

**FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA
MESTRADO PROFISSIONAL EM
CONTROLE DE DOENÇAS E PRAGAS DOS CITROS**

BRUNO DANIEL

**Levantamento populacional de adultos de *Diaphorina citri*
portadores de *Candidatus Liberibacter asiaticus* em regiões e em
áreas com diferentes manejos de huanglongbing**

Dissertação apresentada ao Fundo de Defesa da
Citricultura como parte dos requisitos para obtenção
do título de Mestre em Fitossanidade

Orientador: Dr. Nelson Arno Wulff

Coorientador: Dr. Alécio Souza Moreira

**Araraquara
Março 2019**

BRUNO DANIEL

**Levantamento populacional de adultos de *Diaphorina citri*
portadores de *Candidatus Liberibacter asiaticus* em regiões e em
áreas com diferentes manejos de huanglongbing**

Dissertação apresentada ao Fundo de Defesa da
Citricultura como parte dos requisitos para obtenção
do título de Mestre em Fitossanidade

Orientador: Dr. Nelson Arno Wulff

Coorientador: Dr. Alécio Souza Moreira

**Araraquara
Março 2019**

D1841

Daniel, Bruno

Levantamento populacional de adultos de *Diaphorina citri* portadores de *Candidatus Liberibacter asiaticus* em regiões e em áreas com diferentes manejos de huanglongbing / Bruno Daniel, 2019.

43 f.

Orientador: Dr. Nelson Arno Wulff

Coorientador: Alécio Souza Moreira

Dissertação (Mestrado) – Fundo de Defesa da Citricultura, Araraquara, 2019.

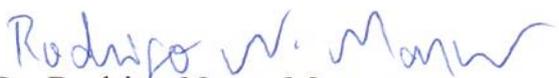
1. Greening 2. Psilídeo asiático dos citros 3. Huanglongbing
4. Monitoramento de inseto vetor I. Título

BRUNO DANIEL

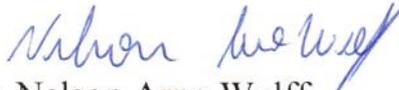
Dissertação apresentada ao Fundo de Defesa da Citricultura - Fundecitrus, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Fitossanidade.

Araraquara, 20 de março de 2019.

BANCA EXAMINADORA


Dr. Rodrigo Neves Marques
Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, Araras/SP


Dr. Haroldo Xavier Linhares Volpe
Fundo de Defesa da Citricultura - FUNDECITRUS, Araraquara/SP


Dr. Nelson Arno Wulff
Fundo de Defesa da Citricultura - FUNDECITRUS, Araraquara/SP

Levantamento populacional de adultos de *Diaphorina citri* portadores de *Candidatus Liberibacter asiaticus* em regiões e em áreas com diferentes manejos de huanglongbing

Autor: Bruno Daniel

Orientador: Dr. Nelson Arno Wulff

Coorientador: Dr. Alécio Souza Moreira

Resumo

O huanglongbing representa o maior desafio da citricultura brasileira e mundial por se tratar de uma doença de difícil controle e alta agressividade, associada à presença de *Candidatus Liberibacter asiaticus*. O vetor responsável pela disseminação da bactéria é o psíldeo *Diaphorina citri*, inseto que se alimenta e se reproduz predominantemente em plantas dos gêneros *Citrus* e *Murraya*. O manejo da doença deve ser realizado com o emprego de ações preventivas à detecção da doença no pomar e que visem reduzir o inóculo. No alerta fitossanitário coordenado pelo Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus) as propriedades com pulverizações rigorosas de inseticida e erradicação frequentes de fontes de inóculo são identificadas como manejo A, enquanto manejo B são propriedades onde há a manutenção de plantas sintomáticas com o manejo do vetor através da pulverização de inseticidas. Na categoria manejo C, além da manutenção das plantas sintomáticas, não existe o manejo do vetor com a pulverização de inseticidas. O monitoramento do psíldeo através de cartões adesivos amarelos colocados nas bordas dos pomares é importante para a decisão de iniciar o controle do vetor. Com o intuito de conhecer a ocorrência e a flutuação populacional dos insetos portadores de *Ca. L. asiaticus* (Las+) em diferentes regiões e entre tipos de manejo, foram coletadas amostras de psíldeos em dois períodos: i) março de 2015 a fevereiro de 2016, quando foram coletados insetos provenientes de cartões adesivos amarelos instalados em propriedades com manejos B e C. As coletas ocorreram nas regiões de Avaré (SP), Santa Cruz do Rio Pardo (SP), Araraquara (SP) e Bebedouro (SP) e ii) entre março de 2016 a março de 2017, além das coletas em pomares com manejo B/C mencionadas, foi incluído Frutal (MG) e realizadas coletas em cartões adesivos instalados em propriedades com manejo A nas regiões de Avaré (SP) e Araraquara (SP). As coletas foram realizadas a cada 15 dias e os insetos coletados foram analisados quanto à presença de *Ca. L. asiaticus* com PCR quantitativo. As proporções de psíldeos Las+ em cada região e período foram comparados por meio de teste de proporção e análises de densidade espectral. As porcentagens de psíldeos Las+ por cartão apresentaram aumento geralmente nos meses que compõem o outono e o inverno, enquanto que a média estimada de psíldeos Las+/cartão foi maior nos meses de inverno e primavera. A proporção de psíldeos Las+ avaliada em uma mesma região em diferentes períodos, embora tenha apresentado diferença estatística somente na região de Araraquara (dezembro de 2014 a maio de 2015) e Bebedouro (junho a novembro de 2016) indicou, de forma recorrente, o primeiro semestre com valores menores, com exceção às regiões de Santa Cruz do Rio Pardo e Araraquara no período de dezembro de 2014 a novembro de 2015. Na comparação do efeito do tipo de manejo adotado (A versus B/C), houve diferença significativa com menor proporção de psíldeos Las+ em propriedades com manejo A em relação ao manejo B/C. A análise de densidade espectral indicou que nas áreas com manejo A ocorreram metade dos picos principais de psíldeos Las+ encontrados nas áreas com manejo B/C.

Palavras-chave: Greening, psíldeo asiático dos citros, huanglongbing, monitoramento de inseto vetor.

Survey of adult psyllid populations carrying *Candidatus Liberibacter asiaticus* in regions and areas with different huanglongbing managements

Author: Bruno Daniel

Advisor: Dr. Nelson Arno Wulff

Co-Advisor: Dr. Alécio Souza Moreira

Abstract

The huanglongbing (HLB) represents the greatest challenge of the Brazilian and world citriculture because it is a disease of difficult control and high aggressiveness, associated with the presence of *Candidatus Liberibacter asiaticus*. The vector responsible for the spread of the bacterium is *Diaphorina citri*, an insect that majority feeds and reproduces on *Citrus* and *Murraya* plants. The disease management must be based on a set of actions which are mostly preventive to the disease entrance in the orchard and to reduce inoculum sources. The Alert Service provided by Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus) classify citrus properties that perform frequent insecticide control together with eradication of inoculum sources as management A, while in management B insecticide control is performed without tree eradication. Management C keeps symptomatic trees in field and do not perform insecticide control of psyllids. Monitoring yellow stick traps for the presence of the Asian Citrus Psyllid (ACP) in the border of the farm is crucial to follow the population fluctuation of the insect and to start the control. Aiming to know the occurrence and fluctuation of ACP carrying *Ca. L. asiaticus* (Las +) in different regions and disease management types, psyllids collection were carried out in two periods: i) March 2015 to February 2016, when insects were collected from yellow stick cards in orchards with B/C management. The collections occurred in the regions of Avaré (SP), Santa Cruz do Rio Pardo (SP), Araraquara (SP) and Bebedouro (SP) and ii) March 2016 to March 2017, in farms with B/C management including Frutal (MG) and also samples from cards collected in farms with A management in the regions of Avaré (SP) and Araraquara (SP). Samples were collected every 15 days and the collected insects were analyzed for the presence of *Ca. L. asiaticus* by qPCR. The proportions of psyllids Las + from each region and period were compared by proportion test and spectral density analysis. The percentage of psyllids Las + per trap showed an increase in all regions between the months of autumn and winter and the estimated average Las + per trap increased in the months composing winter and spring. The proportion of psyllids Las + evaluated in the same region in different periods, although presenting a statistical difference only in Araraquara (December 2014 to May 2015) and Bebedouro (June to November 2016) indicated, on a recurring basis, the first semester with lower values, except for the regions of Santa Cruz do Rio Pardo and Araraquara from December 2014 to November 2015. Comparing both A and B+C managements, the A management properties showed significantly less ACP Las+ compared with B / C management. The spectral density analysis indicated that management areas A showed 50% less peaks of psyllids Las + than found in areas with management B/C.

