₀ foi de 0,006 g de i.a. planta⁻¹ e a CL₅₀ foi 0,028 g de i.a. planta⁻¹ ($\chi^2 = 7,85$; gl = 4; $p > 0.05$).

Tabela 2. Tempo (dias), número de insetos testados (N) e concentração letal (CL, g i.a. planta⁻¹) para matar 10 e 50% dos adultos de *Diaphorina citri* contaminados com tiametoxam em plantas de curry.

| Tempo (dias) | N | CL ₁₀ (IC _{95%}) | CL ₅₀ (IC _{95%}) | Slope (±EP) | χ ² (gl) | p |
|--------------|-----|---------------------------------------|---------------------------------------|--------------|---------------------|------|
| 1 | 320 | 0,035 (0,023 – 0,052) | 0,375 (0,131 – 1,074) | 1,24 (±0,32) | 5,45 (5) | 0,36 |
| 2 | 320 | 0,010 (0,005 – 0,021) | 0,135 (0,076 – 0,239) | 1,15 (±0,25) | 8,94 (5) | 0,11 |
| 3 | 240 | 0,007 (0,005 – 0,012) | 0,031 (0,025 – 0,038) | 2,09 (±0,28) | 2,39 (4) | 0,66 |
| 5 | 320 | 0,004 (0,002 – 0,008) | 0,021 (0,016 – 0,027) | 1,75 (±0,26) | 7,54 (5) | 0,18 |
| 7 | 250 | 0,003 (0,001 – 0,007) | 0,015 (0,010 – 0,022) | 1,68 (±0,36) | 8,17 (4) | 0,09 |

*N: Número de insetos testados; CL = Concentração Letal para matar 10 e 50% dos indivíduos contaminados com o inseticida (g de i.a. planta⁻¹); IC: Intervalo de Confiança com 95% de probabilidade; EP: Erro padrão; gl: Graus de liberdade.

Tabela 3. Tempo (dias), número de insetos testados (N) e concentração letal (CL, g i.a. planta⁻¹) para matar 10 e 50% dos adultos de *Diaphorina citri* contaminados com tiametoxam + clorantraniliprole em plantas de curry.

| Tempo (dias) | N | CL ₁₀ (IC _{95%}) | CL ₅₀ (IC _{95%}) | Slope (±EP) | χ ² (gl) | p |
|--------------|-----|---------------------------------------|---------------------------------------|--------------|---------------------|------|
| 1 | 280 | 0,005 (0,002 – 0,018) | 0,197 (0,081 – 0,476) | 0,81 (±0,21) | 2,56 (4) | 0,63 |
| 2 | 280 | 0,007 (0,004 – 0,012) | 0,041 (0,032 – 0,052) | 1,65 (±0,23) | 8,63 (4) | 0,07 |
| 3 | 270 | 0,006 (0,003 – 0,009) | 0,028 (0,022 – 0,035) | 1,87 (±0,24) | 7,85 (4) | 0,10 |
| 5 | 280 | 0,004 (0,002 – 0,008) | 0,022 (0,017 – 0,029) | 1,76 (±0,24) | 5,91 (4) | 0,21 |
| 7 | 280 | 0,003 (0,001 – 0,007) | 0,015 (0,010 – 0,022) | 1,67 (±0,24) | 5,88 (4) | 0,21 |

*N: Número de insetos testados; CL = Concentração Letal para matar 10 e 50% dos indivíduos contaminados com o inseticida (g de i.a. planta⁻¹); IC: Intervalo de Confiança com 95% de probabilidade; EP: Erro padrão; gl: Graus de liberdade.

Assim, vemos que três dias após a infestação de *D. citri* nas plantas de curry contaminadas com ambos os inseticidas, tanto o produto em mistura quanto o

tiametoxam isolado apresentaram as CL's semelhantes pela sobreposição do intervalo de confiança, o que indica que não há diferenças na mortalidade de *D. citri*, entre os inseticidas testados, demonstrando que somente o ingrediente ativo tiametoxam afeta na sobrevivência dessa espécie.

3.3. Efeito subletal de inseticidas sistêmicos sobre a oviposição de *D. citri*

Não houve oviposição nos tratamentos onde as plantas foram tratadas com os inseticidas sistêmicos, enquanto, o tratamento controle, apresentou uma oviposição média de 13,4 ovos por planta (Tabela 4). Com esses dados, é possível observar, que mesmo em concentrações baixas (CL's₁₀), os inseticidas sistêmicos, tiametoxam e tiametoxam + clorantraniliprole, causaram efeitos na oviposição de *D. citri*.

Tabela 4. Número médio de ovos depositados por *Diaphorina citri* em plantas de curry tratadas com a CL₁₀ de inseticidas sistêmicos (g i.a. planta⁻¹).

| Inseticidas | Concentração (i.a. planta ⁻¹) | Oviposição (Média ± EP) |
|---------------------------------|--|----------------------------|
| Controle (Água destilada) | - | 13,4 ± 5,4 a |
| Tiametoxam | 0,0025 g | 0 ± 0 b |
| Tiametoxam + clorantraniliprole | 0,0020 + 0,0010 g | 0 ± 0 b |

*tratamentos seguidos com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Dunn ($p < 0,05$).

4. Discussão

Estudos que viabilizem o uso do controle químico associado a métodos alternativos para o manejo integrado de *D. citri* e do HLB são extremamente relevantes. Para a utilização da planta de curry como plantio-isca, há necessidade de um sistema para eliminação do inseto vetor, uma vez que essa espécie de planta apresenta uma elevada atratividade e possibilita o desenvolvimento de *D. citri* [18]. Devido ao impacto reduzido que os inseticidas sistêmicos aplicados “via drench” apresentam aos organismos não-alvo [27, 7, 8], os dois métodos citados podem ser consorciados para aumentar a eficácia de redução populacional do inseto vetor. Os nossos resultados demonstram que os inseticidas sistêmicos testados apresentam alta eficácia no controle do psíldeo aplicados nas plantas de curry, sendo um método

viável para o manejo do HLB e redução de inseticidas nas culturas comerciais de citros.

Os dados de persistência dos inseticidas coletados em casa de vegetação e campo apresentaram diferenças no período residual, o que provavelmente foi consequência das diferentes condições dos dois ambientes, visto que, em campo as plantas ficam expostas diretamente ao vento, precipitação, luz solar, dentre outros. Contudo, os inseticidas testados em campo apresentaram alta persistência, controlando acima de 90% dos adultos até 42 dias após a aplicação, diminuindo gradativamente com o tempo. Resultados similares foram relatados na literatura, em que os inseticidas sistêmicos tiametoxam e imidacloprido aplicados “via drench” apresentaram eficiência superior a 80% na mortalidade de *D. citri* por um período entre 50 a 60 dias em plantas de citros [8]. Também foi observado alta mortalidade do psilídeo (~ 80%) com a aplicação “via drench” de tiametoxam e imidacloprido alcançada em 10 dias após a aplicação [35]. A taxa de mortalidade foi mantida por 90 dias em semicampo e por 60 dias no campo em plantas de citros [35].

Os inseticidas apresentaram alta mortalidade nos primeiros confinamentos de insetos às plantas de curry, apenas 7 e 14 dias após a aplicação dos inseticidas. Porém, em estudos com inseticidas sistêmicos normalmente são observados aumento gradual na mortalidade dos insetos, em que somente após 20 a 25 dias da aplicação houve mortalidade elevada (80%) de ninfas de *D. citri* em plantas de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (Rutaceae) [8]. As diferenças encontradas podem ser explicadas por terem sido realizadas com espécies vegetais diferentes, pois é possível que o movimento dos inseticidas no floema ou tecido condutor ocorra de forma distinta. As plantas são sistemas vivos e encontram-se em um estado contínuo de fluxo fisiológico e bioquímico de modo que é possível que ocorram variações consideráveis em relação a taxa de penetração cuticular, metabolismo e fitotoxicidade entre espécies de plantas [36]. Condições abióticas podem influenciar a translocação de substâncias pelo floema, como época do ano, luminosidade, temperatura, umidade, nutrição [37,38], como também, períodos de seca severa [39]. Resultados similares aos apresentados foram obtidos em outro estudo, demonstrando que as plantas de citros necessitavam de tempo superior do que as plantas de curry, para atingir altas mortalidades dos adultos do psilídeo [40]. Esse comportamento pode estar relacionado com a alimentação de *D. citri* em plantas de curry, pois alimenta-se mais do xilema em plantas de curry, ao passo que, em plantas de citros alimenta-se maior parte do tempo

no floema através de um teste de comportamento alimentar utilizando a técnica “Electrical Penetration Graph” (EPG) [40].

Os inseticidas sistêmicos tiametoxam, tiametoxam + clorantraniliprole aplicados “via drench” apresentaram efeito prolongado e melhor performance no controle do inseto vetor, quando comparado ao imidacloprido. Apesar do período residual do imidacloprido ser relevante para o controle de *D. citri*, os dados demonstram uma queda gradual na eficiência de controle, sendo que aos 154 DAA é possível observar que a mortalidade do psílideo nas plantas tratadas com imidacloprido (~25%) se aproxima ao apresentado no tratamento controle (~20%) que foi causada pela mortalidade natural em campo, enquanto, os outros dois inseticidas contendo o ingrediente ativo tiametoxam apresenta 50% de mortalidade de adultos. A vantagem da aplicação de inseticidas sistêmicos diretamente no solo é a oferta de proteção contínua e prolongada, método amplamente utilizado em plantas jovens, devido a preferência de colonização de *D. citri* em plantas jovens e brotações [41]. A alta eficácia dos produtos testados já foi relatada para controle de *D. citri*, sendo que o inseticida tiametoxam, independente da dosagem estudada (1,00; 1,25 e 1,50 g), foi eficaz no controle do psílideo *D. citri* em plantas de curry tratadas “via drench” e mantidas em casa de vegetação [40]. Foi observado que a mortalidade dos espécimes foi maior para tiametoxam do que para imidacloprido quando avaliado após 7 dias de cada confinamento, além de, a maior dose testada foi a que causou maior mortalidade do inseto vetor, reduzindo após 56 DAA [40]. Além disso, foi observado maior eficiência de tiametoxam contra adultos, quando comparadas com a mortalidade causada por imidacloprido em testes realizados em 4 e 6 semanas após o tratamento das plantas de citros [42]. Corroborando com os dados obtidos com os autores, o inseticida tiametoxam no presente trabalho, apresentou melhor performance frente ao controle de *D. citri* em plantas de curry.

Nossos resultados demonstram que concentrações menores dos inseticidas sistêmicos testados foram capazes de gerar mortalidades elevadas de *D. citri* em mudas de curry. Em outro estudo foi obtido a concentração letal média de 0.0001 g L⁻¹ para tiametoxam aplicado em dieta líquida para a ingestão dos insetos, em laboratório [26]. Apesar da CL₅₀ encontrada por esses autores ser menor ao encontrado no presente estudo, a aplicação “via drench” pode ser afetada por outros fatores, como chuvas fortes e sistemas de irrigação que podem ocasionar a lixiviação do solo [43].

Foram observados efeitos subletais à oviposição de *D. citri* em baixas concentrações (0,01 g mL⁻¹). Resultados similares foram encontrados para o inseticida imidacloprido (0,1 µg mL⁻¹) aplicados por imersão em plantas de *Citrus aurantiifolia* (Christm.) cv. Swingle, apresentando efeitos subletais sobre a reprodução, longevidade e desenvolvimento de *D. citri* [44]. Foi observado redução na fecundidade e na fertilidade, além de, plantas tratadas com concentrações subletais demonstraram forte impacto e deterrência na alimentação, o que reduz drasticamente o fitness do inseto [44,45]. É comum que insetos adultos com restrição alimentar, má nutrição ou baixa disponibilidade de alimento apresentem retardamento e redução na produção de ovos [46]. Em outro trabalho foi observado interferências de tiametoxam e imidacloprido aplicados no solo na alimentação e no comportamento de *D. citri* sobre plantas de citros, interferindo principalmente na fase de ingestão do floema e reduzindo a duração da atividade de prova [6]. Os dois inseticidas testados apresentaram efeito repelente a *D. citri*, provocando a migração dos adultos das plantas previamente tratadas com inseticidas [6]. Os fatores apresentados pelos autores acima, podem estar relacionados a ausência de oviposição de *D. citri* nas plantas de curry tratadas com concentrações baixas de inseticidas em nossa pesquisa.

Além da eficácia, os inseticidas sistêmicos tiametoxam, tiametoxam + clorantraniliprole e imidacloprido na redução populacional de *D. citri* possuem potencial de reduzir a inoculação de “*Ca. L. asiaticus*”. Quando aplicados em plantas de *C. sinensis*, houve uma redução de cerca de 59% na transmissão da bactéria [31]. Com isso, além do controle populacional de *D. citri*, os inseticidas também podem ser usados para o manejo da doença, reduzindo a propagação do HLB [19, 31].

Trabalhos que utilizam a integração do uso de inseticidas sistêmicos e plantio-isca, para o controle de *D. citri* e o manejo de HLB ainda são escassos. A associação de *M. paniculata* como planta-isca com a aplicação do inseticida tiametoxam para o controle de *D. citri* foi testada anteriormente, resultando na mortalidade de cerca 100% nos primeiros sete dias após a aplicação em pomares recém estabelecidos, além de reduzir a taxa de recaptura de adultos de *D. citri* nas armadilhas amarelas adesivas e o número de espécimes encontrados em árvores de citros, reduzindo a incidência do HLB em 43% [19]. Contudo, os trabalhos abordando o potencial da planta de curry como cultura armadilha para *D. citri* são preliminares e recentes. A espécie vegetal é considerada uma alternativa para o método de plantio-isca, principalmente por

apresentar imunidade à doença [13,47]. Em laboratório foi constatado que as plantas de curry possuem maior atratividade ao inseto que as plantas de citros [18]. Em testes de campo, a atratividade e a capacidade de manter os insetos nas plantas-isca, foram relatadas para a planta de curry, além de ter sido encontrado maior quantidade de ninfas e adultos nos cultivos não comerciais [48]. Um dos fatores que tornam esta planta mais atrativa que plantas de citros, é o fluxo contínuo de brotações, podendo desempenhar um importante papel na manutenção populacional de *D. citri*, quando as plantas de citros não apresentam brotos [17].

Os efeitos dos inseticidas sistêmicos aplicados diretamente no solo ainda não são bem conhecidos, portanto, são necessários mais estudos referentes aos efeitos subletais sobre os inimigos naturais e organismos não-alvo na cultura dos citros. Trabalhos apontam que endoparasitoides podem ser expostos ao ingrediente ativo dos inseticidas neonicotinoides quando estão em fase de desenvolvimento no interior do corpo do hospedeiro, por meio de resíduos químicos transovarianos, visto que, a transferência de substâncias tóxicas é mediada pela fisiologia do hospedeiro e é inicialmente mediada pela penetração por meio da cutícula do parasitoide ou pela ingestão de alimentos contaminados por agrotóxicos [49]. Portanto, os inseticidas sistêmicos podem causar efeitos sobre o parasitoide, sendo necessário mais estudos com os inimigos naturais que controlam a população do psilídeo em campo. O principal agente de controle biológico de *D. citri* é o ectoparasitoide *Tamarixia radiata* (Waterston) (Hymenoptera: Eulophidae), porém, estudos que abordem os efeitos dos inseticidas sistêmicos sobre os parasitoides são incipientes. Os próximos passos serão verificar a viabilidade da utilização de agentes de controle biológico juntamente as práticas de plantio-isca e a aplicação “via drench” de inseticidas sistêmicos.

5. Conclusões

Os inseticidas sistêmicos testados demonstram eficácia na eliminação de *D. citri* em plantas de curry, viabilizando a utilização do sistema atrai-e-mata. Os inseticidas que possuem o ingrediente ativo tiametoxam em sua composição apresentam controle por um período prolongado. Os inseticidas apresentam alta persistência em campo, com controle superior a 90% até aos 42 DAA, diminuindo gradativamente. Além disso, concentrações baixas dos produtos testados tiametoxam e tiametoxam + clorantraniliprole apresentam efeitos sob a oviposição de *D. citri*.

Esses avanços podem contribuir para a utilização de outros métodos de controle que sejam sinérgicos e compatíveis, como a utilização do agente biológico *T. radiata* [28], aplicação de inseticidas sistêmicos em plantas-isca atuando como um sistema atraí-mata para a atração e eliminação dos insetos vetores [19], contribuindo significativamente para o manejo integrado de pragas e doenças na cultura dos citros.

