

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

Efeito de filme de partículas de caulim sobre a seleção hospedeira e desenvolvimento de *Diaphorina citri* Kuwayama em *Citrus sinensis* (L.) Osbeck

Daniele Turganti Turati

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

**Piracicaba
2008**

Daniele Turganti Turati
Bióloga

**Efeito de filme de partículas de caulim sobre a seleção hospedeira e desenvolvimento de
Diaphorina citri Kuwayama em *Citrus sinensis* (L.) Osbeck**

Orientador:

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

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

**Piracicaba
2008**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Turati, Daniele Turganti

Efeito de filme de partículas de caulim sobre a seleção hospedeira e desenvolvimento de *Diaphorina citri* Kuwayama em *Citrus sinensis* (L.) Osbeck / Daniele TurgantiTurati. - - Piracicaba, 2008.

73 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2008.
Bibliografia.

1. Bactérias fitopatogênicas 2. Caulim 3. Doenças de plantas 4. Frutas cítricas 5. Greenir
6. Insetos vetores I. Título

CDD 634.3
T929e

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

Aos Meus Pais:

Luiz Carlos Turati e Rosangela Turganti Turati, a quem devo tudo que sou, minha educação, persistência e autoconfiança. Por me ensinarem que a vida é repleta de desafios a serem superados a cada dia, sem jamais desistir.

Dedico

Aos meus irmãos:

Aline e Lucas, pelo incentivo, atenção, compreensão e carinho. Pela cumplicidade e alegria sempre presentes em nossas vidas.

E

Ao meu noivo:

Daniel, por sua presença em todos os momentos, pelos incentivos, carinho e amor. Por compreender todo o tempo que estivemos longe.

Ofereço

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me guiado ao longo de minha vida, com muita saúde, perseverança e força de vontade.

Ao Prof. Dr. João Roberto Spotti Lopes, pela orientação, confiança e amizade durante todos os anos de atividades, jornada esta que se iniciou na graduação e perdurou pelo curso de Mestrado. Suas palavras foram fundamentais na concretização deste trabalho.

As minhas avós Joséphina , Iraci, e aos meus tios Vânia e Anardino, que me incentivaram e jamais me deixaram desistir.

Aos meus avôs Clovís (*in memorian*) e Luiz (*in memorian*), que onde estejam, sempre estiveram ao meu lado.

Ao Fundo de Defesa da Citricultura – Fundecitrus pelo apoio técnico e financeiro.

À Prof. Marinéia de Lara Haddad, pelas análises e interpretação dos dados.

Aos amigos, Rodrigo, Marcelo, Fernanda e Cristiane pelo apoio no termino deste trabalho.

Aos professores do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da ESALQ/USP pelos ensinamentos transmitidos.

À equipe de trabalho do laboratório de insetos vetores, Thiago Cordeiro, Rodrigo Marques, Helen Miqueloti, Teresinha Giustolin, Marcelo Miranda, Érica Pereira, Fernando Salas, Carla Munhoz, Alexandre Missassi, Rudiney Ringenberg, Jean Patrick Bonani, Lucas Pereira, Fernanda Nascimento, Joyce, Cristiane Müller, Matê Lopes, Simone Prado, Isolda Haas, Flávio Perina, Érica Olandini, Juliana Balbinotte, Ricardo pela amizade e convivência harmoniosa durante todo o período que por lá permaneci.

Aos funcionários do Departamento de Entomologia pela convivência e respeito com que sempre vivemos.

A bibliotecária Silvia pela correção das referências e revisão do trabalho.

Aos colegas do programa de pós-graduação, pela colaboração, harmonia e companheirismo que expressaram.

Aos queridos seres que marcaram presença em minha. Arara, Willy, Cindy, Veludo e Sofia “Pequeninha” mesmo que não falando, transmitiram sempre muito amor e companheirismo por toda esta jornada. Em especial Snoopy, Pink e Pereba, os quais nos deixaram, mas sempre serão eternos em nossas lembranças.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente contribuíram com mais esta etapa de minha vida.

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
1 INTRODUÇÃO	10
2 DESENVOLVIMENTO	12
2.1 Revisão Bibliográfica	12
2.1.1 Greening.....	12
2.1.2 Transmissão de <i>Candidatus Liberibacter</i> spp.....	13
2.1.3 Bioecologia do inseto vetor.....	15
2.1.4 Controle.....	16
2.1.5 Tecnologia do filme de partículas.....	17
2.1.6 Desenvolvimento da tecnologia do filme de partículas.....	18
2.1.7 Ação sobre a biologia e comportamento do inseto.....	19
2.1.8 Eficácia do filme de partículas no controle de pragas.....	20
2.2 Material e métodos.....	22
2.2.1 Obtenção e manutenção de <i>Diaphorina citri</i> Kuwayama.....	22
2.2.2 Produto utilizado e seu modo de aplicação sobre as plantas.....	23
2.2.3 Determinação do número de aplicações de caulim sobre mudas cítricas para estudo de preferência.....	23
2.2.4 Efeito do filme de partículas caulim sobre a preferência de <i>D. citri</i>	24
2.2.5 Preferencia de <i>D.citri</i> por planta com níveis variáveis de cobertura com filme de partículas.....	25
2.2.6 Determinação do número de aplicações de caulim sobre mudas cítricas para estudo de oviposição.....	26
2.2.7 Teste de preferência de oviposição de <i>D. citri</i> por mudas cítricas tratadas e não tratadas com caulim.....	27
2.2.8 Efeito do filme de partículas sobre os ovos e desenvolvimento de ninfas.....	27
2.2.9 Teste de aquisição de <i>Candidatus Liberibacter</i> por <i>C. citri</i> em folhas com filme de partículas.....	28
2.3 Resultados e discussão.....	32

2.3.1 Determinação do número de aplicações de caulim sobre mudas cítricas para estudo de preferência por <i>D. citri</i>	32
2.3.2 Efeito do filme de partículas de caulim sobre a preferência de <i>D. citri</i>	35
2.3.3 Efeito do filme de partículas de caulim sobre a preferência de machos e fêmeas de <i>D. citri</i> por mudas cítricas.....	42
2.3.4 Preferência de <i>D. citri</i> por plantas com níveis variáveis de cobertura com filme de partículas.....	47
2.3.5 Seleção do número de aplicações de caulim para um menor índice de oviposição por <i>D. citri</i>	52
2.3.6 Efeito do filme de partículas na oviposição de <i>D.citri</i> em mudas cítricas.....	53
2.3.7 Efeito da aplicação de caulim diretamente sobre os ovos e ninfas de <i>D.citri</i>	57
2.3.8 Teste de aquisição de <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> por <i>D.citri</i> em folhas cobertas com filme de partículas.....	62
3 CONCLUSÕES.....	65
REFERÊNCIAS.....	66

RESUMO

Efeito de filme de partículas de caulim sobre a seleção hospedeira e desenvolvimento de *Diaphorina citri* Kuwayama em *Citrus sinensis* (L.) Osbeck

‘Huanglonghing’ (HLB) ou ‘greening’ dos citros é uma séria doença associada a bactérias do gênero *Candidatus Liberibacter*, que no Brasil são transmitidas pelo psílideo *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). Pela inexistência de variedades cítricas resistentes, as medidas de controle de HLB são preventivas, envolvendo o uso de mudas sadias; inspeção e erradicação de plantas sintomáticas e controle do vetor, que tem sido realizado de forma química. A pulverização sistemática de inseticidas para o controle de *D. citri* tem ameaçado o manejo integrado de pragas em citros, tornando-se necessário desenvolver medidas alternativas para o manejo deste inseto. A aplicação de um filme de partículas à base de caulim sobre as plantas pode substituir inseticidas no controle de pragas, por afetar a orientação à planta hospedeira e sua aceitação pelo inseto. O presente trabalho teve por objetivo avaliar o impacto do filme de partículas de caulim sobre a seleção hospedeira e desenvolvimento do psílideo *D. citri* em citros. Em laboratório, realizaram-se estudos de preferência de *D. citri* para pouso, permanência e oviposição em ‘seedlings’ de laranja ‘Caipira’ [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] tratados com caulim (Surround®WP) a 5%, bem como sobre o efeito deste produto quando aplicado diretamente sobre ovos e ninfas em brotações cítricas. Verificou-se que *D. citri* rejeita plantas cítricas cobertas com filme de partículas de caulim para fins de pouso, permanência e oviposição, em testes de livre escolha entre plantas tratadas e não tratadas com este produto. Machos e fêmeas de *D. citri* se comportam de forma semelhante, rejeitando plantas cobertas com caulim e preferindo a face abaxial das folhas de plantas não tratadas. Na ausência de escolha, um número significativo de indivíduos de *D. citri* pousa e permanece por vários dias sobre plantas cítricas cobertas com caulim, porém inferior ao observado sobre plantas não tratadas. Havendo chance de escolha entre plantas inteiramente cobertas com o filme de partículas, parcialmente cobertas (com brotos novos desprotegidos), e plantas não tratadas, verificou-se maior número de psíldeos sobre plantas com brotos desprotegidos do que em plantas inteiramente cobertas com o produto, indicando que a emissão de brotos em plantas tratadas reduz a eficácia do tratamento. A oviposição por *D. citri* é drasticamente reduzida sobre brotações cítricas cobertas com caulim, mesmo em condições de confinamento. Para avaliar o efeito no desenvolvimento de *D. citri*, caulim a 5% foi aplicado diretamente sobre ovos e ninfas de instares iniciais (1^o-3^o instar) e finais (4^o-5^o instar). A aplicação sobre brotações cítricas contendo ovos ou ninfas de diferentes estádios afetou o desenvolvimento de *D. citri*, reduzindo o número de ninfas e/ou adultos produzidos. A eficiência de aquisição de *Candidatus L. asiaticus* por *D. citri* foi reduzida em plantas cobertas com caulim, sugerindo que o caulim possa também afetar a sua alimentação. Os resultados desta pesquisa indicam que a tecnologia de filme de partículas tem bom potencial para o manejo de *D. citri*, podendo ser testada em campo.

Palavras-chave: Huanglongbing; Greening dos citros; inseto vetor; controle, tecnologia de filme de partículas.

ABSTRACT

Effect of kaolin on host selection and development of *Diaphorina citri* Kuwayama on *Citrus sinensis* (L.) Osbeck

Huanglongbing (HLB) or Citrus greening is a serious disease associated to the phytopathogenic bacteria *Candidatus Liberibacter* spp., which in Brazil are transmitted by the Asian citrus psylla, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). Due to the inexistence of resistant varieties, control measures of this disease are preventive, involving planting of healthy nursery trees, inspection and eradication of symptomatic plants and vector control. The frequent spraying of insecticides for controlling *D. citri* has threatened the integrated pest management in citrus, and the development of alternative methods for managing psyllid populations became a research priority. The particle film technology based on kaolin has shown to be effective for controlling some agricultural pests, because it affects host plant finding and acceptance by the insects. This research was carried out to assess the impact of kaolin particle films on host selection and development of *D. citri* on citrus. Laboratory studies were conducted to evaluate landing, permanence and oviposition of *D. citri* on sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] seedlings treated with kaolin (Surround®WP) at 5% concentration in water, in relation to non-treated plants, as well as the effect of this product on psyllid development when applied directly on eggs and nymphs. It was found that *D. citri* rejects citrus plants covered with kaolin, in choice tests between treated x untreated plants. This behavior was the same for *D. citri* males and females, which preferred to land and remain on the leaf abaxial surface of untreated plants. In non-choice tests, significant numbers of psyllid adults landed and remained for several days on citrus covered with kaolin, but the population observed on non-treated plants was higher. In choice tests among citrus seedlings entirely covered with kaolin, partially covered (with uncovered young shoots) and untreated plants, higher number of psyllids were found on plants with uncovered shoots than on entirely covered plants, showing that the emission of young shoot on treated plants decrease treatment efficacy. Oviposition by *D. citri* is drastically reduced on kaolin-treated young shoots, even in non-choice (confinement) tests. To test the effect on *D. citri* development, kaolin was applied directly on eggs, early-instar (1st-3rd instar) nymphs and late-instar (4th-5th instar) nymphs. The treatment on young citrus shoots containing eggs or nymphs of different stadia affected the development of *D. citri*, reducing the number of nymphs and adults produced per shoot. Acquisition efficiency of *Candidatus L. asiaticus* by *D. citri* was reduced on kaolin-treated plants, suggesting that this treatment may also affect vector feeding. Overall, the results of this research indicate that the particle film technology is a promising tool for managing *D. citri* populations in citrus groves, which could be tested for efficacy under field conditions.

Key-words: Huanglongbing; Citrus greening; insect vector; control; Particle film technology

1 INTRODUÇÃO

Com mais de 1 milhão de hectares de plantas cítricas em seu território, o Brasil tornou-se na década de 80, o maior produtor mundial de citros. Em 2007, a área colhida chegou a 779.5 mil hectares, com uma produção em torno de 447.713.137 caixas. A maior parte desta produtividade destina-se à indústria de suco concentrada no Estado de São Paulo, responsável por 80,3% da produção, oriunda da extensa área cultivada, de 565,7 mil hectares, ou seja, correspondente a 73% de toda área colhida, [Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 2008].

A cultura de citros é afetada por inúmeros problemas fitossanitários, representados por pragas e doenças, estando entre os cultivos com maiores perdas devido ao ataque de insetos, ácaros e patógenos. Dentre as principais ameaças à citricultura, destaca-se o “Huanglongbing” (HLB) ou “Greening” dos citros, considerada a doença mais destrutiva dos citros no mundo (BOVÉ, 2006), pela severidade dos sintomas, potencial de progressão da doença e por afetar todas as variedades comerciais (GRAÇA, 1991). Mundialmente esta doença está associada a bactérias do gênero *Candidatus Liberibacter* Gram-negativas, restritas aos vasos do floema de plantas, não cultiváveis, pertencentes à subdivisão α do grupo Proteobacteria (BOVÉ, 2006). No Brasil, são conhecidas duas espécies deste gênero, *Ca. L. asiaticus* e a nova espécie *Ca. L. americanus* (COLETTA-FILHO et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2005). A disseminação da doença se dá por enxertia de material infectado ou por psilídeos. O psilídeo asiático dos citros, *Diaphorina citri* Kuwayama, relatado no Brasil há 60 anos, está estabelecido nos pomares de São Paulo e é o vetor dessas bactérias.

O manejo do HLB tem se baseado em algumas medidas fundamentais, como: plantio de mudas sadias, produzidas em viveiros protegidos; controle dos vetores e eliminação de plantas contaminadas de qualquer idade. O controle do inseto é considerado essencial para reduzir a disseminação da doença nos pomares, sendo que o controle químico é atualmente o método mais utilizado pelos citricultores para suprimir populações *D. citri*. A pulverização constante de inseticidas de amplo espectro de ação, especialmente fosforados e piretróides, tem ameaçado o manejo integrado de pragas em citros, devido aos riscos de resistência de pragas, desequilíbrio biológico, aparecimento de pragas secundárias, entre outros. Assim, torna-se necessário desenvolver medidas alternativas para o manejo deste inseto.

A tecnologia do filme de partículas é considerada uma alternativa com potencial para substituir alguns inseticidas no controle de vários insetos. O caulim, um mineral aluminossilicato ($Al_4 Si_4 O_{10} [OH]_8$) branco, não abrasivo, quimicamente inerte, formulado para o emprego em plantas, é o principal componente desta tecnologia (PUTERKA; GLENN; SEKUTOWSKI, 2000). De acordo com Glenn *et al.*, (1999), os insetos podem ser repelidos ou infestações inteiras suprimidas em plantas cobertas com o filme de partículas. A presença do caulim altera a coloração das plantas, podendo afetar o seu reconhecimento por insetos fitófagos, já que muitos utilizam estímulos visuais ou cores para orientação à planta hospedeira.

O caulim mostra-se eficiente no controle de diversas pragas, tais como afídeos (COTTRELL; WOOD; REILLY, 2002; WYSS; DANIEL, 2004), mosca-das-frutas (MAZOR; EREZ, 2004), psilídeos, cigarrinhas e ácaros (GLENN *et al.*, 1999; PUTERKA *et al.*, 2000). Para o psilídeo *D. citri*, estudos realizados por Hall *et al.* (2007) indicaram que o filme de partículas de caulim debilita a capacidade dos adultos de *D. citri* para caminhar e permanecer sobre as folhas, reduzindo a sua incidência sobre plantas cítricas, embora não tenha mostrado um efeito tóxico quanto aplicado sobre ovos, ninfas e adultos na diluição de 3%.

Considerando-se a redução na infestação de *D. citri* pela aplicação de caulim (HALL *et al.*, 2007) e os possíveis efeitos deste produto sobre os processos de seleção hospedeira, transmissão do patógeno e desenvolvimento do inseto, justificam-se novos estudos para investigar o potencial da tecnologia de filme de partículas como um método alternativo para o manejo deste vetor em pomares de laranja no Brasil.

O presente trabalho teve por objetivo avaliar o impacto do filme de partículas de caulim sobre a seleção hospedeira e desenvolvimento do psilídeo *D. citri* em citros. Para tal, foram realizados estudos de preferência de *D. citri* para pouso, permanência e oviposição em plantas cítricas tratadas com o filme de partículas, bem como sobre o efeito deste produto no desenvolvimento do inseto quando aplicado diretamente sobre ovos e ninfas em plantas cítricas.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 Greening

‘Huanglongbing’(HLB) tamb“greening” dos citros (VAN VUUREN, 1996), considerada a doença mais destrutiva de citros no mundo (BOVÉ, 2006), pela severidade dos sintomas, potencial de progressão da doença e por afetar todas as variedades comerciais (GRAÇA, 1991).

O agente causal da doença é uma bactéria Gram negativa (GARNIER et al., 1984), restrita ao vasos do floema da planta, não cultivável, pertencente à subdivisão α do grupo *Proteobacteria*, cuja característica principal consiste em ser um organismo que vive intimamente associado às células eucarióticas e, em muitos casos, adquirem a habilidade de sobreviver e crescer dentro de artrópodes hospedeiros, além do floema das plantas hospedeiras (BOVÉ; GARNIER, 2002).

Atualmente são conhecidas três estirpes da bactéria, responsáveis por causar a doença em plantas hospederias, a africana (*Candidatus Liberibacter africanus*), asiática (*Candidatus Liberibacter asiaticus*), e a americana (*Candidatus Liberibacter americanus*), sendo estas encontradas respectivamente na África, Ásia e América do Sul (JAGOUÉIX; BOVÉ; GARNIER, 1994; TEXEIRA et al., 2005). Em vários países destes continentes a doença é responsável por perdas significativas nas áreas de citrus, chegando até a 95% de redução em alguns locais (MARTINEZ; WALLACE, 1969; ALTAMIRO; GONZLEZ; VIÑAS 1976; BHAVAKUL et al.,1981; TIRTAWIDJAJA, 1980). Na África do Sul existem relatos de até 100% de perdas na produção (SCHWARZ, 1968).

No Brasil, greening foi relatada pela primeira vez em 2004 em plantas de laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck) na região de Araraquara, Estado de São Paulo, associada à bactéria *Ca. L. asiaticus* e a nova espécie encontrada no país *Ca. L. americanus*, (COLETTA-FILHO et al., 2004; TEXEIRA et al.,2005).

Atualmente, greening encontra-se disseminada em 176 municípios do Estado de São Paulo, um município de Minas Gerais e dois municípios do Paraná (FUNDECITRUS, 2008b), sendo que a incidência da doença nos talhões evoluiu de 3,41% em 2004 para 18,57% em 2008.

Até o momento mais de três milhões de plantas já foram erradicadas, mas estima-se que 2,4 milhões de plantas sintomáticas ainda permanecem nos pomares paulistas (FUNDECITRUS, 2008a)

O sintoma da doença inicia-se em um ramo ou galho, que se destaca pela coloração amarela em contraste com a cor verde natural das folhas. Esses ramos possuem folhas caracterizadas por uma clorose ao longo da nervura principal progredindo para mosqueamento e amarelecimento por toda a folha, no avanço da doença. Como sintoma secundário ocorre a formação de folhas de tamanho reduzido, cloroses semelhantes às provocadas pela deficiência de zinco e nitrogênio (GRAÇA, 1991). Com a evolução da doença, há intensa desfolha dos ramos afetados e o problema começa aparecer em outros ramos da planta, tomando toda a copa da laranjeira, inclusive com surgimento de seca e morte de ponteiros. Os frutos afetados são menores, assimétricos e apresentam um sabor amargo, provavelmente devido à alta acidez e baixa quantidade de açúcar. (McLEAN; SCHWARZ, 1970). Pode ocorrer queda prematura e a coloração irregular do fruto. característica esta que atribui nome a doença (McCLEAN; SCHWARZ, 1970). Também é comum a ocorrência de sementes abortadas em frutos severamente afetados (GRAÇA, 1991).