Keywords: Greening, Asian citrus psyllid, huanglongbing, insect vector monitoring.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------------|---|----|
| Figura 1. | Regionais do Alerta Fitossanitário, com a indicação dos cartões adesivos amarelos georreferenciados utilizados para o monitoramento de <i>Diaphorina citri</i> , representados pelos pontos brancos, no período de março de 2015 a fevereiro de 2016..... | 7 |
| Figura 2. | Regionais de Araraquara (SP), Avaré (SP) e Frutal (SP e MG) e as respectivas posições dos cartões adesivos amarelos georreferenciados (pontos brancos) utilizados para o monitoramento de <i>Diaphorina citri</i> , no período de março de 2016 a março de 2017..... | 9 |
| Figura 3. | Avaliação da porcentagem de psilídeos com <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> entre a 1ª quinzena de março de 2015 e a 2ª quinzena de março de 2017 para Avaré e Araraquara; 1ª quinzena de março de 2015 até a 2ª quinzena de fevereiro de 2016 para Santa Cruz do Rio Pardo e Bebedouro; 1ª quinzena de março de 2016 a 2ª quinzena de março 2017 em Frutal..... | 18 |
| Figura 4. | Avaliação do número médio de psilídeos capturados por cartão entre a 1ª quinzena de março de 2015 e a 2ª quinzena de março de 2017 para Avaré e Araraquara; 1ª quinzena de março de 2015 até a 2ª quinzena de fevereiro de 2016 para Santa Cruz do Rio Pardo e Bebedouro; 1ª quinzena de março de 2016 a 2ª quinzena de março 2017 em Frutal..... | 19 |
| Figura 5. | Avaliação do número estimado de psilídeos com <i>Candidatus Libeirbacter asiaticus</i> entre a 1ª quinzena de março de 2015 e a 2ª quinzena de março de 2017 para Avaré e Araraquara; 1ª quinzena de março de 2015 até a 2ª quinzena de fevereiro de 2016 para Santa Cruz do Rio Pardo e Bebedouro; 1ª quinzena de março de 2016 a 2ª quinzena de março 2017 em Frutal..... | 20 |
| Figura 6. | Porcentagem de psilídeos com <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> entre a 2ª quinzena de março de 2016 e a 2ª quinzena de março de 2017 para Gavião Peixoto e Iaras..... | 22 |
| Figura 7. | Número médio de psilídeos capturados por cartão entre a 2ª quinzena de março de 2016 e a 2ª quinzena de março de 2017 para Gavião Peixoto e Iaras..... | 23 |
| Figura 8. | Número estimado de psilídeos com <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> por cartão entre a 2ª quinzena de março de 2016 e a 2ª quinzena de março de 2017 para Gavião Peixoto e Iaras..... | 24 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|------------------|--|----|
| Tabela 1. | Municípios que participam das regionais de Avaré (SP), Araraquara (SP), Bebedouro (SP) e Santa Cruz do Rio Pardo (SP) monitoradas pelo Alerta Fitossanitário e o número de cartões adesivos amarelos monitorados pelo Fundecitrus e pelos Produtores no Alerta Fitossanitário (2015/2016)..... | 8 |
| Tabela 2. | Municípios que participam das regionais de Avaré (SP), Araraquara (SP) e Frutal (MG) monitoradas pelo Alerta Fitossanitário e o número de cartões adesivos amarelos monitorados pelo Fundecitrus e pelos Produtores no Alerta Fitossanitário (2016/2017)..... | 10 |
| Tabela 3. | Períodos onde ocorreram comparações da proporção de psilídeos Las+ entre junho de 2014 a novembro de 2016 nas regiões de Avaré (SP), Araraquara (SP), Santa Cruz do Rio Pardo (SP) e Bebedouro (SP). “Sim” indica que ocorreu a comparação da proporção de psilídeos Las+ entre a região e o período. “Não” indica que não ocorreu a comparação da proporção de psilídeos Las+ entre a região e o período..... | 15 |
| Tabela 4. | Proporção de psilídeos <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> positivos (Prop. Las+) entre quatro períodos semestrais, de dezembro de 2014 a novembro de 2016 para as regiões de Avaré e Araraquara e proporção entre dois períodos semestrais, de dezembro de 2014 a novembro de 2015 para as regiões Santa Cruz do Rio Pardo e Bebedouro..... | 25 |
| Tabela 5. | Proporção de psilídeos <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> positivos entre as regiões de Avaré, Araraquara, Santa Cruz do Rio Pardo (Santa Cruz) e Bebedouro, nos quatro semestres entre junho de 2014 e novembro de 2016..... | 27 |
| Tabela 6. | Comparação da proporção de psilídeos positivos para <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> entre Iaras (manejo A) e Avaré (manejo B/C) e entre Gavião Peixoto (manejo A) e Araraquara (manejo B/C), entre março de 2016 e março de 2017..... | 28 |
| Tabela 7. | Número de picos principais da proporção de psilídeos portadores de <i>Candidatu. Liberibacter asiaticus</i> por ano entre março de 2016 e março de 2017 em propriedades de manejo A (Iaras e Gavião Peixoto) e B/C (Avaré e Araraquara)..... | 29 |

SUMÁRIO

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 1. | INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2. | MATERIAL E MÉTODOS..... | 7 |
| 2.1. | Regiões monitoradas e períodos de monitoramento..... | 7 |
| 2.2. | Descrição do monitoramento de <i>Diaphorina citri citri</i> e dos tipos de manejo.. | 11 |
| 2.3. | Porcentagem e proporção de psílídeos com <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> e número de adultos de <i>Diaphorina citri</i> capturados por período de avaliação e tipo de manejo..... | 11 |
| 2.4. | Coleta de <i>Diaphorina citri</i> para detecção de <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> | 12 |
| 2.5. | Extração de ácido desoxirribonucleico..... | 12 |
| 2.6. | Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)..... | 13 |
| 2.7. | Ocorrência de psílídeos com <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> em diferentes regiões e épocas do ano..... | 14 |
| 2.8. | Análise dos dados..... | 14 |
| 2.8.1. | Teste de proporção..... | 14 |
| 2.8.2. | Ciclos principais de ocorrência de <i>Diaphorina citri</i> em áreas com diferentes tipos de manejo | 15 |
| 3. | RESULTADOS..... | 16 |
| 3.1. | Porcentagem de psílídeos com <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> e número de psílídeos capturados por cartão em diferentes regiões e épocas do ano..... | 16 |
| 3.2. | Comparação da proporção de psílídeos com <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> entre diferentes épocas e regiões..... | 24 |
| 3.3. | Comparação da proporção de psílídeos com <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> em função do manejo do huanglongbing adotado nas propriedades em cada região..... | 28 |
| 3.4. | Frequência da proporção de psílídeos com <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> | 28 |
| 4. | DISCUSSÃO..... | 30 |
| 5. | CONCLUSÕES..... | 36 |
| | REFERÊNCIAS..... | 37 |
| | ANEXOS..... | 44 |

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor de laranja do mundo, seguido pelos Estados Unidos da América. No ano de 2017, a área plantada com laranja de todas as variedades no estado de São Paulo e Triângulo Mineiro, foi de 415.232 hectares, com uma produção na safra 2017/2018 de 398,35 milhões de caixas de 40,8 kg (Fundo de Defesa da Citricultura, 2017d, e). O estado de São Paulo lidera a produção nacional.

A diminuição da área plantada e da produção de laranjas se deve em grande parte a problemas fitossanitários. O grande desafio da citricultura mundial é a convivência com pragas e doenças que oneram o custo de produção, tornando-se um gargalo para a continuidade ou não do citricultor no setor. Estima-se que cerca de 40 milhões de árvores foram erradicadas na primeira década deste século (Neves et al., 2010). Dentre as pragas chave na citricultura, o Greening ou Huanglongbing (HLB) tem ganhado destaque pela agressividade que possui. O primeiro relato desta doença no mundo ocorreu na China, há mais de cem anos. Por provocar o amarelecimento da copa das plantas, recebeu o nome de huanglongbing, que em português significa doença do ramo amarelo (Reiking, 1919; Lin, 1956).

Os sintomas podem ser observados durante todo o ano, principalmente em momentos de maior estresse para a planta, como acontece no período do inverno. As folhas com sintomas da doença apresentam manchas irregulares, com áreas verde claras ou amareladas contrastando com o verde normal das folhas sadias (Ferreira, 2013). Quando os sintomas da doença estão em um estágio avançado, as nervuras encontram-se espessas e claras e o limbo corticoso. É comum que ocorra a desfolha e morte dos ramos afetados (Belasque Junior et al., 2009). Os frutos apresentam redução de tamanho, tortuosidade, além de espessamento do albedo e escurecimento da columela (Bassanezi et al., 2009; Bassanezi et al., 2011). Há queda precoce dos frutos em plantas sintomáticas e os que ficam retidos nos ramos doentes, apresentam grande impacto na qualidade, com acidez elevada e menor porcentagem de sólidos solúveis (Bassanezi et al., 2006). As sementes ficam menores e escuras quando comparadas às sementes de um fruto sadio (Bassanezi et al., 2011). De acordo com a legislação vigente, plantas com greening devem ser erradicadas do pomar.

O primeiro relato da doença no Brasil ocorreu no estado de São Paulo, em Araraquara, no ano de 2004 (Coleta-Filho et al., 2004). Atualmente a doença está presente em todas as regiões produtoras do estado de São Paulo, além de regiões no Paraná e Minas Gerais. Em 2018,

no estado de São Paulo e Triângulo Mineiro, aproximadamente 18% das laranjeiras apresentavam sintomas da doença (Fundo de Defesa da Citricultura, 2018).