Referências

1. Bové, J.M. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *J. Plant Pathol.* **2006**, *88*, 7-37.
2. Leong, S.S.; Leong, S.C.; Beattie, G.A. Integrated Pest Management strategies for Asian Citrus Psyllid *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) and Huanglongbing in Citrus for Sarawak, East Malaysia, Borneo. *Insects* **2022**, *13* (10), 960.
3. Yamamoto, P.T.; Alves, G.R.; Beloti, V.H. Manejo e controle do Huanglongbing (HLB) dos cítricos. *Cienc Investig Agrar* **2014**, *16* (2), 69-82.
4. Grafton-Cardwell, E.E.; Stelinski, L.L.; Stansly, P.A. Biology and management of Asian citrus psyllid, vector of the huanglongbing pathogens. *Annu. Rev. Entomol.* **2013**, *58*, 413-432.
5. Bassanezi, R.B.; Lopes, S.A.; Miranda, M.P. Wulff, N.A.; Volpe, H.X.L.; AYRES, A.J. Overview of citrus huanglongbing spread and management strategies in Brazil. *Trop. Plant Pathol.* **2020**, *45*(3), 251-264.
6. Miranda, M.P.; Yamamoto, P.T.; Garcia, R.B.; Lopes, J.P. Thiamethoxam and imidacloprid drench applications on sweet orange nursery trees disrupt the feeding and settling behavior of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). *Pest Manag. Sci.* **2016**, *72*(9), 1785-1793.
7. Rogers, M.E.; Shawer, D.B. Effectiveness of several soil-applied systemic insecticides for managing the Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae). *Proc. Fla. State Hort. Soc.* **2007**, *120*, 116-119.
8. Yamamoto, P.T.; Felipe, M.R.; Sanches, A.L.; Coelho, J.H.C.; Garbim, L.F.; Ximenes, N.L. Eficácia de inseticidas para o manejo de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) em Citros. *BioAssay* **2009**, *4*(4), 1-9.
9. Ndakidemi, B.; Mtei, K.; Ndakidemi, P. Impacts of synthetic and botanical pesticides on beneficial insects. *Agric. Sci.* **2016**, *7*, 364-372.

10. Belasque, J.J.; Bassanezi, R.B.; Yamamoto, P.T.; Ayres, A.J.; Tachibana, A.; Violante, A.R.; Tank, A.J.; Giorgis, F.; Tersí, F.E.A.; Menezes, G.M.; Dragone, J.; Jank, R.H.J.; Bové, J.M. Lessons from Huanglongbing management in São Paulo State, Brazil. *Plant Pathol. J.* **2010**, *92*, 709-716.
11. Tiwari, S.; Mann, R.S.; Rogers, M.E.; Stelinkski, L.L. Insecticide resistance in field populations of Asian citrus psyllid in Florida. *Pest Manag. Sci.* **2011**, *67(10)*, 1785-1793.
12. Vázquez-García, M.; Velázquez-Monreal, J.; Medina-Urrutia, V.M.; Jesús Cruz-Vargas, C.; Sandoval-Salazar, M.; Virgen-Calleros, G.; Torres-Morán, J.P. Insecticide resistance in adult *Diaphorina citri* Kuwayama from lime orchards in Central est Mexico. *Southwest. Entomol.* **2013**, *38(4)*, 579-596.
13. Beloti, V.H.; Alves, G.R.; Coletta-Filho, H.D.; Yamamoto, P.T. The Asian citrus psyllid host *Murraya koenigii* is immune to citrus huanglongbing pathogen 'Candidatus Liberibacter asiaticus'. *Phytopathology* **2018**, *108(9)*, 1089-1094.
14. Chen, X.D.; Ebert, T.A.; Pelz-Stelinski, K.S.; Stelinski, L.L. Fitness costs associated with thiamethoxam and imidacloprid resistance in three field populations of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) from Florida. *Bull. Entomol. Res.* **2020**, *110(4)*, 512-520.
15. Adler, L.S.; Hazzard, R.V. Comparison of perimeter trap crop varieties: Effects on herbivory, pollination, and yield in butternut squash. *Environ. Entomol.* **2009**, *38*, 207-215.
16. Ravanfar, S.A.; Achor, D.S.; Killiny, N.; Shilts, T.; Chen, Y.; El-Mohtar, C.; Stelinski, L.L.; Bonning, B.C.; Orbovic, V. Genetic modification of *Berbera koenigii* for expression of the bacterial pesticidal protein Cry1Ba1. *Front Plant Sci.* **2022**, *14*, 899624.
17. Tomaseto, A.F.; Krugner, R.; Lopes, J.R.S. Effect of plant barriers and citrus leaf age on dispersal of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). *J. Appl. Entomol.* **2016**, *140*, 91-102.
18. Beloti, V.H.; Santos, F.; Alves, G.R.; Bento, J.M.S.; Yamamoto, P.T. Curry leaf smells better than citrus to females of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). *Arthropod-Plant Interactions* **2017**, *11(5)*, 709-716.
19. Tomaseto, A.F.; Marques, R.N.; Fereres, A.; Zanardi, O.Z.; Volpe, H.X.L.; Alquézar, B.; Pena, L.; Miranda, M.P. Orange jasmine as a trap crop to control *Diaphorina citri*. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1-11.

20. Hokkanen, H.M. Trap cropping in pest management. *Annu. Rev. Entomol.* **1991**, *36(1)*, 119-138.
21. Sarkar, S.C.; Wang, E.; Wu, S.; Lei, Z. Application of trap cropping as companion plants for the management of agricultural pests: a review. *Insects* **2018**, *9(4)*, 128.
22. Hossain, M.M.; Singha, A.; Haque, M.S.; Mondal, M.T.R.; Jiku, M.A.S.; Alam, M.A. Management of chili insect pests by using trap crops. *Thai J. Agric. Sci.* **2021**, *54(3)*, 212-221.
23. Sétamou, M.; Bartels, D.W. Living on the edges: spatial niche occupation of Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) in citrus groves. *PLoS One* **2015**, *10*, 1-21.
24. Lopes, J.R.S.; Parra, J.R.P.; Yamamoto, P.T.; Bento, J.M.S. Psilídeo-asiático-dos-citros, *Diaphorina citri* Kuwayama. In: *Pragas introdutivas no Brasil: insetos e ácaros*. FEALQ, Piracicaba, São Paulo, Brasil, 2015; pp. 299-314.
25. Holden, M.H.; Ellner, S.P.; Lee, D.H.; Nyrop, J.P. Sanderson, J.P. Designing an effective trap cropping strategy: the effects of attraction, retention and plant spatial distribution. *J. Appl. Entomol.* **2012**, *49(3)*, 715-722.
26. Langdon, K.W.; Rogers, M.E. Neonicotinoid-induced mortality of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) is affected by route of exposure. *J. Econ. Entomol.* **2017**, *110(5)*, 2229-2234.
27. Mizell, R.F.; Sconyers, M.C. Toxicity of imidacloprid to selected arthropod predators in the laboratory. *Fla. Entomol.* **1992**, *75(2)*, 277-280.
28. Parra, J.R.P.; Alves, G.R.; Diniz, A.J.F.; Vieira, J.M. *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae) x *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae): Mass rearing and potential use of the parasitoid in Brasil. *J. Integr. Pest Manag.* **2016**, *7(1)*, 1-11.
29. Nava, D.E.; Torres, M.L.G.; Rodrigues, M.D.L.; Bento, J.M.S.; Parra, J.R.P. Biology of *Diaphorina citri* (Hem., Psyllidae) on different hosts and at different temperatures. *J Appl. Entomol.* **2007**, *131(9-10)*, 709-715.
30. Alves, G.R.; Diniz, A.J.F.; Parra, J.R.P. Biology of the huanglongbing vector *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) on different hosts plants. *J. Econ. Entomol.* **2014**, *107(2)*, 691-696.

31. Carmo-Sousa, M.; Garcia, R.B.; Wulff, N.A.; Fereres, A.; Miranda, M.P. Drench application of systemic insecticides disrupts probing behavior of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) and inoculation of *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Insects* **2020**, *11*(5), 314.
32. FINNEY, D.J. *Probit analysis*. Cambridge, England: Cambridge University Press, 1971; p. 31.
33. Moral, R.A.; Hinde, J.; Demétrio, C.G. Half-normal plots and overdispersed models in R: The hnp package. *J. Stat. Softw.* **2017**, *81*, 1-23.
34. Venables, W.N.; Ripley, B.D. Random and mixed effects. In *Modern applied statistics with S*, Springer, New York, NY, 2002, pp. 271-300.
35. Ichinose, K.; Bang, D.V.; Tuan, D.H.; Dien, L.Q. Effective use of neonicotinoids for protection of citrus seedlings from invasion by *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). *J Econ. Entomol.* **2010**, *103*(1), 127-135.
36. Bromilow, R. H.; Chamberlain, K.; Evans, A. A. Physicochemical aspects of phloem translocation of herbicides. *Weed Science* **1990**, *38*(3), 305-314.
37. Bennett, S. H. (1957). The behaviour of systemic insecticides applied to plants. *Annu. Rev. Entomol.* **1957**, *2*(1), 279-296.
38. Lemoine, R.; Camera, S. L.; Atanassova, R.; Dédaldéchamp, F.; Allario, T.; Pourtau, N.; Bonnemain, L.; Faucher, M.; Girousse, C.; Lemonnier, P.; Parrilla, J.; Durand, M. Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. *Front. Plant Sci.* **2013**, *4*, 272.
39. Sevanto, S. Drought impacts on phloem transport. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2018**, *43*, 76-81.
40. Beloti, V.H. Utilização de *Murraya koenigii* Como Planta-Isca Visando o Manejo do Psilídeo *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) Ph.D. Thesis, Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, Brazil, 2018.
41. Boina, D.R.; Bloomquist, J.R. Chemical control of the Asian citrus psyllid and of huanglongbing disease in citrus. *Pest Manag. Sci.* **2015**, *71*, 808–823.
42. Byrne, F. J.; Daugherty, M. P.; Grafton-Cardwell, E. E.; Bethke, J. A.; Morse, J. G. Evaluation of systemic neonicotinoid insecticides for the management of the Asian citrus psyllid *Diaphorina citri* on containerized citrus. *Pest Manag. Sci.* **2017**, *73*(3), 506-514.

43. Fletcher, E.; Morgan, K.T.; Qureshi, J.A.; Leiva, J.A.; Nkedi-Kizza, P. Imidacloprid soil movement under micro-sprinkler irrigation and soil-drench applications to control Asian citrus psyllid (ACP) and citrus leafminer (CLM). *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0192668.
44. Boina, D.R.; Salyani, M.; Stelinski, L.L. Chemical control of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* **2009**, *122*, 176–180.
45. Boina, D.R.; Onagbola, E.O.; Salyani, M.; Stelinski, L.L. Antifeedant and sublethal effects of imidacloprid on Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*. *Pest Manag. Sci.* **2009**, *65*, 870–877.
46. Byrne, F.J.; Daugherty, M.P.; Grafton-Cardwell, E.E.; Bethke, J.A.; Morse, J.G. Evaluation of systemic neonicotinoid insecticides for the management of the Asian citrus psyllid *Diaphorina citri* on containerized citrus. *Pest Manag. Sci.* **2017**, *73*, 506–514.
47. Damsteegt, V.D.; Postnikova, E.N.; Stone, A.L.; Kuhlmann, M.; Wilson, C.; Sechler, A.; Schaad, N.W.; Brlansky, R.H.; Schneider, W.L. *Murraya paniculata* and related species as potential hosts and inoculum reservoirs of 'Candidatus Liberibacter asiaticus', causal agent of huanglongbing. *Plant Dis.* **2010**, *94*, 528–533.
48. Marsh, A.S. Use of Curry Leaf (*Murraya koenigii*) and Volkamer Lemon (*Citrus volkameriana*) as Potential Trap Crops for the Asian Citrus Psyllid (*Diaphorina citri*) in a Commercial Citrus Grove. Ph.D. Thesis, California State Polytechnic University, Pomona, CA, USA, 2016.
49. Medina, P.; Morales, J.J.; Budia, F.; Adan, A.; Del Estal, P.; Vinuela, E. Compatibility of endoparasitoid *Hyposoter didymator* (Hymenoptera: Ichneumonidae) protected stages with five selected insecticides. *J. Econ. Entomol.* **2007**, *100*, 1789–1796.

EFEITO DE *Bergera koenigii* SOBRE A INFECTIVIDADE DA BACTÉRIA “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” EM *Diaphorina citri*

Resumo

Atualmente, a principal doença da cultura dos citros é o Huanglongbing (HLB), que é manejada principalmente pela eliminação de plantas sintomáticas e pelo controle químico do inseto vetor, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). Ainda que frequentes aplicações de inseticidas sejam realizadas, o sucesso no controle da doença tem sido insatisfatório, principalmente em função do forte impacto da transmissão primária da doença. Frente a necessidade de métodos alternativos de controle, a planta de curry (*Bergera koenigii* L.) tem mostrado grande potencial como planta-isca no sistema atrai e mata, pois é atrativa a *D. citri* e imune a “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” (CLAs), agente associado ao HLB. O objetivo com este estudo foi avaliar se alimentação em plantas de curry pode afetar ou reduzir a infectividade e a concentração bacteriana de espécimes de *D. citri* infectados com CLAs. Para isto, indivíduos sadios foram confinados em plantas fonte da bactéria por dez dias e posteriormente foram retirados e os ovos depositados foram mantidos para posterior desenvolvimento. Após 2 a 4 dias da emergência de adultos nas plantas-fonte, os insetos foram transferidos para plantas de curry e de citros. Amostras de adultos de *D. citri* foram retiradas aos quatro, oito e quinze dias para quantificação de concentração bacteriana por PCR em tempo real (qPCR). Os resultados demonstram que amostras de insetos que permaneceram por um período de quatro dias em plantas de curry apresentaram 58,88% e em citros 100,00% de amostras infectadas com CLAs. Assim, demonstrando maior proporção de amostras de insetos positivas obtida em citros quando comparado ao curry. Quando testado a permanência dos insetos por oito dias, foi observado 66,66% e 50,00% das amostras positivas para plantas de citros e de curry, respectivamente. Quando os insetos foram confinados por quinze dias, foram obtidas 80% das amostras positivas em citros e 93,75% em curry, aumentando a proporção de amostras infectadas obtidas de plantas de curry, em comparação a menor proporção obtida na mesma planta aos oito dias de permanência (50,00%). Em relação a concentração bacteriana, não foram observadas diferenças entre as amostras de psíldeos nos diferentes períodos testados. Por fim, é possível observar diferenças na proporção de amostras positivas de *D. citri* nos diferentes tempos testados, principalmente aos quatro dias de permanência, sendo necessários novos estudos para obter informações sobre os efeitos da alimentação de *D. citri* em plantas de curry no processo de transmissão da bactéria para plantas de citros.

Palavras-chave: transmissão, Huanglongbing, curry, psíldeo-asiático-dos-citros, antimicrobiana, antibacteriana, planta-isca.

Abstract

Currently, the main citrus disease is Huanglongbing (HLB), which is mainly managed by eliminating symptomatic plants and chemically controlling the insect vector, *Diaphorina citri*. Although frequent insecticide applications are carried out, the success in controlling the disease has been unsatisfactory, mainly due to the strong impact of the primary transmission of the disease. Faced with the need for alternative control methods, the curry leaf tree (*Bergera koenigii*) has shown great potential as a trap plant in the attract and kill system, as it is attractive to *D. citri* and immune to “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” (CLAs), agent associated with the HLB. The objective of this study was to evaluate whether feeding on curry plants can affect or

reduce the infectivity and bacterial concentration of *D. citri* specimens infected with CLAs. For this, healthy individuals were confined in plants that were the source of the bacteria for ten days and were subsequently removed and the deposited eggs were kept for further development. After 2 to 4 days of emergence of adults on the source plants, the insects were transferred to curry and citrus plants. Samples of *D. citri* adults were taken at four, eight and fifteen days for quantification of bacterial concentration (Ct) by Real time quantitative PCR (qPCR). The results demonstrate that samples of insects that remained for a period of four days in curry leaf showed 58.88% and in citrus 100.00% of samples infected with CLAs. Thus, demonstrating a higher proportion of positive insect samples obtained from citrus when compared to curry leaf. When testing the permanence of insects for eight days, 66.66% and 50.00% of positive samples were observed for citrus and curry plants, respectively. Meanwhile, when the insects were confined for fifteen days, 80% of the positive samples were obtained in citrus and 93.75% in curry leaf, increasing the proportion of infected samples obtained from curry leaf, compared to the smaller proportion obtained from the same plant after eight days of feeding (50.00%). Regarding the bacterial concentration, no differences were observed between the samples of psyllids in the different periods tested. Finally, it is possible to observe differences in the proportion of positive samples of *D. citri* from psyllids at the different times tested, mainly at four days of permanence between samples obtained from citrus and curry, requiring further studies to obtain information on the effects of feeding of *D. citri* in curry leaf in the process of transmission of the bacteria to citrus plants.