2.1.2 Transmissão de *Candidatus Liberibacter spp*

A identificação do psíldeo africano *Trioza erythrae* (Del Guercio) e o psíldeo asiático *Diaphorina citri* Kuwayama como vetor do *Candidatus Liberibacter spp* ocorreu nas Filipinas por Salibe e Cortez (1966), sendo estes conhecidos como meio primário de disseminação da doença no campo (OBERHOLZER; HOFMEYR, 1971). Sendo o primeiro vetor natural de *Ca. L. africanus* na África, e o segundo vetor de *Ca. L. asiaticus* sob condições naturais na Ásia e Américas (BOVÉ, 2006).. Foi comprovado recentemente que o vetor no Estado de São Paulo é *D. citri*, que não só transmite *Ca. L. asiaticus*, mas também *Ca. L. americanus* (TEXEIRA et al., 2005a). Ambas as espécies transmitem os dois patógenos (LALLEMAND; FOS; BOVÉ, 1970). No entanto, ainda não se tem conhecimento se esta infecção pode ser simultânea (GARNIER, 2000).

As informações sobre interações patógeno-vetor e características da transmissão encontradas na literatura em alguns casos são conflitantes. Provavelmente, devido as diferenças

entre as espécies e biótipos de vetores, espécies e estirpes da bactéria. Entretanto, na maioria dos casos as informações levam a crer que este patógeno tem uma relação circulativa propagativa com seus insetos vetores.

Adultos de *D. citri* são capazes de adquirir o patógeno de plantas infectada (CAPOOR; RAO; VISWANATH, 1974; ZHAO, 1981; XU et al., 1987), no entanto o tempo de aquisição pode variar de 15 a 30 minutos (OBERHOLZE; HOFMEYR, 1955, CAPOOR; RAO; VISWANATH, 1974) ou de 5 a 7 horas (XU et al., 1987), sendo que longos períodos de alimentação conferem ao inseto alta infectividade (GRAÇA, 1991). Ninfas de *D. citri* a partir do quarto ínstar são capazes de adquirir e reter o patógeno até adultos, fase na qual são capazes de transmitir a doença imediatamente após a emergência (CAPOOR; RAO; VISWANATH, 1974; ZHAO, 1981), no período de 1 a 25 dias (XU et al. 1987).

O período de latência do patógeno dentro do inseto pode variar de 24 horas (XU et al., 1987) até 21 dias (CAPPOR; RAO; VISWANATH, 1974). Hung et al (2004) observaram um longo período de retenção da estirpe asiática em adultos de *D. citri* após aquisição em plantas infectadas.

A taxa de transmissão por *D. citri* pode variar de 1 a 100% (XU et al., 1988), sendo que alguns trabalhos indicam que períodos curtos de alimentação são suficientes para que ocorra a transmissão (RAYCHAUDHURI et al., 1972), entretanto, outros indicam a necessidade de um período mínimo de 5 horas (XU et al., 1987). A ocorrência de transmissão transovariana ainda não foi bem explicada, existindo relatos conflitantes na literatura (HALBERT; MANJUNATH 2004).

Além dos insetos vetores *Candidatus Liberibacter* spp pode ser transmitida por meio de enxertia Salibe e Cortez (1966). No entanto, a infecção é variável e depende da parte da planta enxertada, da quantidade de tecido utilizada e do patógeno presente nas regiões utilizadas (HALBERT; MANJUNATH, 2004).

De acordo com Halbert e Manjunath (2004), a transmissão pelas sementes é desconhecida, principalmente, em função dos frutos serem perdidos e suas sementes quase sempre abortadas. Em um primeiro experimento Tirtawidjaja (1981) não observou sintomas da doença nas mudas provenientes de sementes de plantas doentes.

2.1.3 Bioecologia do Inseto Vetor

Diaphorina citri (=Euphalarus citri (Kuwayama 1908) pertence à ordem Hemiptera e família Psyllidae foi descrita ocorrendo em citros em Schinchik, no Taiwan em 1907. São insetos diminutos, que na fase adulta chegam a medir de 2 a 3 mm de comprimento (AUBERT, 1987; GALLO et al., 2002). Possuem o corpo mosqueado de marrom, com cabeça e asas contendo machas amarronzadas e secreção serosa sob a forma de pó. Comumente são encontrados na face abaxial das folhas e quando parados, apresentam a disposição de 45° em relação ao substrato em que se encontram (MEAD, 2002). Os adultos em temperaturas elevadas, vivem em média de 80 a 90 dias, apresentando um longo período para adquirir bactérias (AUBERT, 1987) e em temperaturas baixas este período pode ser estendido para até 9 meses (YANG et al. 2006).

Os autores Weninger e Hall (2007) observaram que ambos os sexos podem adquirir maturidade reprodutiva em 2 a 3 dias após emergirem.. E o acasalamento ocorrendo exclusivamente sobre as brotações, durante a fotofase (WENNINGER ; HALL, 2007).

A duração da copula de *D. citri* varia de 18 min a 50 min (WENNINGER; HALL, 2007). Após esse período de acasalamento o inseto inicia a oviposição dentro de um dia (WENNINGER; HALL, 2007) sobre as novas brotações, onde é o local exclusivo para as fêmeas colocarem os ovos (HUSAIN; NATH, 1927). Os ovos são depositados em gemas foliares ainda em abertura, ramos novos e na axila das folhas (HUANG et al., 1999). O número médio de ovos por fêmea varia de 630 a 1230 ovos (HUANG et al., 1990). Os ovos possuem coloração amarela e formato alongado, chegando a medir em torno de 0,3mm de altura e 0,14mm de comprimento (TSAI; LIU, 2000). O período de incubação do ovo à temperatura de 28° C é de 3,5 dias em média (LIU; TSAI, 2000).

As ninfas passam por cinco ínstares, são pequenas e achatadas, com 0,25 a 1,7mm de comprimento, cor amarelada e apresentam pernas curtas. São essencialmente sedentárias (WU, 1980) permanecendo grande parte do tempo agregadas e se alimentam na superfície das folhas na parte terminal do pecíolo entre a gema axilar e os brotos novos (TSAI; LIU, 2000). Esta fase, em temperaturas elevadas, tem duração de 11 a 15 dias (CHAVAN; SUMMANWAR, 1993). Desta forma, o ciclo de *D. citri* varia de 15 a 47 dias dependendo da temperatura (LIU; TSAI, 2000).

A flutuação populacional do psilídeo está correlacionada com o ritmo e qualidade da brotação, uma vez que os ovos são colocados exclusivamente sobre a ponteira de brotações novas

e as ninfas se desenvolvem em folhas imaturas (CATLING, 1970). No Brasil, Yamamoto; Paiva e Gravena (2001) demonstraram que há uma variação significativa na dinâmica populacional de *D. citri* em pomares na região norte do Estado de São Paulo, uma vez que a densidade mais alta ocorre no final da primavera e começo do verão, enquanto que durante o outono e inverno a população foi reduzida. Essa oscilação provavelmente está relacionada ao regime de chuvas, a preferência do pelo inseto pelo clima seco e quente, e conseqüentemente ao surgimento de novas brotações no pomar de citros (REGMI; LAMA, 1988). Em regiões com estações secas e úmidas, o pico dos psilídeos é alto depois das primeiras brotações nas estações chuvosas seguida de tempo seco (CATLING, 1970).

O psilídeo asiático *D. citri* é mais sensível às chuvas e umidades relativa do que as temperaturas extremas. (AUBERT, 1987). Chuvas mensais em consideradas em excesso, acima de 150 mm, são geralmente associadas com baixa população de *D. citri* devido aos ovos e ninfas jovens serem lavadas da superfície das plantas (AUBERT, 1987).

2.1.4 Controle

O controle do HLB é difícil, entretanto, algumas medidas podem auxiliar no manejo da doença: a inspeção constante do pomar; o uso de mudas sadias; o controle dos vetores por meio de monitoramento e aplicação de inseticidas; erradicação de plantas contaminadas e de plantas de murta (hospedeiro alternativo de psilídeos e do patógeno). A poda de galhos afetados não é eficaz para o controle da doença pois não recupera a planta e nem reduz a fonte de contaminação.

A principal estratégia e a mais empregada pelos citricultores para diminuição da contaminação em laranjeiras e disseminação da doença na propriedade ou talhão é o controle químico dos vetores. Mesmo, com relatos da presença de *D. citri* no Brasil, desde a década de 40, até o ano de 2004 este inseto não apresentava-se como praga importante da cultura, ocorrendo endemicamente nos pomares, incluindo São Paulo (GALLO; MONTENEGRO, 1960) e seu controle era realizado somente em alguns locais onde a infestação era alta e resultava em danos diretos (NAKANO et al., 1999).

Atualmente, com a comprovação de seu papel como vetor, psilídeos tem sido responsáveis por intensas aplicações de inseticida nos pomares de citros. O controle é realizado geralmente com inseticidas sistêmicos e de contato. Os sistêmicos são mais eficazes no controle

de *D. citri* em virtude do fato do psilídeo se alimentar de seiva. Entre estes os indicados especificamente para psilídeos são os monocrotophos, organofosforados e piretróides, os quais são aplicados diretamente no tronco, no solo e via “drench.. Na Ásia, uma ampla faixa de inseticidas, principalmente, os organofosforados e piretróides são muito utilizados como spray para matar ovos e ninfas de *D. citri* sobre as brotações.

Os inseticidas de contato recomendados são neonicotinóides (tiametoxan, imidacloprido, acetamiprido, tiacloprido), organofosforados (Acefato, dimetoato, etiona, malationa, clorpirifós, metidationa), piretróides (deltametrina, lambdacialotrin, fenpropatrina, esfenvalerato, gama-cialotrina) e carbamatos (carbosulfano, indoxacarbe) (YAMAMOTO, 2006).

O controle biológico com parasitóides é realizado em outros países por meio da vespa ectoparasitóide *Tamarixia radiata* (Waterston) (Hymenoptera: Eulophidae) (AUBERT, 1987). No Brasil a ocorrência natural deste inimigo natural foi relatada em 2004, no entanto existe ainda produção suficiente deste inseto que viabilize o controle biológico aplicado.

2.1.5 Tecnologia do filme de partículas

O emprego do pó mineral no controle de insetos é utilizado há décadas, existem relatos do seu uso desde a era primitiva, onde homens e animais se banhavam com pós para repelir insetos hematófagos de seu próprio corpo (EBLING, 1971), atualmente ainda é observado este comportamento entre os pássaros, que tomam “banho de pós”, com a mesma finalidade.

Os minerais têm sido testados e utilizados na agricultura para o controle de pragas há muito tempo. Sua eficácia está relacionada à abrasividade de suas partículas sobre as pragas, na qual provoca o rompimento da cutícula do inseto, promovendo sua dessecação (ALEXANDER et al., 1944), ou até mesmo, a obstrução do seu sistema digestivo.(EBELING, 1961)

Os estudos realizados por Alexander et al.,(1944) e Ebeling (1961) e a busca por substitutos aos inseticidas sintéticos no controle de pragas, deram suporte para o início dos estudos com tecnologia do filme de partículas, no controle de insetos em diferentes culturas.

Esta tecnologia é baseada em diferentes teorias, como a interrupção do reconhecimento da planta hospedeira pelo inseto mascarando a pelas suas propriedades refletivas de luz, pela alteração da atratividade e repelência das plantas em função da mudança de cor. (KRING, 1962; KRING, 1964; MOERICK, 1952).

O principal composto da tecnologia é o caulim, constituído de hidróxido de silicato de alumínio ($\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$) quimicamente inerte. É um mineral branco, possui grãos de $2\mu\text{m}$ (GLENN et al., 1999). O produto bruto possui traços dos metais Fe_2O_3 e TiO_2 e de sílica cristalina (SiO_2), na qual são removidos, assim aumentando a luz refletida e evitando problemas com a saúde humana (GLENN et al., 1999).

2.1.6 Desenvolvimento da tecnologia do filme de partículas

Em 1994, deu-se início as pesquisas com uso do caulim hidrofóbico, na qual teve a finalidade de verificar a eficiência do produto na redução dos danos causados nos frutos pela exposição a radiação solar. Experimento realizado por Glenn e Puterka (2005) mostrou que o produto além de reduzir os danos causados aos frutos pela exposição a radiação solar, indicou que o produto também é efetivo por reduzir os danos causados pelos insetos. Por conseqüências aos resultados obtidos no trabalho de Glenn e Puterka (2005), as pesquisas com o caulim hidrofóbico intensificaram-se, dando início ao uso da tecnologia do filme de partículas no controle de pragas agrícolas..

O caulim hidrofóbico (M96-018) foi o primeiro protótipo utilizado, empregado na formulação em pó, por partículas cobertas com silicone, impedindo a sua dispersão em água. Devido a sua falta de aderência o produto passou a ser utilizado associado ao metanol (MEOH).

Após tempo de estudo, o caulim hidrofóbico foi substituído pelo caulim hidrofílico (M97-009), devido ao alto risco do metanol e a sua falta de aderência (PUTERKA et al., 2000), possuindo este as mesmas características, mas sem a cobertura de silicone. Sua utilização na agricultura tornou-se mais viável devido a sua fácil dispersão em água, características econômicas e compatibilidade com outros materiais. Para maior eficiência passou-se a utilizar um espalhante adesivo M03 em conjunto com o caulim, tornando-se conhecido comercialmente em 1999 como Surround® crop protectant (Engelhard Corp., Iselin, New Jersey). Em 2001, foi substituído por Surround® WP corp protectant, o qual tem adicionado em sua fórmula o espalhante adesivo (GLENN; PUTERKA, 2005).

Ambas as formulações são similares no modo de ação e eficácia contra as pragas, no entanto o caulim hidrofílico promove melhor controle de algumas doenças (PUTERKA et al., 2000; GLENN et al., 2002)

2.1.7 Ação sobre a biologia e comportamento do inseto

Os artrópodes utilizam os sentidos de toque, gustação, visão e olfato para reconhecer, a localizar e aceitar as plantas hospedeiras, de onde irá obter seu alimento e fará sua reprodução. Durante o processo de localização e aceitação das plantas hospedeiras os quatro sentidos interagem de tal maneira que estimulam de forma positiva ou negativa o comportamento do inseto na seleção da planta hospedeira (GLENN; PUTERKA, 2005).

Por meio de teste de escolha e sem escolha Glenn e Puterka, 2005, observaram que o principal modo de ação do filme de partículas sobre as diferentes espécies de insetos é a repelência, por plantas cobertas com caulim, resultando na redução da alimentação e oviposição. A repelência é uma tentativa de demonstrar o possível mecanismo de ação do caminho inseto, do caminho até a planta, sendo antes do contato do inseto com a planta cobertas com filme de partículas (repelência), versus depois do contato do inseto com a planta coberta com o filme de partículas, na qual, o termo mais apropriado é deterência (GLENN; PUTERKA, 2005).

Muitas espécies de fitófagos usam a acuidade visual, localizar o hospedeiro. Plantas hospedeiras cobertas com filme de partículas se constituem em uma barreira física contra a praga, tornando-a irreconhecível visualmente ou tatilmente ao inseto (GLENN; PUTERKA, 2005; PUTERKA et al., 2000). Adultos de *Rhagoletis pomonella* (Walsh) e *Cacopsylla pyricola* (Foerster), são atraídos pela coloração da plantas e uma alteração da cor devido ao emprego do filme de partículas reduziu o número de insetos presentes nas plantas (PUTERKA et al., 2000)

Alguns insetos usam a percepção tátil para localização a planta hospedeira, para ovipositar e alimentar. Segundo Saour e Makee (2004), a oviposição de *Bactrocera oleae* (Rossi), foi reduzida, devido ao não reconhecimento da planta hospedeira, pois estes insetos possuem receptores no ovipositor, que são ativos no processo de oviposição

Insetos podem tornar-se cobertos com partículas diante a presença de plantas cobertas com caulim, por consequência reduzindo a alimentação e oviposição na planta hospedeira, devido a redução do movimento e capacidade de fixar-se sobre as mesmas. Segundo os autores Glenn et al., (1999), Glenn e Puterka (2005), esta aderência das partículas ocorre em função da força eletrostática ou pela fricção do inseto sobre a superfície da planta. Cottrel et al., (2002)

demonstram que os pulgões não são capazes de fixarem sobre as folhas cobertas com caulim devido seus tarsos tornarem cobertos com as partículas.

Os insetos *Cacopsylla pyricola* Forster, *Rhagoletis mendax* (Curran) exposto ao caulim também tornaram-se coberto por partículas, na qual interferiu na sua acuidade visual, reduzindo sua alimentação (PUTERKA et al., 2000).

O filme de partículas também pode alterar o gosto e o olfato das plantas hospedeiras (GLENN; PUTERKA, 2005). Outros mecanismos de comportamento são também observados quando as plantas tornam-se cobertas com o filme de partículas tais como: redução da sobrevivência dos adultos ou insetos imaturos quando nascem em folhas coberta com o filme de partículas (KNIGHT et al., 2000; UNRUH et al., 2000; COTTRELL et al., 2002); redução no sucesso do acasalamento de lepidóptera exposta ao filme de partículas (KNIGHT et al., 2000)

2.1.8 Eficácia do filme de partículas no controle de pragas

A tecnologia do filme de partículas tem sido proposta como um novo método para o controle de pragas (GLENN et al.,1999). A densidade populacional de diversas pragas mostra-se reduzida em plantas de várias culturas agrícolas cobertas com filme de partículas (GLENN et al.,1999; UNRUH et al.,2000; PUTERKA et al., 2000), e os mecanismos responsáveis por esta redução são vários. Os mais observados são:

Redução da oviposição: *Ceratitis capitata* (Wiedemann), em frutos de nectarina (*Prunus persica* var. nucipersica (L.) Batsch), maçã e caqui (*Diospyros kaki* L.) (MAZOR; EREZ, 2004), *Rhagoletis pomonella* (Walsh), *Choristoneura rosaceana* (Harris) e *Cydia pomonella* (L.) em maçãs (KNIGHT et al., 2000, UNRUH et al., 2000,), *Rhagoletis mendax* (Curran) em frutos de mirtilo (*Vaccinium myrtillus* L.) (LEMOYNE et al., 2008), *Homalodisca coagulata* (Say) em videira (*Vitis* sp.) (PUTERKA et al., 2003), *Cacopsylla pyricola* (Foerster) e *Cacopsylla pyri* (L.) em plantas de pêra (*Pirus communis* L.) (GLENN et al., 1999, PUTERKA et al., 2000, 2005, PASQUALINI et al., 2002, DANIEL et al., 2005), *Anthonomus grandis grandis* Boheman em plantas de algodão (*Gossypium* sp.) (SHOWLER, 2002), *Trips tabaci* (Lind) em plantas de cebola (*Allium cepa* Lineu) (LARENTZAKI et al. 2008).

Repelindo os adultos e diminuindo a densidade populacional: *Bactrocera oleae* (Gmelin) em oliveira (*Olea europaea* L.) (SAOUR; MAKEE, 2004), *Rhagoletis mendax* (Curran)

em plantas de mirtilo (LEMOYNE et al., 2008), *Typhlocyba pomaria* (McAtee), *Myzus persicae* (Sulzer), *Aphis spiraecola* Patch, *Aphis pomi* (De Geer) e *Dysaphis plantaginea* (Passerini), *Choristoneura rosaceana* (Harris) e *Cydia pomonella* (L.) em plantas de maçãs (GLENN et al., 1999, KNIGHT et al., 2000, UNRUH et al., 2000, KNIGHT et al., 2001, WYSS; DANIEL, 2004, BARKER et al., 2007, MARKÓ et al., 2006), *Cacopsylla pyricola* (Foerster) (GLENN et al., 1999, PUTERKA et al., 2000), *Agonoscena targionii* (Lichtenstein) em plantas de pistacho (*Pistácia vera* L.), *Acyrtosiphon pisum* (Harris) em plantas de ervilha (*Pisum sativum* L.) (EIGENBRODE et al., 2006), *Melanocalis caryefoliae* (Davis) em plantas de noqueira (*Juglans regia* Linné) (COTTRELL et al., 2002)

Redução da alimentação: *Cacopsylla pyricola* (Foerster) em plantas de pêra (GLENN et al., 1999, PUTERKA et al., 2000), *Homalodisca coagulata* (Say) em videira (PUTERKA et al., 2003), *Anthonomus grandis grandis* Boheman em plantas de algodão (SHOWLER, 2002), *Trips tabaci* (Lind) em plantas de cebola (LARENTZAKI et al. 2008).

A efetividade do filme de partículas é frequentemente específico para as espécies e muito deve ser estudado para cada praga em seu próprio ambiente, pois efeitos indesejáveis no controle de pragas tem sido relatados (GLENN; PUTERKA, 2005).