O HLB é uma doença causada por bactérias gram-negativas, restritas ao floema dos hospedeiros (Garnier et al., 1984) pertencentes ao gênero *Candidatus Liberibacter* spp. O termo *Candidatus* define-se pelo fato destas bactérias ainda não terem sido cultivadas em meio de cultura (Sechler et al., 2009). Ocorrem no Brasil as espécies *Ca. L. asiaticus* (Las) e *Ca. L. americanus* (Lam) e na África a *Ca. L. africanus* (Bové et al., 2008; Coletta-Filho et al., 2004; Teixeira et al., 2005a, b; Teixeira et al., 2009), porém, nos pomares paulistas a espécie *Ca. L. asiaticus* é identificada com maior frequência (Teixeira et al., 2010). Existem outros organismos que induzem a mesma sintomatologia do HLB nas plantas, como é o caso dos fitoplasmas do grupo 16Sr IX (Teixeira et al., 2008b) ou do grupo III (Wulff et al., 2019) e também fitoplasmas do grupo I relatado por (Chen et al., 2009) na China. No México, ambos fitoplasmas foram relatados (Arratia-Castro et al., 2014; Wulff et al., 2015).

A transmissão da bactéria de uma planta doente para uma planta sadia ocorre principalmente através do psilídeo asiático dos citros *Diaphorina citri* (Bové, 2006; Yamamoto et al., 2006). Embora a doença tenha sido identificada nos pomares brasileiros no ano de 2004, o psilídeo asiático dos citros já havia sido relatado no Brasil em laranjeiras no Rio de Janeiro na década de 40 (Costa Lima, 1942). De maneira geral, o inseto não trazia grandes problemas para a citricultura até a chegada da bactéria. Na fase adulta, *D. citri* mede aproximadamente 2 a 3 mm de comprimento e vive em média 45 dias, podendo chegar até quatro meses (Gallo et al., 2002). Apresenta coloração acinzentada e possui asas transparentes com as bordas escuras. Uma característica do inseto bastante relevante é a posição de 45° em relação à superfície do broto durante a alimentação. Os hospedeiros naturais de *D. citri*, além do gênero *Citrus*, são as plantas do gênero *Murraya* e estão associados, geralmente, a ramos novos, onde colocam seus ovos de coloração amarelada e formato afilado, sendo mais grossos na base e mais finos na direção da sua extremidade distal (Artiles, 2017). A fase jovem é representada por cinco ínstar e não possuem capacidade de voo, com locomoção limitada aos brotos. Além disso, é achatada, com coloração amarelada e apresentam pernas curtas e um par de antenas (Hall et al., 2008; Nava et al., 2010; Yamamoto, 2008). No Brasil e na maioria dos países afetados pela doença e que têm *D. citri* como vetor, predomina a ocorrência de *Ca. L. asiaticus* (Halbert & Manjunath, 2004; Bové, 2006). A transmissão ainda pode ocorrer nos citros por meio de material vegetal infectado via enxertia e através de cuscuta (*Cuscuta* spp.). A bactéria apresenta uma distribuição bastante irregular nos tecidos das plantas, fato que pode ocasionar em resultados diagnósticos falsos-negativos durante análises de PCR (Sousa, 2009). Além das plantas cítricas, a espécie

Murraya paniculata (L.) Jack, conhecida como Murta e muito utilizada na arborização urbana, é um dos principais hospedeiros do psílídeo vetor.

Os fatores climáticos podem interferir na distribuição e população do inseto no espaço e no tempo (Paiva, 2009), afetando diretamente a sua biologia. Quem regula sua flutuação populacional bem como a sua oviposição são os fluxos vegetativos (Leal, 2009) (Anexo 1 e 2), que estão intimamente ligados aos fatores climáticos característicos de cada região. Sales, (2015) através de amostragens visuais identificou na região de Arthur Nogueira (SP), épocas onde não foram localizados adultos nas plantas (outono e inverno de 2013) e altas populações do inseto vetor nos meses que compõem o verão e primavera, do mesmo ano.

O inseto adulto se movimenta a curtas e longas distâncias por meio de vários voos curtos sequenciais ou de forma contínua através de correntes de ar, atingindo maiores distâncias (Ulian, 2016). Durante a dispersão de *D. citri* entre pomares comerciais e/ou plantas localizadas nos quintais de residências para pomares comerciais, nota-se que o inseto se concentra principalmente nas regiões externas dos pomares, ou seja, regiões que representam a bordadura da propriedade. Ulian (2016) encontrou uma incidência acumulada de plantas sintomáticas para HLB 2,8 vezes maior na região de bordadura do que na região interna do pomar, fato consequente da maior concentração de psílídeos nesta região. Por se tratar de um inseto vetor, não há possibilidades de se estabelecer um nível de controle para a tomada de ação, visto que com apenas um psílídeo há condições de ocorrer a transmissão da bactéria de uma planta doente para uma planta sadia (Belasque Junior et al., 2010a).

Algumas ações têm apresentado resultados positivos no controle da doença e também no controle do inseto vetor, como a inspeção e a eliminação de plantas cítricas doentes dentro e fora do pomar, o monitoramento e o controle rigoroso do vetor, de forma regional e conjunta (Bové, 2006). O monitoramento regional é muito importante, pois a incidência de HLB e a população de *D. citri* em uma área vizinha que não realiza manejo adequado podem interferir no progresso da doença em áreas próximas que atuam de forma efetiva no controle do vetor (Bassanezi et al., 2010, 2013).

O monitoramento de *D. citri* é realizado basicamente através de dois processos: a inspeção visual de brotos, visando encontrar as três fases do ciclo do inseto (ovo – ninfa e adulto) e a utilização de cartões adesivos amarelos instalados nas bordas dos talhões para o monitoramento de adultos (Sassi, 2016). A inspeção visual tem como principal objetivo checar se o controle do inseto através das pulverizações está ocorrendo de forma assertiva. Já o monitoramento através dos cartões identifica o momento e o local de entrada do inseto (Miranda

et al., 2011). Este último é mais preciso, pois proporciona uma maior captura de psilídeos (Santos et al., 2012).

O cartão adesivo amarelo atrai o inseto visualmente e por esse motivo o local de instalação na planta é de extrema importância: devem ser posicionados na bordadura dos talhões, visto que o inseto possui uma característica de entrada no pomar pela borda da propriedade ou dos talhões. A instalação deve contemplar todo o perímetro da propriedade e os cartões devem ser dispostos no terço superior da planta, local com maior intensidade de fluxos vegetativos. A distância entre um cartão e outro deve ser a menor possível, a fim de maximizar a eficiência de captura, mas deve levar em conta também a disponibilidade de mão de obra existente na propriedade, para que as trocas sejam feitas no máximo em intervalos de 15 dias (Miranda et al., 2011). O intervalo de troca e leitura dos cartões foi estudado por Sala (2013) e apontou que períodos superiores a 15 dias podem provocar a degradação do inseto no cartão adesivo, dificultando a visualização pelo inspetor, além de perda de eficiência do cartão, por redução na coloração e na quantidade de cola. Além disso, caso seja necessária a detecção de Las em psilídeos oriundos deste tipo de monitoramento, se mantidos por até 15 dias no cartão não há decréscimo na sensibilidade de detecção. Zanardi et al. (2018) através da utilização de feromônio sexual para atração do psilídeo macho, identificou uma maior capacidade de captura de psilídeos quando comparado com cartões adesivos sem a presença do feromônio, aumentando inclusive a captura de fêmeas, fato que pode estar relacionado com sinais químicos ou físicos produzidos por machos capturados nos cartões adesivos e não pela possibilidade do composto atrair ambos os sexos. A utilização desta descoberta e sua comercialização deverá trazer um aumento na captura de psilídeos, tornando o monitoramento mais eficaz.

Para a correta identificação dos psilídeos capturados nos cartões, os inspetores devem estar treinados e receberem reciclagens constantes. A incorreta avaliação pode levar a estimativas errôneas da população do inseto vetor. O treinamento periódico dos inspetores aumenta significativamente a acurácia da leitura dos cartões, tendo um ganho de cerca de 47% na detecção dos insetos quando comparado ao período anterior ao treinamento (Leonardo, 2014). A principal característica taxonômica a ser observada nos psilídeos capturados é a cor das asas: as anteriores são transparentes e possuem manchas escuras na borda (Gallo et al., 2002). Além disso, as leituras dos cartões quando realizadas no escritório apresentam maior acurácia em relação à leitura no campo (Leonardo, 2014).

Este monitoramento é de extrema importância na gestão do manejo do greening, pois levanta informações relevantes com relação à quantidade de psilídeos capturados em um determinado período de tempo. Além disso, pode indicar o momento de entrada do inseto na

propriedade e também em qual face da propriedade há uma maior recorrência na captura de psilídeos. Esta informação facilita no direcionamento para a identificação de possíveis fontes de inóculo nas áreas adjacentes às divisas da propriedade, como matas, chácaras, condomínios residenciais, pesqueiros, pomares mal manejados, entre outros, auxiliando nas ações externas. O número de psilídeos capturados nos cartões somados às fases vegetativas das plantas direciona o controle interno do vetor. Quando ocorre captura de psilídeos e são encontradas vegetações novas nos pomares, a proteção dessas plantas com inseticidas é indispensável e o intervalo de pulverização, bem como a escolha do inseticida a ser utilizado, também é direcionado por esses indicadores do monitoramento. Segundo Sala (2013), outro importante ponto a ser determinado é a frequência de indivíduos infectivos na população, ou seja, quantificar a presença de indivíduos que possuem a bactéria associada ao HLB.