Keywords: transmission, huanglongbing, curry, Asian Citrus Psyllid, antimicrobial, antibacterial, trap crop.

1. Introdução

Os patógenos de plantas transmitidos por insetos incluem vírus, bactérias como mollicutes (fitoplasmas e espiroplasmas) e fungos, organismos que são onipresentes em ecossistemas manejados e naturais, e muitos são agentes causais de doenças destrutivas que afetam a agricultura, resultando grandes perdas de produtividade do setor agrícola (EIGENBRODE et al., 2018). Bactérias transmitidas por insetos vetores causam algumas das mais graves doenças e ocasionam perdas de produção em todo o mundo (HUANG et al., 2020). A pesquisa de doenças bacterianas transmitidas por vetores é um desafio devido ao crescimento fastidioso de patógenos, a incapacidade de cultivar as bactérias, dependência de um inseto vetor para transmissão e a falta de sistemas modelo (JIANG et al., 2019; HUANG et al., 2020).

A cultura dos citros é frequentemente ameaçada pelos diversos patógenos causadores de doenças que causam perdas econômicas consideráveis à produção (MENDONÇA et al., 2017). Atualmente, o HLB é o maior desafio enfrentado pelos produtores de citros (CANALE et al., 2016), sendo uma das doenças mais destrutivas

que acomete plantas de citros, associada as bactérias “*Candidatus Liberibacter spp.*”, que são transmitidas por insetos vetores (BOVÉ, 2006).

Liberibacter spp. são alfa-proteobactérias Gram-negativas limitadas ao floema, transmitidas por psilídeos (Hemiptera: Psylloidea), que só possuem capacidade de se multiplicar na planta hospedeira ou no inseto vetor (SARKAR; GHANIM, 2020). As bactérias dependem principalmente de uma espécie de psilídeo para transmissão e estão restritas ao floema da planta hospedeira em que seus insetos vetores se alimentam (CASTEEL et al., 2012). Os psilídeos se alimentam de seiva do floema de plantas de citros através da inserção dos seus estiletos no sistema vascular da planta, sendo que, esse processo por si só não é prejudicial para as plantas, porém, é durante a alimentação que os insetos adquirem e transmitem os agentes patogênicos associados ao HLB (MOLKI et al., 2019).

O psilídeo-asiático-dos-citros, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) tornou-se a principal praga da citricultura brasileira, pela sua capacidade de transmitir bactérias associadas ao HLB, “*Candidatus Liberibacter americanus*” (CLam) e “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” (CLas) (BOVÉ, 2006; LOPES et al., 2015), sendo a última a mais disseminada nas Américas (YAMAMOTO et al., 2014).

O processo de transmissão dessas bactérias fitopatogênicas inicia-se com a aquisição do patógeno em uma planta infectada e termina com a inoculação do mesmo em uma planta sadia, mediada pelo inseto vetor (PARRA et al., 2010). A aquisição de CLas pode ocorrer tanto por ninfas como por adultos de *D. citri*, porém, a aquisição da bactéria por adultos é baixa e as ninfas adquirem a bactéria com mais eficácia, desde que se desenvolva em plantas infectadas (PELZ-STELINSKI et al., 2010). Esses indivíduos que adquirem o patógeno na fase ninfal permanecem infectivos mesmo após a ecdise até a fase adulta do psilídeo (INOUE et al., 2009), evidenciando que a bactéria é do tipo circulativa no inseto vetor (KILLINY; JONES, 2018). Além disso, após a aquisição da bactéria, existe um período de latência para que *D. citri* seja capaz de inocular em plantas sadias (PARRA et al., 2010). Devido a isso, a longa persistência de CLas em *D. citri* permite que os espécimes transportem o patógeno a longas distâncias, promovendo a disseminação primária para outros pomares comerciais de citros (CANALE et al., 2016).

Para a detecção das bactérias causadoras do HLB, são necessárias metodologias de detecção rápidas, precisas e robustas para a obtenção de uma resposta eficaz para a realização do manejo adequado (LI et al., 2006). CLas não é

cultivável em meios de cultura e, portanto, recorre-se a abordagens moleculares para detectar e diferenciar “*Candidatus Liberibacter spp.*” (LI et al., 2006). O uso do PCR quantitativo em tempo real (qPCR) vem sendo utilizado atualmente como ferramenta em diversos países, oferecendo uma detecção com eficácia e mais rápida em comparação ao PCR convencional (MORGAN et al., 2012).

As estratégias atuais de manejo do HLB se concentram no controle do inseto vetor, evitando a propagação da infecção e na erradicação de árvores infectadas (GOTTWALD, 2010; YAMAMOTO et al., 2014; DALA-PAULA et al., 2019). O controle do inseto vetor que ocorre principalmente por meio da aplicação de inseticidas, apesar de ser um método efetivo, o uso frequente gera impactos no ambiente, resultando em desequilíbrio ecológico, surtos de pragas secundárias e o ressurgimento de pragas (BELASQUE et al., 2010; BELOTI et al., 2018). Ademais, já foram reportados casos de populações de psílídeos resistentes devido ao uso excessivo do mesmo grupo químico de inseticidas (TIWARI et al., 2011; VÁZQUEZ-GARCÍA et al., 2013). Frente a isso, táticas de controle adequadas e mais sustentáveis que possam reduzir a migração de *D. citri* em cultivos comerciais de citros são necessárias para melhor o manejo do HLB (TOMASETO et al., 2019).

O método de cultura-armadilha é uma opção viável e eficaz para reduzir a dependência do manejo convencional de pragas, por meio do uso de inseticidas (SARKAR et al., 2018). Essa estratégia é amplamente utilizada no manejo de pragas, por meio da atração dos insetos para distanciar os indivíduos da cultura comercial, além de, reduzir a disseminação de qualquer patógeno veiculados por insetos vetores (SARKAR et al., 2018).

Os psílídeos são oligófagos e têm como hospedeiras plantas da família Rutaceae (AUBERT, 1987; HALBERT; MANJUNATH, 2004, ALVES et al., 2014; YAN et al., 2014). Dentre essas, a planta de curry, *Berbera koenigii* L. (Rutaceae) apresenta grande potencial para sua utilização como cultura armadilha em lavouras comerciais de citros para o manejo do HLB e de *D. citri* (MARSH, 2016; BELOTI et al., 2017; BELOTI et al., 2018; EDUARDO et al., 2023).

A planta de curry é imune à bactéria “*Ca. L. asiaticus*”, além de ser mais atraente para o inseto vetor quando comparado as laranjeiras (BELOTI et al., 2017; BELOTI et al., 2018). Além disso, sabe-se que a planta de curry é um dos hospedeiros preferenciais para a colonização de *D. citri* em campo (WESTBROOK et al., 2011) e a oviposição das fêmeas é maior em plantas dessa espécie do que em plantas de

citros (TECK et al., 2011). Isso ocorre devido a produção contínua de brotações, podendo desempenhar um papel importante na manutenção de altas densidades populacionais, atraindo e mantendo os insetos na cultura não-alvo (BELOTI et al., 2017). Em campo, apresenta grande potencial para sua utilização como cultura armadilha em lavouras comerciais de citros (MARSH, 2016).

Além disso, a planta de curry possui atividades antioxidantes, antidiabéticas, anticarcinogênicas, estimulantes, antimicrobianas e antifúngicas (KHANUM et al., 2000; YADAV et al., 2002; NINGAPPA et al., 2008; KANDRAL et al., 2012; KUMAR et al., 2013; HARBI et al., 2016). Resultados recentes sugerem que a folha de curry possui alto teor de fenólicos, além de uma classe incomum de alcaloides carbazol, que é conhecida por propriedades antimicrobianas que provavelmente está relacionado com a imunidade da planta de curry à CLas (HIJAZ et al., 2020). Além disso, já foi relatado que a planta de curry apresenta quantidades menores de aminoácidos, ácidos orgânicos, açúcares e metabólitos, quando comparados às plantas de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck e de *Murraya paniculata* L. (KILLINY, 2016). Os fenólicos são um grupo de metabólitos secundários, e pode ser que o acúmulo de compostos fenólicos no local da infecção pode resultar em isolamento dos patógenos e atuar na prevenção da propagação para outras partes da planta (NICHOLSON, 1992).

Porém, estudos sobre os efeitos da alimentação de *D. citri* em plantas de curry frente à infecção de CLas são incipientes na literatura. Diante disso, o objetivo com este estudo foi verificar se a alimentação em plantas de curry pode afetar ou reduzir a infectividade e a concentração bacteriana de indivíduos de *D. citri* infectados com “*Ca. L. asiaticus*”.

2. Material e Métodos

2.1. Colônia de manutenção de *Diaphorina citri*

Como substrato de oviposição e alimento para *D. citri*, foram utilizadas mudas de murta (*M. paniculata*) para a criação dos insetos, sendo um hospedeiro altamente adequado para o desenvolvimento dos insetos (NAVA et al., 2007; ALVES et al., 2014). A metodologia empregada na colônia de manutenção foi de acordo com o descrito por Parra et al. (2016).

As plantas de murta foram podadas em aproximadamente 25 cm de altura e, quando produziram brotos (2 a 3 cm de comprimento) foram colocadas seis plantas em cada gaiola de criação (45 × 45 × 50 cm), as quais foram dispostas em bandejas contendo água. Posteriormente, aproximadamente trezentos espécimes adultos, no início do período reprodutivo (12 dias após a eclosão), foram colocados no interior de cada gaiola. Os indivíduos permaneceram no interior das gaiolas por sete dias, a fim de permitir a deposição de ovos nas plantas. Após este período, os adultos foram retirados por meio de um succionador manual, e as plantas com as posturas permaneceram nas gaiolas para permitir seu desenvolvimento.

2.2. Efeito de *Bergera koenigii* sobre a infectividade da bactéria “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” no psilídeo

Os bioensaios foram conduzidos no Laboratório de Manejo Integrado de Pragas, do Departamento de Entomologia e Acarologia, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” na Universidade de São Paulo, localizado na cidade de Piracicaba, São Paulo, Brasil. As plantas e os insetos foram mantidos em sala climatizada à temperatura de 25 ± 2 °C, U.R. de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14 h. As análises moleculares foram desenvolvidas em colaboração com o Dr. Helvécio Della Coletta-Filho do Centro de Citricultura Sylvio Moreira/IAC, em Cordeirópolis/São Paulo, Brasil.

As plantas de *C. sinensis* foram previamente infectadas com “*Ca. L. asiaticus*” (plantas-fonte) através da enxertia por borbulhia. Posteriormente, as plantas-fonte foram previamente podadas para permitir o crescimento de brotações, ideais para a alimentação e, principalmente, a oviposição das fêmeas.

Com o surgimento das brotações, adultos sadios de *D. citri* provenientes da colônia de manutenção de laboratório, foram confinados nas plantas-fonte com o auxílio de uma gaiola confeccionada com tecido *tunil* que cobria toda a extensão da planta. Após dez dias do confinamento, os adultos foram retirados por um succionador manual e descartados, sendo mantido os ovos e ninfas de *D. citri* até completar o desenvolvimento da progênie e, concomitantemente adquirir a bactéria (período de acesso à aquisição - PAA).

Ao final do desenvolvimento ninfal (5º instar) e dois a quatro dias após a emergência de adultos, amostras de insetos foram retirados aleatoriamente e foram

colocados em grupo de três espécimes por *ependorf*, para a realização de testes de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) para detecção e quantificação de CLAs, a fim de verificar a taxa de infectividade na população de *D. citri*.

Neste mesmo período, os adultos recém emergidos das plantas-fonte foram transferidos para plantas saudáveis de laranjeira doce (*C. sinensis*) e de curry (*B. koenigii*). Para isto, foram utilizadas as mesmas gaiolas de tecido *tunil* para realizar o confinamento dos insetos em cada espécie vegetal. Os adultos de *D. citri* foram mantidos nessas plantas por quatro, oito e quinze dias. Após a retirada dos insetos das plantas testadas, os espécimes foram individualizados em grupos de três em tubos *ependorf* contendo álcool 70% e armazenados em freezer (-20 °C) para posterior detecção e quantificação de CLAs por PCR em tempo real (qPCR).

O delineamento experimental foi em blocos com parcelas ao acaso e os tratamentos foram constituídos por plantas de citros e de curry que foram expostas a insetos que entraram em contato com planta-fonte.

3.2. Diagnóstico e quantificação de CLAs

3.2.1. Extração do DNA total: insetos e plantas

A extração do DNA dos insetos foi realizada de acordo com o método descrito por Coletta-Filho et al. (2014). Grupos de três psílídeos por amostra, foram macerados pelo sistema "TissueLyser" II (Qiagen, Valencia, CA) a 20 Hz por 60 s em microtubo de 1,5 mL contendo 100 µL de tampão STE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA e 25 mM NaCl) e duas beads de 3 mm. Posteriormente, foi adicionado de 15 µL de Proteinase K (200 µg/ml) às amostras que foram incubadas a 56 °C por 30 min. O DNA total foi purificado usando o Kit DNA Purification Kit Wizard Genomic (Promega Corporation, Madison, WI), seguindo as instruções do fabricante. O pellet final foi eluído em um volume final de 50 µL de tampão de eluição (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 20 µg µl⁻¹ RNase) e armazenados a -20 °C antes dos testes de qPCR.

A extração do DNA das plantas de citros foi realizada utilizando o método de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) adaptado de Murray e Thompson (1980). As folhas foram coletadas e com auxílio de uma tesoura o pecíolo e nervura central foram finamente fatiados. Os tecidos vegetais foram colocados em tubos do tipo *ependorf* de 2 mL contendo beads de 5 mm e 625 µL de tampão 1 (100 mM Tris pH 8.0; 50 mM

EDTA; 500 mM NaCl). O tecido vegetal foi triturado pelo homogeneizador TissueLyser II a 30 Hz por 120 s. Após isso, 725 µL do tampão 2 (CTAB 5%; Sarcosyl 10%; 10 mM B-mercaptoethanol) foi adicionado ao tubo. O tubo com o conteúdo foi mantido a 65 °C por 30 min e depois centrifugado por 5 min a 3.500 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 1,5 ml seguido das extrações com clorofórmio/álcool isoamílico 24:1 e precipitação com isopropanol, sendo o DNA total suspenso em 400 µl of 1/10TE + RNase.

3.2.2. PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

A presença de “*Ca. L. asiaticus*” nas amostras de adultos de *D. citri* foi determinada por intermédio do PCR em tempo real (qPCR) utilizando primers e sonda desenvolvidos por Lin et al. (2010), sendo a sonda marcada com FAM/Iowa Black FQ (IDT Inc., Coralville, IA). Todas as amplificações foram realizadas em duplicata utilizando o termociclador ABI 7500 (Life Technology Corporation, Carlsbad, CA) e conduzidas num volume total de 13 µL contendo 3 µL de DNA total, 10 µM de cada primer, 5 µM da sonda e 0.1v de 5x Hot Firepol probe qPCR Mix Plus (ROX) (Solis Biodyne, Tartu, Estonia). A eficiência da qPCR foi monitorada utilizando em todas as corridas três concentrações conhecidas de plasmídeo clonado contendo o inserto do gene *eftu* (elongation factor) de CLas ampliado pelos primers, assim como amostras de DNA de tecido sabidamente infectado por CLas. Como controle negativo foi utilizado tecido de plantas saudáveis e água autoclavada como “branco”. Somente amostras cujos valores de Ct (Cycle threshold) foram menores que 33,0 foram consideradas positivas para a presença de CLas (AMMAR et al., 2011; HILF et al., 2011; COLETTA-FILHO et al., 2014, CANALE et al., 2016). Amostras com valores de Ct entre 31 e 33 foram repetidas posteriormente para confirmação dos resultados. Somente aquelas amostras cujos resultados se mantiverem foram consideradas como positivas.