Foi observado por Bostanian e Racette (2008) que múltiplas aplicações do filme de partículas cobrindo os pomares de maçãs aumentaram a densidade populacional de *Phyllonorycter elmaella* (Doganhar e Mutuura) *Dysaphis plantaginea* Passerini sobre as plantas e de *Quadraspidiotus perniciosus* (Comstock) sobre os frutos. Os danos causados nos frutos por *C. pomonella* e o retorcimentos dos galhos de plantas causados por *Archips argyrspillus* (Walker) também foram aumentados na presença do filme de partículas.

O filme de partículas também proporcionou o aumento da densidade populacional de outras pragas tais como *Aphis gossypii* (Glover) em algodão e *Phyllonorycter blancardella* (Fabricius), *Lyonetia clerkella* (Linnaeus) e *Phytomyza heringiana* (Hendel) em macieiras. Em alguns casos é relatado que a densidade populacional de algumas pragas é aumentada devido à redução dos inimigos naturais. O nível da infestação de *Erosoma lanigerum* (Hausmann) foi severo e mais alto do que o nível econômico, devido a redução de inimigos naturais, como *Forticula auricularia* (Linnaeus) e *Allothrombium fuliginosum* (Hermann) Os insetos *D. plantaginea*; *Phyllonorycter elmaella* (Doganlar e Mutuura) também tiveram a densidade populacional alta devido à baixa taxa de parasitismo e predadores (KNIGHT et al., 2001).

As partículas de pós são conhecidas por interromper a ação dos inimigos naturais.. Mas seu efeito sobre o balanço biológico pode variar entre as pragas seus predadores e parasitóides. A “Environmental Protection Agency in América” considerou o caulim como um produto não prejudicial aos organismos não alvo e ao meio ambiente, e estudos indicaram não haver efeito adverso do filme de partículas sobre as aranhas, abelhas ou organismos aquáticos (EPA, 1999).

Além do potencial no controle de pragas, o filme de partículas de caulim podem contribuir para o equilíbrio fisiológico da planta, pois suas propriedades refletivas reduzem o estresse de calor e aumentam a fotossíntese devido a uma redução de temperatura da planta, proporcionando um aumento no tamanho e rendimento dos frutos (GLENN et al., 1999; THOMAS et al.,2004, GLENN; PUTERKA, 2005; LAPOINTE et al.,2006)) e ainda, protege os frutos de queimaduras solares (GLENN et al., 2003).

2.2 Material e métodos

Os estudos foram conduzidos nas dependências do Laboratório de Insetos Vetores do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba.

2.2.1 Obtenção e manutenção de *Diaphorina citri* Kuwayama

Os adultos de *D. citri* utilizados neste trabalho foram provenientes de criação mantida no Laboratório de Insetos Vetores (ESALQ/USP), em sala climatizada ($26 \pm 1^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\%$ UR, e fotofase de 14 h).

A criação foi estabelecida com a captura de aproximadamente 300 indivíduos adultos de *D. citri* em cerca-viva de murta [*Murraya paniculata* (L.) Jack] no Campus da ESALQ, utilizando-se um aspirador bucal. Para oviposição, os insetos coletados foram introduzidos em gaiola constituída por uma estrutura de cantoneiras de alumínio (33 x 33 cm na base e 50 cm de altura), com revestimento de tela antiafídica e porta de acrílico transparente, contendo mudas de murta com brotações novas (Figura 1A). Após 7 dias de oviposição, os adultos de *D. citri* insetos foram transferidos com auxílio de um aspirador bucal para uma outra caixa de postura, contendo novas plantas de murta. Após o desenvolvimento ninfal e emergência dos adultos (cerca de 2-3

semanas), parte dos indivíduos obtidos (em torno de 10%) foi utilizada para oviposição e continuidade do sistema de criação, enquanto que o restante foi utilizado para o desenvolvimento desta pesquisa.

2.2.2 Produto utilizado e seu modo de aplicação sobre as plantas.

Uma formulação com 95% de caulim, denominada Surround WP Crop Protectant (Engelhard Corp., Iselin, NJ 08830, USA) (Figura 2A), foi utilizada para a obtenção do filme de partículas sobre plantas cítricas nos experimentos. Para pulverização, este produto foi diluído em água a 5%. A sua aplicação foi feita até o ponto de escorrimento com um pulverizador manual de 5 L da marca Bruden, com bico tipo cônico de alto volume, de modo a cobrir integralmente as plantas com o filme de partículas brancas (Figura 1E). Para tratamentos com mais de uma camada do produto, esperou-se a secagem da primeira pulverização por um período de 1-2 h, antes de realizar uma outra aplicação.

As plantas usadas nos experimentos foram ‘seedlings’ de laranja-doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck], variedade Caipira, com ≈ 20 cm de altura., produzidos em tubetes com substrato de casca de *Pinus*, fertilizados periodicamente e mantidos continuamente em telado livre de psilídeos.

2.2.3 Determinação do número de aplicações de caulim sobre mudas cítricas para estudos de preferência

Realizou-se um teste preliminar para definir o número necessário de aplicações do caulim sobre as mudas cítricas de modo a obter um filme de partículas uniforme e efetivo sobre o comportamento do psilídeo *D. citri*. Por meio de um experimento de livre escolha, avaliou-se a preferência dos psilídeos por mudas cítricas que receberam uma, duas e três aplicações do caulim, em relação a plantas não tratadas (controle). Após a secagem do produto, os tubetes contendo as plantas foram inseridos em garrafas de vidro de 500 ml, contendo água em seu interior. O experimento foi conduzido em sala climatizada ($26 \pm 1^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\%$ UR e fotofase de 14 h)..

Para o teste de escolha, utilizaram-se gaiolas de criação (item 2.2.1) contendo uma planta de cada tratamento (n = 4). O teste teve início com a liberação de 45 psilídeos adultos com idade de 3-5 dias, dentro de cada gaiola, no final da tarde (17:00-18:00 h). Durante 96 h, nos horários de 8:00, 13:00 e 18:00 horas, registrou-se o número de insetos pousados sobre as plantas de cada tratamento.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com esquema fatorial de 12 gaiolas (repetições), tendo como fatores o número de aplicações de caulim e o tempo após a aplicação. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias do número de insetos encontradas nos diferentes tratamentos comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). As transformações dos dados foram efetuadas de acordo com as exigências da análise de variância.

2.2.4 Efeito do filme de partículas de caulim sobre a preferência de *D. citri*

Com a finalidade de verificar o possível efeito de filme de partículas à base de caulim sobre a preferência de *D. citri* por plantas cítricas, foram realizados testes de livre-escolha e sem chance escolha (confinamento)

Os experimentos foram desenvolvidos nas mesmas condições climáticas (sala climatizada) e com delineamento semelhante ao do item 2.2.3, porém com apenas dois tratamentos: seedlings de laranja ‘Caipira’ tratados com três pulverizações de caulim e seedlings não tratados (controle). Para o teste de escolha foram estabelecidas gaiolas com quatro plantas cítricas, sendo duas delas tratadas com o caulim e as outras duas não tratadas (controle), enquanto que no teste sem escolha foram oferecidas quatro plantas cítricas de um único tratamento (tratadas ou não tratadas) por parcela (gaiola). Após a liberação de 45 psilídeos adultos (machos e fêmeas) de *D. citri* dentro das gaiolas, avaliou-se o número de indivíduos pousados sobre as plantas de cada tratamento, nos mesmos intervalos de tempo descritos anteriormente (item 2.2.3). No teste de confinamento, avaliou-se também o número de indivíduos mortos ou dispersos (pousados sobre as paredes da gaiola), bem como a preferência de *D. citri* por diferentes partes (haste e faces abaxial e adaxial da folha) de plantas cobertas e não cobertas com o filme de partículas.

Um segundo experimento de livre escolha foi realizado para avaliar como machos e fêmeas se comportam diante plantas cítricas cobertas com o filme de partículas. Neste

experimento, apenas machos ou fêmeas foram introduzidos em cada gaiola contendo as plantas tratadas e não tratadas. Nos períodos sucessivos após a liberação, avaliou-se o número de insetos sobre plantas de cada tratamento, bem como a distribuição dos sexos sobre diferentes partes (haste e faces abaxial e adaxial da folha) de plantas tratadas e não tratadas.

O delineamento experimental, condições ambientais da sala climatizada e as análises estatísticas dos testes de livre escolha e de confinamento foram semelhantes ao descrito no item 2.2.3, sendo que os fatores estudados foram: tratamento com caulim (aplicação ou não de caulim) e tempo após a liberação. No caso do segundo de experimento de livre escolha, em que machos e fêmeas foram testados independentemente, a análise envolveu também os fatores sexo e posição dos insetos na planta.

2.2.5 Preferência de *D. citri* por plantas com níveis variáveis de cobertura com filme de partículas

Adultos de *D. citri* possuem uma preferência por pousar em brotos, e sua população é alta no período de brotação das plantas (XU et al., 1998). Assim, a emissão de novas brotações em mudas cítricas tratadas é um aspecto que pode anular o efeito do filme de partículas. Para investigar este efeito, realizou-se um teste de escolha para avaliar a preferência de *D. citri* entre plantas dos seguintes tratamentos: a) inteiramente cobertas com o filme de partículas de caulim; b) parcialmente cobertas (com brotos novos desprotegidos) (Figura 1B); e c) totalmente descobertas (controle; plantas não tratadas). Para obtenção de brotos desprotegidos, as plantas foram inteiramente cobertas com três aplicações de caulim e posteriormente mantidas no laboratório até a emissão dos brotos.

No teste de livre escolha, utilizou-se uma planta de cada tratamento por gaiola, totalizando três plantas. O teste foi iniciado com a liberação de 45 adultos de *D. citri* com idade de 3-5 dias, dentro de cada gaiola, no final da tarde (17:00 h). As avaliações foram feitas diariamente às 8:00, 13:00 e 18:00 horas, durante 48 h, registrando-se o número de insetos pousados sobre a planta de cada tratamento. Para a planta contendo o broto desprotegido, avaliou também o número de insetos presentes na parte da planta coberta com caulim e no broto descoberto.

As condições de laboratório (sala climatizada), delineamento experimental e as análises estatísticas dos dados seguiram os procedimentos descritos no item 2.2.3. Os fatores estudados foram o nível de cobertura das plantas com caulim e o tempo após a liberação dos insetos no teste.

2.2.6 Determinação do número de aplicações de caulim sobre mudas cítricas para estudos de oviposição

A fim de determinar o número necessário de aplicações do caulim sobre as mudas cítricas para um menor índice de oviposição por *D. citri*, realizou-se um teste de livre-escolha entre plantas tratadas com uma, duas e três aplicações de caulim a 5%, e plantas não tratadas (controle) ‘Seedlings’ de laranja ‘Caipira’ produzidos em tubetes foram podados e mantidos em estufa, até a emissão de novos brotos. As plantas com brotações selecionadas para o experimento continham folíolos ainda fechados, que são preferidos para a oviposição por *D. citri* (Huang et al. 1999). Após as aplicações de caulim e secagem do produto, as plantas foram introduzidas em número de quatro (uma de cada tratamento) e

O teste foi realizado em condições de laboratório de $26 \pm 1^\circ\text{C}$, 70% UR, e fotofase de 14 h. Após a aplicação de caulim e secagem do produto, quatro plantas (uma de cada tratamento) foram introduzidas em postes plásticos transparentes do tipo “baleiro”, contendo duas aberturas retangulares cobertas com tecido vaporoso (voile), para circulação de ar (Figura 1C). As bases dos tubetes foram mantidas no interior de um pote plástico contendo água. O teste foi iniciado com a introdução de quinze casais de *D. citri*, com 3-5 dias de idade, em cada baleiro. Após 7 dias de confinamento, os insetos foram removidos e imediatamente realizou-se a contagem do número de ovos e ninfas de psilídeos presentes sobre as plantas de cada tratamento, por meio do microscópio estereoscópico. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 23 potes (repetições).

2.2.7 Teste de preferência para oviposição de *D. citri* em mudas cítricas tratadas e não tratadas com caulim.

Uma alteração na textura e coloração da superfície de brotações cítricas pode inibir a oviposição por *D. citri*. Com a finalidade de examinar o efeito do filme de partículas sobre a preferência de *D. citri* para oviposição, realizaram-se testes com e sem chance de escolha entre mudas cítricas tratadas e não tratadas com caulim, em condições de laboratório ($26 \pm 1^\circ\text{C}$, 70% UR, e fotofase de 14 h). O número de aplicações de caulim utilizado neste experimento foi o que mostrou menor número de ovos colocados pelas fêmeas de *D. citri* no experimento anterior (item 2.2.6).

A forma de condução deste estudo, em potes do tipo “baleiro” contendo quatro plantas em tubetes (Figura 1C), onde foram introduzidos 15 casais jovens de *D. citri*, foi semelhante à descrita em 2.2.6. Para o teste sem chance de escolha foram introduzidas quatro plantas tratadas ou não tratadas por pote (parcela), enquanto que para o teste de livre-escolha, foram inseridas duas plantas tratadas e duas não tratadas no interior de cada pote. No teste sem chance de escolha, além de avaliar o número de ovos e ninfas presentes nas plantas de cada tratamento, registrou-se o número de adultos mortos após o período de confinamento de 7 dias, em cada parcela.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 14 repetições, ou seja, 14 potes com plantas tratadas e não tratadas no teste de livre escolha, e 14 potes para cada um dos tratamentos do teste sem chance de escolha.

2.2.8 Efeito da aplicação de caulim diretamente sobre ovos e ninfas de *D. citri*

Neste estudo, avaliou-se a viabilidade das fases de ovo e ninfal de *D. citri*, após duas aplicações de caulim a 5% sobre os seguintes estádios de desenvolvimento: a) ovos com 1 dia de idade; b) ninfas de ínstars iniciais (1^o.-3^o. ínstar); e c) ninfas de ínstars finais (4^o.-5^o. ínstar). Os testes foram realizados em sala climatizada temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$, 70% UR, e fotofase de 14 h.

Para a obtenção de ovos e ninfas deste inseto com idade uniforme, aproximadamente 80 ‘seedlings’ de laranja ‘Caipira’ com brotações jovens (folhas ainda em formação) foram dispostos sobre suportes de metal no interior de uma gaiola de postura (Figura 1F), onde foram introduzidos aproximadamente 200 indivíduos. Os ‘seedlings’ foram diariamente analisados

quanto à presença de ovos sob microscópio estereoscópio, sendo que aqueles que aqueles que apresentavam cerca de 15-25 ovos do dia foram separados para os experimentos, em uma gaiola distintas. O tratamento com caulim foi realizado após os insetos de um mesmo lote de idade terem atingido o estágio de desenvolvimento desejado; metade das plantas não foi tratada, para servirem como controle.

Após a aplicação de caulim, as plantas de cada tratamento (tratadas e não tratadas) foram mantidas em gaiolas distintas, na sala climatizada. As avaliações foram realizadas a cada dois dias, contando-se o número de ovos e ninfas presentes em cada planta, sob estereoscópio. Quando as ninfas atingiram o 5º instar, as plantas de cada tratamento foram individualizadas em gaiolas confeccionadas com garrafa pet de 2 L, contendo aberturas cobertas com voile, e mantidas nesta condição até a emergência de adultos, que foram contados. Baseando-se nos números de ninfas e adultos obtidos em cada planta, calcularam-se as taxas de viabilidade para os períodos embrionário e ninfal, respectivamente.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 20 plantas tratadas com caulim e 8 não tratadas na fase de ovo; 21 plantas tratadas e 21 não tratadas na fase de instares iniciais; e 15 plantas tratadas e 15 não tratadas na fase de instares finais. Os dados de porcentagem de viabilidade e de número médio de ninfas e adultos obtidos foram submetidos a análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Os dados foram transformados pela função $\arcsin \sqrt{P/100}$, no caso de viabilidade e pela função $(x + 8)$, no caso de número médio de ninfas e adultos.

2.2.9 Teste de aquisição de *Candidatus Liberibacter asiaticus* por *D. citri* em folhas com filme de partículas

A ocorrência de aquisição da bactéria limitada ao floema, *Ca. L. asiaticus*, pelo vetor *D. citri*, seria uma evidência indireta da alimentação deste inseto no floema de plantas cítricas. Com a finalidade de investigar o efeito do filme de partículas sobre a alimentação do psilídeo, realizou-se um teste de aquisição desta bactéria em plantas-fonte tratadas ou não com o produto.

Três plantas-fonte de laranja doce infectadas pela bactéria *Ca. L. asiaticus* foram utilizadas neste experimento. Folhas jovens já expandidas de cinco ramos das diferentes plantas-fonte foram cobertas com duas aplicações de caulim (Surround®WP) a 5%, sendo que uma outra

folha do mesmo ramo não foi coberta com o produto. Gaiolinhas de polietileno transparente, com dimensões de 5x4 cm de base e 2 cm de altura (Figura 1G), foram utilizadas para o confinamento de 30 adultos sadios de *D. citri* sobre cada folha selecionada, por um período de acesso aquisição (PAA) de 78 h. Após o PAA, os grupos de indivíduos confinados sobre cada folha foram transferidos para seedlings de laranja ‘Caipira’ sadios, sobre os quais permaneceram confinados em gaiolinhas por um período de latência de 27 dias. Um grupo de insetos da mesma colônia foi transferido diretamente da criação para os seedlings de laranja sadios, sem passagem pela planta-fonte, para constituir um controle negativo. Os insetos que permaneceram vivos durante todo o período de latência foram submetidos à extração de DNA e teste de “polymerase chain reaction” (PCR) com oligonucleotídeos específicos para detecção de *Ca. L. asiaticus*, visando determinar se adquiriram a bactéria nas plantas-fonte.

Extração de DNA dos psilídeos. O protocolo de extração de DNA de insetos foi baseado no trabalho de Deng et al. (2006). Cada amostra, constituída de três psilídeos, foi macerada em tudo de 200 µl, em 100 µl de STE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 25mM NaCl), com auxílio de uma ponteira. Após a trituração, foi adicionado 15 µl de proteinase K na concentração de 200 µg/ml; a seguir as amostras foram agitadas vigorosamente em *vortex* por 10 s e incubadas por 30 min a 56°C. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm por 1min; retirou-se 55µl da fase superior das amostras, transferindo para um novo tubo de 500 µl. Para purificação do DNA, foi realizada uma etapa adicional com reagentes do Kit Wizard Promega®. Adicionou-se 100 µl de Nuclei Lysis Solution e as amostras foram agitadas vigorosamente em *vortex* e incubadas por 5 min a 80°C. Após serem resfriadas em temperatura ambiente, adicionou-se 60 µl de Protein Precipitation Solution, as amostras foram agitadas em *vortex* e em seguida incubadas em gelo por 5 min. A seguir as amostras foram centrifugadas a 13.000 x g por 3 min, transferindo-se a fase superior das amostras para um novo tubo (≈140µl) e adicionando-se 200µl de isopropanol, misturando-as por inversão. As amostras foram mantidas por 10min em ultrafreezer (-80°C) ou por 2-24 h em freezer (-20°C). Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 5 min a 14.000 x g, o sobrenadante foi descartado, e adicionou-se 150 µl de etanol 70%. As amostras foram agitadas no *vortex* e centrifugadas por 5min a 14.000 x g; o sobrenadante foi descartado e o tubo incubado a 50°C por ≈ 20 min para secar. Adicionou-se 50µl de 1/10 TE + Rnase e as amostras foram incubadas por 30 min a 37°C, e finalmente armazenadas em geladeira (4-8°C) até a realização da Polymerase Chain Reaction (PCR).

PCR. Para a detecção de *Ca. L. asiaticus* em *D. citri* realizou-se um teste duplo de PCR (*nested*-PCR), com oligonucleotídeos ('primers') desenvolvidos e gentilmente cedidos por Helvécio Della Coletta-Filho, do Centro APTA Citros 'Sylvio Moreira' (comunicação pessoal) Os oligonucleotídeos utilizados na primeira PCR foram Omp 1-F e Omp 1-R que resultam em um fragmento de 884 pares de base (pb). Para segunda reação, utilizaram-se os oligonucleotídeos Omp 2-F e Omp 2-R, que amplificam um fragmento de 411 pb.

Utilizou-se a seguinte mistura de reagentes para a amplificação do DNA: tampão 1X para PCR (Invitrogen™ - Life Technologies), 1,5 mM de MgCl₂, 64μM de dNTPmix, 25 ng/μl de cada oligonucleotídeo, 1 unidade de *Taq* DNA-polimerase e 3μl de DNA da amostra para um volume final da reação de 25μl. A amplificação foi realizada em um termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc., Watertown, MA 02172, EUA) programado para a primeira PCR com as seguintes condições: um ciclo inicial a 94°C por 3 min; 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 20 s, anelamento a 62°C por 45 s e extensão a 72°C por 45 s; com ciclo final de extensão a 72°C por 10 min, estabilizando a 4°C por tempo indeterminado. Para segunda reação, 2μl do produto foi diluído 50X e utilizado 2 μl como DNA-molde com igual mistura de reagentes da primeira PCR para um volume final de 25 μl. A amplificação foi realizada nas seguintes condições: um ciclo inicial a 94°C por 3 min; 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 20 s, anelamento a 65°C por 45 s e extensão a 72°C por 45 s; com ciclo final de extensão a 72°C por 10 min, estabilizando a 4°C por tempo indeterminado.