O monitoramento do psilídeo e das fases vegetativas da planta de citros servem também como base de informações para o Sistema de Alerta Fitossanitário e Manejo Regional. Para um controle mais efetivo do HLB, sabe-se que somente a aplicação de inseticidas para controlar a população do vetor não é suficiente. Faz-se necessário um conjunto de outras ações. Dentro do que se preconiza no alerta fitossanitário e no manejo regional do HLB, os cartões adesivos geram os indicadores da flutuação populacional do inseto e o manejo regional atua em grandes áreas em um mesmo intervalo de tempo, com o objetivo de evitar ou diminuir psilídeos nas áreas tratadas.

No contexto de realizar o monitoramento de *D. citri*, o alerta fitossanitário foi criado pelo Fundecitrus no início do ano de 2009 com o monitoramento quinzenal de psilídeos em algumas regiões do estado de São Paulo (Sassi, 2016). Com o passar dos anos o alerta começou a ser realizado em áreas citrícolas com diferentes níveis de manejo do HLB, além do início do monitoramento dos fluxos vegetativos das plantas (Fundo de Defesa da Citricultura, 2017a) e emissão de alertas regionais de aplicação de inseticidas em conjunto quando da ocorrência de aumento na população do inseto e/ou dos picos de fluxos vegetativos. Atualmente, o alerta fitossanitário contempla treze regiões nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Paraná, cobrindo mais de 260 mil hectares com o uso de aproximadamente 28 mil cartões adesivos amarelos a cada quinzena (Fundo de Defesa da Citricultura, 2017b).

Diante do tempo em que a doença está presente nas áreas citrícolas de diversas regiões do mundo e do conhecimento adquirido sobre a mesma durante esse período, há fortes indícios que exista uma relação direta entre Liberibacterias e HLB (Teixeira et al., 2010; Wulff et al., 2019). Para a determinação da presença ou não da bactéria no inseto, o método mais utilizado é a extração de DNA de ambos, inseto e bactéria. Atualmente, a técnica de reação em cadeia de

polimerase (do inglês polymerase chain reaction – PCR) tem sido um método muito utilizado, pela sua especificidade e sensibilidade na detecção de patógenos presentes tanto em amostras vegetais como em insetos vetores (Sassi, 2016). A técnica se baseia na replicação de fragmentos específicos de DNA e no caso específico de diagnóstico de doenças, utilizando primers específicos para a detecção do patógeno (Cardinali, 2012).

Em algumas situações, principalmente no início das infecções, a técnica de PCR convencional não consegue diagnosticar a presença das Liberibacterias nos tecidos dos hospedeiros (Coletta-Filho et al., 2010). Nesse caso, é necessário o emprego de uma técnica que apresente maior sensibilidade no diagnóstico, requisito em que a técnica de qPCR (PCR em tempo real) atende e adicionalmente, permite a quantificação do patógeno no tecido amostrado do hospedeiro (Teixeira et al., 2008a ; Li et al., 2006). No processo de quantificação dos fragmentos de DNA e RNA, os valores de amplificação são lidos durante a fase exponencial das reações, fato que torna o processo mais rápido e com maior reprodutibilidade (Novais et al., 2004). O resultado do teste indica, para cada amostra, o número de ciclos (Ct – cycle threshold) necessários para a geração de fluorescência superior ao limiar de detecção da reação (threshold). O valor obtido de Ct indica, de modo inversamente proporcional, a quantidade de DNA alvo na amostra, ou seja, quanto maior a quantidade de DNA alvo na amostra, menor é o Ct indicado pelo teste (Tichopad et al., 2003; Sassi, 2016).

O presente trabalho tem por objetivo determinar a frequência de psilídeos portadores de *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las+) em áreas com diferentes intensidades de manejo, com o intuito de relacionar o tipo de manejo com a proporção de insetos Las+ e comparar a presença destes insetos entre diferentes regiões.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Regiões monitoradas e períodos de monitoramento

Durante os períodos de março de 2015 a fevereiro de 2016 a população de psilídeos contendo *Ca. L. asiaticus* foi monitorada quinzenalmente nas regiões de Avaré (SP), Araraquara (SP), Bebedouro (SP) e Santa Cruz do Rio Pardo (SP), nos locais indicados pelos pontos brancos na Figura 1. Para isso, foram selecionados cartões adesivos amarelos compreendidos no âmbito do Sistema de Alerta Fitossanitário. Cada uma das regiões amostradas abrange pelo menos 20 municípios com propriedades citrícolas (Tabela 1).

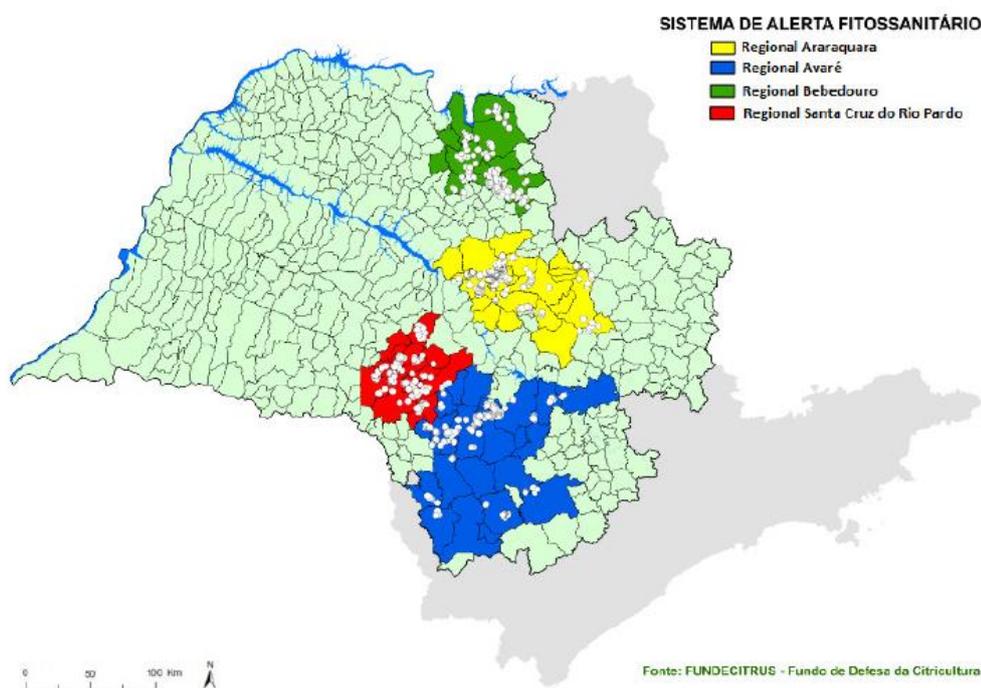


Figura 1. Regionais do Alerta Fitossanitário, com a indicação dos cartões adesivos amarelos georreferenciados utilizados para o monitoramento de *Diaphorina citri*, representados pelos pontos brancos, no período de março de 2015 a fevereiro de 2016.

Os dados da dissertação de Sassi (2016), representando avaliação de psilídeos Las+ entre fevereiro de 2014 e fevereiro de 2015 foram incluídos nas análises com intuito de se conseguir um maior período de amostragem e realizar análises com períodos semestrais (vide item-3.8).

Tabela 1. Municípios que participam das regionais de Avaré (SP), Araraquara (SP), Bebedouro (SP) e Santa Cruz do Rio Pardo (SP) monitoradas pelo Alerta Fitossanitário e o número de cartões adesivos amarelos monitorados pelo Fundecitrus e pelos produtores no Alerta Fitossanitário (2015/2016).

| Regional | Municípios | Número médio de cartões monitorados pelo Fundecitrus | Número médio de cartões monitorados pelos Produtores |
|------------------------------|---|---|---|
| Avaré (SP) | Angatuba, Anhembi, Arandú, Avaré, Borebi, Botucatu, Buri, Capão Bonito, Cerqueira Cesar, Cesário Lange, Coronel Macedo, Iaras, Itaberá, Itaí, Itapetininga, Itapeva, Itatinga, Lençóis Paulista, Manduri, Pardinho, Piracicaba, Pratânia, Santa Maria da Serra, São Manuel, São Miguel Arcanjo, Taquarituba, Taquarivaí e Tatuí | 294 | 2840 |
| Araraquara (SP) | Américo Brasiliense, Analândia, Araraquara, Bariri, Boa Esperança do Sul, Brotas, Gavião Peixoto, Ibaté, Ibitinga, Itaju, Itirapina, Luís Antonio, Matão, Motuca, Nova Europa, Ribeirão Bonito, Rincão, São Carlos, São Simão, Tabatinga e Trabiçu | 343 | 1860 |
| Bebedouro (SP) | Barretos, Bebedouro, Cajobi, Colina, Embaúba, Guapiaçu, Monte Azul Paulista, Novais, Olímpia, Paraíso, Pirangí, Severínia, Tabapuã, Taiuva, Taquaral, Viradouro e Vista Alegre do Alto | 260 | 4498 |
| Santa Cruz do Rio Pardo (SP) | Águas de Santa Bárbara, Agudos, Alvinlândia, Cabrália Paulista, Duartina, Espírito Santo do Turvo, Fernão, Gália, Lucianópolis, Lupércio, Ocaçu, Óleo, Paulistânia, Piratininga, Santa Cruz do Rio Pardo, São Pedro do Turvo e Ubirajara | 186 | 1792 |

Entre o período de março de 2016 e março de 2017, foram coletados psilídeos de cartões das regionais de Araraquara (SP), Avaré (SP) e Frutal (MG). Para cada cartão adesivo em que psilídeos foram coletados, tomou-se nota do manejo adotado na propriedade (Figura 2).