3.3. Análises estatísticas

Os tratamentos, constituídos por plantas de citros e curry, foram comparados quanto à proporção de amostras de psilídeos infectadas com CLas (eficiência de aquisição) e à concentração bacteriana. A concentração bacteriana foi medida pelo

valor de Ct, visto que, quanto menor o valor de Ct maior é a concentração bacteriana. A proporção de indivíduos de *D. citri* positivos foi avaliada por meio de um Modelo Linear Generalizado, assumindo distribuição binomial. Neste modelo, foi avaliado o efeito dos fatores tempo e tratamento sobre a proporção de espécimes positivos. A significância do modelo foi checada a partir do Type III Wald Chisquare ($\alpha = 0,05$). O Teste de Tukey foi utilizado para realizar a comparação entre os pares ($\alpha = 0,05$). Para analisar o efeito do tempo e tratamento sobre a concentração bacteriana foi utilizada uma Análise de Variância (ANOVA). Inicialmente, foram checadas as premissas de normalidade dos resíduos e homoscedasticidade, utilizando o teste Shapiro-Wilk e Bartlett, respectivamente. As comparações entre os pares foram feitas pelo Teste Tukey ($\alpha = 0,05$). A qualidade de ambos os modelos foi avaliada por meio da função hnp com o pacote Half Normal Plot (MORAL et al., 2017). Todas as análises foram conduzidas no Software R (R CORE TEAM, 2023), utilizando os pacotes emmeans (LENTH et al., 2019), ggplot2 (WICKMAM, 2011), ExpDes.pt (FERREIRA et al., 2018).

4. Resultados

As plantas de *C. sinensis* utilizadas como fonte da bactéria, após análises de detecção e quantificação de CLas por PCR, foram diagnosticadas positivas à infecção da bactéria, apresentando Ct entre 16,98 e 24,17 (Tabela 1).

Tabela 1. Detecção e quantificação de “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” considerando a média técnica c_T em plantas-fonte (*Citrus sinensis*).

| Plantas fontes | Média técnica c_T | Detecção de CLas |
|----------------|---------------------|------------------|
| 1 | 21,24 | Positivo |
| 2 | 24,17 | Positivo |
| 3 | 20,90 | Positivo |
| 4 | 19,46 | Positivo |
| 5 | 19,30 | Positivo |
| 6 | 18,67 | Positivo |
| 7 | 22,61 | Positivo |
| 8 | 16,98 | Positivo |

*Média técnica c_T : média do valor de Ct (Cycle threshold) das amostras em duplicatas;

*Plantas que apresentaram valor Ct abaixo de 33,0 foram consideradas positivas à infecção de CLas

A análise realizada demonstrou efeito significativo do tempo na proporção de amostras de adultos de *D. citri* infectados com CLAs ($X^2 = 7,66$; $df = 2$; $p = 0,021$) e que esta proporção pode diferir entre plantas hospedeiras em períodos de alimentação específicos ($X^2 = 9,78$, $df = 2$, $p = 0,007$). No entanto, o tratamento (planta hospedeira) isoladamente não influenciou na infecção destes insetos ($X^2 = 3,09$; $df = 2$; $p = 0,078$) (Figura 1).

Foram obtidas 15 amostras de psíldeos coletados de plantas de citros e 18 amostras coletadas de plantas de curry, no período de quatro dias de alimentação. As amostras apresentaram diferenças significativas entre amostras de insetos que se alimentaram em plantas de curry e de citros por quatro dias, sendo observado uma alta proporção de amostras positivas em citros (100,00%) quando comparados as amostras de insetos coletadas de plantas de curry (58,88%) (Figura 1).

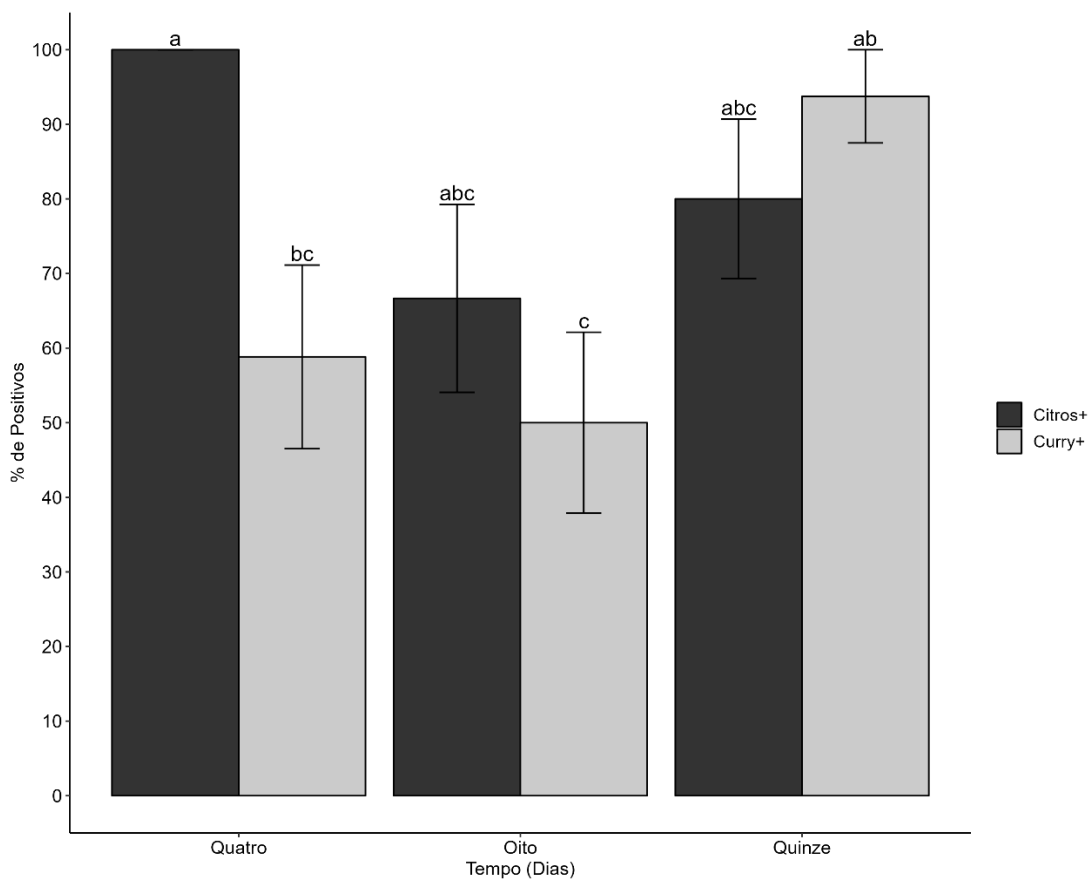


Figura 1. Proporção (%) de amostras de psíldeos positivas à “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” quando mantidos por quatro, oito e quinze dias em plantas de citros e de curry. Colunas seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si ao nível de 5% de significância pelo teste Tukey.

Em relação ao número de amostras, foram obtidas 15 amostras de psílídeos que se alimentaram por oito dias, coletadas de cada planta testada. Foi possível observar uma menor proporção de amostras infectadas em plantas de citros (66,66%) quando comparados a quatro dias de alimentação (100,00%), porém, não diferiram significativamente entre eles (Figura 1). Quando permaneceram por oito dias em curry, a proporção de amostras infectadas foi semelhante à obtida com quatro dias (58,88%), apresentando 50,00% das amostras de psílídeos positivas a CLas (Figura 1).

No período de 15 dias de alimentação de *D. citri* nas plantas, foram obtidas 15 amostras de psílídeos coletadas de plantas de citros e 17 amostras provenientes de plantas de curry. Entretanto, é possível observar um aumento na porcentagem de amostras infectadas quando os insetos permaneceram por quinze dias em curry (93,75%), apresentando diferenças estatísticas das amostras coletadas aos oito dias (50,00%) na mesma planta (Figura 1).

Os psílídeos mantidos por oito dias nas plantas de curry e de citros, apresentaram numericamente menor proporção de amostras infectivas que os demais períodos testados (Figura 1). Porém, estatisticamente não foi possível observar diferenças na infectividade de amostras coletadas após quatro, oito e quinze dias de permanência nas plantas de citros (Figura 1). A proporção de amostras de insetos infectivos coletadas aos oito dias em plantas de curry, diferiu significativamente da porcentagem obtida aos quinze dias, mas ambas não diferiram da proporção apresentada aos quatro dias (Figura 1).

Em relação a concentração bacteriana, não foi possível observar diferenças significativas entre os tratamentos (plantas de curry e de citros) ($F = 0,02$; $df = 1$; $p = 0,876$) e os períodos testados (quatro, oito e quinze dias) (Figura 2) ($F = 0,13$; $df = 2$; $p = 0,872$). A variação dos valores de Ct obtidos demonstra que aos quinze dias nas plantas de curry, foi obtido maior concentração bacteriana de amostras de psílídeos que permaneceram por esse período (17,45 – 32,85) (Figura 2).

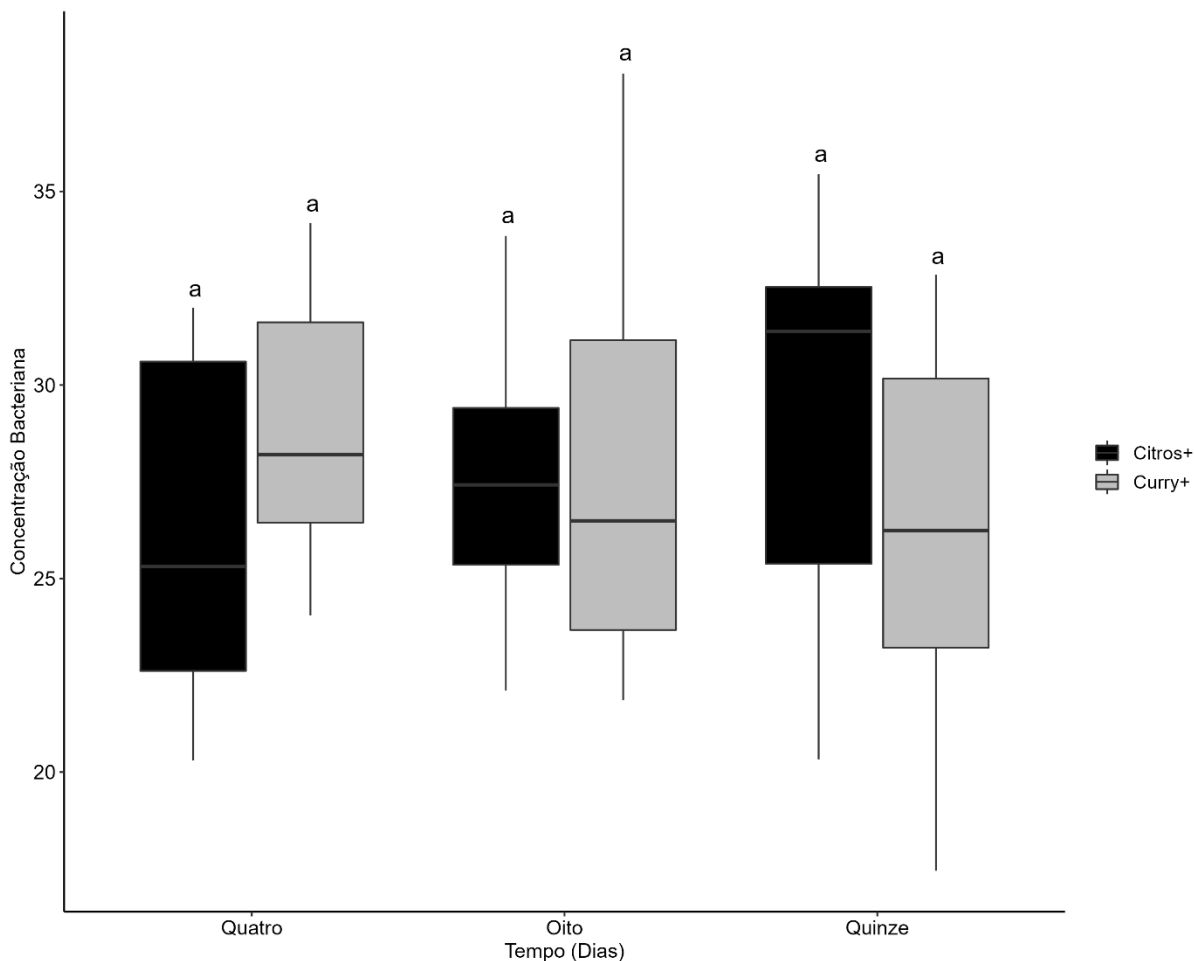


Figura 2. Concentração bacteriana medida pelo valor de Ct (Cycle Thresold) das amostras de psíldeos que permaneceram por quatro, oito e quinze dias em plantas de citros e de curry. Colunas seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si ao nível de 5% de significância pelo teste Tukey.

5. Discussão

A atividade antimicrobiana de *B. koenigii* é amplamente estudada, principalmente na área médica (KHANUM et al., 2000; YADAV et al., 2002; NINGAPPA et al., 2008; KANDRAL et al., 2012; KUMAR et al., 2013; HARBI et al., 2016). Foi detectada uma proteína monomérica com massa molecular de ~35 kDa, isolada de folhas de curry, que apresenta potente atividade antibacteriana (NINGAPPA et al., 2010). A proteína designada como APC (proteína antioxidante das folhas de curry) demonstrou potente atividade contra cepas patogênicas humanas testadas, inibindo a atividade de bactérias, como: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi* e *Bacillus subtilis*

(NINGAPPA et al., 2010).

Na agricultura, as plantas de curry (*B. koenigii*) e de murta (*M. paniculata*) têm sido estudadas para sua aplicação em campo como planta-isca (MARSH, 2016; TOMASETO et al., 2019). No entanto, plantas de murta não são imunes à CLas, apesar de apresentar baixa incidência de sintomas e baixo título bacteriano na planta infectada (LOPES et al., 2010). Em áreas endêmicas de HLB, *M. paniculata* é considerado um hospedeiro importante para a transmissão do patógeno para plantas de citros (CIFUENTES-ARENAS et al., 2019). Porém, por meio da combinação de condições altamente favoráveis à infecção e transmissão da bactéria, e na ausência de procedimentos efetivos de quarentena, essas plantas podem eventualmente servir como transportadoras de CLas para locais livres de HLB (CIFUENTES-ARENAS et al., 2019). Além disso, Ramsey et al. (2022) observaram que de 1 a 4% dos adultos de *D. citri* testados após quatro meses mantidos em *M. paniculata*, ainda estavam infectados por CLas, o que pode ser epidemiologicamente significativo caso haja a migração desses insetos de plantas de murta para plantas de citros saudáveis em áreas comerciais.

Em contraponto, a planta de curry (*B. koenigii*) vem demonstrando grande potencial como planta-isca para o manejo alternativo de *D. citri* e do HLB, decorrente de sua imunidade à bactéria e maior atratividade ao inseto vetor (BELOTI et al., 2018), podendo ser uma ferramenta importante para o setor citrícola. Estudos sobre a interação *D. citri* x CLas x hospedeiro vegetal demonstram que CLas não possui capacidade de colonizar as plantas de curry (KILLINY, 2016). Assim, é possível que a seiva do floema da planta de curry seja inadequada para a sobrevivência da bactéria (KILLINY, 2016). Outra hipótese é que possa ocorrer respostas das células de defesa contra as infecções bacterianas, porém, ainda devem ser investigadas (ALVES et al., 2021). Porém, é comprovado que *B. koenigii* é mais eficiente do que *M. paniculata* em limitar o crescimento e desenvolvimento de CLas (ALVES et al., 2021).

Para o manejo integrado do HLB e de *D. citri*, estudos vêm sendo realizados, principalmente com outros métodos mais efetivos para a redução da disseminação da doença em campo que possam ser utilizados concomitantemente. Porém, atualmente não existem estratégias eficazes para prevenir a infecção por CLas ou curar árvores (HUANG et al., 2021). Um estudo recente realizado foi capaz de identificar um peptídeo antimicrobiano estável de *Microcitrus australasica* (F. Muell.) Swingle

(Rutaceae) que pode inibir a infecção por CLas e de “*Candidatus Liberibacter solanacearum*”, sendo observado uma redução dos sintomas da doença em árvores positivas para HLB, que também induziu imunidade inata que pode atuar na inibição e prevenção de infecções (HUANG et al., 2021).