Após a amplificação, adicionou-se cerca de 1μl de corante (0,25% azul de bromofenol, 40% de sacarose) por amostra e visualizou-se o produto da reação de PCR através da eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE 1X (89 mM Tris; 89mM Ácido Bórico e 2 mM EDTA; pH 8,0), corado com 0,5 μg/ml de brometo de etídio. Os fragmentos amplificados foram visualizados sob luz UV e documentados em um fotodocumentador *Eagle Eye II* (Stratagene, La Jolla, CA 92037, EUA).

Em todos os testes de PCR foram utilizados dois controles positivos, DNA de planta infectada e DNA de insetos infectivos e dois controles negativos, água e DNA de insetos sadios.

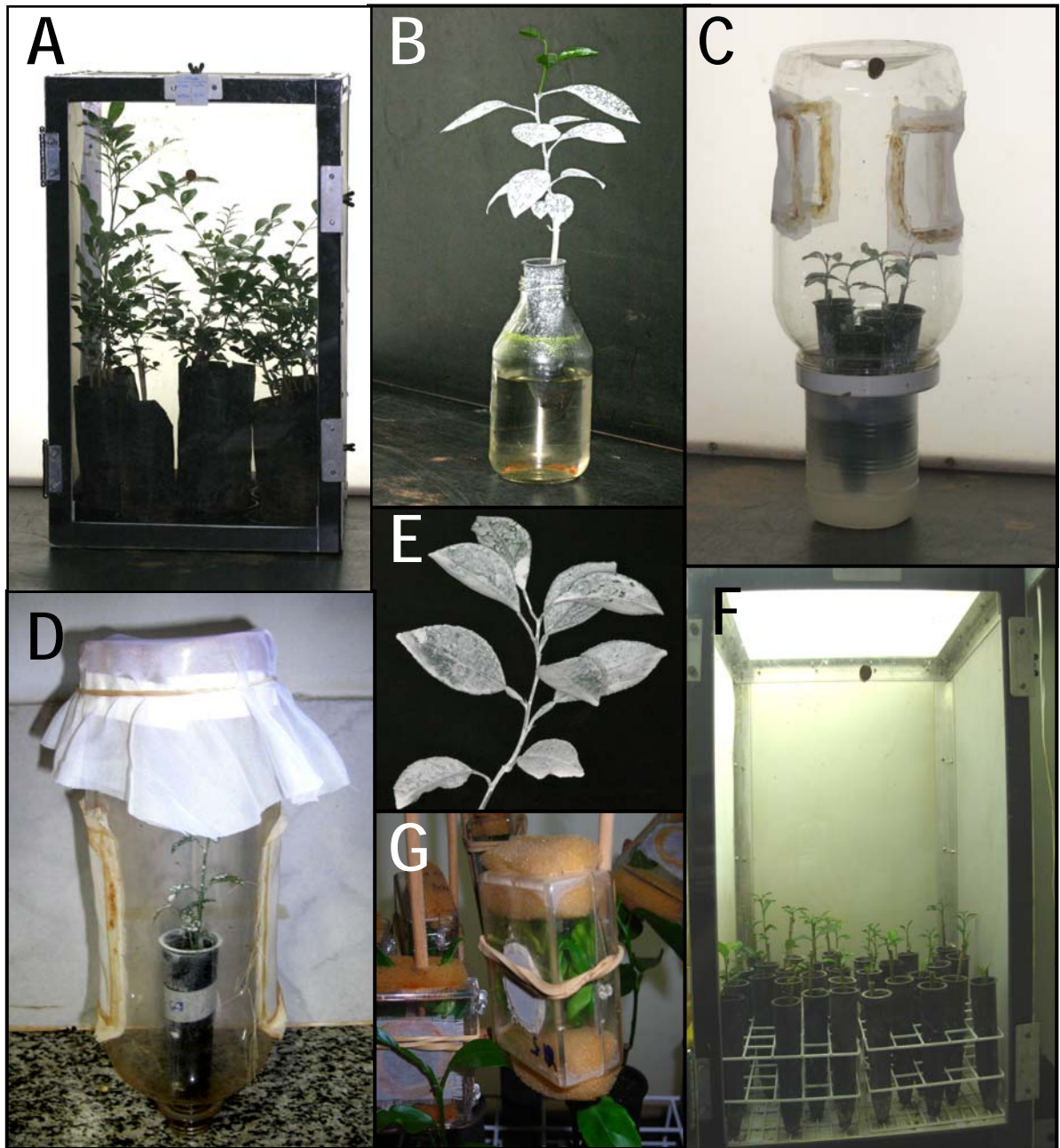


Figura – 1 Sistemas de confinamento e plantas utilizadas nos estudos com *Diaphorina citri* neste trabalho. A: gaiola de postura; B: planta tratada com caulim (Surround®WP) a 5%, contendo broto desprotegido; C: pote tipo “baleiro” utilizado para testes de oviposição; D: garrafa Pet, utilizada para emergência de adultos; E: planta cítrica integralmente coberta com caulim. F: Gaiola contendo ‘seedlings’ com brotações novas, para obtenção de ovos. G: gaiolinhas para confinamento de psíldeos sobre folhas no teste de aquisição de bactéria..

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Determinação do número de aplicações de caulim sobre mudas cítricas para estudos de preferência por *Diaphorina citri* Kuwayama

A preferência de *D. citri* por plantas cítricas tratadas com filme de partículas de caulim foi reduzida conforme o aumento no número de aplicações ($F=1.131,49$; $P<0001$; $g.l.=3$) (Figura 2). As médias obtidas para cada tratamento, considerando todo o período de avaliação, foram $24,8\pm 0,9$ (plantas sem aplicação), $5,8\pm 0,5$ (uma aplicação), $2,9\pm 0,5$ (duas aplicações) e $1,1\pm 0,2$ (três aplicações). Observou-se redução de 95,6% no número médio de insetos em plantas com três aplicações do caulim, comparando-se com o controle sem aplicação, e de 81,0% em relação ao tratamento com apenas uma aplicação.

O tratamento com duas aplicações não diferiu estatisticamente dos tratamentos com uma e três aplicações. Hipoteticamente, um maior número de repetições poderia evidenciar uma diferença entre os tratamentos com uma e duas aplicações, o que suportaria a escolha de duas aplicações como o procedimento mais adequado para estudos com este produto. Entretanto, o tratamento com três aplicações proporcionou uma cobertura mais uniforme sobre as plantas, quando comparada com os demais tratamentos. Segundo Glenn et al., (1999), uma completa e uniforme cobertura de caulim sobre a superfície das plantas é essencial para maior efetividade no controle do inseto. Portanto, considerou-se o número de três aplicações de caulim mais adequado para a execução dos testes de preferência de *D. citri* por plantas tratadas e não tratadas. É possível que um maior número de aplicações proporcionasse uma cobertura ainda mais uniforme das plantas; porém, considerou-se que mais de três aplicações poderia inviabilizar economicamente esta tecnologia.

A interação tratamento x tempo após a liberação dos psilídeos no experimento não foi significativa ($F=0,68$; $P=0.9144$; $g.l.=33$). Observou-se uma constância no número médio de insetos em plantas dos diferentes tratamentos durante o período de 96 h de avaliações (Figura 3).

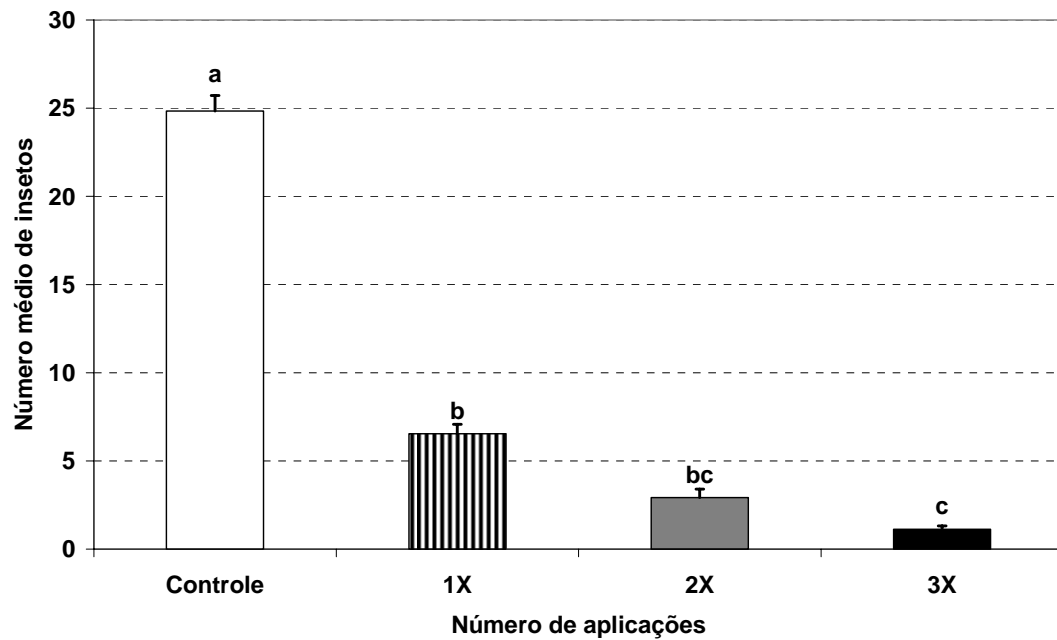


Figura 2 - Número médio de adultos de *Diaphorina citri* por planta durante 96 h em teste de livre escolha entre plantas cítricas com uma (1X), duas (2X) e três (3X) aplicações de caulim (Surround®WP) a 5%, e sem aplicação (controle). Médias com letras distintas diferem pelo teste de Tukey ($P < 0.05$). Barras sobre as colunas representam o erro padrão da média

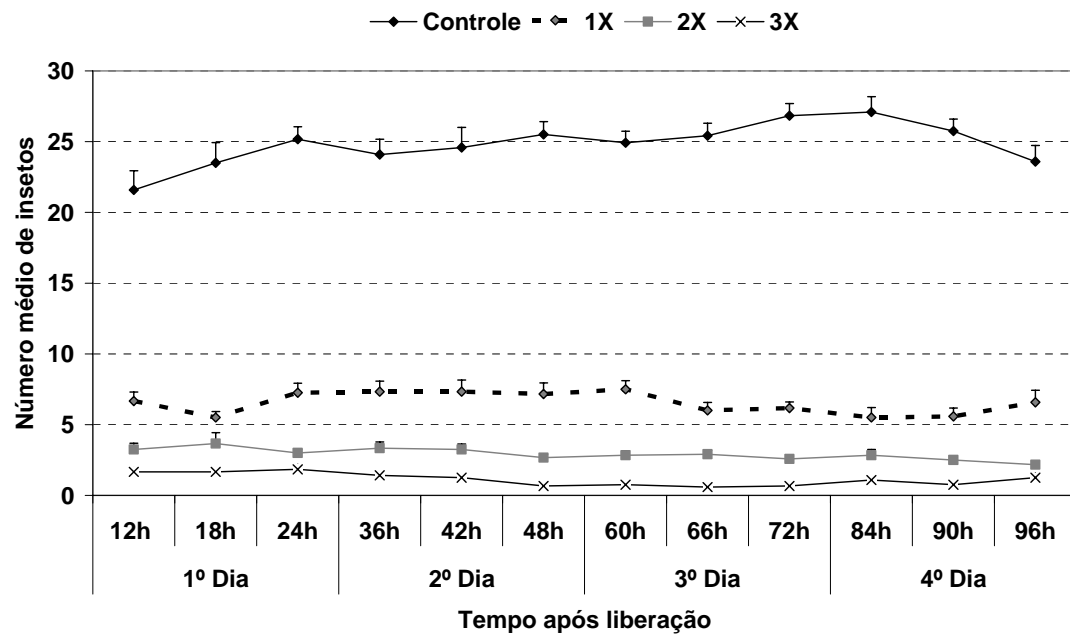


Figura 3 - Número médio de adultos de *Diaphorina citri* por planta, em períodos sucessivos de tempo após a liberação, em teste de livre escolha entre plantas cítricas com uma (1X), duas (2X) e três (3X) aplicações de caulim (Surround®WP) a 5%, e sem aplicação (controle). Barras sobre os pontos representam o erro padrão da média

2.3.2 Efeito do filme de partículas de caulim sobre a preferência de *D. citri*.

Com base nos resultados do item 2.3.1, testou-se a preferência e o comportamento dos adultos de *D. citri* para pouso sobre plantas cobertas com filme de partículas após três aplicações de caulim e plantas não cobertas (controle), em testes com e sem possibilidade de escolha.

Teste de livre escolha. Diante da possibilidade de escolha, adultos de *D. citri* mostraram uma nítida preferência pelas plantas não cobertas com caulim (controle) ($F=5.895,83$; $P<0.0001$; g.l.=1) (Figura 4). Houve uma redução de 93% no número médio de indivíduos observados sobre plantas com filme de partículas ($2,4\pm 0,3$) em relação ao número sobre plantas não tratadas ($34\pm 0,5$). Verificou-se que o número médio de psilídeos sobre plantas dos dois tratamentos foi relativamente constante após 18 h da liberação dos insetos nas gaiolas, não havendo interação significativa entre tratamento e tempo ($F=0.54$; $P=0,87$; g.l.=11) (Figura 5).

Teste sem chance de escolha. Os testes realizados em regime de confinamento mostraram que, na ausência de escolha, um número relativamente alto de adultos de *D. citri* pousa sobre a plantas tratadas com caulim ($20,8\pm 0,6$), embora significativamente inferior ao observado sobre plantas não tratadas (controle) ($37,0\pm 0,6$) ($F=596,66$; $P<0.0001$; g.l.=1) (Figura 6). Outro efeito interessante é o aumento significativo do número de insetos dispersos ($F=186,53$; $P<0.0001$; g.l.=1) e mortos ($F=143,23$; $P<0.0001$; g.l.=1) quando confinados em gaiolas contendo apenas plantas cobertas com caulim, em relação a gaiolas com plantas não tratadas (Figura 6). Isto evidencia a inadequação da planta tratada para a alimentação e sobrevivência do inseto. Para este teste de confinamento, também não houve significância da interação tratamento x tempo ($F=0,43$; $P=0,94$; g.l.=11) (Figura 7).

Quanto à localização dos psilídeos sobre as plantas cítricas nos testes sem escolha, observou-se que o número de insetos localizados em ambas as faces das folhas foi significativamente maior em plantas não tratadas, porém as médias igualaram-se estatisticamente para os insetos presentes nas hastes (Tabela 1). Analisando-se a preferência de partes da planta por *D. citri*, o número de insetos foi significativamente mais alto na face abaxial das folhas tanto de plantas cobertas como de não cobertas com caulim, diferindo estatisticamente das outras partes (Tabela 1). Os resultados deste experimento diferiram dos encontrados por Cottrell et al

(2002) para o afídeo *Melanocallis caryaefoliae* (Davis), que se localizou predominantemente na face abaxial das folhas em plantas não tratadas, enquanto que em plantas cobertas com caulim foi mais freqüente na face adaxial. Segundo estes autores, a alteração na posição do afídeo em folhas de plantas tratadas foi devido à aderência de partículas de caulim ao corpo dos insetos, o que impediu a sua fixação no local preferencial (face abaxial das folhas).

Esta análise comparativa da distribuição de *D. citri* em plantas cítricas teve por objetivo verificar se o filme de partículas mostra-se eficiente quando aplicado nas diferentes partes da planta. Os resultados do teste sem escolha indicam que embora haja uma redução no número de psilídeos na face abaxial de folhas de plantas tratadas, esta continua sendo um local preferido para esses insetos, conforme já demonstrado em um estudo anterior.(MEAD,2002). A face abaxial foi a que apresentou cobertura menos uniforme de partículas de caulim, seguida pela haste, o que pode explicar os resultados obtidos no presente estudo.

O menor número de adultos de *D. citri* sobre plantas cobertas com caulim, tanto em testes de escolha como de confinamento, pode ser atribuído ao não reconhecimento ou não aceitação das plantas cítricas pelos psilídeos. Segundo Glenn et al., (1999), o filme de partículas possui propriedades reflectivas que podem alterar a percepção da planta hospedeira pelos artrópodes. Com resultados semelhantes ao do presente estudo, Hall et al. (2007) observou que o psilídeo *D. citri* foi repellido de plantas cítricas cobertas com caulim (Surround®WP) a 3%, em condições de campo, devido à alteração na coloração das plantas (Hall et al., 2007)

Segundo KE (1991) os psilídeos asiáticos são atraídos pela coloração amarela de armadilhas adesivas e verde-amarelada de plantas cítricas. Investigando um método de monitorar os adultos de *D. citri*, Hall et al., (2007) observou que armadilhas amarelas capturam mais psilídeos que as azuis, indicando que esta espécie é atraída pela cor amarela. O psilídeo-da-pereira, *Cacopsylla pyricola* (Förster), também é atraído por plantas com coloração verde-amarelada. Segundo Puterka et al., (2005), a alteração na coloração da superfície das plantas devido à aplicação do caulim repeliu os adultos de *C. pyricola* em pereira.

A ocorrência de números significativos e a baixa mortalidade de *D. citri* sobre plantas cítricas cobertas com caulim nos testes sem escolha (Figura 9), deve-se provavelmente à cobertura não uniforme do filme de partículas. Resultados semelhantes foram obtidos por Larentzaki et al (2007), que observaram alimentação por adultos de *Thrips tabaci* Linderman (Thysanoptera: Thripidae) em áreas foliares de plantas de cebola com pouco depósito de caulim;

tais autores sugeriram que uma cobertura uniforme do filme de partículas na planta é essencial para reduzir o dano causado pela alimentação de tripes.

Em experimento sem chance de escolha Puterka e Rienke (2003), demonstraram que adultos da cigarrinha *Homalodisca coagulata* (Say) (Hemiptera: Cicadellidae) são fortemente repelidos de plantas cítricas cobertas com filme de partículas, não sendo observados indivíduos sobre as plantas tratadas com caulim. Estes autores relataram 0% de sobrevivência das cigarrinhas confinadas sobre as plantas cobertas com caulim em relação a 18% de sobrevivência sobre plantas não tratadas, após 4 dias de observações. A menor sobrevivência em plantas tratadas foi atribuída ao fato de os indivíduos de *H. coagulata* não pousarem sobre as mesmas, o que os conduziu à morte, devido à falta de alimentação.