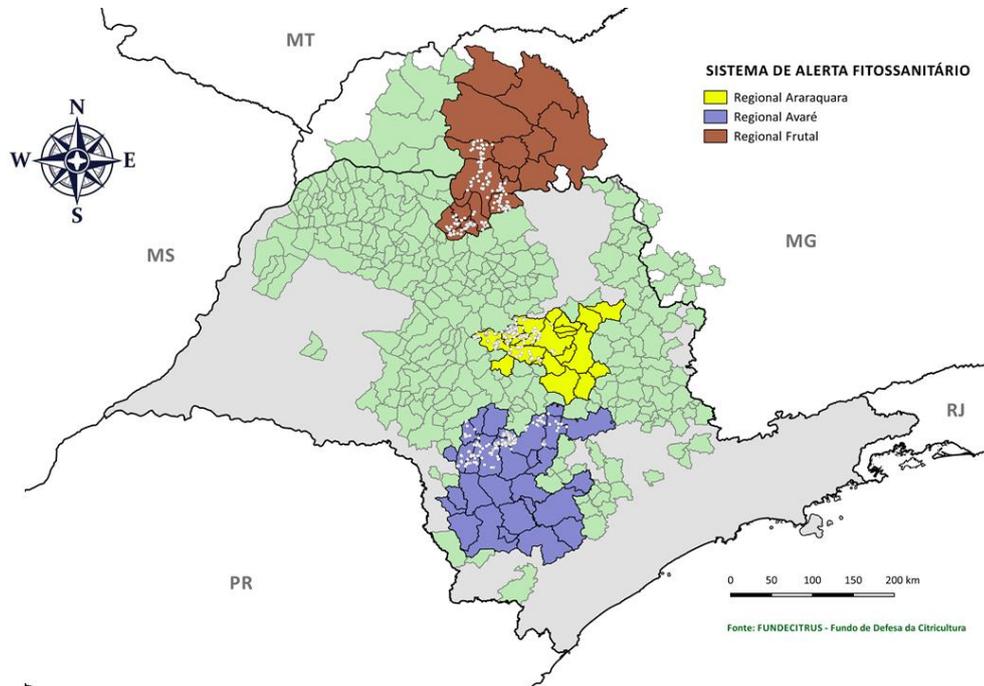


Figura 2. Regionais de Araraquara (SP), Avaré (SP) e Frutal (SP e MG) e as respectivas posições dos cartões adesivos amarelos georreferenciados (pontos brancos) utilizados para o monitoramento de *Diaphorina citri*, no período de março de 2016 a março de 2017.

Foram avaliados cartões adesivos monitoradas pelo Fundecitrus e por produtores dentro do sistema de Alerta Fitossanitário. Cada uma das regiões amostradas abrange pelo menos 20 municípios com propriedades citrícolas (Tabela 2).

Dentro de cada região, os municípios em que foram coletados insetos adultos de *D. citri* em propriedades que adotam o manejo do greening de forma similar estão identificados na Tabela 2.

Tabela 2. Municípios que participam das regionais de Avaré (SP), Araraquara (SP) e Frutal (MG) monitoradas pelo Alerta Fitossanitário e o número de cartões adesivos amarelos monitorados pelo Fundecitrus e pelos produtores no Alerta Fitossanitário (2016/2017)

| Regional | Municípios ^a | Número médio de cartões monitorados pelo Fundecitrus | Número médio de cartões monitorados pelos Produtores |
|------------------|--|--|--|
| Avaré (SP) | Angatuba, Anhemi , Arandú , Avaré , Borebi, Botucatu , Buri, Capão Bonito, Cerqueira Cesar , Cesário Lange, Coronel Macedo, Iaras , Itaberá, Itaí, Itapetininga, Itapeva, Itatinga, Lençóis Paulista, Manduri, Pardinho, Piracicaba, Pratânia , Santa Maria da Serra, São Manuel, São Miguel Arcanjo, Taquarituba, Taquarivaí e Tatuí | 213 | 3148 |
| Araraquara (SP) | Américo Brasiliense, Analândia, Araraquara , Bariri, Boa Esperança do Sul , Brotas, Gavião Peixoto , Ibaté, Ibitinga , Itápolis , Itaju, Itirapina, Luís Antonio, Matão , Motuca, Nova Europa , Ribeirão Bonito, Rincão, São Carlos, São Simão, Tabatinga e Trabiçu | 221 | 1678 |
| Frutal (SP e MG) | Água Comprida, Altair , Campina Verde, Campo Florido, Colômbia , Comendador Gomes , Conceição das Alagoas, Fronteira, Frutal , Guaraci , Icém , Itapagipe, Ituiutaba, Monte Alegre de Minas, Nova Granada , Onda Verde , Palestina, Pirajuba, Planura , Prata, São Francisco de Sales, Uberaba, Uberlândia e Veríssimo. | 188 | 3284 |

^a Em negrito municípios com coletas de amostras de *Diaphorina citri* no período de março de 2016 a março de 2017.

2.2. Descrição do monitoramento de *Diaphorina citri* e dos tipos de manejo

O monitoramento de *D. citri* foi realizado com o auxílio de cartões adesivos amarelos. Os cartões foram posicionados nas bordas dos talhões, no terço superior da copa das plantas (onde os fluxos vegetativos são mais intensos), voltadas para o carreador, onde a possibilidade do inseto aterrissar é maior.

Os cartões adesivos amarelos foram instalados em propriedades com diferentes tipos de manejo do HLB e de *D. citri*:

- Propriedades com Manejo A: propriedades que realizam pelo menos quatro inspeções de plantas sintomáticas durante o ano e erradicam todas as plantas sintomáticas detectadas. Além disso, realizam um controle rigoroso do inseto vetor com aplicações de inseticidas.
- Propriedades com Manejo B: propriedades que realizam somente o controle do inseto vetor do HLB com aplicações de inseticidas. Não erradicam plantas com sintomas da doença.
- Propriedade Sem Manejo (Manejo C): propriedades que não realizam o manejo do HLB e seu inseto vetor de forma efetiva, ou seja, não realizam pulverizações com inseticidas, não inspecionam os talhões periodicamente e tampouco erradicam as plantas sintomáticas.

2.3. Porcentagem e proporção de psílídeos com *Candidatus Liberibacter asiaticus* e número de adultos de *Diaphorina citri* capturados por período de avaliação e por tipo de manejo

A proporção de psílídeos com *Ca. L. asiaticus* após as análises de qPCR e o número de insetos capturados foram obtidos para cada quinzena de avaliação e para cada região. A proporção de psílídeos com *Ca. L. asiaticus* foi obtida dividindo-se o número de insetos comprovadamente positivos para Las pelo número total de insetos capturados. A multiplicação do valor obtido por 100 resultou na obtenção da porcentagem de psílídeos com *Ca. L. asiaticus*, variável também utilizada para comparação entre as diferentes regiões, tipos de manejo e períodos de avaliação.

As coletas e as avaliações ocorreram em duas etapas: i) entre março de 2015 a fevereiro de 2016 para os cartões adesivos amarelos com coletas em áreas de manejo menos rigoroso do inseto vetor (B e C); e ii) de março de 2016 a março de 2017, no qual avaliou-se

separadamente insetos capturados em áreas com manejo mais intenso do vetor (manejo A) e em áreas com manejo menos rigoroso (manejo B) e sem manejo (manejo C). Portanto, comparando-se manejo A contra B/C.

As áreas com o controle do vetor (manejo A e manejo B) e onde teoricamente existiram pulverizações de inseticidas não receberam auditorias durante o período das avaliações, afim de se confirmar a veracidade nos intervalos das aplicações de inseticidas. Assim, embora a classificação entre os manejos A, B e C tenha sido inferida no momento que a propriedade aderiu ao alerta fitossanitário, os dados coletados são amostrais, sem delineamento experimental.

2.4. Coleta de *Diaphorina citri* para detecção de *Candidatus Liberibacter asiaticus*.

A coleta dos psilídeos nos cartões adesivos amarelos ocorreu a cada 15 dias. A fim de se obter uma amostragem padrão dos insetos capturados durante a quinzena, no máximo dois psilídeos por cartão limitando-se a 50 psilídeos coletados e analisados por quinzena e por região. Os insetos foram retirados dos cartões adesivos amarelos com auxílio de uma pinça. Após as coletas, os insetos foram armazenados individualmente em tubos de 1,5 mL, contendo 100 µL de etanol 70% para conservá-los. As análises para detecção de Las foram realizadas no laboratório de Pesquisa e Diagnose do Fundecitrus, em Araraquara, SP. No laboratório, os insetos foram armazenados a – 20° C até o momento da extração do DNA.