Devido ao fato que a viabilidade do manejo de doenças transmitidas por vetores depende da capacidade da pesquisa em obter culturas resistentes ou repelentes aos patógenos por meio de abordagens tradicionais ou engenharia genética e de bloquear a transmissão de patógenos pelo vetor de insetos (HECK, 2018) são necessários estudos para verificar como a alimentação de *D. citri* em plantas de curry podem afetar a infectividade de CLas nos psílídeos. Em decorrência dos resultados positivos em relação a inibição de bactérias patogênicas humanas, além de, o curry ser imune à “*Ca. L. asiaticus*”, provavelmente haja algum fator inibidor do crescimento de CLas nas folhas e essas características necessitam ser mais profundamente pesquisadas, pois podem contribuir para o manejo de *D. citri* e do HLB.

Os dados obtidos neste estudo demonstraram efeitos significativos em relação ao tempo na proporção de amostras de psílídeos infectados com CLas, podendo diferir entre plantas hospedeiras (curry e citros) em diferentes períodos de alimentação. No estudo realizado por Ramsey et al. (2022) foi observado que os títulos bacterianos em adultos de *D. citri* e a proporção de indivíduos infectados com CLas diminuíram ao longo das gerações após a transferência das plantas de citros infectadas para plantas de murta saudas. Além disso, após várias gerações alimentando-se em *M. paniculata*, a aquisição de patógenos e as taxas de transmissão em *D. citri* transferidos posteriormente para plantas de citros com CLas foram reduzidas em 20 a 40% e 15 a 20%, respectivamente (RAMSEY et al., 2022). Neste estudo, também foi observado que o percentual de infecção de insetos transferidos para *M. paniculata* saudável diminuiu para 2,5% em 4 meses, com valor médio de Ct de 37,82 (RAMSEY et al., 2022). Sendo assim, é possível que a espécie vegetal em que o inseto infectivo se alimenta e se desenvolve afete diretamente no desenvolvimento da bactéria que causa o HLB.

As amostras coletadas de plantas de citros apresentaram mais de 40% a mais de amostras positivas quando comparadas ao curry (58,88%). Provavelmente, as propriedades antimicrobianas presentes na planta de curry (HARBI et al., 2016) servem de proteção para a planta frente a colonização da bactéria. Porém, a planta

pode não possuir capacidade de reduzir ou afetar a bactéria presente no inseto vetor, sendo necessário a realização de novas pesquisas para comprovar essa hipótese. Recentemente, um estudo realizado com *Nicotiana tabacum* L., importante cultura comercial na China, apresentou efeitos sobre a sobrevivência de adultos de *D. citri* (ZHENG et al., 2023). O trabalho relatou que a sobrevivência em *N. tabacum* foi inferior a 30 horas, sendo que o composto L-nicotina foi altamente tóxico ao psílideo, podendo auxiliar no controle do inseto vetor e de disseminação do HLB (ZHENG et al., 2023). Esse estudo demonstra que os compostos de plantas podem ter efeitos negativos sobre desenvolvimento e sobrevivência de *D. citri*. Para o curry, sabe-se que suas folhas possuem alto teor de fenólicos e uma classe incomum de alcaloides carbazol que tem ações antimicrobianas, diferentemente das plantas de citros (HIJAZ et al., 2020). Devido a isso, acreditam que os compostos podem estar relacionados com a imunidade da planta de curry à CLas (HIJAZ et al., 2020).

Além disso, as amostras de psíldeos coletadas de plantas de citros e de curry podem ter sido insuficientes, sendo necessário estudos com maior número de amostras em diferentes períodos de tempo. É importante destacar, que em termos de disseminação primária, o mais importante são os adultos que adquirem a bactéria em áreas externas à de manejo e posteriormente as transmitem para as laranjeiras das propriedades com manejo do HLB (GOTTWALD, 2010; GASPAROTO et al., 2018). Assim, se os insetos não forem eliminados pelo inseticida através do sistema atraí-e-mata, se houver efeitos antimicrobianos presentes nas folhas, isto pode contribuir à diminuição da concentração bacteriana e da proporção de insetos infectivos, o que pode servir como uma estratégia para o manejo integrado da doença.

Os dados obtidos neste estudo, nas condições utilizadas, demonstraram que a concentração bacteriana não foi afetada pela alimentação em plantas de curry e citros por um período de quatro, oito e quinze dias. Entretanto, é possível observar diferenças na proporção de amostras positivas a CLas. Desta forma, destaca-se a importância de estudos mais aprofundados e testes com insetos se alimentando em plantas de curry por um maior período de tempo. Além de ser necessário mais estudos sobre a transmissão de CLas por psíldeos que se alimentaram do curry, com maior número de amostras, diferentes períodos de alimentação, além de testes com a técnica de EPG para comparar o tempo de alimentação entre amostras e tratamentos. Desta forma, os resultados apresentados contribuem para novos estudos acerca dos

efeitos da planta de curry na infecção de insetos pela bactéria “*Ca. L. asiaticus*”.

Referências

ALVES, G.R.; DINIZ, A.J.F.; PARRA, J.R.P. Biology of the Huanglongbing vector *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) on different host plants. **Journal of Economic Entomology**, v. 107, n. 2, p. 691-696, 2014.

ALVES, M.N.; CIFUENTES-ARENAS, J.C.; RAIOL-JUNIOR, L.L.; FERRO, J.A.; PENA, L. Early population dynamics of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” in susceptible and resistant genotypes after inoculation with infected *Diaphorina citri* feeding on young shoots. **Frontiers in microbiology**, v. 12, 683923, 2021.

AMMAR, E.D.; SHATTERS, R.G., LYNCH, C.; HALL, D.G. 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**, v. 104, n. 3, p. 526-533, 2011.

AUBERT, B. *Trioza erythrae* Del Guercio and *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psylloidea) the two vectors of citrus greening disease: Biological aspects and possible control strategies. **Fruits**, v. 42, n. 3, p. 149-162, 1987.

BELASQUE, J.; BASSANEZI, R.B.; YAMAMOTO, P.T.; AYRES, A.J.; TACHIBANA, A.; VIOLANTE, A.R.; TANK Jr, A.; DI GIORGI, F.; TERSI, F.E.A.; MENEZES, G.M.; DRAGONE, J.; JANK Jr, R.H.; BOVÉ, J.M. Lessons from Huanglongbing management in São Paulo State, Brazil. **Journal of Plant Pathology**, v. 92, n. 2, p. 285-302, 2010.

BELOTI, V.H.; SANTOS, F.; ALVES, G.R.; BENTO, J.M.S.; YAMAMOTO, P.T. Curry leaf smells better than citrus to females of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). **Arthropod-Plant Interactions**, v. 11, p. 709-716, 2017.

BELOTI, V.H.; ALVES, G.R.; COLETTA-FILHO, H.D.; YAMAMOTO, P.T. The Asian Citrus Psyllid host *Murraya koenigii* is immune to citrus Huanglongbing pathogen

'*Candidatus Liberibacter asiaticus*'. **Ecology e Epidemiology**, v. 108, p. 1089-1094, 2018.

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

CANALE, M.C.; TOMASETO, A.F.; HADDAD, M.L.; COLETTA-FILHO, H.D.; LOPES, J.R.S. Latency and persistence of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' in its psyllid vector, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). **Phytopatology**, v. 107, n. 3, p. 264-272, 2016.

CASTEEL, C.L.; HANSEN, A.K.; WALLING, L.L.; PAINE, T.D. Manipulation of plant defense responses by the tomato psyllid (*Bactericerca cockerelli*) and its associated endosymbiont *Candidatus Liberibacter psyllaeus*. **PloS one**, V. 7, n. 4, e35191, 2012.

CIFUENTES-ARENAS, J.C.; BEATTIE, G.A.C.; PENA, L.; LOPES, S.A. *Murraya paniculata* and *Swinglea glutinosa* as short-term transient hosts of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' and implications for the spread of huanglongbing. **Phytopathology**, v. 109, n. 12, p. 2064-2073, 2019.

COLETTA-FILHO, H.D.; DAUGHERTY, M.P.; FERREIRA, C.; LOPES, J.R. Temporal progression of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' infection in citrus and acquisition efficiency by *Diaphorina citri*. **Phytopathology**, v. 104, n. 4, p. 416-421, 2014.

DALA-PAULA, B.M.; PLOTTO, A.; BAI, J.; MANTHEY, J.A.; BALDWIN, E.A.; FERRAREZI, R.S.; GLORIA, M.B.A. Effect of huanglongbing or greening disease on orange juice quality, a review. **Frontiers in plant science**, v. 9, p. 1976, 2019.

EDUARDO, W.I.; SILVA, A.C.; VOLPE, H.X.L.; ALQUÉZAR, B.; PENA, L.; MIRANDA, M.P. Push-pull and kill strategy for *Diaphorina citri* control in citrus orchards. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 171, n. 4, p. 287-299, 2023.

EIGENBRODE, S.D.; BOSQUE-PÉREZ, N.A.; DAVIS, T.S. Insect-borne plant pathogens and their vectors: ecology, evolution, and complex interactions. **Annual Review of Entomology**, p. 169-191, 2018.

FERREIRA, E.B.; CAVALCANTI, P.P.; NOGUEIRA, D.A.; FERREIRA, M.E.B. Package 'ExpDes. pt', 2018.

GASPAROTO, M.C.G.; HAU, B.; BASSANEZI, R.B.; RODRIGUES, J.C., AMORIM, L. Spatiotemporal dynamics of citrus huanglongbing spread: a case study. **Plant pathology**, v. 67, n. 7, p. 1621-1628, 2018.

GOTTWALD, T. R. Current epidemiological understanding of citrus huanglongbing. **Annual Review of Phytopathology**, v. 48, p. 119–397, 2010.

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

HARBI, H.; IRFAN, U.M.; ALI, S. The antibacterial effect of curry leaves (*Murraya koenigii*). **European Journal of Pharmaceutical and Medical Research**, v. 3, n. 382-387, 2016.

HECK, M. Insect transmission of plant pathogens: A systems biology perspective. **MSystems**, v. 3, n. 2, p. e00168-17, 2018.

HIJAZ, F.; AL-RAMWI, F.; MANTHEY, J.A.; KILLINY, N. Phenolics, flavonoids and antioxidant capacities in Citrus species with different degree of tolerance to Huanglongbing. **Plant Signaling & Behavior**, v. 15, n. 5, p. 1752447, 2020.

HILF, M.E. Colonization of citrus seed coats by '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' implications for seed transmission of the bacterium. **Phytopathology**, v. 101, n. 10, p. 1242-1250, 2011.

HUANG, W.; REYES-CALDAS, P.; MANN, M.; SEIFBARGHO, S.; KAHN, A.; ALMEIDA, R.P.; BÉVEN, L.; HECK, M.; HOGENHOUT, S.A.; COAKER, G. Bacterial vector-borne plant diseases: unanswered questions and future directions. **Molecular plant**, v. 13, n. 10, p. 1379-1393, 2020.

HUANG, C Y.; ARAUJO, K.; SÁNCHEZ, J.N.; KUND, G.; TRUMBLE, J.; ROPER, C.; GODFREY, K.E.; JIN, H. A stable antimicrobial peptide with dual functions of treating and preventing citrus Huanglongbing. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 118, n. 6, p. e2019628118, 2021.

INOUE, H.; OHNISHI, J.; ITO, T.; TOMIMURA, K.; MIYATA, S.; IWANAMI, T.; ASHIHARA, W. Enhanced proliferation and efficient transmission of *Candidatus Liberibacter asiaticus* by adult *Diaphorina citri* after acquisition feeding in the nymphal stage. **Annals of Applied Biology**, v. 155, n. 1, 29-36, 2009.

JIANG, Y.; ZHANG, C.X.; CHEN, R.; HE, S.Y. Challenging battles of plants with phloem-feeding insects and prokaryotic pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 116, n. 47, p. 23390-23397, 2019.

KANDRAL, H.K.; PANDITH, A.; SHRUTHI, S.D. A review on *Murraya koenigii*: Multipotential medicinal plant. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 5, n. 1, p. 5-14, 2012.

KHANUM, F.; ANILAKUMAR, K.R.; SUDARSHANA KRISHNA, K.R.; VISWANATHAN, K.R.; SANTHANAM, K. Anticarcinogenic effects of curry leaves in dimethylhydrazine-treated rats. **Plant Foods for Human Nutrition**. v. 55, p. 347–355, 2000.

KILLINY, N. Metabolomic comparative analysis of the phloem sap of curry leaf tree (*Bergera koenigii*), orange jasmine (*Murraya paniculata*), and Valencia sweet orange (*Citrus sinensis*) supports their differential responses to Huanglongbing. **Plant Signaling & Behavior**, v. 11, n. 11, p. e1249080, 2016.

KILLINY, N.; JONES, S.E. Metabolic alterations in the nymphal instars of *Diaphorina citri* induced by *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the putative pathogen of huanglongbing. **PLoS One**, v. 13, n. 1, p. e0191871, 2018.

KUMAR, S.R.; LOVELEENA, D.; GODWIN, S. Medicinal property of *Murraya koenigii* - a review. **International Research Journal of Biological Sciences**, v. 2, n. 9, p. 80-83, 2013.

LI, W.; HARTUNG, J.S.; LEVY, L. Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus huanglongbing. **Journal of Microbiological Methods**, v. 66, n. 1, p. 104-115, 2006.

LIN, H.; CHEN, C.; DODDAPANENI, H.; DUAN, Y.; CIVEROLO, E.L.; BAI, X.; ZHAO, X. A new diagnostic system for ultra-sensitive and specific detection and quantification of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the bacterium associated with citrus huanglongbing. **Journal of Microbiological Methods**, v. 81, p. 17-25, 2010.

LENTH, R.; SINGMANN, H.; LOVE, J.; BUERKNER, P.; HERVE, M. Package 'emmeans', 2019.

LOPES, S.A.; FRARE, G.F.; CAMARGO, L.E.A.; WULFF, N.A.; TEIXEIRA, D.C.; BASSANEZI, R.B.; BEATTIE, G.A.C.; AYRES, A. Liberibacters associated with orange jasmine in Brazil: incidence in urban areas and relatedness to citrus Liberibacters. **Plant Pathology**, v. 59, n. 6, p. 1044-1053, 2010.

LOPES, J.R.S.; PARRA, J.R.P.; YAMAMOTO, P.T.; BENTO, J.M.S. Psilídeo-asiático-dos-citros, *Diaphorina citri* Kuwayama. In: *Pragas introdutivas no Brasil* [S.l.: s.n.], 2015.

MARSH, A.S. Use of Curry Leaf (*Murraya koenigii*) and Volkamer Lemon (*Citrus volkameriana*) as Potential Trap Crops for the Asian Citrus Psyllid (*Diaphorina citri*) in a Commercial Citrus Grove. Tese de doutorado, California State Polytechnic University, Pomona, CA, USA, 2016.

MENDONÇA, L.B.P.; ZAMBOLIM, L.; BADEL, J.L. Bacterial citrus diseases: major threats and recent progress. **Journal Bacteriology & Mycology Open Access**, v. 5, n. 4, p. 340-350, 2017.

MOLKI, B.; THI HA, P.; MOHAMED, A.; KILLINY, N.; GANG, D.R.; OMSLAND, A.; BEYENAL, H. Physiochemical changes mediated by "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" in Asian citrus psyllids. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-9, 2019.

MORAL, R.A.; HINDE, J.; GARCIA, C.G.B.D. Half-normal plots and overdispersed models in R: the hnp package. *Journal of Statistical Software*, v. 81, n. 10, 2017.

MORGAN, J.K.; ZHOU, L.; LI, W.; SHATTERS, R.G.; KEREMANE, M. Improved real-time PCR detection of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' from citrus and psyllid hosts by targeting the intragenic tandem-repeats of its prophage genes. **Molecular and Cellular Probes**, v. 26, p. 90-98, 2012.

MURRAY, M.G.; THOMPSON, W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic acids research**, v. 8, n. 19, p. 4321-4326, 1980.