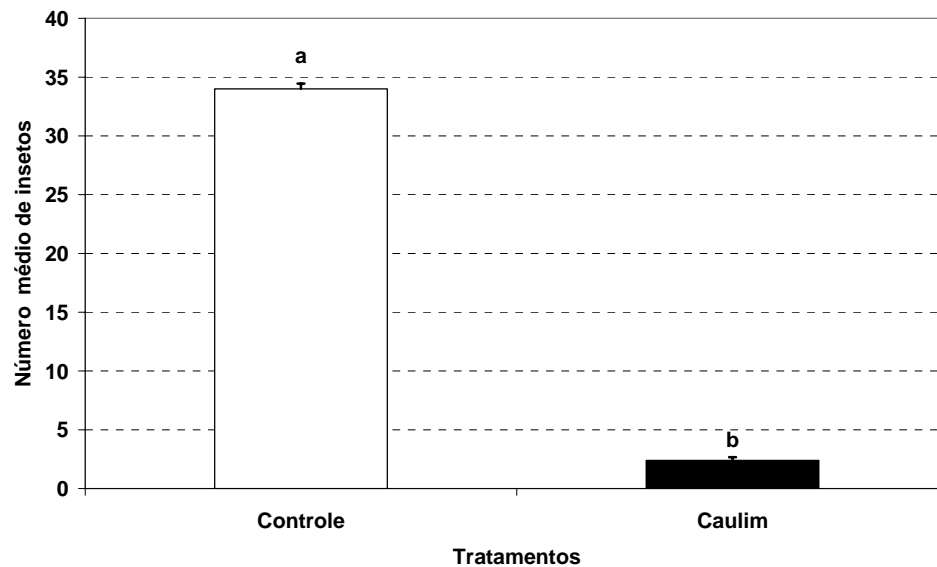


Figura 4 - Número médio de adultos de *Diaphorina citri* pousados sobre plantas cítricas cobertas com três aplicações de caulim (Surround®WP) a 5%, ou não cobertas (controle), durante 96 h em teste de livre escolha. Médias com letras distintas diferem estatisticamente ($P < 0.05$). Barras sobre as colunas representam o erro padrão da média

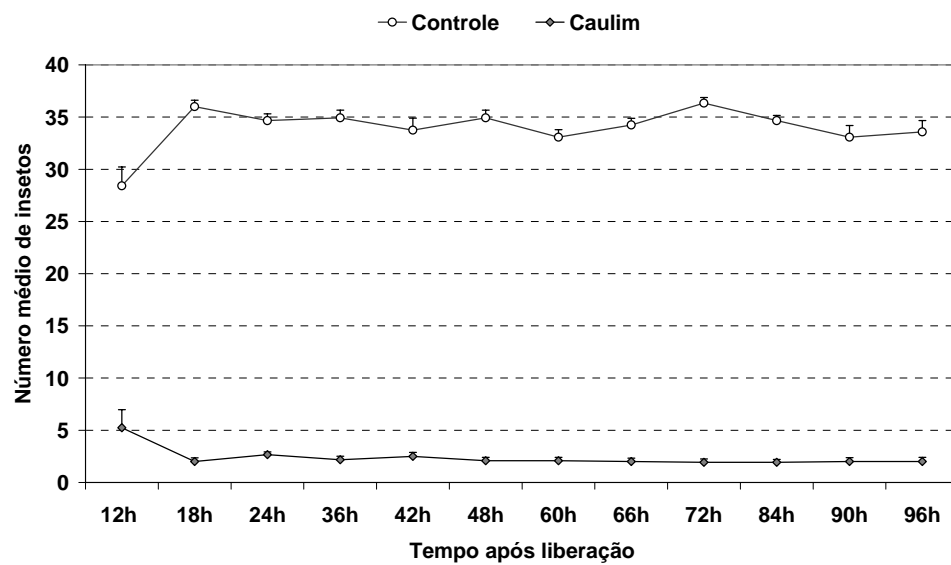


Figura 5 - Número médio de adultos de *Diaphorina citri* pousados sobre plantas cítricas cobertas com três aplicações de caulim (Surround®WP) a 5%, ou não cobertas (controle), em períodos sucessivos após a liberação, em teste de livre escolha. Barras sobre os pontos representam o erro padrão da média

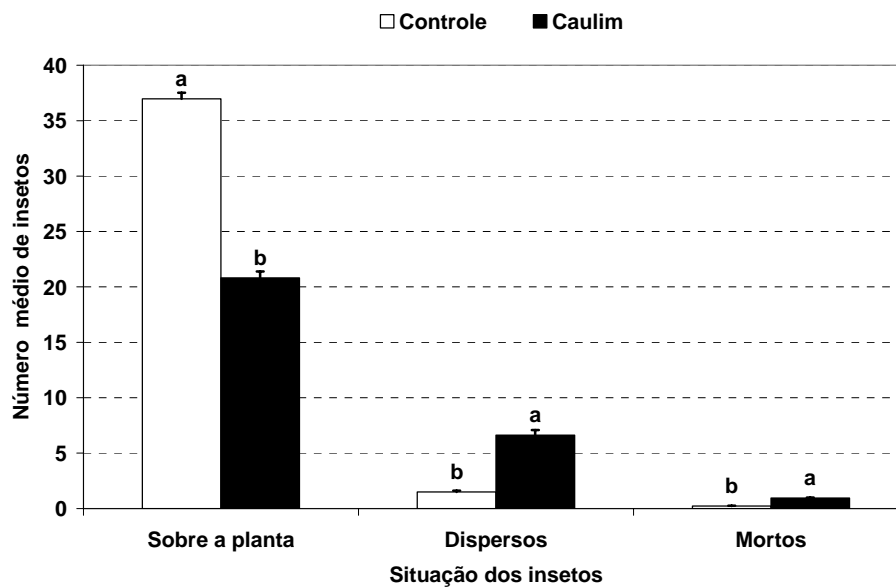


Figura 6 - Número médio de adultos de *Diaphorina citri* situados sobre as plantas, dispersos nas paredes e mortos no interior de gaiolas, durante 96 h em teste sem chance de escolha entre plantas cítricas tratadas com três aplicações de caulim (Surround®WP) a 5%, e não tratadas (controle). Médias com letras distintas, para uma mesma situação dos insetos, diferem estatisticamente ($P < 0.05$). Barras sobre as colunas representam o erro padrão da média

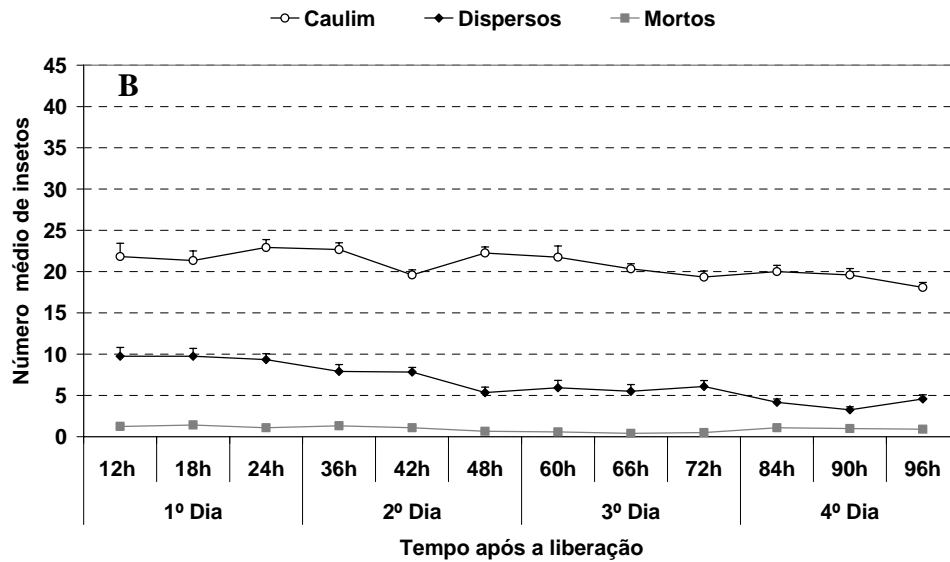
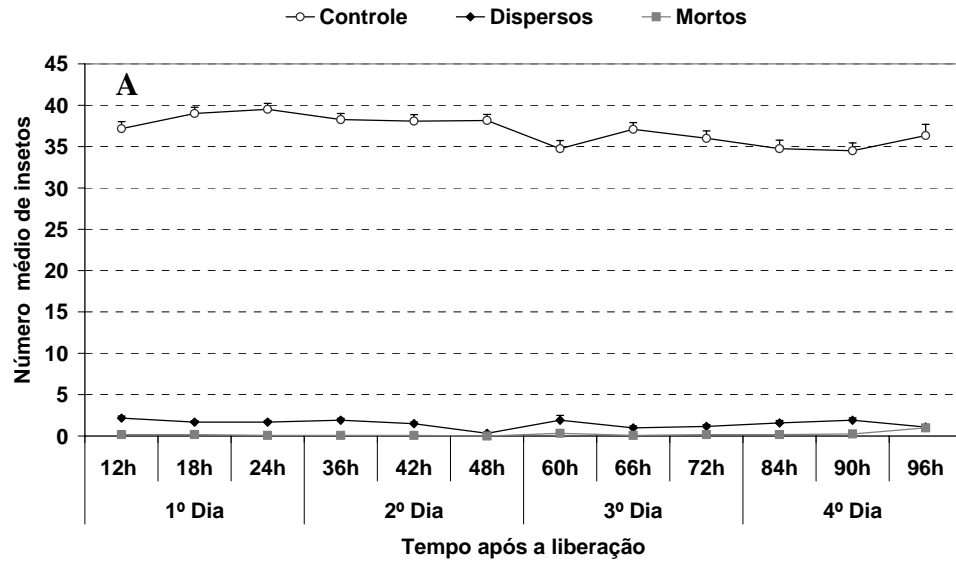


Figura 7 - Número médio de adultos de *Diaphorina citri* pousados sobre as plantas, dispersos nas paredes e mortos no interior das gaiolas, em períodos sucessivos após a liberação, no teste sem chance de escolha entre (A) plantas cítricas não tratadas (Controle) e (B) plantas tratadas com três aplicações de caulim (Surround®WP) a 5%. Barras sobre os pontos representam o erro padrão da média

Tabela 1- Número médio de adultos *Diaphorina citri* observados na haste e nas faces adaxial e abaxial das folhas de plantas cítricas cobertas com três aplicações de caulim (Surround® WP) a 5% e não cobertas (controle), no teste sem chance de escolha

Tratamento	Distribuição dos insetos nas plantas		
	Face adaxial	Face abaxial	Haste
Controle	8,4 ± 0,2 bA *	24,4 ± 0,5 aA	4,4 ± 0,3 bA
Caulim	4,9 ± 0,3 bB	11,0 ± 0,5 aB	4,6 ± 0,2 bA

*Médias (±EPM) seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (P<0,05). Letras minúsculas comparam médias na linha e maiúsculas, na coluna.

Embora tenham sido observados adultos de *D. citri* sobre plantas cítricas tratadas com caulim no presente estudo, principalmente no teste sem chance de escolha, o número médio de indivíduos foi drasticamente reduzido em relação ao verificado em plantas não tratadas. Estes resultados sugerem que os psílídeos sejam repelidos diante de plantas hospedeiras cobertas com filme de partículas, o que explicaria a maior dispersão e mortalidade dos mesmos no teste de confinamento. Uma cobertura uniforme de filme de partículas é essencial para uma maior

eficiência no controle deste inseto vetor, visando-se reduzir a disseminação do Huanglongbing em citros. Os efeitos do caulim sobre *D. citri* observados neste estudo justificam a realização de testes com este produto em condições de campo. Devido à eliminação do filme de partículas das plantas com precipitação pluviométrica, esta técnica teria maior potencial de sucesso na época de estiagem (junho a setembro no Estado de São Paulo), quando inseticidas sistêmicos aplicados via solo ou tronco geralmente não são efetivos.

2.3.3 Efeito do filme de partículas sobre a preferência de machos e fêmeas de *D. citri* por mudas cítricas

A cobertura pelo filme de partículas à base de caulim reduziu drasticamente o número de machos e fêmeas presentes sobre as plantas, durante o teste de livre escolha. Tanto as fêmeas ($F=1.547,65$; $P<0.0001$; g.l.=1) como os machos ($F=2.501,01$; $P<0.0001$; g.l.=1) preferiram a planta não coberta com caulim (Figura 8). Para machos e fêmeas houve uma redução de 79,7 e 78,7%, respectivamente, no número médio de indivíduos pousados sobre plantas cobertas com o produto em relação a plantas não cobertas

Não houve efeito significativo do tempo após a liberação sobre a preferência de fêmeas ($F=1.02$; $P=0.43$; g.l.=11) e machos ($F=1.09$; $P=0.37$; g.l.=11) pelas plantas dos diferentes tratamentos. Também não houve interação do tratamento x tempo para fêmeas ($F=0.83$; $P=0.60$; g.l.=11) e machos ($F=1.81$; $P=0.06$; g.l.=11) (Figura 9 e 10).

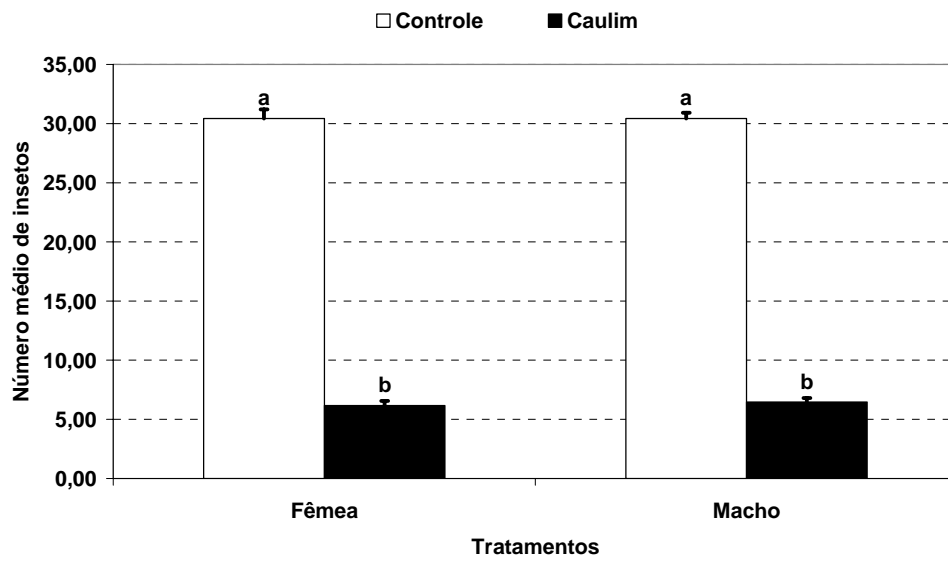


Figura 8 – Número médio de fêmeas e machos de *Diaphorina citri* pousados sobre plantas cítricas não tratadas (controle) ou tratadas com três aplicações de caulim (Surround ®WP) a 5%, durante 96 h de teste de livre escolha. Colunas com letras distintas, para um mesmo sexo, diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P < 0.05$). Barras sobre as colunas representam o erro padrão da média

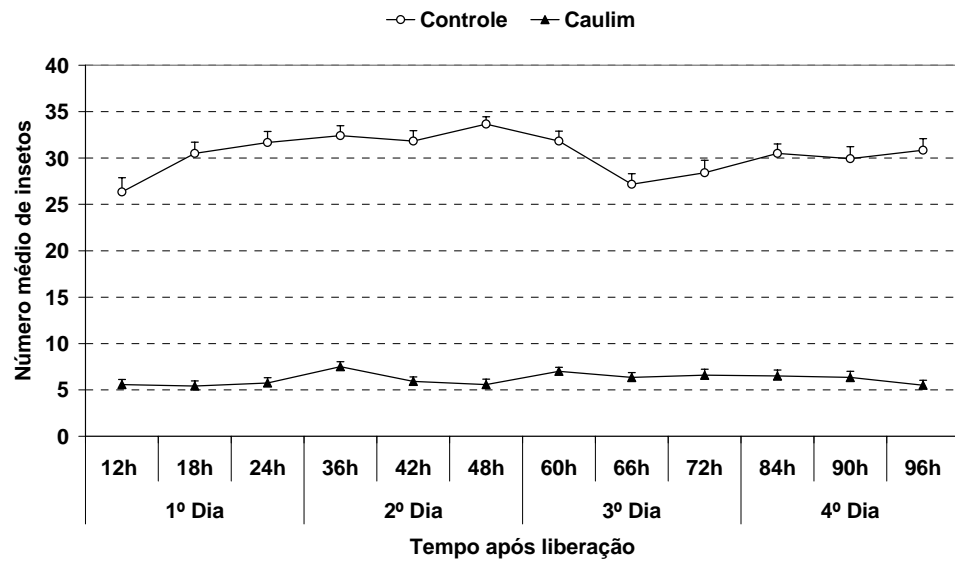


Figura 9 – Número médio de fêmeas de *Diaphorina citri* pousadas sobre plantas cítricas não tratadas (controle) ou tratadas com três aplicações de caulim (Surround ®WP) a 5%, em períodos sucessivos de tempo após a liberação em teste de livre escolha Barras sobre os pontos representam o erro padrão da média

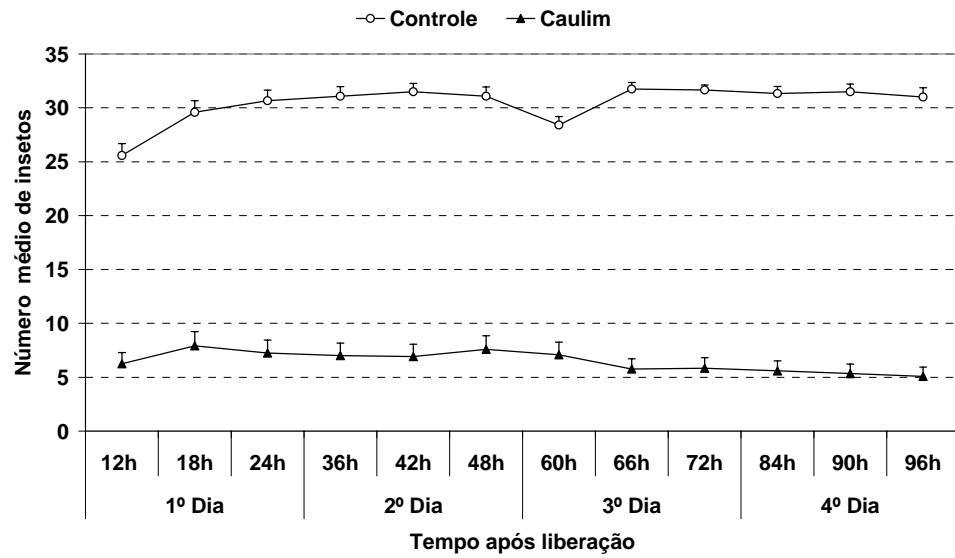


Figura 10 – Número médio de machos de *Diaphorina citri* pousadas sobre plantas cítricas não tratadas (controle) ou tratadas com três aplicações de caulim (Surround ®WP) a 5%, em períodos sucessivos de tempo após a liberação em teste de livre escolha Barras sobre os pontos representam o erro padrão da média

Tabela 2 - Número médio de machos e fêmeas de *Diaphorina citri* observados na haste e nas faces adaxial, abaxial das folhas de plantas cítricas cobertas com três aplicações de caulim (Surround® WP) a 5% e não cobertas (controle), em teste de livre escolha

Parte da planta	Fêmea		Macho	
	Controle	Caulim	Controle	Caulim
Face adaxial	5,0 ± 0,3 bA*	0,9 ± 0,0 bB	6,1 ± 0,2 bA	1,2 ± 0,1 bB
Face abaxial	24,2 ± 0,6 aA	4,0 ± 0,3 aB	22,2 ± 0,5 aA	4,2 ± 0,2 aB
Haste	1,4 ± 0,1 bA	1,4 ± 0,1 bA	1,7 ± 0,2 cA	0,9 ± 0,1 cA

* Médias (±EPM) seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0.05). Letras minúsculas comparam médias na coluna, enquanto que as maiúsculas comparam as médias na linha, para um mesmo sexo.

Quanto à distribuição dos psilídeos (machos e fêmeas) sobre as plantas, pode-se observar que, quando comparados os tratamentos (controle e caulim), o número de insetos localizados em ambas as faces das folhas foi significativamente maior em plantas não tratadas (F=148.19; P<0.0001; g.l.=1); porém, não houve diferença no número de insetos presentes nas hastes de ambos tratamentos (Tabela 2). Pode-se observar que não houve efeito significativo da interação tratamento x sexo (F=0.00; P=0.97; g.l.=1).

Comparando-se as partes da planta, verificou-se um maior número de fêmeas e machos na face abaxial das folhas em relação aos outros locais, independentemente do tratamento (controle e caulim) (F=69; P<0.0001; g.l.=2) (Tabela 2). Para os machos, o número de indivíduos na face adaxial da folha foi superior ao observado na haste, enquanto que para fêmeas não houve diferença estatística entre estas duas partes. Não se observou diferença significativa entre os machos e fêmeas quanto à localização na planta (F=0.64; P=0.53; g.l.=2).

Pode-se observar neste experimento que tanto as fêmeas como os machos foram repelidos das plantas cobertas com caulim. Na literatura, não há relatos sobre diferenças no comportamento de machos e fêmeas diante de plantas com filme de partículas. Mas sabe-se que as fêmeas de *D. citri* reduzem a oviposição sobre plantas de *Murraya paniculata* (L.) Jack tratadas com este produto (HALL et al., 2007).

2.3.4 Preferência de *D. citri* por plantas com níveis variáveis de cobertura com filme de partículas

No teste de livre escolha entre plantas cítricas com níveis diferentes de cobertura com o filme de partículas de caulim, observou-se que os adultos de *D. citri* preferem plantas não tratadas, seguidas de plantas com brotos desprotegidos (Figura 11). O número médio de psilídeos foi significativamente reduzido em plantas inteiramente cobertas com caulim ($3,6 \pm 0,41$) em relação a plantas não tratadas ($19,1 \pm 0,79$) ou parcialmente cobertas com o filme de caulim [$7,4 \pm 0,61$] ($F=157,38$; $P<0.0001$; g.l.=2). Não houve efeito significativo do tempo após a liberação dos insetos sobre o número médio de psilídeos observados sobre plantas cítricas integralmente cobertas com caulim ($F=0,31$; $P=0,91$; g.l.=5), plantas parcialmente cobertas ($F=0,54$; $P=0,75$; g.l.=5), e plantas não tratadas ($F=2,26$; $P=0,053$; g.l.=5) (Figura 12). Também não houve interação significativa entre tempo e esses tratamentos ($F=0,90$; $P=0,48$; g.l.=5).