2.5. Extração de ácido desoxirribonucleico

A extração do DNA a partir das amostras de psilídeos coletados no campo foi realizada seguindo o método do CTAB (Murray & Thompson, 1980). Os insetos foram macerados com o auxílio de pistilo em 400 µL de tampão de extração (CTAB – 2,0%, NaCl – 8,2%, PVP 10000 – 2,0%, Tris 0,01 M pH 8,0 e EDTA 0,05 M pH 8,0) contendo 0,2% de β-mercaptoetanol. Posteriormente, as amostras foram levadas à incubação por 30 minutos em banho maria, a 65° C seguida de centrifugação a 960 g durante 5 minutos. Do sobrenadante, foram retirados 300 µL e adicionados 350 µL de clorofórmio:álcool isoamil, retornando as amostras para centrifugação a uma rotação de 15.300 g por 10 minutos. Novamente foi retirado 300 µL do sobrenadante e adicionado 180 µL de isoparopanol para a precipitação do DNA por meio de incubação a -20° C por 30 minutos. Os tubos foram submetidos novamente a centrifugação a 15.300 g por 20 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado que restou (DNA

concentrado) foi limpo com 700 µL de álcool 70% e centrifugado a 15.300 g por mais 10 minutos. Após a centrifugação, as amostras passaram por 5 minutos no 'speed' vácuo para secagem e foram ressuspensas em 25 µL em água deionizada, autoclavada purificada em sistema Milli-Q.

2.6. Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)

Para a detecção de DNA da bactéria *Ca. L. asiaticus* nas amostras de psilídeos coletados, utilizou-se a técnica de PCR em tempo real (qPCR), por ser considerada mais sensível que a PCR convencional na detecção da bactéria (Li et al., 2006; Teixeira et al., 2008a). Com base na técnica desenvolvida por Li et al. (2006) para detecção de Las foram utilizados oligonucleotídeos e sonda com base na região do DNA ribossomal 16S (DNAr 16S). Utilizou-se 3 µL da amostra de DNA para cada reação de qPCR, 6 µL de Path ID Master Mix (Ambion), 0,5 µM dos primers HLBas: 5' TCGAGCGCGTATGCAATACG 3' (forward) e HLBr: 5' GCGTTATCCCGTAGAAAAAGGTAG 3' (reverse), 0,2 µM da sonda HLBp: FAM-AGACGGGTGAGTAACGCG-MGB-NFQ. A detecção simultânea do DNA de psilídeos foi possível pelo emprego dos oligonucleotídeos e sonda específicos: 0,35 µM dos primers DCF 5' TGGTGTAGATGGTTGTGATCTGATGTG 3' (forward) e DCR 5' ACCGTTCCACGACGGTGA 3' (reverse) e 0,15 µM de sonda DCP VICTGTGGGCGAGGCTACAGAAC- MGB-NFQ (Manjunath et al., 2008) em volume final de reação de 12 µL.

O processo de qPCR iniciou com a desnaturação por 10 minutos a 95 °C seguidos de 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C e 45 segundos a 58 °C para anelamento e extensão. Como controle foram utilizadas amostras de DNA extraído de *D. citri* sabidamente positivos para Las como controle positivo, amostras de DNA extraído de *D. citri* criado em murta (*Murraya sp.*) sadia como controle negativo para Las- e água autoclavada e purificada como "branco" da reação. As amostras e os controles foram amplificados em termocicladores StepOnePlus (Applied Biosystem).

Para a confirmação da presença de DNA de *D. citri* nas amostras foi observado o valor de Ct até 36,0 para a sonda DCP, sendo excluídas das avaliações as amostras que resultaram em valores acima de Ct 36,0. Com relação as amostras portadoras de Las, foi observado o valor de Ct até 35,0, para a sonda HLBp (Sala, 2013).

2.7. Ocorrência de psilídeos com *Candidatus Liberibacter asiaticus* em diferentes regiões e épocas do ano.

Com o propósito de identificar os momentos onde existiam maiores populações de psilídeos portando a bactéria e conseqüentemente maior possibilidade de novas infecções, períodos de avaliação foram divididos em dois subperíodos de 6 meses cada. O primeiro subperíodo foi de junho até novembro e o segundo de dezembro até maio, pois coincidem com épocas de maior fluxo vegetativo (V1, V2 e V3) e conseqüentemente maior captura de psilídeos, segundo dados do Alerta Fitossanitário (Anexo 1 e 2). Devido a esta divisão, as regiões de Santa Cruz do Rio Pardo e Bebedouro continham somente resultados de dezembro de 2014 a novembro de 2015 e para as regiões de Avaré e Araraquara, de dezembro de 2014 a novembro de 2016. Para cada período foram calculadas as proporções de insetos Las+ em relação ao número total de amostras analisadas.

2.8. Análise dos dados

2.8.1 Teste de proporção

Para cada subperíodo foi calculada a proporção de psilídeos Las positivos em relação ao total de psilídeos coletados. Em seguida, dentro dos subperíodos estabelecidos de junho a novembro e dezembro a maio de cada período de avaliação, as regiões de Avaré (SP), Araraquara (SP), Santa Cruz do Rio Pardo (SP) e Bebedouro (SP) foram comparadas por teste de proporção a 5% para os períodos descritos na Tabela 3. Para a comparação ‘manejo A *versus* manejo B/C’, foram utilizadas amostras coletadas no período de março de 2016 a março de 2017.

Tabela 3. Períodos onde ocorreram comparações da proporção de psilídeos Las+ entre junho de 2014 a novembro de 2016 nas regiões de Avaré (SP), Araraquara (SP), Santa Cruz do Rio Pardo (SP) e Bebedouro (SP). “Sim” indica que ocorreu a comparação da proporção de psilídeos Las+ entre a região e o período. “Não” indica que não ocorreu a comparação da proporção de psilídeos Las+ entre a região e o período.

| Período/Região | Avaré | Araraquara | Santa Cruz do Rio Pardo | Bebedouro |
|----------------------------|-------|------------|-------------------------|-----------|
| Junho 2014 a novembro 2014 | Sim | Sim | Sim | Sim |
| Dezembro 2014 a maio 2015 | Sim | Sim | Sim | Sim |
| Junho 2015 a novembro 2015 | Sim | Sim | Sim | Sim |
| Dezembro 2015 a maio 2016 | Sim | Sim | Não | Não |
| Junho 2016 a novembro 2016 | Sim | Sim | Não | Não |

2.8.2 Ciclos principais de ocorrência de *Diaphorina citri* em áreas com diferentes tipos de manejo

Para comparar a frequência de ocorrência dos principais picos populacionais de *D. citri* entre regiões com diferentes tipos de manejos (manejo A *versus* manejo B e C), utilizou-se dados de propriedades com manejo B/C das regiões de Avaré (SP) e Araraquara (SP) e para propriedades com manejo A, utilizou-se dados de propriedades localizadas em dois municípios, Iaras (SP) e Gavião Peixoto (SP), as quais foram comparadas com os dados de manejo B/C de Avaré (SP) e Araraquara (SP), respectivamente, devido à proximidade entre as propriedades

Durante o período de avaliação março de 2016 a março de 2017 foram obtidas séries temporais da proporção de psilídeos Las positivos em relação ao total de psilídeos coletados em cada data de avaliação. Essas séries temporais foram submetidas a análises espectrais. Tais análises se baseiam em funções trigonométricas e identificam a frequência de ocorrência dos principais picos da série temporal (Chatfield, 2004) ‘proporção de psilídeos Las+’ para o presente estudo. Para aplicar essa análise, as séries foram transformadas para eliminar os ruídos, tendências e sinais não-estacionários. Como resultado da análise, o pico populacional de *D. citri* mais importante gerado pelo periodograma é considerado o mais importante do fenômeno estudado (Chatfield, 2004), indicando para cada uma das regiões, com que frequência, em dias, ocorreram os picos principais de psilídeos Las+.

3. RESULTADOS

3.1. Porcentagem de psilídeos com *Candidatus Liberibacter asiaticus* e número de psilídeos capturados por cartão em diferentes regiões e épocas do ano.

As regiões de Avaré (SP) e Santa Cruz do Rio Pardo (SP) e as regiões de Araraquara (SP) e Bebedouro (SP) se comportaram de forma semelhante entre si, com relação à porcentagem de psilídeos positivos para *Ca. L. asiaticus* entre março de 2015 e março de 2016, com uma tendência similar entre as regiões. As porcentagens de psilídeos Las+ aumentaram gradativamente no outono, atingindo índices superiores a 80%. No inverno, a queda na porcentagem de psilídeos Las+ foi marcante nas regiões de Araraquara e Bebedouro e menos acentuada nas regiões de Avaré e Santa Cruz do Rio Pardo. Na primavera esta tendência de queda continuou em todas as regiões, atingindo os menores índices no período na região de Araraquara e Bebedouro e posteriormente na região de Avaré e Santa Cruz do Rio Pardo. O verão foi a estação mais discrepante entre as regiões, intercalando porcentagens baixas e altas em Avaré e Santa Cruz do Rio Pardo, porcentagens estáveis em Araraquara e aumentos na região de Bebedouro. Neste período, a porcentagem média de psilídeos Las+ foi de 69,7% em Avaré, 70,3% em Santa Cruz do Rio Pardo, 63,9% em Araraquara e 62,3% em Bebedouro. Entre março de 2016 a março de 2017, observou-se aumento na porcentagem de psilídeos Las+ no início do outono para as regiões de Avaré, Araraquara e Frutal (SP e MG). Já no começo do inverno, a porcentagem decaiu de forma mais marcante na região de Frutal, e em Avaré e Araraquara entre os meses de primavera e verão. A região de Frutal teve a menor média de psilídeos Las+, 33,1%, seguido de Araraquara, 71,8% e Avaré, 73,7% (Figura 3).