NAVA, D.E.; TORRES, M.L.G.; RODRIGUES, M.D.L.; BENTO, J.M.S.; PARRA, J.R.P. Biology of *Diaphorina citri* (Hem., Psyllidae) on different hosts and at different temperatures. **Journal Applied Entomology**, v. 131, n. 9-10, p. 709-715, 2007.

NICHOLSON, R.L.; HAMMERSCHMIDT, R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. **Annual review of phytopathology**, v. 30, n. 1, p. 369-389, 1992.

NINGAPPA, M.B.; DINESHA, R.; SRINIVAS, L. Antioxidant and free radical scavenging activities of polyphenol-enriched curry leaf (*Murraya koenigii* L.) extracts. **Food Chemistry**, v. 106, p. 720-728, 2008.

NINGAPPA, M.B.; DHANANJAYA, B.L.; DINESHA, R.; HARSHA, R.; SRINIVAS, L. Potent antibacterial property of APC protein from curry leaves (*Murraya koenigii* L.). **Food chemistry**, v. 118, n. 3, p. 747-750, 2010.

PARRA, J.R.P. ALVES, G.R.; DINIZ, A.J.F.; VIEIRA, J.M. *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae) x *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae): Mass rearing and potential use of the parasitoid in Brasil. **Journal of Integrated Pest Management**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2016.

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

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing, version 3.5.2 ed. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2023.

RAMSEY, J.S.; AMMAR, E D.; MAHONEY, J.E.; RIVERA, K.; JOHNSON, R.; IGWE, D.O.; THANNHAUSER, T.W.; MACCOSS, M.J.; HALL, D.G.; HECK, M. Host plant adaptation drives changes in *Diaphorina citri* proteome regulation, proteoform expression, and transmission of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*', the citrus greening pathogen. **Phytopathology**®, v. 112, n. 1, p. 101-115, 2022.

SARKAR, S.C.; WANG, E.; WU, S.; LEI, Z. Application of trap cropping as companion plants for the management of agricultural pests: a review. **Insects**, v. 128, n. 9, p. 1-16, 2018.

SARKAR, P.; GHANIM, M. Unravelling the pathogenesis and molecular interactions of *Liberibacter* phytopathogens with their psyllid vectors. **Agronomy**, v. 10, n. 8, p. 1132, 2020.

TECK, L.; ABANG, F.; BEATTIE, A.; HENG, K.; KING, W. Influence of host plant species and flush growth stage on the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama. **American Journal of Agricultural and Biological Sciences**, v. 6, n. 4, p. 536-543, 2011.

TIWARI, S.; MANN, R.S.; ROGERS, M.E.; STELINSKI, L.L. Insecticide resistance in field populations of Asian citrus psyllid in Florida. **Pest Management Science**, v. 67, p. 1258-1268, 2011.

TOMASETO, A.F.; MARQUES, R.N.; FERERES, A.; ZANARDI, O.Z.; VOLPE, H.X.L.; ALQUÉZAR, B.; PENA, L.; MIRANDA, M.P. Orange jasmine as a trap crop to control *Diaphorina citri*. **Scientific Reports**, v. 9, p. 1-11, 2019.

VÁZQUEZ-GARCÍA, M; VELÁZQUEZ-MONREAL, J.; MEDINA-URRUTIA, V.M.; CRUZ-VARGAS, C.J.; SANDOVAL-SALAZAR, M.; VIRGEN-CALLEROS, H.; TORRES-MÓRAN, J.P. Insecticide resistance in adult *Diaphorina citri* Kuwayama from lime orchards in Central West Mexico. **Southwestern Entomologist**, v. 38, n. 4, p. 579-596, 2013.

YADAV, S.; VATS, V.; DHUNNOO, Y.; GROVER, J. K. Hypoglycemic and antihyperglycemic activity of *Murraya koenigii* leaves in diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 82, p. 111–116, 2002.

YAN, H.; ZENG, J.; ZHONG, G. The push–pull strategy for citrus psyllid control. **Pest management science**, v. 71, n. 7, p. 893-896, 2015.

WETSBROOK, C.J.; HALL, D.G.; STOVER, E.; DUAN, Y.P.; LEE, R.F. Colonization of Citrus and Citrus-related germplasm by *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). **HortScience**, v. 46, n. 7, p. 997-1005, 2011.

WICKMAM, H. ggplot2. **Wiley interdisciplinary reviews: computational statistics**, v. 3, n. 2, p. 180-185, 2011.

ZHENG, L.; XU, Q.; GONG, G.; LIAO, Y.; YU, M.; SHABALA, S.; CHEN, W.; WU, W. *Nicotiana tabacum* as a dead-end trap for adult *Diaphorina citri*: A potential biological tactic for protecting citrus orchards. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, 1081663, 2023.

AVALIAÇÃO ESPECTRAL DE PLANTAS DE CITROS (*Citrus sinensis*) INFECTADAS COM “*Candidatus Liberibacter asiaticus*”

Resumo

O Huanglongbing (HLB) é a principal e mais destrutiva doença que acomete os citros, cujo patógeno é transmitido por um inseto vetor, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). Para a doença, não existem métodos curativos, portanto, são necessários métodos rápidos e precisos para a detecção precoce da doença em campo, antes mesmo do aparecimento dos sintomas. Assim, é possível a remoção mais rápida de árvores infectadas, evitando a disseminação da bactéria por pomares comerciais de citros. Diante disso, foram realizadas avaliações espectrais, utilizando câmera hiperespectral, de plantas sadias e infectadas de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck com “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” (CLAs) até o aparecimento visual dos sintomas. Como resultado, foi possível determinar faixas de bandas que demonstraram diferenças significativas na reflectância relativa entre os tratamentos constituídos por plantas sadias e infectadas, desde os primeiros dias de avaliação, quando as plantas infectadas com CLAs ainda se encontravam no estágio assintomático da doença. A partir da segunda semana de avaliação, diferenças espectrais foram detectadas na região do vermelho de borda (660 – 750 nm) até a última semana de avaliação. A partir da sexta semana, diferenças espectrais entre plantas sadias e sintomáticas foram observadas em faixas próximas à região do visível (520 – 680 nm). Assim, conclui-se que é possível detectar diferenças espectrais nas folhas de *C. sinensis* infectadas por CLAs antes do aparecimento dos sintomas, sendo viável a utilização do sensor hiperespectral para o monitoramento da doença. Nossos resultados indicam a necessidade de futuros estudos para a validação do uso de sensores hiperespectrais para a detecção do HLB em pomares comerciais de citros, contribuindo para o manejo integrado da doença.

Palavras-chave: Huanglongbing, greening, agricultura de precisão, sensoriamento remoto, hiperespectral, detecção precoce.

Abstract

Huanglongbing (HLB) is the main and most destructive disease that affects citrus, whose pathogen is transmitted by an insect vector, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). For the disease, there are no curative methods, therefore, fast and accurate methods are needed for early detection of the disease in the field, even before the appearance of symptoms. Thus, it would be possible to remove infected trees more quickly, preventing the spread of the bacteria in commercial citrus orchards. Thus, spectral evaluations were conducted, using a hyperspectral camera, of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck healthy and infected plants with “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” (CLAs) until the visual appearance of symptoms. As a result, it was possible to determine ranges of bands that showed significant differences in relative reflectance between treatments consisting of healthy and infected plants, from the first days of evaluation, when plants infected with CLAs were still in the asymptomatic stage of the disease. From the second week of evaluation, spectral differences were detected in the near red edge region (660 – 750 nm) until the last week of evaluation. From the sixth week, spectral differences between healthy and symptomatic plants were observed in bands close to the visible region (520 – 680 nm). Thus, we concluded that it is possible to detect spectral differences in leaves of *C. sinensis* infected by CLAs before the onset of symptoms, making it feasible to use a hyperspectral sensor to

monitor the disease. Our results indicate the need for future studies to validate the use of hyperspectral sensors for the management and detection of HLB in commercial citrus orchards, contributing to the integrated management of the disease.

Keywords: huanglongbing, greening, precision agriculture, remote sensing, hyperspectral, early detection.

1. Introdução

As doenças que acometem plantas cultivadas são um dos principais problemas que reduzem diretamente a qualidade da produção agrícola (Iqbal et al. 2018). A detecção e identificação de lesões em plantas são necessárias para identificar rapidamente a necessidade da implementação do manejo, contribuindo para a redução de danos e perdas na produção (Gutte e Gitte 2016). O monitoramento de doenças e pragas dos citros em estágios iniciais é essencial para garantir a eficiência do sistema fitossanitário, visto que, diversas doenças causadas por fungos, bactérias, vírus e artrópodes limitam a produção de citros (Moriya et al. 2021).

O psílideo-asiático-dos-citros, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), é uma das principais pragas dos citros por ser inseto vetor da bactéria associada à doença mais destrutiva da cultura, o huanglongbing (HLB) ou também chamado de Greening (Bové 2006, Grafton-Cardwell et al. 2013, Monzó et al. 2015). A doença é causada por bactérias "*Candidatus Liberibacter* spp." que causam grandes perdas na produção de citros (Bové 2006, Canale et al. 2016). Nas Américas, "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" (CLAs) possui maior prevalência e disseminação, sendo a principal bactéria que acomete a citricultura (Yamamoto et al. 2014).

A doença tem apresentado um grande desafio para a produção de citros, pois não existem métodos curativos de manejo, apenas preventivos (Yamamoto et al. 2009, Bassanezi et al. 2020). Dentre esses métodos, uma das práticas utilizadas de manejo do HLB é a eliminação o mais rápido possível de plantas sintomáticas, uma vez que essa árvore pode ser fonte de inóculo, propiciando a disseminação da doença no restante do pomar (Mishra et al. 2009, He et al. 2022). A detecção de plantas sintomáticas é feita por inspeção visual e é adotada por muitos produtores, porém, é um método muito demorado, e muitas vezes ineficaz, visto que, a manifestação dos sintomas pode demorar alguns meses para aparecer (Mishra et al. 2009, Gottwald 2010).

Dessa forma, é de grande relevância o desenvolvimento de um método eficaz para prevenir e controlar a propagação do HLB em extensos pomares de citros, assim,

melhorando a qualidade e o rendimento da produção (Lan et al. 2020). Do mesmo modo, a detecção precoce de surtos de pragas e a aplicação de métodos de controle eficazes são intrínsecos ao manejo integrado de pragas (MIP), permitindo que as decisões de controle ocorram antes que as pragas estejam bem estabelecidas e provoquem perdas significativas na produção (Iost Filho et al. 2020). O MIP depende diretamente do monitoramento de insetos-praga para apoiar a tomada de decisão de um determinado nível de infestação ou injúria e selecionar o método de controle adequado (Prete et al. 2021). O principal desafio dos produtores está relacionado às ferramentas e técnicas de monitoramento de pragas, que são demoradas, caras e, por vezes, pouco confiáveis (Iost Filho et al. 2020, Prete et al. 2021).

Até o momento, o teste de PCR em tempo real é o método mais preciso para a detecção e diagnóstico do HLB em plantas de citros, porém, as amostras devem ser coletadas em campo e, posteriormente, testadas em laboratório, individualmente (Li et al. 2011). Esse processo de análise é trabalhoso e demorado, e não é utilizada considerando a extensão de árvores em áreas comerciais. Apesar de ser eficiente, também é um método com um custo alto (Li et al. 2011), pois requer equipamentos e profissionais especializados, tornando-se inviável em pomares de grande escala (Lan et al. 2020).

A implementação de métodos sem contato, altamente eficientes e acessíveis para detectar e monitorar doenças e pragas de plantas ao longo de extensas áreas, poderia facilitar a proteção das plantas (Zhang et al. 2019). A detecção precoce de *D. citri* pode auxiliar na proposição de medidas de controle adequadas nas áreas de cultivo onde ainda não há ocorrência da doença (Monzó et al. 2015). Em áreas onde a doença já está presente, o monitoramento de *D. citri* pode ser útil para o gerenciamento de todo o local com base nas flutuações de densidade do inseto (Monzó et al. 2015).

O avanço em tecnologia de sensores tem demonstrado potencial para o monitoramento automatizado de pragas e seus danos, otimizando o uso de inseticidas e reduzindo perdas de rendimento na agricultura (Iost Filho et al. 2020, Iost Filho et al. 2022). O Sensoriamento remoto é uma ciência que possui grande afinidade com o conceito de Agricultura de Precisão, incentivando o desenvolvimento de novas metodologias e outras abordagens que produzem informações espaciais que sirvam para auxiliar os agricultores no planejamento e nas tomadas de decisão de controle e manejo da lavoura (Moriya et al. 2019). O conceito de Agricultura de Precisão (AP)

prioriza uma melhor gestão de insumos agrícolas, como água, fertilizantes, herbicidas, inseticidas, entre outros, permitindo que o manejo adequado seja feito precisamente onde e quando é necessário (Oliveira et al. 2020).

Para a detecção precoce do HLB, alguns estudos preliminares demonstraram o potencial do uso de imagens espectrais e apontaram que há diferença na reflectância entre plantas de citros infectadas e sadias em campo (Mishra et al. 2009, Li et al. 2011). Foi desenvolvido um dispositivo portátil baseado em imagens de reflectância multiespectral e fluorescência multicolorida para a detecção de doenças em diferentes estádios infectados em cultivares de citros (He et al. 2022). Além disso, a técnica de imagem polarizada desenvolvida por Pourreza et al. (2017) foi capaz de detectar a infecção de CLas em folhas de citros quando se encontravam em estado pré-sintomático e estágios sintomáticos iniciais. O método também detectou quatro níveis de infecção enquanto as folhas ainda não apresentavam sintomas (Pourreza et al. 2017). Por meio dessa técnica, é possível diferenciar o acúmulo de amido em folhas infectadas com HLB de sintomas causados pela deficiência de zinco, que podem ser confundidas pela similaridade das manchas nas folhas (Pourreza et al. 2015). Entretanto, a detecção por essa técnica foi eficaz a uma distância de 80 cm das plantas (Pourreza et al. 2015), o que dificultaria a detecção em grandes áreas de produção de citros.

A imagem de reflectância hiperespectral tem sido usada com sucesso para identificar doenças, deficiências nutricionais e defeitos em diferentes espécies de frutas e vegetais (Kumar et al. 2012). As imagens hiperespectrais proveem informações espaciais e espectrais do tecido vegetal da planta, podendo permitir a detecção precisa de alterações na reflectância geradas por danos acometidos por insetos (Iost Filho et al. 2022). Além disso, o uso de imagens hiperespectrais em plantas de citros vem sendo estudadas e demonstraram grande potencial para a detecção precoce do HLB (Mei et al. 2014, Weng et al. 2018, Zhang et al. 2019). A imagem hiperespectral pode fornecer assinaturas espectrais únicas e, portanto, pode ser usada para detectar árvores potencialmente infectadas em uma grande área de forma rápida e eficiente, reduzindo significativamente o custo do monitoramento (Kumar et al. 2012). No estudo de Deng et al. (2020) foram utilizadas informações de bandas hiperespectrais para a detecção do HLB em plantas citros, sendo realizada a seleção de bandas com base na distância máxima de entropia, encontrando 20 bandas úteis para a detecção, localizadas principalmente em três regiões: região do

visível, região do vermelho de borda e região do infravermelho próximo.

Estudos com imagens espectrais estão sendo realizados por diversos pesquisadores, porém, atualmente, essa tecnologia ainda não é comercializada para a detecção do HLB em pomares de citros, pois apesar do progresso obtido nas pesquisas, ainda existem desafios que precisam ser enfrentados para validar sua aplicabilidade em campo considerando que estudos com diferentes graus de infecção ainda são escassos, principalmente em estágios assintomáticos (Weng et al. 2018). Portanto, são necessários mais estudos para a adoção dessa ferramenta de forma rápida e eficaz, detectando a doença precocemente em estágios assintomáticos, assim, evitando a disseminação da doença em áreas comerciais. Com isso, objetivou-se com este estudo verificar o potencial do imageamento hiperespectral na detecção de diferenças no padrão espectral entre plantas de citros sadias e infectadas, antes do aparecimento dos sintomas do HLB.

2. Material e Métodos

2.1. Manutenção de plantas sadias e infectadas

As plantas de citros, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, variedade "Valência", utilizadas nas análises foram mantidas durante todo o bioensaio em casas-de-vegetação, no Laboratório de Manejo Integrado de Pragas, no Departamento de Entomologia e Acarologia, na Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, na Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), Piracicaba, Brasil. O tratamento controle (plantas sadias) e o infectado com CLas foram mantidos em locais distintos, para evitar possíveis contaminações. As plantas foram irrigadas por meio do sistema de aspersores e gotejadores instalados casas-de-vegetação.