Analisando-se a distribuição dos psilídeos na planta parcialmente tratada com caulim, observou-se um número muito maior número de indivíduos pousados sobre os brotos (parte desprotegida) do que na parte da planta coberta com o produto ($F=94,3$; $P<0.0001$; g.l.) (Figura 13).

A efetividade de plantas tratadas com caulim contendo brotos desprotegidos foi reduzida significativamente em relação a plantas integralmente cobertas com este produto. Nas plantas com cobertura parcial houve concentração dos insetos sobre as brotações desprotegidas (Figura 13), mostrando que essas brotações são atrativas aos psilídeos mesmo estando em uma planta tratada com o produto. Ainda assim, o número médio de psilídeos nas plantas com apenas os brotos desprotegidos foi 61,3% inferior ao de plantas não tratadas (Figura 11), indicando que há um efeito repelente do caulim mesmo em plantas parcialmente cobertas.

Resultados semelhantes foram obtidos por Daniel et al.,(2005) em pereira, que observaram menor eficiência de caulim no controle dos psilídeos *Cacopsylla bidens* (Sulc) e *Cacopsylla pyri* (L.) quando as plantas emitiram brotações após aplicação deste produto. Segundo Hall et al., (2007), estudos realizados em pomares de laranja mostrara uma redução de 60% na número de adultos de *D. citri* observados em brotações cítricas cobertas com caulim (Surround®WP) a 3%, quando comparado com brotações não cobertas. Os valores acumulativos observados pelos autores foram de 476 psilídeos em brotos tratados (caulim) comparado com 1.176 em brotos não tratados (controle).

Com base nos resultados obtidos no presente experimento e no trabalho desenvolvido por Hall et al., (2007), pode-se deduzir que uma cobertura integral de brotações cítricas com o filme de partículas é importante para um controle mais efetivo de *D. citri*. Como a flutuação populacional de psilídeos está correlacionada com a emissão e qualidade de brotações (CATLING, 1970), novas aplicações deveriam ser realizadas após a emissão de brotos novos em pomares cítricos, para reduzir efetivamente a população de *D. citri* e, conseqüentemente, diminuir a disseminação da doença Huanglongbing.

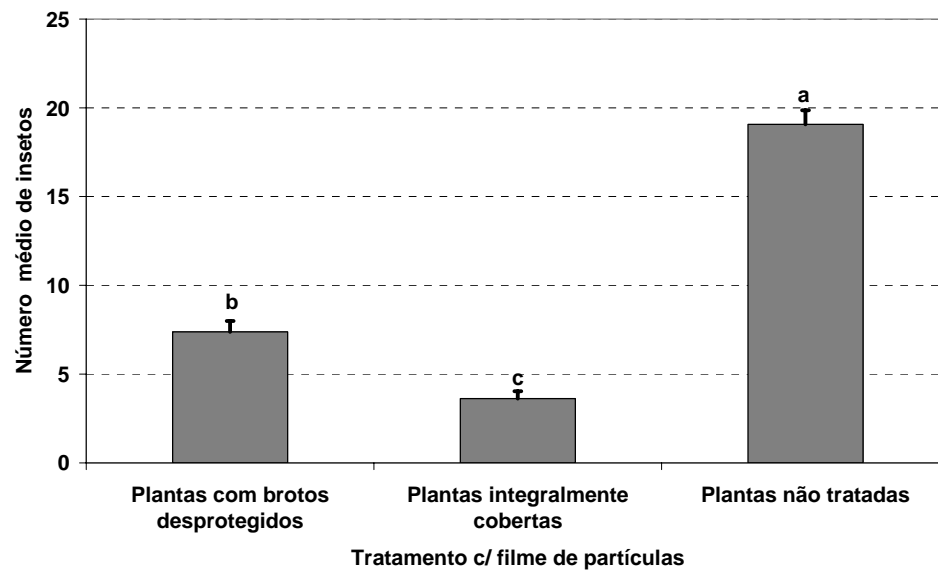


Figura 11 - Número médio de adultos de *Diaphorina citri* sobre plantas cítricas inteiramente cobertas com três aplicações de caulim (Surround ®WP) a 5%, plantas parcialmente cobertas (brotos desprotegidos) e plantas não tratadas (controle), durante 48 h do teste de livre escolha. Colunas com letras distintas diferem pelo teste de Tukey ($P < 0.05$). Barras sobre as colunas representam o erro padrão da média

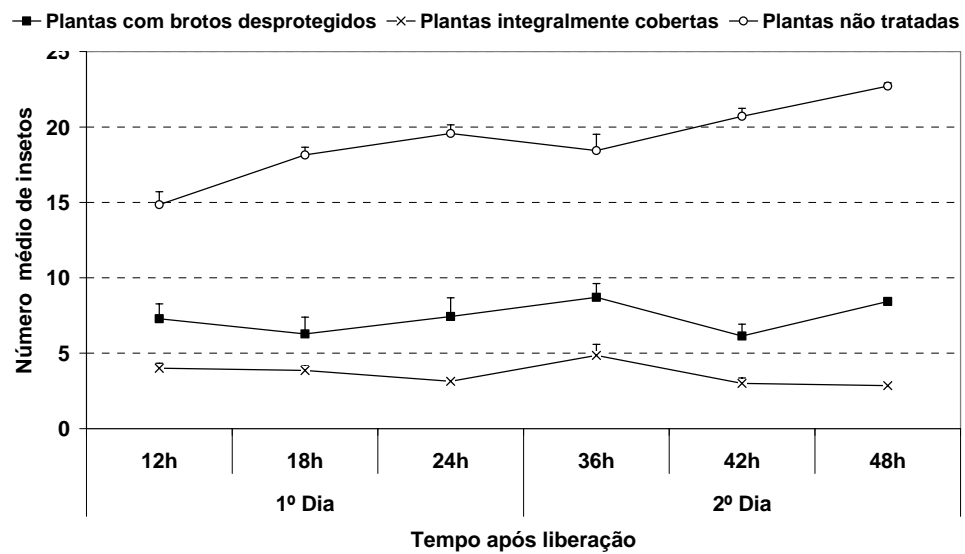


Figura 12 - Número médio de adultos de *Diaphorina citri* sobre plantas cítricas inteiramente cobertas com três aplicações de caulim (Surround ®WP) a 5%, plantas parcialmente cobertas (brotos desprotegidos) e plantas não tratadas (controle), em períodos sucessivos de tempo após a liberação no teste de livre escolha. Barras sobre as colunas representam o erro padrão da média

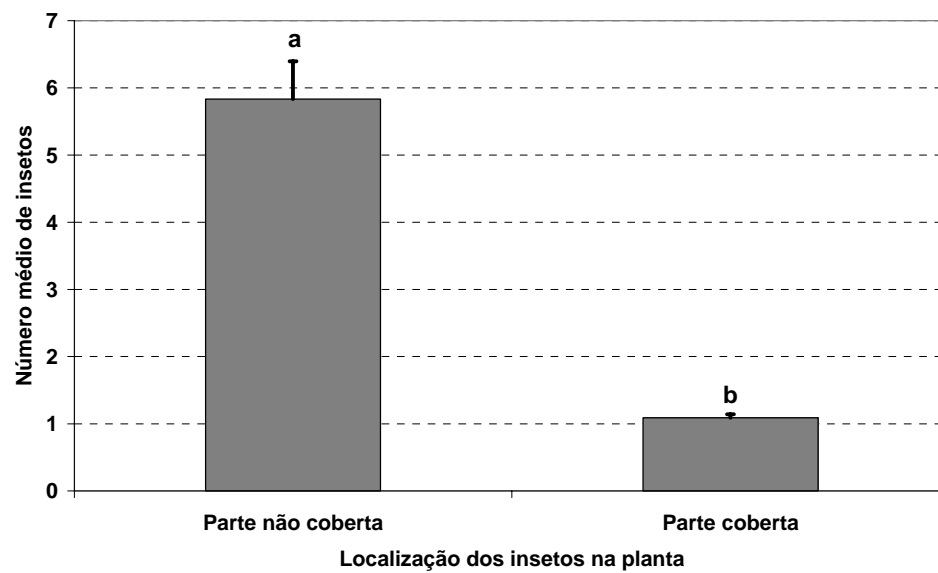


Figura 13 - Número médio de adultos de *Diaphorina citri* observados na parte coberta e não coberta (brotos) com filme de partículas, em plantas cítricas que foram parcialmente tratadas com caulim (Surround®WP) a 5%, no teste de livre escolha. Colunas com letras distintas diferem pelo teste de Tukey ($P < 0.05$). Barras sobre as colunas representam o erro padrão da média

2.3.5 Seleção do número de aplicações de caulim para um menor índice de oviposição por *D. citri*

No teste de livre escolha, houve nítida preferência de *D. citri* por ovipositar em plantas cítricas não tratadas com caulim, sendo a oviposição totalmente suprimida em plantas cobertas com duas e três aplicações do produto, e drasticamente reduzida em plantas cobertas com uma aplicação do produto (Tabela 3).

Portanto, considerou-se o número de duas aplicações de caulim como suficiente para inibir a postura pelo psilídeo em estudos a respeito do efeito de filme de partículas sobre a oviposição e desenvolvimento de imaturos deste inseto. Para ‘seedlings’ muito jovens de laranja ‘Caipira’, como os que foram usados neste estudo preliminar, observou-se fitotoxicidade em 35% das plantas que foram submetidas a três aplicações de caulim, possivelmente devido ao acúmulo de partículas sobre os folíolos ainda fechados, o que dificultou o desenvolvimento da planta. A fitoxidez foi observada somente nas folhas pequenas de ‘seedlings’ cítricos em desenvolvimento, as quais são ideais para a oviposição de *D. citri*. Portanto, optou-se por usar apenas duas aplicações de caulim para os estudos de oviposição, que demandam ‘seedlings’ com brotações muito jovens.

O filme de partículas a base de caulim (Surround®WP) não tem sido fitotóxico quando aplicado na diluição de 3% em plantas de pêra (PASQUALINI; CIVOLANI; GRAPPADELLI, 2002), a 3% em plantas cítricas (HALL et al., 2007), e a 5% em até quatro vezes em plantas de pistache (SAOUR, 2004),

Segundo Daniel et al.,(2005) a quantidade de ovos colocados pelo psilídeo da pêra *C. pyri* em pereira é afetada pelo número de aplicações do caulim. O número de ninfas foi reduzido em 97,7% e 100%, respectivamente, quando foram efetuadas duas e três aplicações do caulim sobre as plantas, devido à redução de ovos colocados pelos insetos. Os resultados obtidos na presente pesquisa são consistentes com os relatados por Daniel et al., (2005); houve redução drástica e supressão na oviposição de *D. citri* com o aumento no número de aplicações de caulim nas plantas cítricas.

Tabela 3 - Número médio de ovos e ninfas de *Diaphorina citri* observados por planta, após 7 dias de exposição de adultos sobre plantas cítricas não tratadas (controle) ou cobertas com uma (1X), duas (2X) e três (3X) aplicações de caulim (Surround®WP) a 5%, em teste de livre escolha

Tratamento	Nº ovos + ninfas	Intervalo de variância
Controle	6,0 ± 1,0	1 - 34
1X	0,3 ± 0,1	2 - 3
2X	0,0 ± 0,0	0 - 0
3X	0,0 ± 0,0	0 - 0

2.3.6 Efeito do filme de partículas na oviposição de *D. citri* em mudas cítricas.

Baseando-se nos resultados obtidos no teste do item 2.3.5, testou-se a preferência de *D. citri* para ovipositar sobre plantas cobertas com filme de partículas após duas aplicações de caulim e plantas não cobertas (controle), em testes com e sem possibilidade de escolha.

Teste de livre escolha. Havendo chance de escolha entre os tratamentos, observou-se que a preferência de *D. citri* por plantas cobertas com caulim foi nula, não ocorrendo oviposição sobre as mesmas, enquanto que o número médio de ovos observados sobre as plantas não cobertas foi $35,4 \pm 3,7$.

Teste sem chance de escolha. Testes realizados em regime de confinamento mostraram que, na ausência de escolha, ocorreu oviposição sobre plantas tratadas com o filme de partículas. Porém, o número médio de ovos e ninfas observado após 7 dias de confinamento dos adultos sobre as plantas tratadas foi 97,7% inferior ao de plantas não tratadas (controle) (Tabela 4),

revelando um forte efeito inibitório do caulim sobre a oviposição de *D. citri*. Verificou-se, também, uma maior mortalidade dos adultos sobre as plantas cobertas com o caulim.

Resultados semelhantes foram obtidos por Hall et al.,(2007), que observou redução no número de ovos colocados pelos adultos de *D. citri* sobre brotações de [*Murraya paniculata* (L.) Jack] cobertas com caulim (Surround®WP) a 3%, quando comparado com brotações não tratadas (controle), em teste de livre escolha. O valor acumulativo de ovos colocados pelos psilídeos foi de 927 em plantas cobertas e 5997 em plantas não cobertas com caulim (HALL et al., 2007), observando-se, portanto, uma redução de 84,5% na oviposição naquele estudo.

A ocorrência de oviposição de *D. citri* em plantas tratadas com caulim no presente teste de confinamento deve-se, possivelmente, à cobertura não uniforme do filme de partículas na superfície vegetal, pois ninfas foram observadas em áreas desprotegidas do produto na folha (Figura 14). Cottrell et al.,(2002) também verificou a presença de ninfas e sobrevivência de adultos sobre plantas tratadas com caulim, atribuindo este fato à aplicação desuniforme do filme de partículas sobre as plantas, o que teria proporcionado aos afídeos uma oportunidade para pousar sobre áreas com menor quantidade do produto.

O número reduzido ou nulo de ovos de *D. citri* observado sobre plantas cítricas tratadas, nos testes de livre escolha e de confinamento, pode ter sido ocasionado por repelência dos adultos desta espécie diante de plantas cobertas com caulim, ou pelo não reconhecimento das mesmas como hospedeiras, como já observado no teste do item 2.3.2. Há outras hipóteses na literatura para explicar a redução da oviposição de insetos em plantas cobertas com caulim. Segundo Hall et al., (2007), a presença do filme de partículas sobre as plantas cítricas inibiu o movimento das fêmeas de *D. citri* sobre a superfície das folhas e afetou a sua habilidade para se fixar sobre a superfície tratada. Puterka et al., (2005) também notaram que a oviposição do psilídeo da pereira foi reduzida devido à inibição dos movimentos e dificuldade para fixação na superfície de folhas cobertas com caulim. O mesmo foi verificado para o psilídeo *C. pyri* (PASQUALINI et al.,2002). Outra explicação plausível para redução do número de ovos é a presença de partículas de caulim presas no corpo dos insetos que caminham sobre plantas tratadas com o produto. Glenn et al., (1999) observaram que a presença de caulim sobre os adultos do psilídeo da pereira, *C. pyricola*, alterou o comportamento dos mesmos, mantendo-os preocupados em retirar as partículas presas em suas asas e pernas, reduzindo assim o número de ovos colocados sobre as plantas.

Outro efeito interessante no presente estudo foi o aumento significativo na mortalidade de adultos de *D. citri* nas plantas cítricas cobertas com o caulim. Isto evidencia a inadequação da planta tratada para a alimentação do inseto. Cottrel et al.,(2002) observou alta mortalidade do afídeo *Melanocallis caryaefoliae* (Davis), depois de 6 dias de confinamento sobre folhas de plantas cobertas com o filme de partículas em relação a plantas não cobertas, reduzindo o número de ninfas produzidas nestas plantas. O aumento da mortalidade dos insetos pode ser ocasionado por uma repelência dos insetos diante de plantas cobertas com o filme de partículas (caulim) ou alteração no seu comportamento alimentar, resultando em não alimentação, como sugerido por Glenn et al.,(1999).

Os resultados deste estudo em laboratório mostram que o filme de partículas à base de caulim (Surround®WP) a 5% afeta a oviposição e sobrevivência de adultos de *D. citri* em brotações cítricas, e talvez possa ser efetivo no controle deste inseto vetor no campo. Seriam necessários outros trabalhos para investigar o efeito do caulim em condições de campo e determinar a viabilidade econômica deste tratamento na produção de laranja. A adaptação da tecnologia do filme de partículas na citricultura poderia oferecer uma alternativa aos inseticidas convencionais para o controle de *D. citri*, especialmente na época da seca, quando produtos sistêmicos não são efetivos.

Tabela 4 - Número médio de ovos e ninfas observados e mortalidade de adultos de *Diaphorina citri* após 7 dias de confinamento sobre plantas cobertas ou não cobertas com duas aplicações de caulim (Surround®WP) a 5%

Tratamento	Nº ovos + ninfas (Intervalo de variação)	Mortalidade de adultos (%)
Controle	56,7 ± 5,6 (0 – 175)	17%
Caulim	1,3 ± 0,4 (0 – 10)	83%

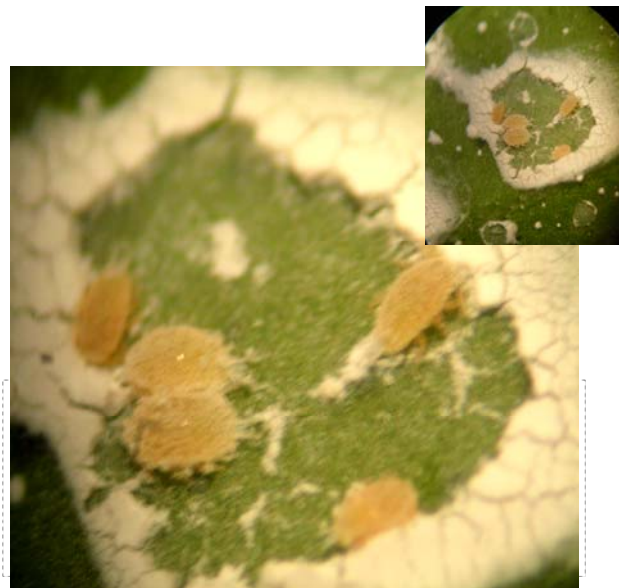


Figura 14 – Ninfas desenvolvidas sobre áreas desprotegidas de plantas cobertas com caulim, no teste sem chance de escolha

2.3.7 Efeito da aplicação de caulim diretamente sobre ovos e ninfas de *D. citri*

A aplicação de caulim diretamente sobre mudas cítricas contendo ovos de *D. citri* afetou significativamente a viabilidade dos ovos ($F=11,92$; $P=0.0018$; $g.l.=1$) e total ($F=6,43$; $P=0,017$; $g.l.=1$), mas não a viabilidade ninfal ($F=1,40$; $P=0.246$; $g.l.=1$) (Tabela 5). A viabilidade do período embrionário foi reduzida de 56,3%, em plantas não tratadas (controle) para 21,8%, no caso da aplicação do produto. A viabilidade total (fase de ovo + fase ninfal) foi de apenas 1,9% em plantas tratadas, em relação a 12,1% no controle.

Analisando-se o ritmo de eclosão de ninfas (Figura 15A) e de emergência de adultos (Figura 15B) em períodos sucessivos após o tratamento com caulim sobre os ovos, verificaram-se números reduzidos de ambos os estádios de desenvolvimento sobre as plantas tratadas em relação às não tratadas. Uma redução gradativa de ninfas foi observada a partir do 8º dia em ambos os tratamentos, que deve-se à mortalidade de ninfas e à emergência de adultos (Figura 15A). O número médio de ninfas observado ao longo dos períodos sucessivos de avaliação foi mais elevado nas plantas não tratadas ($F=5.72$; $P=0.026$; $g.l.=1$).

Houve redução significativa na viabilidade ninfal quando o caulim foi aplicado diretamente sobre os estádios de primeiro instares (1º-3º instar) ($F=16,05$; $P=0.0003$; $g.l.=1$) e último instares (4º-5º instar) ($F=19,62$; $P=<0.0001$; $g.l.=1$), em relação ao controle (Tabela 5). Observou-se uma alta mortalidade de ninfas no 2º dia após a aplicação de caulim sobre os primeiros instares (Figura 16A) e últimos instares de *D. citri* (Figura 17A). Entretanto, o número médio de ninfas ao longo das avaliações não diferiu significativamente entre o controle e o tratamento com caulim realizado sobre os primeiros instares ($F=3.72$; $P=0.067$; $g.l.=1$) ou últimos instares ($F=1,25$; $P=0,28$; $g.l.=1$), embora o baixo valor de P obtido pelas ninfas de primeiros instares indiquem efeito marginalmente significativo do tratamento. Analisando-se o ritmo de emergência dos adultos, verificou-se uma elevação gradual e significativa do número médio de indivíduos no controle em relação ao tratamento com caulim, tanto para aplicações realizadas no estágio primeiros instares ($F= 13,02$, $P=0.0016$; $g.l.=1$) (Figura 25B), quanto no estágio últimos instares ($F=7,06$; $P=0.02$; $g.l.=1$) (Figura 17B).