De maneira geral, as porcentagens de psilídeos Las+ se mantiveram elevadas durante os meses que compõem o outono e inverno (meados de março a início de setembro) e mais baixas nos meses que compõem a primavera e verão (meados de setembro a início de março).

Em relação ao número médio de psilídeos capturados por cartão adesivo amarelo, as regiões de Avaré, Santa Cruz do Rio Pardo, Araraquara e Bebedouro apresentaram flutuação similar no período de março de 2015 a março de 2016 (Figura 4). No outono ocorreu uma queda gradativa no número de psilídeos/cartão nas regiões citadas, sendo mais expressiva na região de Araraquara, que saiu de aproximadamente 0,36 psilídeos/cartão para 0,07 psilídeos/cartão. Avaré, Santa Cruz do Rio Pardo e Araraquara tiveram aumento no índice médio de psilídeos/cartão em meados do inverno e na região de Bebedouro este aumento ocorreu mais

tarde, meados da primavera. Neste momento, a região de Araraquara atingiu o maior índice do período, com valor médio de 0,44 psilídeos/cartão. No final da primavera, para as quatro regiões, o índice caiu novamente e se manteve baixo durante todo o verão, com valores médios abaixo de 0,1 psilídeos/cartão. A região que apresentou o maior índice médio de psilídeos/cartão durante todo o período avaliado foi Araraquara (0,14), seguido de Santa Cruz do Rio Pardo (0,1), Avaré (0,05) e Bebedouro (0,02). No período de março de 2016 a março de 2017, as regiões de Avaré e Araraquara se comportaram de forma similar. A região de Araraquara iniciou aumento na média de psilídeos/cartão antes que Avaré, em meados de outono e, entre inverno e primavera, as duas regiões tiveram um pico no índice, chegando a 0,44 psilídeos/cartão em Araraquara e 0,34 psilídeos/cartão em Avaré. A região de Frutal registrou um aumento médio de psilídeos/cartão entre o inverno e a primavera, porém, de forma bem menos expressiva que nas outras regiões, pois obteve um número médio de psilídeos/cartão no período igual a 0,05. A maior média de psilídeos/cartão encontrada no período foi na região de Araraquara (0,2), seguido da região de Avaré (0,1). De maneira geral, os números médios do índice avaliado aumentaram nos meses que compõem as estações de inverno e primavera (Figura 4).

Entre março de 2015 a março de 2016, as médias de psilídeos Las+/cartão acompanharam a mesma tendência das médias de psilídeos/cartão nas regiões de Avaré, Santa Cruz do Rio Pardo e Bebedouro. Na região de Araraquara, entre o inverno e a primavera, a média estimada de psilídeos Las+/cartão ficou abaixo das médias encontradas para psilídeos/cartão. De maneira geral, a região de Bebedouro apresentou o menor valor médio estimado de psilídeos Las+/cartão (0,01). O maior valor médio encontrado foi na região de Araraquara (0,08), seguido de Santa Cruz do Rio Pardo (0,07) e Avaré (0,03). No período de março de 2016 a março de 2017, as tendências da estimativa de psilídeos Las+/cartão foram as mesmas para as regiões de Avaré, Araraquara e Frutal, quando comparadas com as médias de psilídeos/cartão. Somente na região de Frutal, na primavera, a média de psilídeos/cartão apresentou um pico maior que a estimativa de psilídeos Las+/cartão (Figura 5).

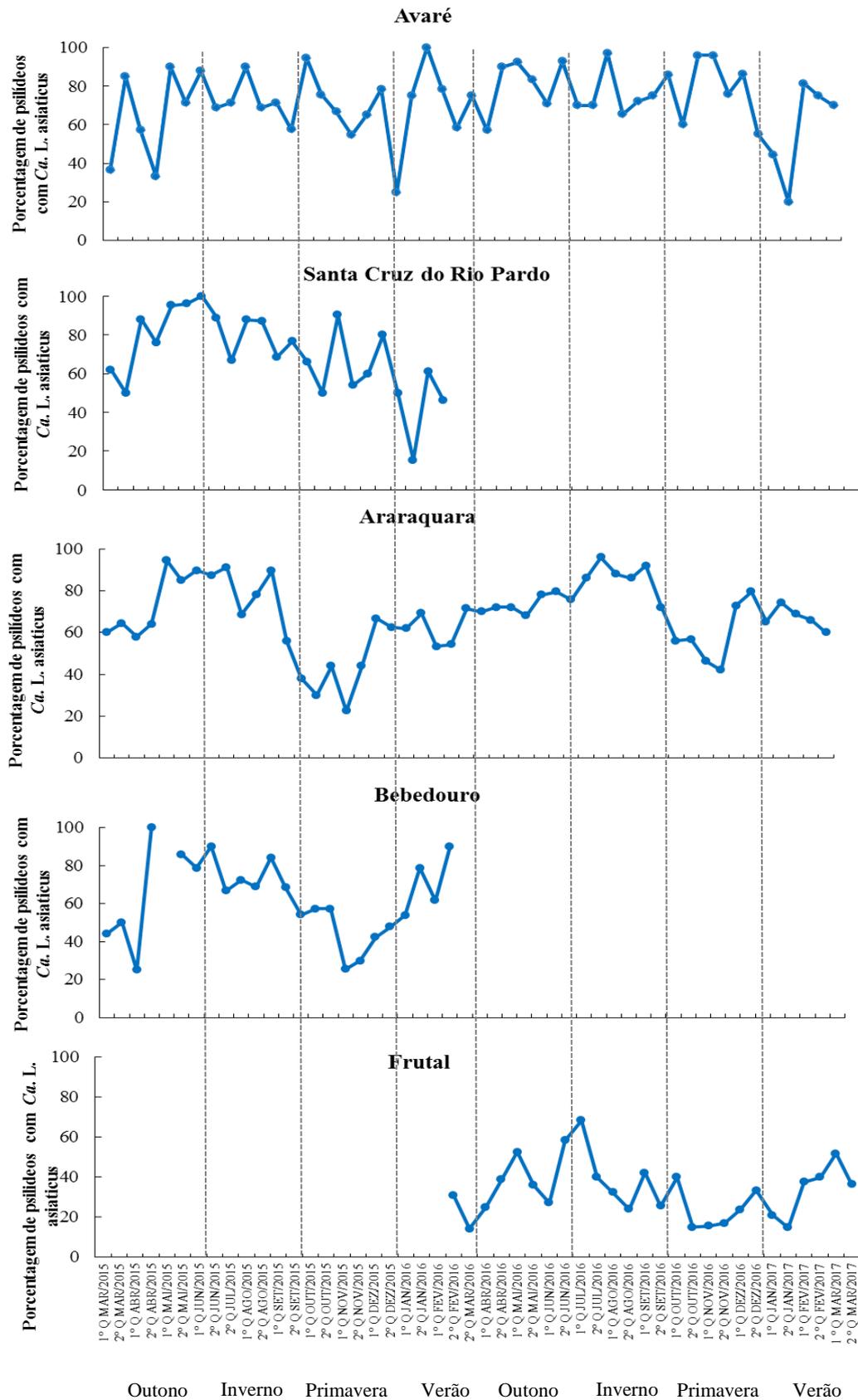


Figura 3. Avaliação da porcentagem de psilídeos com *Candidatus Liberibacter asiaticus* entre a 1ª quinzena de março de 2015 e a 2ª quinzena de março de 2017 para Avaré e Araraquara; 1ª quinzena de março de 2015 até a 2ª quinzena de fevereiro de 2016 para Santa Cruz do Rio Pardo e Bebedouro; 1ª quinzena de março de 2016 a 2ª quinzena de março de 2017 em Frutal.