Os tratamentos foram constituídos por cinco plantas de citros infectadas com CLas por meio de enxertia por borbúlia, e cinco plantas sadias, representando o tratamento controle do experimento. Dessa forma, após aproximadamente 50 dias da infecção das plantas, foram iniciadas as avaliações espectrais.

2.2. Coleta de dados espectrais

As avaliações espectrais foram realizadas por meio de sensor hiperespectral, cujas especificações são: sistema de bancada de coleta de imagens hiperespectrais Pika-L, interface Firewire (IEEE 1394b); output, digital (12 bit); 600 bandas espectrais

variando de 400 a 1000 nm de comprimento de onda. A lente objetiva tem um comprimento focal de 23 mm (abertura máxima de F 2.4), otimizada para espectros próximos ao infravermelho. Os dados de reflectância foram adquiridos com resolução de aproximadamente 25 pixels por mm². Quadros de Teflon branco foram utilizados para calibração de branco, e a reflectância relativa foi calculada tendo como referência para o branco os quadros de Teflon. O sensor foi mantido em ambiente controlado e montado em uma torre contendo iluminação específica para coleta dos dados hiperespectrais.

Semanalmente, foram realizadas leituras espectrais de três a quatro folhas de cada planta (repetição). As folhas foram escolhidas de diferentes ramos da planta, a partir do ramo mais apical ao mais basal. As folhas que possuíam algum tipo de dano no tecido vegetal foram descartadas e não foram utilizadas para as avaliações.

As avaliações espectrais iniciaram após cinquenta dias da infecção das plantas com CLas. Para tanto, as amostras (folhas) foram posicionadas sobre uma plataforma linear abaixo do sensor, que se move realizando a leitura de modo automático controlado pelo software Spectronon (Resonon Inc., Montana, EUA). Cada folha foi posicionada na plataforma com sua face adaxial voltada para o sensor, que realiza uma leitura amostral, em regiões de interesse escolhidas manualmente. Para a coleta dos dados, a região de interesse selecionada no software foi a folha de citros como um todo. Os dados numéricos dos espectros gerados foram transferidos para o computador para gravação, processamento e análise. As coletas de dados espectrais foram realizadas até o aparecimento do sintoma visual característico do HLB (Figura 1), totalizando quinze leituras semanais. As avaliações espectrais foram realizadas semanalmente, aos 50, 58, 64, 72, 79, 86, 94, 99, 107, 114, 122, 129, 134, 143 e 150 dias após a infecção das plantas com CLas por meio de borbulhas.

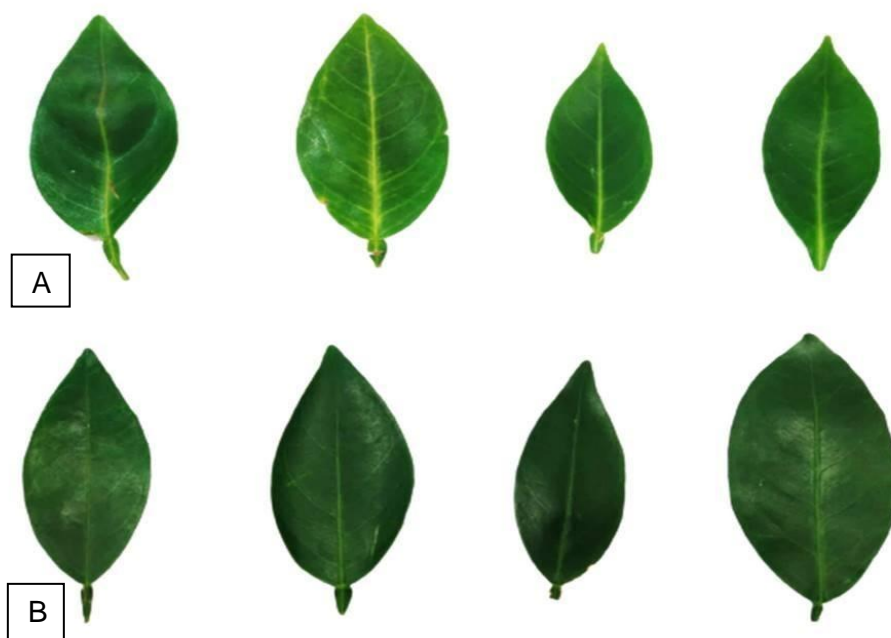


Figura 1. Comparação das folhas retiradas de plantas (a) infectadas com “*Ca. L. asiaticus*” e (b) não infectadas após aproximadamente 200 dias da infecção.

2.3. Análises estatísticas

Os dados foram submetidos a uma análise multivariada pela técnica de componentes principais para verificação de outliers e autocorrelação entre as bandas espectrais. Para cada uma das variáveis (bandas espectrais), foi realizada uma análise de variância em uma via com teste post-hoc da diferença honestamente significativa de Tukey, comparando as médias dos grupos propostos (tratamentos testados) entre si no período das avaliações. Todas as análises foram desenvolvidas usando a linguagem R (R Development Core Team 2023).

3. Resultados

Foi possível observar que, a partir dos dados espectrais obtidos de plantas infectadas e sadias, algumas faixas de bandas espectrais apresentaram diferenças na reflectância entre os tratamentos testados, desde o primeiro dia de avaliação, isto é, após 50 dias da infecção por borbulhas das plantas de citros (Tabela 1). Após a extração de dados, foram determinadas faixas espectrais que apresentaram significância entre os tratamentos, para reduzir a redundância e aumentar a eficiência de detecção (Tabela 1).

Observou-se que desde o primeiro dia de avaliação das folhas, houve diferenças entre plantas saudas e infectadas por HLB na faixa da região do infravermelho próximo entre 730 – 1200 nm (Tabela 1). A partir da segunda avaliação até a última avaliação, as faixas espectrais que se repetiram com frequência nas diferentes avaliações são próximas à região do vermelho de borda (660 – 750 nm) (Tabela 1).

A partir da sétima semana de leitura, foi observado diferenças significativas entre plantas infectadas e saudas na região do visível (520 – 680 nm) em todas as semanas avaliadas até a última semana de avaliação (15ª semana) (Tabela 1).

Tabela 1. Avaliações (DAI) e faixas espectrais de bandas (nm) com significância entre os tratamentos (plantas infectadas e saudas) de folhas de *Citrus sinensis*, determinada pela análise de componentes principais ($p < 0,05$).

| Avaliação (DAI) | Faixa espectral (nm) | p |
|-----------------|----------------------------------|--------|
| 50 | 730 – 1020 | < 0,05 |
| 58 | 700 – 730 | < 0,05 |
| 64 | 700 – 740 | < 0,05 |
| 72 | 660 – 720 | < 0,05 |
| 79 | 700 – 740 | < 0,05 |
| 86 | 380 – 520; 600 – 720; 940 – 1020 | < 0,05 |
| 94 | 520 – 680; 680 – 740 | < 0,05 |
| 99 | 520 – 580; 700 – 740 | < 0,05 |
| 107 | 520 – 610; 690 – 750 | < 0,05 |
| 114 | 530 – 580; 700 – 740 | < 0,05 |
| 122 | 520 – 610; 700 – 750 | < 0,05 |
| 129 | 520 – 610; 700 – 740 | < 0,05 |
| 134 | 520 – 590; 700 – 740 | < 0,05 |
| 143 | 530 – 570; 700 – 740 | < 0,05 |
| 150 | 530 – 580; 700 – 740 | < 0,05 |

*DAI = dias após a infecção

Na primeira avaliação realizada aos 50 dias após a infecção das plantas, foi possível observar que as plantas saudas apresentaram um fator de reflectância maior quando comparados com plantas previamente infectadas com CLAs, próximo a região

do infravermelho próximo (730 a 1000 nm) (Figura 2). Na faixa de 400 a 700 nm não foi possível observar diferenças nas curvas em relação ao fator de reflectância entre ambos os tratamentos (Figura 2).

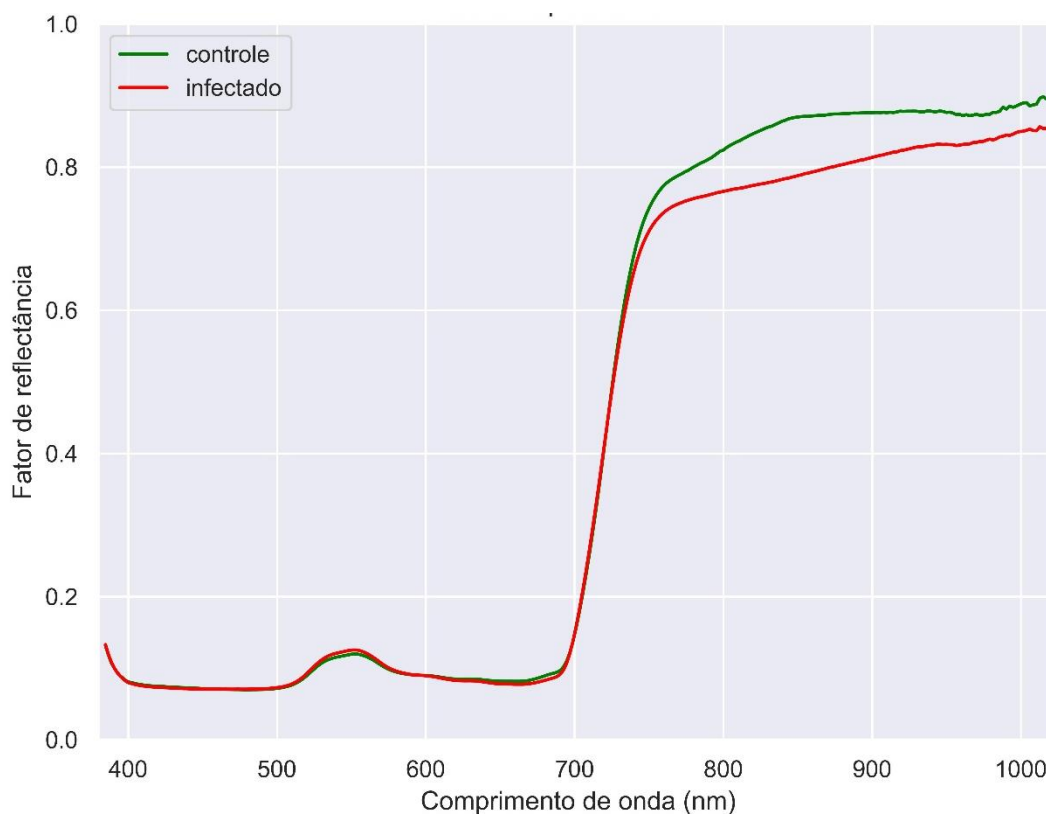


Figura 2. Curva espectral da reflectância de plantas infectadas por “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” e sadias (controle) na primeira semana de avaliação (~50 dias após a infecção).

Após 86 dias da infecção, referente à 5ª avaliação realizada, foi possível observar pequenas diferenças nas curvas espectrais nas regiões de 500 – 600 nm e 900 – 1000 nm, regiões próximas ao visível e ao infravermelho próximo, respectivamente (Figura 3). Porém, as diferenças entre as curvas espectrais na região do infravermelho próximo entre as plantas sadias e infectadas foram mais suaves em relação às diferenças observadas na primeira semana de observação (Figura 2).

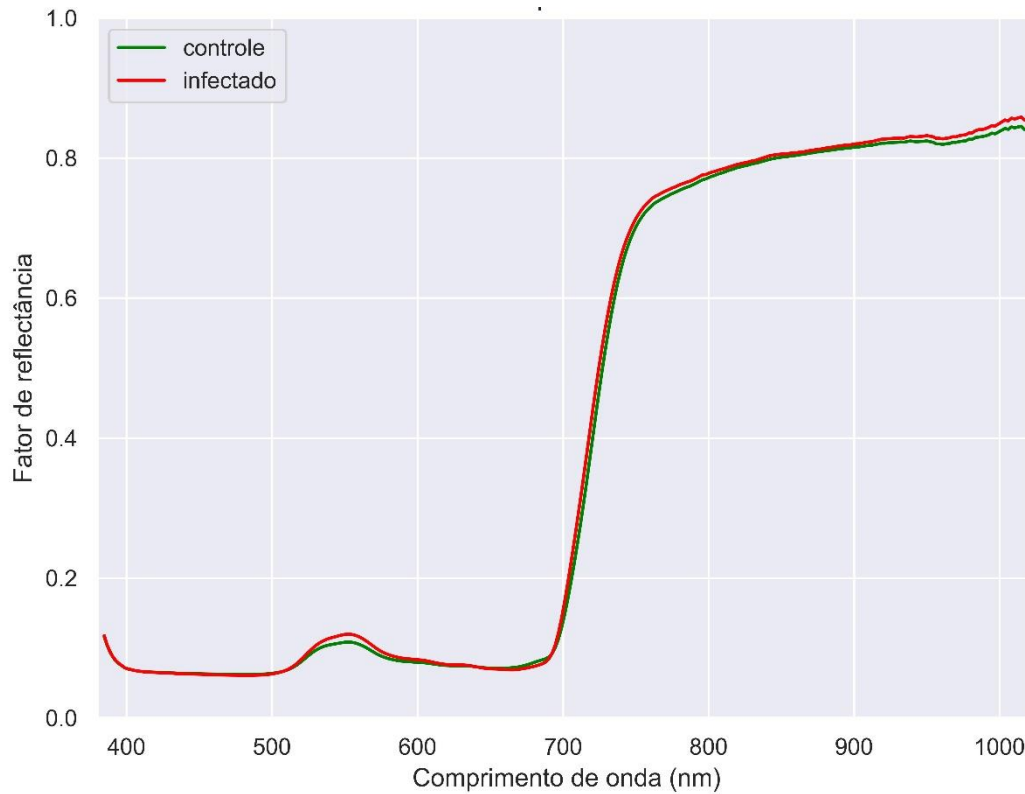


Figura 3. Curva espectral da reflectância de plantas infectadas por “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” e sadias (controle) na quinta semana de avaliação (~80 dias após a infecção).

Na última avaliação, após 150 dias da infecção das plantas, as curvas espectrais demonstraram leves diferenças relevantes na região próxima do vermelho de borda (680 – 730 nm) (Figura 4). Porém, na região do visível (500 – 600 nm), foi possível observar um menor fator de reflectância nas plantas sadias do que nas plantas infectadas (Figura 4).

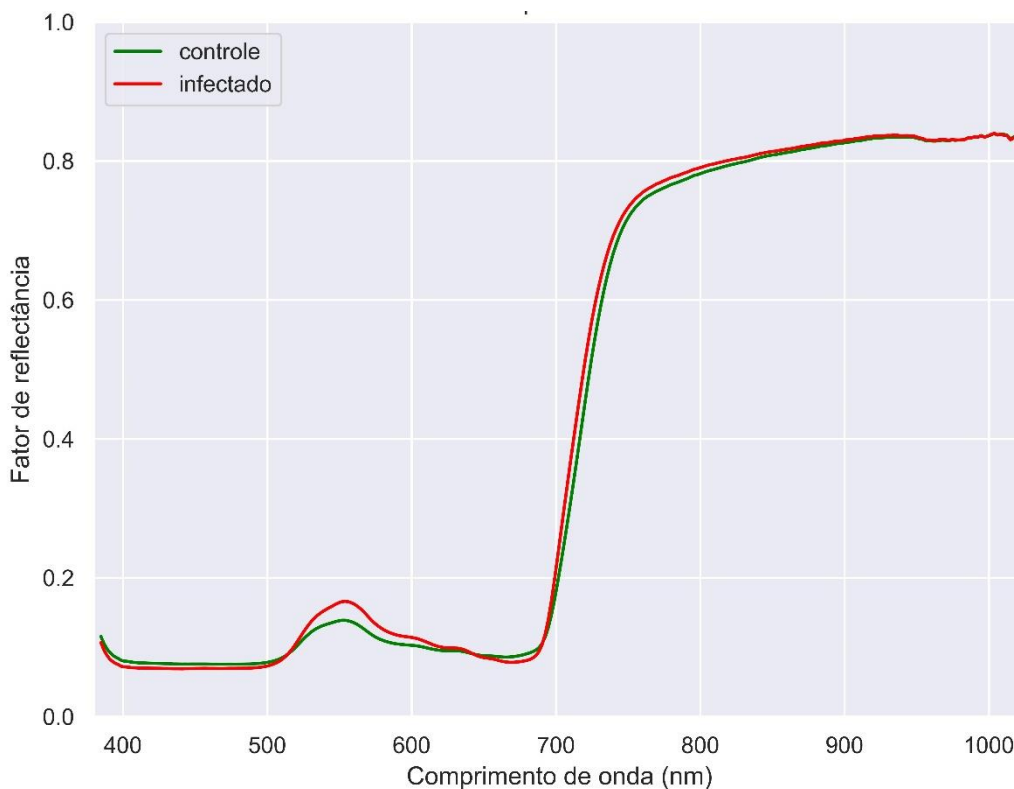


Figura 4. Curva espectral da reflectância de plantas infectadas por “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” e sadias (controle) na 15ª de avaliação (~150 dias após a infecção).