Em plantas tratadas com caulim, as ninfas tornaram-se agitadas e parte delas morreram no decorrer do período de avaliação; aquelas que permaneceram vivas foram observadas em locais com menor deposição de caulim, que possivelmente permitiram a alimentação.

Os resultados do presente estudo diferem dos obtidos por Hall et al., (2007) para *D. citri*, que não observaram um efeito negativo sobre a viabilidade dos ovos e o desenvolvimento de ninfas de últimos ínstars quando se aplicou caulim (Surround®WP) a 3% diretamente sobre ovos, ninfas e adultos. Estes autores observaram após 15 dias de tratamento um efeito tóxico sobre fêmeas adultas, na qual a sobrevivência das mesmas foi reduzida. Os resultados contrastantes se devem a diferença na conduta do experimento, tais como: planta hospedeira utilizada foi à murta [*Murraya paniculata* (L.) Jack], sendo os brotos contendo ninfas arrancados e mantidos em placas de petri até a aplicação do caulim (Surround WP), sendo utilizado a concentração de 3%, na qual diferenciando do presente experimento.

Tabela 5 - Viabilidade das fases de ovo, ninfa e do desenvolvimento total (ovo + ninfa) de *Diaphorina citri* após duas aplicações de caulim (Surround®WP) a 5% sobre plantas cítricas contendo diferentes estádios de desenvolvimento deste inseto

Estádio de desenvolvimento tratado	Tratamento	n **	Viabilidade (%)		
			Ovo	Ninfal	Total
Ovos	Caulim	20	21,8±1,8 b *	7,5±2,0 a	1,9±0,5 b
	Controle	8	56,3±9,1 a	14,8±6,1 a	12,1±5,1 a
Ninfas de 1° ao 3° ínstar	Caulim	21	-	2,4±0,4 b	-
	Controle	21	-	23,9±2,5 a	-
Ninfas de 4° ao 5° ínstar	Caulim	15	-	4,3±0,7 b	-
	Controle	15	-	27,2±2,7 a	-

*Médias de viabilidade (±EPM) seguidas de uma mesma letra, nas colunas e para um mesmo estágio tratado, não diferem estatisticamente pelo test t (P<0,05).

** n: representa o número de parcelas (plantas com ≈20 ovos ou ninfas) submetidas ao tratamento.

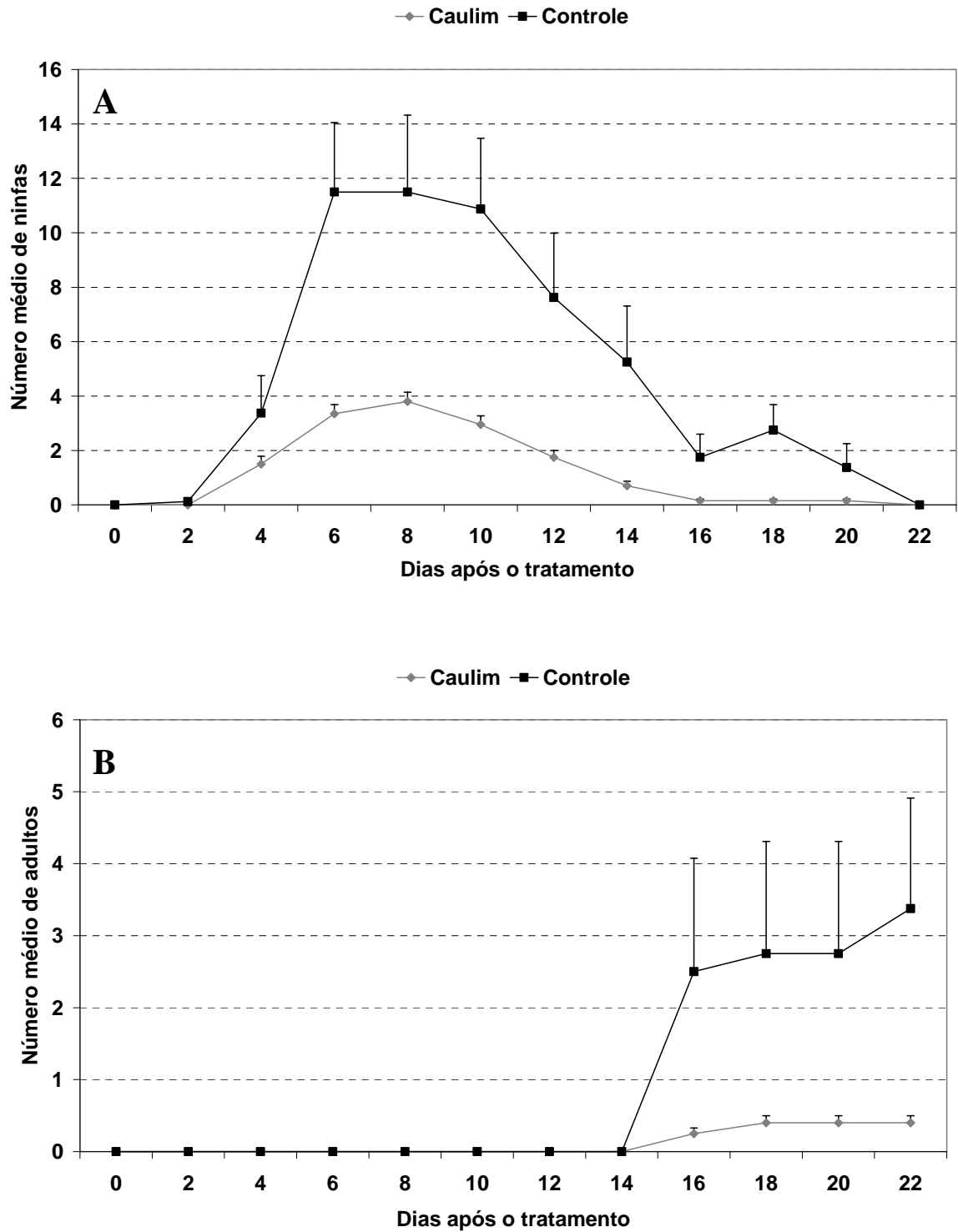


Figura 15 – Número médio de (A) ninfas e (B) adultos observados em períodos sucessivos após a aplicação de caulim (Surround®WP) a 5% sobre plantas cítricas contendo ovos de *Diaphorina citri*, em relação a plantas não tratadas (controle). Barras sobre as colunas representam o erro padrão da média

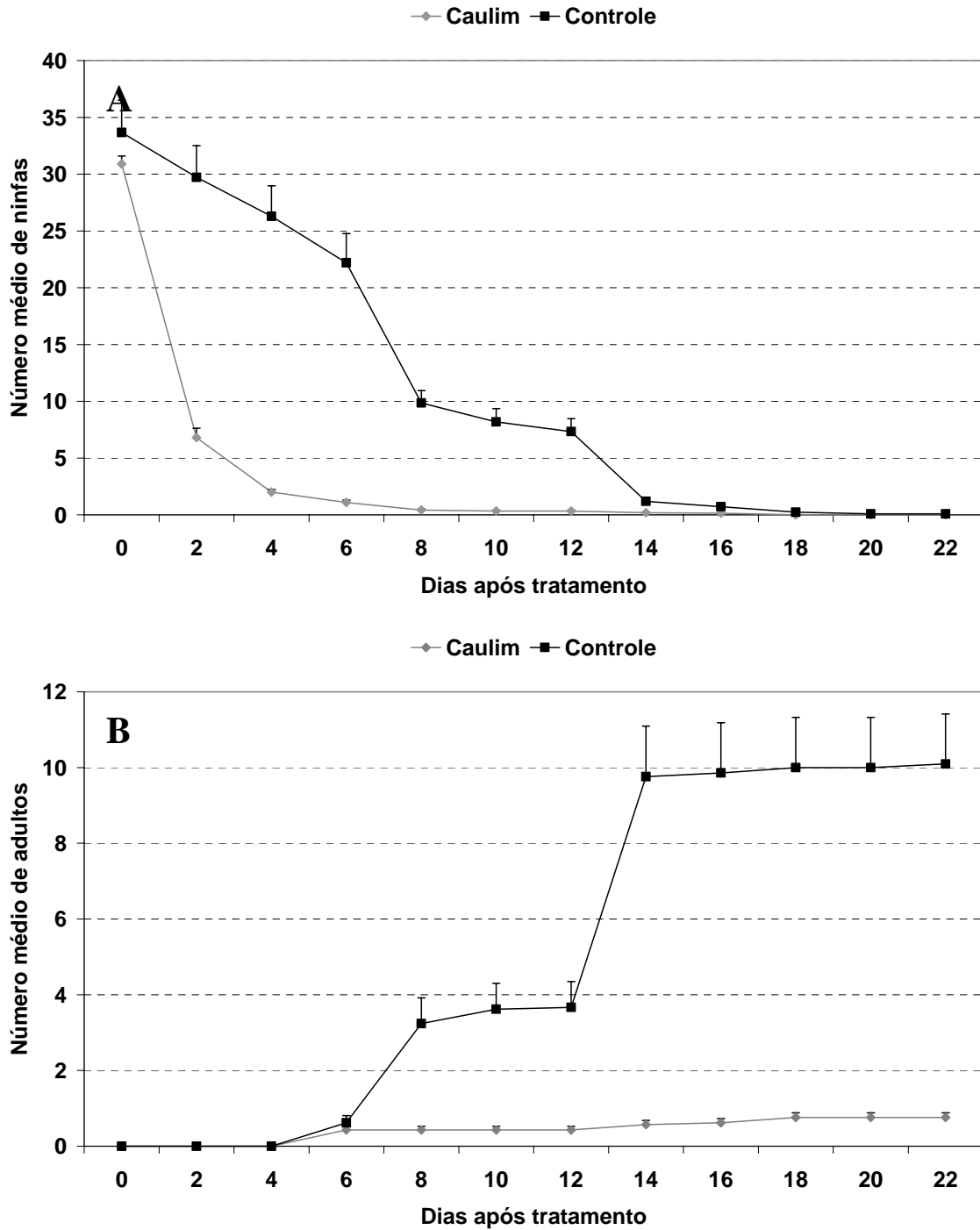


Figura 16 – Número médio de (A) ninfas e (B) adultos observados em períodos sucessivos após a aplicação de caulim (Surround®WP) a 5% sobre plantas cítricas contendo primeiros ínstares (1^o-3^o instar) de *Diaphorina citri*, em relação a plantas não tratadas (controle). Barras sobre as colunas representam o erro padrão da média

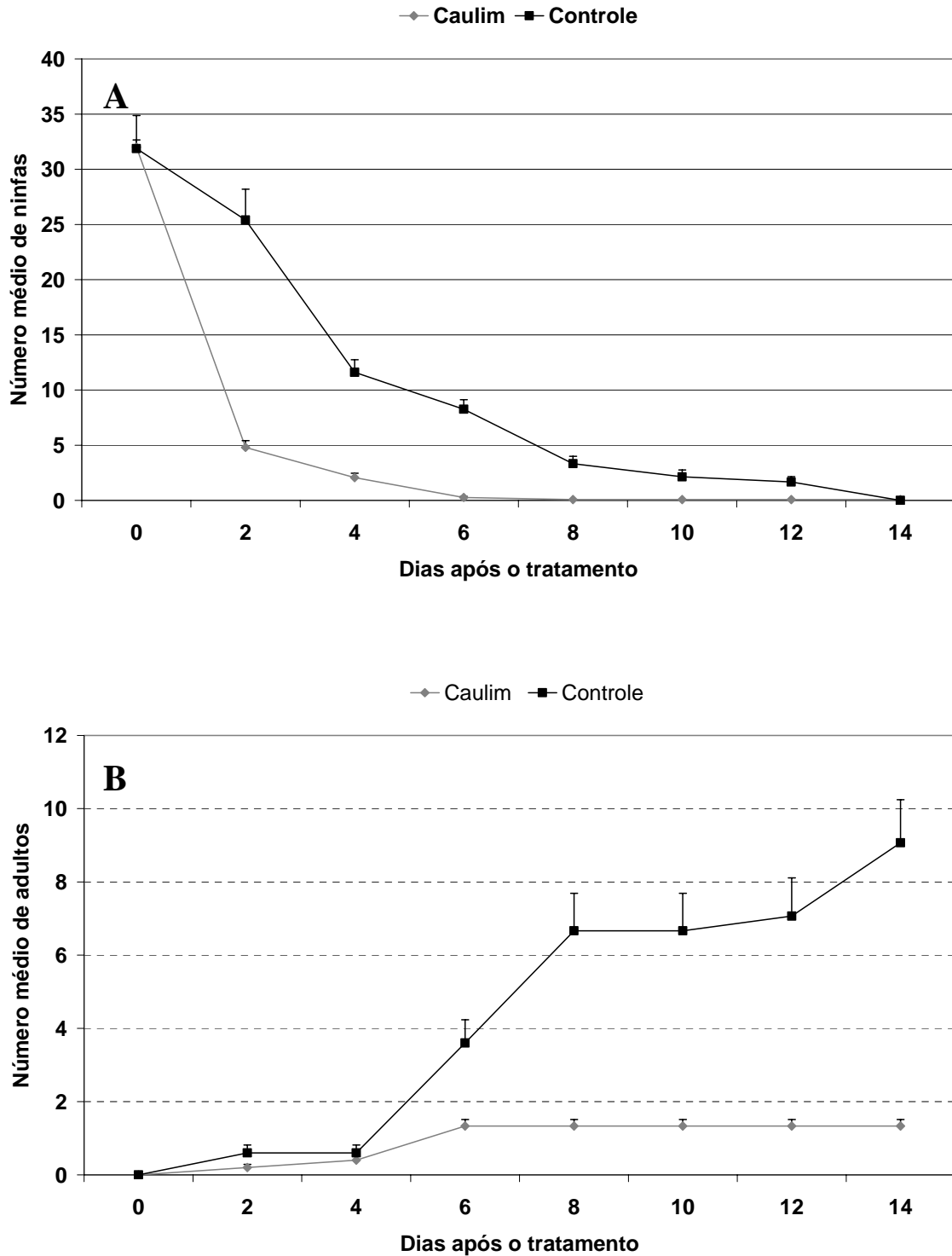


Figura 17 – Número médio de (A) ninfas e (B) adultos observados em períodos sucessivos após a aplicação de caulim (Surround®WP) a 5% sobre plantas cítricas contendo último ínstar (4^o-5^o instar) de *Diaphorina citri*, em relação a plantas não tratadas (controle). Barras sobre as colunas representam o erro padrão da média

Para o psilídeo da pereira (*C. pyri*), no entanto, Puterka et al.,(2005) encontraram resultados semelhantes aos do presente estudo, observando dessecação dos ovos após a aplicação direta do caulim (Surround WP) a 5% sobre os mesmos. Além disso, a sobrevivência de ninfas de *C. pyri* foi afetada quando aplicaram o caulim sobre ninfas iniciais e de últimos ínstaes. Observaram, também, uma interação significativa de tratamento x tempo, com aumento da mortalidade no decorrer do tempo após a aplicação. As ninfas que sobreviveram tornaram-se agitadas e movimentaram-se para locais da superfície da planta não cobertos com caulim (Knight et al.,2001).

Segundo Puterka et al.,(2005), a mortalidade das ninfas do psilídeo *C. pyri* pode ter sido ocasionada por surfactantes ou outros componentes da formulação do filme de partículas, que teriam um direto na cutícula das ninfas. Outra hipótese é de que o filme de partículas possa interferir com a mobilidade das ninfas, devido à presença de partículas de caulim aderidas em seu corpo; isto ocasionaria mortalidade pela dificuldade em localizar um local adequado para alimentação.

Os resultados do presente estudo indicam que aplicação de caulim sobre ovos ou ninfas de *D. citri* afeta a viabilidade e o desenvolvimento de imaturos deste inseto, reduzindo o número de adultos emergidos. Observou-se efeito do caulim sobre todas as fases de desenvolvimento de *D. citri*. Portanto, no campo o produto poderá ser efetivo se aplicado sobre brotações cítricas contendo ovos e/ou ninfas em desenvolvimento. Com isso, poderia auxiliar no combate à disseminação da doença, pois reduziria a emergência de adultos infectivos.

2.3.8 Teste de aquisição de *Candidatus Liberibacter asiaticus* por *D. citri* em folhas com filme de partículas.

Dos 300 insetos que foram submetidos ao período de acesso à aquisição (PAA) da bactéria *Ca. L. asiaticus* sobre plantas-fonte tratadas ou não tratadas com o filme de partículas de caulim, apenas 147 insetos sobreviveram o período de latência de 27 dias, sendo 99 em folhas não cobertas e 48 em folhas cobertas com caulim. A alta mortalidade dos psilídeos em plantas cobertas com caulim foi investigada nos testes anteriores.

Tabela 6.- Proporção de amostras de *Diaphorina citri* infectivas após 78h de acesso dos insetos à aquisição em folhas de plantas-fonte de *Candidatus Liberibacter asiaticus* tratadas ou não com três aplicações de caulim (Surround®WP) a 5%

Planta-fonte	Tratamento (folha)*	Proporção de amostras de psilídeos positivas**	Infectividade da folha***
Ramo 1	Caulim	0/6	Positiva
	Controle	0/9	Positiva
Ramo2	Caulim	1/3	Positiva
	Controle	1/8	Positiva
Ramo3	Caulim	0/4	Positiva
	Controle	3/14	Positiva
Ramo4	Caulim	0/1	Positiva
	Controle	0/1	Positiva
Ramo5	Caulim	0/2	Positiva
	Controle	0/1	Positiva
Controle negativo****	-	0/8	Negativa
Total	Caulim	1/16	Positiva
acumulativo	Controle	4/33	Positiva

* Os tratamentos foram constituídos de folhas novas tratadas com três aplicações de caulim a 5%, ou não tratadas (controle), localizadas em uma mesma brotação de cada planta-fonte.

** Proporção de amostras de psilídeos (3 adultos/amostra) positivas para *Ca. L. asiaticus* pelo teste de *nested-PCR* sobre o total de amostras avaliadas.

*** As folhas sobre as quais os insetos foram confinados durante o período de acesso aquisição, foram submetidas a um teste de PCR para confirmar a infecção pelo patógeno.

**** Grupos de insetos obtidos da mesma colônia sadia, porém não submetidos a um período de acesso à aquisição em plantas-fonte.

Verificou-se aquisição da bactéria por psílídeos tanto em plantas tratadas como em plantas não tratadas por caulim. Entretanto, para os psílídeos confinados sobre folhas cobertas com o filme de partículas, a taxa acumulativa de infectividade (1/16) foi mais baixa do que a de insetos confinados em folhas não cobertas (controle) (4/33) (Tabela 6)

Estes resultados indicam que a capacidade de aquisição do patógeno *Ca. L. asiaticus* e, conseqüentemente, de alimentação de *D. citri* no floema foi reduzida, porém não suprimida na presença de um filme de partículas de caulim sobre as plantas-fonte. Segundo Tubajika et al., (2006), a incidência da Doença de Pierce foi reduzida a 6% e 14% em em videiras tratadas com caulim e inseticidas convencionais, respectivamente, mostrando que o filme de partículas altera o comportamento das cigarrinhas, afetando a sua alimentação. Em geral, há outros relatos na literatura a respeito do efeito do caulim sobre a aquisição de fitopatógenos por insetos vetores.

Com base nos resultados obtidos neste experimento e no trabalho de Tubajika et al., (2006), supõe-se que o aplicação de caulim em brotações cítricas possa reduzir a eficiência de aquisição da bactéria por *D. citri* em plantas eventualmente infectadas e, conseqüentemente, inibir a disseminação secundária do Huanglongbing para outras plantas..