4. Discussão

Os estudos relacionados ao monitoramento de *D. citri* e detecção precoce de HLB vêm sendo aprofundados, principalmente utilizando-se sensores hiperespectrais (Mei et al. 2014, Weng et al. 2018, Zhang et al. 2019). A precisão obtida com o uso de sensores remotos pode contribuir para maior assertividade na tomada de decisão de manejo de doenças como HLB, além de proporcionar a detecção com precisão do local com o ataque de pragas ou doenças, identificando as áreas infectadas em grandes pomares de forma mais rápida e eficaz do que os métodos atuais de monitoramento.

Houve diferenças significativas entre a reflectância de plantas infectadas com HLB e sadias na região do vermelho de borda (660 – 750 nm) a partir da segunda avaliação realizada, após 58 dias da infecção das plantas, e a partir de 86 dias foram observadas diferenças significativas em faixas espectrais na região do visível (520 – 680 nm). Esses resultados corroboram os obtidos por Mei et al. (2014) que observaram, nas curvas espectrais, diferenças na reflectância espectral média de

plantas positivas ao HLB, na faixa de bandas de 400 a 700 nm. A reflectância espectral das folhas pode ser influenciada por diferentes fatores, como as condições de crescimento, estrutura das folhas e seus constituintes, o ambiente e outras características (Mei et al. 2014). Assim, esses fatores podem influenciar características internas da folha e morfológicas, como cor, textura, estrutura, pigmento, umidade e composição dos tecidos vegetais (Mei et al. 2014). Embora os dados hiperespectrais possam fornecer informações espectrais e espaciais ricas relacionadas às propriedades patológicas das folhas de citros, eles também contêm informações redundantes, sendo assim, é necessário selecionar comprimentos de onda representativos e importantes para reduzir informações irrelevantes (Weng et al. 2018).

Na primeira avaliação, após 50 dias da infecção, a reflectância de plantas saudáveis foi maior na região do infravermelho próximo (730 – 1000 nm). Entretanto, após 79 e 150 dias da infecção (5ª e 15ª avaliação espectral), foi observada que a reflectância na região do visível (500 – 600 nm) foi menor para plantas saudáveis quando comparadas às plantas infectadas. Resultados similares foram obtidos por outros autores, como o observado por Sankaran et al. (2013), onde a reflectância das árvores saudáveis na região do vermelho de borda e do infravermelho próximo foi superior do que a reflectância de árvores com HLB. Resultados semelhantes também foram observados por Weng et al. (2018), com o uso da combinação de imagens hiperespectrais e a análise metabólica de carboidratos para a detecção de HLB. Assim, a reflectância das folhas assintomáticas infectadas com HLB na região visível foi ligeiramente maior do que as saudáveis, mas menor do que as das folhas sintomáticas infectadas com CLAs e deficientes em ferro (Weng et al. 2018). Sankaran et al. (2013), utilizando um sistema Vis-NIR montado em veículo para detectar plantas de citros infectados com HLB, também observaram que a reflectância média das árvores infectadas com HLB foi maior do que a saudáveis na região do visível do espectro magnético. Kumar et al. (2012) e Li et al. (2014) também apresentaram conclusões semelhantes utilizando imagens multi e hiperespectrais aéreas. Na faixa visível (400 – 700 nm), a reflectância média das plantas saudáveis foi menor do que nas amostras infectadas pelo HLB, enquanto a reflectância das plantas saudáveis na faixa de 700 – 1000 nm foi muito maior do que plantas infectadas com HLB (Kumar et al. 2012; Li et al. 2014).

As diferenças na reflectância de plantas infectadas e sadias na região do visível e no infravermelho próximo podem ocorrer devido ao fato da vegetação saudável apresentar boa absorção de energia na região visível, enquanto apresenta alta reflectância na região do infravermelho próximo (Sankaran et al. 2013). Isso se deve à presença de pigmentos foliares, como xantofilas, clorofilas e carotenóides, que absorvem fortemente energia luminosa na região do visível e pouca ou nenhuma absorção na região do infravermelho próximo (Knipling 1970; Roy 1989). Como observado em nosso estudo, não foram observadas diferenças na curva espectral próximas à região do visível na primeira semana de avaliação, decorrente das plantas de citros encontrarem-se no estágio inicial da infecção de CLas. Foram detectadas diferenças significativas apenas na região do infravermelho próximo (730 – 100 nm), porém, com o avanço do tempo de avaliação, foi possível observar um aumento cada vez maior da diferença na reflectância de plantas sadias e doentes na região do visível, por exemplo, quando comparamos as curvas espectrais após 79 e 150 dias da infecção das folhas de citros.

Considerando o tempo inicial da infecção e do início da coleta dos dados, podemos verificar que as diferenças significativas na reflectância relativa entre plantas infectadas e sadias foram detectadas em faixas de bandas espectrais de 520 – 680 nm na região do visível, após aproximadamente cinco meses da infecção das plantas com CLas. Em casa-de-vegetação, o período do surgimento de sintomas visuais é de três a seis meses, enquanto no campo, em árvores de grande porte, pode levar mais de um ano para a detecção visual (Folimonova e Achor 2010). Como as plantas foram mantidas em casa-de-vegetação, provavelmente as diferenças significativas entre a reflectância de plantas sadias e infectadas na região visível estão relacionadas às mudanças de pigmentação decorrentes do aparecimento de sintomas visuais do HLB.

Os dados obtidos demonstram que diferenças significativas na reflectância são encontradas entre plantas sadias e infectadas na região do vermelho de borda (660 – 750 nm) a partir de 58 dias após a contaminação das plantas. Assim, o uso de imagens espectrais na detecção precoce do HLB possui grande potencial para o monitoramento de plantas infectadas, visto que os sintomas visuais do HLB começam a surgir aproximadamente seis meses após a transmissão da bactéria, o que dificulta a eliminação de plantas doentes e, conseqüentemente, aumenta a disseminação da doença na cultura dos citros.

As diferenças encontradas na reflectância podem servir como base para o diagnóstico e classificação precoce do HLB em plantas assintomáticas. Para isto, destaca-se a importância de estudos mais aprofundados em laboratório e em campo, a fim de aprimorar o uso de sensores hiperespectrais passíveis de utilização pelos citricultores, tornando-se uma ferramenta aplicável de manejo para o HLB. Os resultados aqui apresentados são preliminares e contribuirão para os futuros estudos de aprimoramento de técnicas com o uso de sensores para a detecção de áreas infectadas com bactérias associadas ao HLB e, conseqüentemente, para o manejo do inseto vetor e da doença em pomares comerciais de citros.

Referências

Bassanezi RB, Lopes SA, Miranda MP, Wulff NA, Volpe HXL, Ayres AJ. Overview of citrus huanglongbing spread and management strategies in Brazil. *Trop. Plant Pathol.* 2020; 45: 251-264.

Bové M. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *J. Plant Pathol.* 2006; 88: 7–37.

Canale MC, Tomaseto AF, Haddad ML, Coletta-Filho HD, Lopes JRS. Latency and persistence of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' in its psyllid vector, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). *Phytopathology* 2016; 107(3): 264-272.

Deng X, Zhu Z, Yang J, Zheng Z, Huang Z, Yin X, Wei S, Lan Y. Detection of citrus huanglongbing based on multi-input neural network model of UAV hyperspectral remote sensing. *Remote Sensing* 2020; 12(17), 2678.

Folimonova SY, Achor DS. Early events of citrus greening (Huanglongbing) disease development at the ultrastructural level. *Phytopathology* 2010; 100(9), 949-958.

Gottwald TR. Current epidemiological understanding of citrus huanglongbing. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2010; 48: 119-139.

Grafton-Cardwell EE, Stelinski LL, Stansly PA. Biology and management of Asian citrus psyllid, vector of the huanglongbing pathogens. *Annu. Rev. Entomol.* 2013; 58: 413-432.

Gutte VS, Gitte MA. A survey on recognition of plant disease with help of algorithm. *Int. J. Eng. Sci.* 2016: 7100.

He C, Li X, Liu Y, Yang B, Wu Z, Tan S, Ye D, Weng, H. Combining multicolor fluorescence imaging with multispectral reflectance imaging for rapid citrus Huanglongbing detection based on lightweight convolutional neural network using a handheld device. *Comput Electron Agric.* 2022: 194: 106808.

lost Filho FH, Heldens WB, Kong Z, Lange ES. Drones: innovative technology for use in precision pest management. *J. Econ. Entomol.* 2020: 113(1): 1-25.

lost Filho FH, Bastos JP, Medeiros AD, Rosalen DL, Yamamoto, PT. Assessment of Injury by Four Major Pests in Soybean Plants Using Hyperspectral Proximal Imaging. *Agronomy* 2022: 12(7): 1516.

Iqbal Z, Khan MA. Sharif M, Shah JH, Rehman MH, Javed K. An automated detection and classification of citrus plant diseases using image processing techniques: A review. *Comput Electron Agric* 2018: 153: 12-32.

Knipling EB. Physical and physiological basis for the reflectance of visible and near-infrared radiation from vegetation. *Remote sensing of environment* 1970: 1(3): 155-159.

Kumar A, Lee WS, Ehsani RJ, Albrigo LG, Yang C, Mangan RL. Citrus greening disease detection using aerial hyperspectral and multispectral imaging techniques. *J. Appl. Remote Sens.* 2012: 6(1): 063542-063542.

Lan Y, Huang Z, Deng X, Zhu Z, Huang H, Zheng Z, Lian B, Zeng G, Tong, Z. Comparison of machine learning methods for citrus greening detection on UAV multispectral images. *Comput Electron Agric* 2020: 171: 105234.

Li X, Lee WS, Li M, Ehsani R, Mishra AR, Yang C, Mangan RL. Comparison of different detection methods for citrus greening disease based on airborne multispectral and hyperspectral imagery. *American Society of Agricultural and Biological Engineers* 2011: 7-10.

Li H, Lee WS, Wang K, Ehsani R, Yang C. Extended spectral angle mapping (ESAM) for citrus greening disease detection using airborne hyperspectral imaging. *Precision Agriculture* 2014: 15: 162-183.

Mei H, Deng X, Hong T, Luo X. Early detection and grading of citrus huanglongbing using hyperspectral imaging technique. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering* 2014: 30(9), 140-147.

Mishra AR, Ehsani REZA, Karimi D, Albrigo LG. Potential applications of multiband spectroscopy and hyperspectral imaging for detecting HLB infected orange trees. *Proc. annu.* 2009: 122: 147-151.

Monzó C, Arevalo HA, Jones MM, Vanaclocha P, Croxton SD, Qureshi JA, Stansly PA. Sampling methods for detection and monitoring of the Asian citrus psyllid (Hemiptera: Psyllidae). *Environ. Entomol.* 2015: 44(3): 780-788.

Moriya É, Imai NN, Tommaselli AMG, Berveglieri A, Honkavaara E, Soares MA, Marino M. Detecting citrus huanglongbing in Brazilian orchards using hyperspectral aerial images. *Int. Arch. Photogramm. Remote Sens. Spat. Inf. Sci. - ISPRS Arch.* 2019: 42: 1881-1886.

Moriya ÉAS, Imai NN, Tommaselli AMG, Berveglieri A, Santos GH, Soares MA, Marino M, Reis, TT. Detection and mapping of trees infected with citrus gummosis using UAV hyperspectral data. *Comput Electron Agric.* 2021: 188: 106298.

Oliveira MRRD, Ribeiro SG, Mas JF, Teixeira ADS. Advances in hyperspectral sensing in agriculture: a review. *Rev. Ciênc. Agron.*, v. 51, e20207739, 2020

Pourreza A, Lee WS, Ehsani R, Schueller JK, Raveh E. An optimum method for real-time in-field detection of Huanglongbing disease using a vision sensor Comput Electron Agric. 2015; 110: 221-232.

Pourreza A, Lee WS, Czarnecka E, Verner L, Gurley W. Feasibility of Using the Optical Sensing Techniques for Early Detection of Huanglongbing in Citrus Seedlings. Robotics 2017; 6(2): 11.

Preti M, Moretti C, Scarton G, Giannotta G, Angel, S. (2021). Developing a smart trap prototype equipped with camera for tortricid pests remote monitoring. Bull. Insectology 2021; 74(1): 147-160.

R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing, version 3.5.2 ed. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2023.

Roy PS. Spectral reflectance characteristics of vegetation and their use in estimating productive potential. Proceedings: Plant Sciences 1989; 99: 59-81.

Sankaran S, Maja JM, Buchanon S, Ehsani R. Huanglongbing (Citrus Greening) detection Using Visible, near Infrared and Thermal Imaging techniques. Sensors (Basel) 2013; 13, 2117–2130.

Weng H, Lv J, Cen H, He M, Zeng Y, Hua S, Li H, Meng Y, Fang H, He Y. Hyperspectral reflectance imaging combined with carbohydrate metabolism analysis for diagnosis of citrus Huanglongbing in different seasons and cultivars. Sens. Actuators B Chem. 2018; 275: 50-60.

Yamamoto PT, Felipe MR, Sanches AL, Coelho JHC, Gardim LF, Ximenes NL. Eficácia de Inseticidas para o manejo de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) em Citros. BioAssay 2009; 4(4): 1-9.

Yamamoto PT, Alves GR, Beloti VH. Manejo e controle do huanglongbing (HLB) dos cítricos. Investig. Agrar. 2014; 16(2): 69-82.

Zhang J, Huang Y, Pu R, Gonzalez-Moreno P, Yuan L, Wu K, Huang W. Monitoring plant diseases and pests through remote sensing technology: A review. *Comput Electron Agric.* 2019; 165: 104943.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

A utilização da planta de curry como cultura armadilha e a aplicação de inseticidas sistêmicos “via drench” possuem capacidade de reduzir a população de *D. citri*, servindo como um sistema atrai-e-mata em campo. O produto a base de tiametoxam apresenta alta eficácia no controle do inseto, apresentando altas porcentagens de mortalidade por um período prolongado em plantas de curry, sendo o inseticida que apresentou melhor performance no manejo de *D. citri* neste estudo.

Os testes de transmissão demonstraram que adultos que se alimentaram por quatro, oito e quinze dias em plantas de citros e de curry não apresentaram diferenças significativas em relação à concentração bacteriana. Entretanto, foram observadas diferenças significativas entre as proporções de amostras de insetos infectivos entre as plantas de citros e curry em determinados períodos de tempo. Sendo assim, são necessários mais estudos testando maiores tempos de alimentação de ninfas e adultos de *D. citri* em plantas de curry e investigar mais a fundo a proporção de insetos infectivos em diferentes períodos.

As avaliações espectrais de plantas positivas ao HLB e sadias demonstraram diferenças na reflectância sadias na região do vermelho de borda (660 - 750 nm) a partir da segunda avaliação realizada. E a partir de seis semanas de avaliação (aproximadamente cinco meses da infecção inicial), foi observado diferenças significativas em faixas de bandas espectrais de 520 - 680 nm na região do visível. Em relação as curvas espectrais, na primeira semana de avaliação foi observado maior reflectância de plantas sadias na região do infravermelho próximo (700 – 1000 nm). Entretanto, na 5ª (~80 dias da infecção) e na 15ª (~150 da infecção) foram observados que a reflectância na região do visível (500 – 600 nm) foi menor para plantas sadias. Assim, foi possível concluir que há diferenças na reflectância de plantas sadias e infectadas assintomáticas, servindo de base para estudos futuros com a utilização de imagens hiperespectrais.