3 CONCLUSÕES

- O psilídeo *Diaphorina citri* Kuwayama rejeita plantas cítricas cobertas com um filme de partículas de caulim a 5% para fins de pouso, permanência e oviposição, quando há possibilidade de escolha entre plantas tratadas e não tratadas com este produto.
- Machos e fêmeas de *D. citri* se comportam de forma semelhante, rejeitando plantas cobertas com caulim para pouso e permanência, e preferindo a face abaxial das folhas em plantas não tratadas.
- Na ausência de escolha, um número significativo de indivíduos de *D. citri* pouso e permanece por vários dias sobre plantas cítricas cobertas com caulim, porém inferior ao observado sobre plantas não cobertas com o produto.
- Havendo chance escolha entre plantas inteiramente cobertas com o filme de partículas, parcialmente cobertas (com brotos novos desprotegidos), e plantas não tratadas, os psilídeos preferem as plantas não tratadas, seguida daquelas com apenas os brotos desprotegidos.
- A oviposição por *D. citri* é drasticamente reduzida sobre brotações cítricas cobertas com o filme de partículas, mesmo em condições de confinamento.
- Aplicação de caulim a 5% diretamente sobre ovos ou ninfas de *D. citri* afeta o desenvolvimento deste inseto, reduzindo o número de ninfas e/ou adultos produzidos.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, P.; KITCHNER, J.A.; BRISCOE, H.V.A. Inert dust insecticides. Part 1: mechanisms of action. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 31, p. 143-159, 1944.
- ALTAMIRANO, D.M.; GONZALES, C.I.; VIÑAS, R.C. Analysis of the devastation of leaf-mottling (greening) disease of citrus and its control program in the Philippines. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS, 7., 1976, Riverside. **Proceedings...** Riverside, 1976. p. 22-26.
- AUBERT, B. *Trioza erytrae* Del Guercio and *Diaphorinacitri* Kuwayama (Homoptera: Psylloidea), the two vectors of citrus greening disease: biological aspects and possible control strategies. **Fruits**, Montpellier, v. 42, p. 149–162, 1987.
- BARKER, J.E., HOLASCHKE, M.; FULTON, A.; EVANS, K.A.; POWELL, G. Effects of kaolin particle film on *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) behaviour and performance. **Bulletin of Entomological Research**, Oxford, v. 97, p. 455-460, 2007.
- BHAVAKUL, K.; INTAVIMOLSRI, S.; VICHITRANANDA, S.; KRATUREUK, C.; PROMMINTARA, M. The current citrus disease situation in Thailand with emphasis on citrus greening. In: INTERNATIONAL SOCIETY OF CITRICULTURE, 1., 1981, São Paulo, **Proceedings...** São Paulo, 1981. p. 464-466.
- BOSTANIAN, N.J.; RACETTE, G. Particles films for managing arthropod pests of apple. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 101, n. 1, p. 145-150, 2008.
- BOVÉ, J.M. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. **Journal Plant Pathology**, Pretoria, v. 88, p. 7-37, 2006.
- BOVÉ, J.M.; GARNIER, M. Phloem and xylem restricted plant pathogenic bacteria. **Plant Science**, Amsterdam, v. 164, p. 423-438, 2002.
- CAPOOR, S.P.; RAO, D.G.; VISWANATH, S. M. Greening disease of citrus in the Deccan Trap Country and its relationship with the vector, *Diaphorina citri* kuwayama In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 6., 1974, Richmond. **Proceedings...** Richmond, 1974. p. 43-49.
- CATLING, H. D. 1970. Distribution of the psyllid vectors of citrus greening disease, with notes on the biology and bionomics of *Diaphorina citri*. **FAO Plant Protection Bulletin** 18: 8-15.
- CATLING, H.D. The bionomics of the South African psylla *Trioza erytrae*. The influence of parasites and notes on the main species. **Journal of the Entomological of Southern Africa**, Pretoria, v. 32, p. 209-223, 1969.

CHAVAN, V. M., AND A. S. SUMMANWAR. 1993. Population dynamics and aspects of the biology of citrus psylla, *Diaphorina citri* Kuw. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 12., 1993, Riverside **Proceedings...**Riverside, 1993. p. 286-290.

COLETA-FILHO, H.D.; TARGON, M.L.P.N.; TAKITA, M.A.; DE NEGRI, J.D.; POMPEU JR, J.; MACHADO, M.A. First report of the causal agent of Huanglongbing ('*Candidatus Liberibacter asiaticus*') in Brazil. **Plant Disease**, Minnesota, v.88, p. 1382, 2004.

COTTRELL, T.E.; WOOD, B.W.; REILLY, C.C. Particle film affects black pecan aphid (Homoptera: Aphididae) on pecan. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 95, p. 782-788, 2002.

DANIEL, C.; PFAMMATTER, W.; KEHRLI, P.; WYSS, E. Processed kaolin as an alternative insecticide against the European pear sucker, *Cacopsylla pyri* (L.) **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 129, p. 363-367, 2005.

EBLING, W. Physiochemical mechanisms for the removal of insect wax by means of finely divided powders. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 30, p. 531-564, 1961.

EBLING, W. Sorptive dusts for pest control. **Annual Review Entomology**, Stanford, v. 16, p. 123-158, 1971.

EIGENBRODE, S. D.; DING, H.; NEUFELD, J.; DUETTING, P. Effects of hydrophilic and hydrophobic kaolin-based particle films on pea aphid (Homoptera: Aphididae) and its entomopathogen *Pandora neoaphidis* (Entomophthorales: Entomophthoraceae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 99, p. 23-31, 2006.

EPA, 1999. Disponível em:
<http://www.epa.gov/pesticidas/biopesticidas/ingredientes/factsheets/factsheet_100104.htm>. Acesso em: 17 jul. 2008.

FUNDECITRUS, 2008. Disponível em:<<http://www.fundecitrus.com.br>>. Acesso em: 10 jun. 2008.

FUNDECITRUS, 2008a. Disponível em
:<http://www.fundecitrus.com.br/informativo/nota_manifestoHLB_0608html>. Acesso em 15 jun 2008.

FUNDECITRUS. **Revista do fundecitrus** 12 p. Disponível em:
<http://www.fundecitrus.com.br/revista/fundec_ed143_completa.pdf>. Acesso em: 12 abr. 2008b

GALLO, D.; MONTENEGRO, H.W.S. Ocorrência de psilídeos nos pomares paulistas. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 35, p. 41-42, 1960.

GALLO, D.; NAKANO, O.; NETO, S.S.; CARVALHO, R.P.L.; BAPTISTA, G.C.; FILHO, E.B.; PARRA, J.R.P.; ZUCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIM, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R. S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920p.

GARNIER, M.; DANIEL, N.; BOVÉ, J. N. The greening organism is a gram negative bacterium. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 9., 1984, Riverside, **Proceedings...**Riverside, 1984. p. 115-124.

GARNIER, M.; JAGOUEIX-EVEILLARD, S.; CRONJE, P.R. ; ROUX, H.F. ; BOVÉ, J.M. Genomic characterization of a Liberibacter present in an ornamental rutaceous tree, *Calodendrum capense*, in the Western Cape Province of South Africa. Proposal of *Candidatus Liberibacter africanus* subsp. *Capensis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, n. 50, p. 2119-2125, 2000.

GLENN, D.M.; PUTERKA, G.J. Particle films: a new technology for agriculture. **Horticultural Reviews**, New York, v. 31, p. 1-44, 2005.

GLENN, D.M.; PRADO, E.; EREZ, A.; PUTERKA, G.J. A reflective, processed-Kaolin particle film affects fruit temperature, radiation reflection, and solar injury in apple. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 127, p. 188-193, 2002.

GLENN, D.M.; EREZ, A.; PUTERKA, G.J.; GUNDRUM, P. Particle films affect carbon assimilation and yield in 'Empire' apple. **Journal of American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 128, p. 356-362, 2003.

GLENN, D.M.; PUTERKA, G.J.; VENDERZWET, T.; BYERS, R.E.; FELDHAK, C. Hydrophobic particle films: a new paradigm for suppression of arthropod pests and plant diseases. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 92, p. 759-771, 1999.

GRAÇA, J.V. Citrus greening disease. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 29, p. 109-136, 1991.

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**, Florida, v. 87, n. 3, p. 330-353, 2004.

HALL, D.G., LAPOINTE, S.L., WENNINGER, E. J. Effects of a particle film on biology and behavior of *Diaphorina citri* (Homoptera:Psyllidae) and its infestations in citrus. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 100, p. 847-854, 2007.

HORTON, D.R.; KRYSAN, J.L. Probing and oviposition-related activity of summerform pear psylla (Homoptera: Psyllidae) on host and nonhost substrates. **Environmental Entomology**, Washington, v. 19, p. 1463-1468, 1990.

HUANG, C.H.; LIAW, C.F. ; CHANG, L. ; LAN, T. Incidence and spread of citrus likubin in relation to the population fluctuation of *Diaphorina citri*. **Plant Protection Bulletin**, Taiwan, n. 32, p. 167-176, 1990.

- HUANG, J.; LUO, X.; HUANG, B.; YAO, X. Studies on citrus psylla *Diaphorina citri* Kuwayama and its control. **Entomological Journal of East China**, Pequin, v. 8, p. 26-34, 1999.
- HUSAIN, M.A.; NATH, D. The citrus psylla (*Diaphorina citri* Kuwana) (Psyllidae:Homopetar). Memoirs of the Department of Agriculture in India, Agricultural research Institute, Central Publication Branch, Govt. of India. **Indian Entomological Service**, Pusa, v. 10, n. 2, p. 2-27, 1927.
- HUNG, T.F.; HUNG, S.C.; CHEN, C.N.; HSU, M.H.; SU, H.J. Detection by PCR of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the bacterium causing citrus huanglongbing in vector psyllids: application to the study of vector-pathogen relationships. **Plant Pathology**, Oxford, n. 53, p. 96-102, 2004.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento sistemático da produção agrícola**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa10200601.shtm>>. Acesso em: 20 jan.. 2008.
- JAGOEIX, S.,BOVÉ, J. M., GARNIER, M.. The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the α subdivision of the proteobacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 44, p. 379-386, 1994.
- KE, C. The present status of citrus huanglongbing and its control in China. In: INTERNATIONAL ASIA PACIFIC WORKSHOP ON INTEGRATED CITRUS HEALTH MANAGEMENT, 6., 1991, Rome. **Proceedings...**Rome, 1991. p. 24-30.
- KRING, J.B. New ways to repel aphids. **Frontiers of Plant Science**, New Haven, v. 17, p. 6-7, 1964.
- KRING, J.B. Reaction of aphids to reflected light. **Bulletin of the Entomological Society of America**, Washington, v. 8, p. 159, 1962.
- KRYSAN, J.L., HORTON, D.R. Seasonality of catch of pear psylla *Cacopsylla pyricola* (Homoptera:Psyllidae) on yellow traps. **Environmental Entomology**, Washington, v. 20, p. 626-634, 1991.
- KNIGHT, A.L.; UNRUH, T.R.; CHRISTIANSON, B.A.; PUTERKA, G.J.; GLENN, D. M. Effects of a kaolin-based particle film on the obliquebanded leafroller (Lepidoptera: Tortricidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 93, p. 744-749, 2000.
- KNIGHT, A.L.; CHRISTIANSON, B. Jr.; UNRUH, T.R.; PUTERKA, G.J.; GLENN, D. M. Impacts of seasonal kaolin particle films on apple pest management. **Canadian Entomologist**, Riverside, v. 133, p. 413-428, 2001.
- LALANCETTE, N.; BELDING, R.D.; SHEATER, P.W.; FRECON, J.L.; TIETJEN, W. H. Evaluation of hydrophobic and hydrophilic kaolin particle films for peach crop, arthropod and disease management. **Pest Management Science**, Pretoria, v. 61, p. 25-39, 2005.

LALLEMAND, J.; FOS, A.; BOVÉ, J.M. Transmission de la bacterie associée à la forme africaine de la maladie du greening de stubborn, ou des maladies similaires. **Fruits**, Montpellier, v. 25, p. 455-465, 1970.

LAPOINTE, S.L.; MCKENZIE, C.L. HALL, D.G. Reduced oviposition by *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) and growth enhancement of citrus by surround particle film. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 99, p. 109-116, 2006.

LARENTZAKI, E., SHELTON, A. M., PLATE, J. Effect of kaolin particle film on *Thrips tabaci* (Thysanoptera: Thripidae), oviposition, feeding and development on onions: A lab and field case study. **Crop. Protection**, Pretoria, v. 27, p. 727-734, 2007.

LEMOYNE, P., VICENT, C., GAUL, S., MACKENZIE, K. Kaolin affects blueberry maggot on fruit. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 101, n. 1, p. 118-125, 2008.

LIU, H. Y.; TSAI, J.H. Effects of temperature on biology and life table parameters of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae). **Annual Applied Biology**, London, v. 137, p. 201-206, 2000.

MARCÓ, V., BLOMMERS, L.H.M., BOGYA, S., HLENSEN, H. The effect of kaolin treatments on phytophagous and predatory arthropods in the canopies of apple trees. **Journal of Fruits and Ornamental Plant Research**. Pretoria, v. 14, n. 3, p. 79-87, 2006.

MARTINEZ, A.L.; WALLACE, J.M. Citrus greening disease in Philippines. In: CONFERENCE OF THE INTERNACIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 1., 1969, Riverside. **Proceedings...** Riverside, 1969. p. 1427-1431.

MAZOR, M.; EREZ, A. Processed kaolin protects fruit from mediterranean fruit fly infestations. **Crop Protection**, Guildford, v. 23, p. 47-51, 2004.

MCCLEAN, A. P. D.; SCHWARZ, R.E. Greening of blotchy-mottle disease of citrus **Phytophylactica**, Pretoria, v. 2, p. 177-194, 1970.

MEAD, F. W. 2002. Feature names. Disponível em:
<<http://creatures.ifas.ufl.edu/citrus/acpsyllid.htm>>. Acessado em: 17 jan. 2007

MOERICKE, V. Fareben als landereize für geflügelte Blattläuse (Aphidina). **Zeitschrift für Naturforschung**, Tübingen, v. 7, p. 304, 1952.

NAKANO, O.; LEITE, C.A.; FLORIN, A.C.P. Controle químico do psilideo dos citros, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). **Revista Laranja**, Araraquara, v. 20, p. 319-328, 1999.

OBERHOLZER, P.C.J.; HOFMEYR, J.D.J. The nature and control of clonal senility in commercial varieties of citrus in South Africa. **Bulletin**, Pretoria, p. 46, 1955.

PANDE, Y.D. Biology of citrus psylla, *Diaphorina citri* Kuw. (Hemiptera:Psyllidae). **Journal of Entomology of Israel**, Israel, v. 6, p. 307-311, 1971.

PASQUALINI, E.; CIVOLANI, S.; CORELLI GRAPPADELLI, L. Particle film technology: approach for a biorational control of *Cacopsylla pyri* (Rynchota: Psyllidae) in Northern Italy. **Bulletin**, Pretoria, v. 55, p. 39–42, 2002.

PUTERKA, G.J.; GLENN, D.M.; SEKUTOWSKI, D.G. **Method for protecting surfaces from arthropod infestation**. U.S. Patent No. 6,027,740, 2000.

PUTERKA, G. J.; GLENN, D.M.; SEKUTOWSKI, D.G.; UNRUH, T.R.; JONES, S.K. Progress toward liquid formulations of particle films for insect and disease control in pear. **Environmental Entomology**, Lanham, v. 29, p. 329–339, 2000.

RAYCHAUDHURI, S.P.; NARIANI, T.K. ; LELE, V.C. ; SINGH, G.R. Greening and citrus decline in India. In:INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 5., 1972, Swaziland. **Proceedings....** Swaziland, 1972. p. 35-37.

REGMI, C., LAMA, T.K. Greening incidente and greening vector population dynamics in Pokhara. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 10., 1988, Riverside. **Proceedings...Riverside**,1988. p. 238-242.

SALIBE, A.A.; CORTEZ, R.E. Studies on the leaf mottling disease of citrus in the Philippines. **FAO Plant Protection Bulletin**, Rome, v. 14, p. 141-144, 1966.

SAOUR, G.; MAKEE, H. A kaolin-based particle film for suppression of the olive fruit fly *Bactrocera oleae* Gmelin (Dip. Tephritidae) in olive groves. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 128, p. 28-31, 2004.

SCHWARZ, R.E. The distribution of greening in citrus areas of South Africa. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 4., 1968, Riverside. **Proceedings...Riverside**, 1968. p. 124-127.

SHOWLER AT. Effects of kaolin-based particle film application on boll weevil (Coleoptera: Curculionidae) injury to cotton. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 95, p. 754–762, 2002.

SISTERSON, M.S.; LIU, Y.B.; KERNS, D.L.;TABASHNIK, B.E. Effects of kaolin particle film on oviposition, larval mining, and infestation of cotton by pink bollworm (Lepidoptera: Gelechiidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 96, p. 805–810, 2003.

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

TEXEIRA, D.C.; SAILLARD, C.; EVEILLARD, S.; DANED, J.L.; COSTA, P.I.; AYRES, A.J.; BOVÉ, J. *Candidatus Liberibacter americanus*, associated with citrus huanglongbing (greening) disease in São Paulo State, Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 55, p. 1857-1862, 2005.

TEIXEIRA, D.C.; DANET, J.L.; EVEILLARD, S.; MARTINS, E.C.; JESUS JR., W.C.; YAMAMOTO, P.T.; LOPES, S.A.; BASSANEZI, R.B.; AYRES, A.J.; SAILLARD, C.; BOVE, J.M. Citrus huanglongbing in São Paulo State, Brazil: PCR detection of the “*Candidatus*” *Liberibacter* species associated with the disease. **Molecular and Cellular Probes**, London, v. 19, p. 173–179, 2005.

THOMAS, A.L.; MULLER, M.E.; DODSON, B.R.; EILERSIECK, M.R.; KAPS, M. A kaolin-based film suppresses certain insect and fungal pests while reducing heat stress in apples. **Journal of the American Pomological Society**, v. 58, p. 42–51, 2004.

TIRTAWIDJAJA, S. Citrus virus research in Indonésia. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 8., 1980, Riverside. **Proceedings...**Riverside, 1980. p. 129-132.

TIRTAWIDJAJA, S. . Insect, dodder and seed transmissions of citrus vein phloem degeneration (CVPD).Proc. International Soc. Citriculture v. 1, p 469-471, 1981..

TSAI, J.H.; LIU, Y.H. Biology of *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) on four host plants. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 93, p. 1921-1725, 2000.

TUBAJIKA, K.M.; CIVEROLO, E.L.; PURTEKA, G.; WENDEL, L.; CIOMPERLIK, M.; BARTELS, D; LUVISI, D.; HASHIM, J.M. Messenger and particle film Surround reduces Pierce’s disease development in grape. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 84, p. S93, 2006.

UNRUH, T. R.; KNIGHT, A. L.; UPTON, J.; GLENN, D.M.; PUTURKA, G.J. Particle films for suppression of the codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) in apple and pear orchards. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 93, p. 737–743, 2000.

VAN VUUREN, S.P., Huanglongbing. The official name for greening disease of citrus. **Inligtingsbulletin – Instituut vir Tropiese en Subtropiese Gewasse**, cidade, v.287, p.5-6, 1996.

XU, C.F.; XIA, Y.H.; LI, K.B.; KE, C. Further study on the transmission of citrus huanglungbin by a psyllid *Diaphorina citri* Kuwayama. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 10., 1987, Riverside, **Proceedings...**Riverside, 1987. p. 24-32.

XU, C.F.; XIA, H.Y.; LI, K.B.; KE, C. Further study of the transmission of citrus huanglungbin by a psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama. CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS. 10., Riverside. **Proceedings...**Riverside, 1988. p. 243-248.

WEATHERSBEE, A.A.; McCKENZIE, C.L. Effect of neem biopesticide on repellency, mortality, oviposition and development of *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae). **Florida Entomologist**, Florida, v. 88, n. 4, p. 401-407, 2005.

- WENNINGER, E. J.; HALL, D. G. Daily timing of mating and age at reproductive maturity in *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). **Florida Entomologist**, Florida, v. 90, n. 4, p.715-722, 2007.
- WYSS, E.; DANIEL, C. Effects of autumn kaolin and pyrethrin treatments on the spring population of *Dysaphis plantaginea* in apple orchards. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 128, p. 147–149, 2004.
- WU D. Relationship between the habits of citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama, and the occurrence of citrus huanglongbing. **China Citrus**, Pequim, v. 2, p. 33-34, 1980.
- YAMAMOTO, P.T. **Estratégias de controle químico de *Diaphorina citri*** . In: SIMPOSIO HUANGLOGGING (HLB, EX-GRENING) NO ESTADO DE SÃO PAULO,; SEMANA DA CITRICULTURA, 28., 2006. Cordeirópolis. **Anais...**Centro APTA Citros 'Silvio Moreira' do IAC, 2006, Cordeirópolis/ SP.
- YAMAMOTO, P.T.; PAIVA, P.E.B.; GRAVENA, S. Flutuação populacional de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) em pomares de citros na região norte do estado de São Paulo. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, n. 1, p. 165-170, 2001.
- YANG, Y.; MINGDU, H.; ANDREW, G.; BEATTIE, C.; XIA, YULU.; OUYANG, GECHENG.; XIONG, J. Distribution, biology, ecology and control of the psyllid *Diaphorina citri* Kuwayama, major pest of citrus: A status report for China. **International Journal of Pest Management**, London, v. 52, n. 4, p.343-352, 2006.
- ZHAO, X.Y. Citrus yellow shoot disease (huanglongbin) - a review. In: INTERNATIONAL SOCIETY OF CITRICULTURE, 1., 1981, Tokyo. **Proceedings...**Tokyo, 1981. p. 466-469.