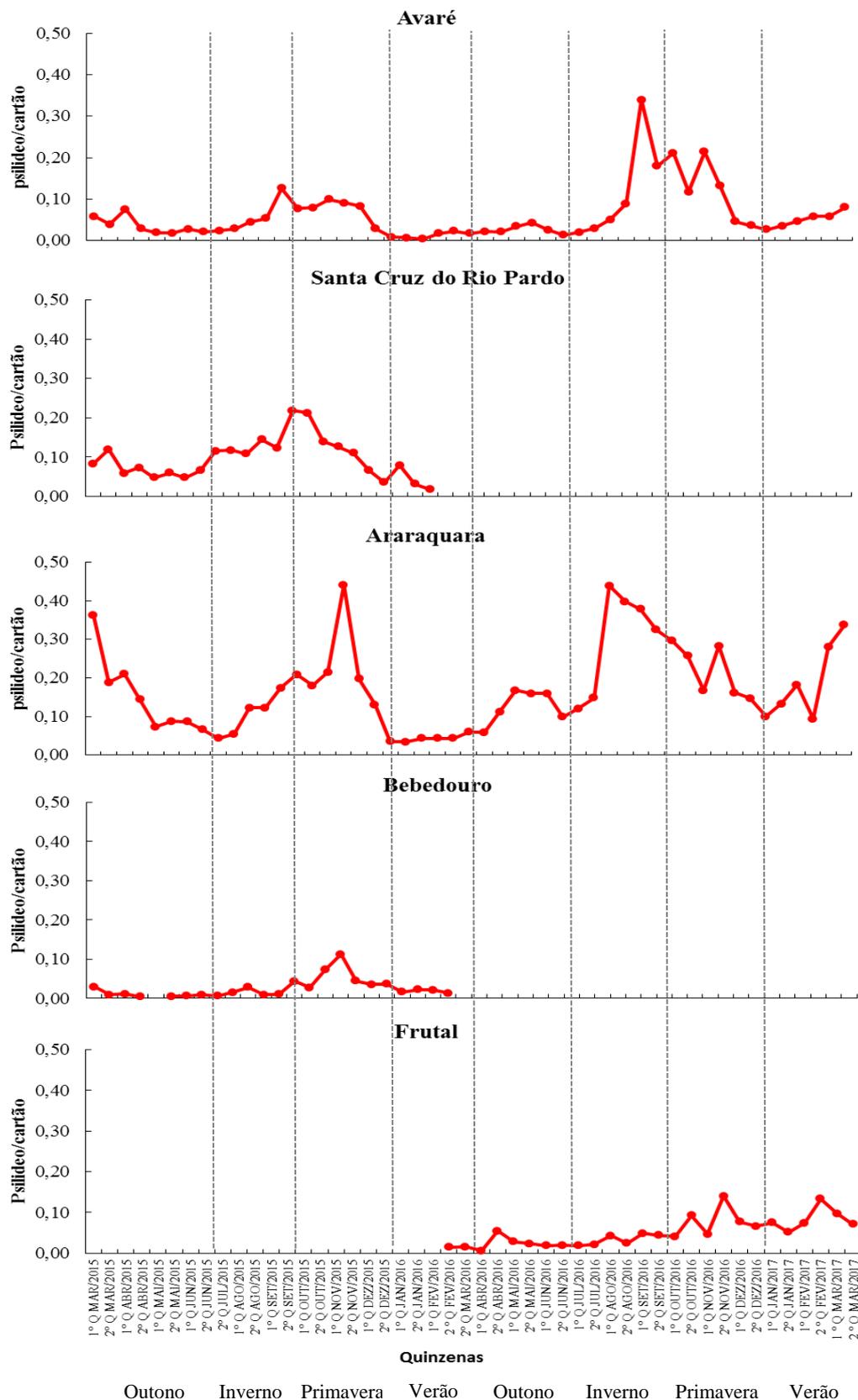


Figura 4. Avaliação do número médio de psilídeos capturados por cartão entre a 1ª quinzena de março de 2015 e a 2ª quinzena de março de 2017 para Avaré e Araraquara; 1ª quinzena de março de 2015 até a 2ª quinzena de fevereiro de 2016 para Santa Cruz do Rio Pardo e Bebedouro; 1ª quinzena de março de 2016 a 2ª quinzena de março 2017 em Frutal.

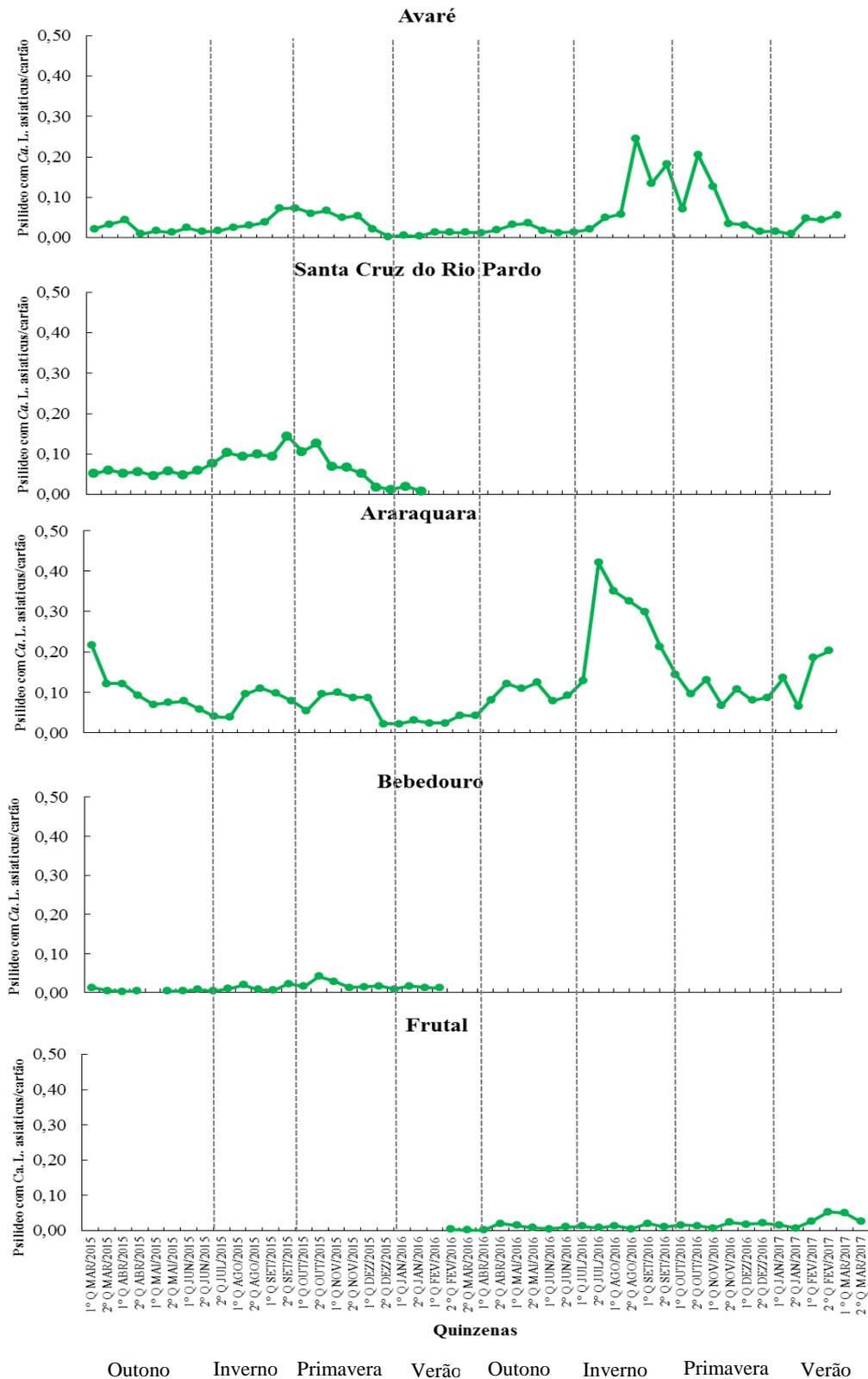


Figura 5. Avaliação do número estimado de psilídeos com *Candidatus Liberibacter asiaticus* entre a 1ª quinzena de março de 2015 e a 2ª quinzena de março de 2017 para Avaré e Araraquara; 1ª quinzena de março de 2015 até a 2ª quinzena de fevereiro de 2016 para Santa Cruz do Rio Pardo e Bebedouro; 1ª quinzena de março de 2016 a 2ª quinzena de março de 2017 em Frutal.

Nos locais de coletas de psilídeos no manejo A entre março de 2016 e março de 2017, a flutuação da porcentagem de psilídeos Las+ para as regiões de Gavião Peixoto (SP) e Iaras (SP) foram parecidas, porém Iaras apresentou uma porcentagem média de psilídeos Las+ maior que Gavião Peixoto, 65,3% e 57,9%, respectivamente. Na primavera, a porcentagem de psilídeos Las+ caiu para um dos menores índices do período na área de Iaras (33,3%) (Figura 6). Essa tendência de queda também foi observada na primavera de 2015 na regional de Avaré (Figura 5), região onde o município de Iaras está inserido. Porém, na primavera em Gavião Peixoto houve um dos maiores índices do período. A área de Gavião Peixoto (SP) apresentou uma média de psilídeos Las+/cartão 11,3% menor que a região de Araraquara, quando comparado manejo A contra manejo B/C, enquanto em Iaras, o índice de psilídeos Las+/cartão foi 15% menor do que o índice encontrado nos cartões presentes em áreas de manejo B/C na região de Avaré.

Em relação ao número médio de psilídeos/cartão e estimativa de psilídeos Las+/cartão, a flutuação dos valores encontrados ao longo do período de março de 2016 a março de 2017 foram parecidas para as localidades de Gavião Peixoto e Iaras. Na primavera, em Iaras, a média estimada de psilídeos Las+/cartão não acompanhou o aumento ocorrido no índice psilídeos/cartão. Os maiores índices de psilídeos/cartão foram encontrados no inverno em ambos os locais, 0,44 psilídeos/cartão na primeira quinzena de agosto para Gavião Peixoto (SP) e 0,34 psilídeos/cartão na primeira quinzena de setembro para Iaras (Figura 7) e nesta mesma estação encontrou-se o segundo maior índice de psilídeo Las+/cartão na primeira quinzena de agosto para Gavião Peixoto e o maior índice para a região de Iaras na primeira quinzena de setembro (0,26 e 0,25, respectivamente) (Figura 8).

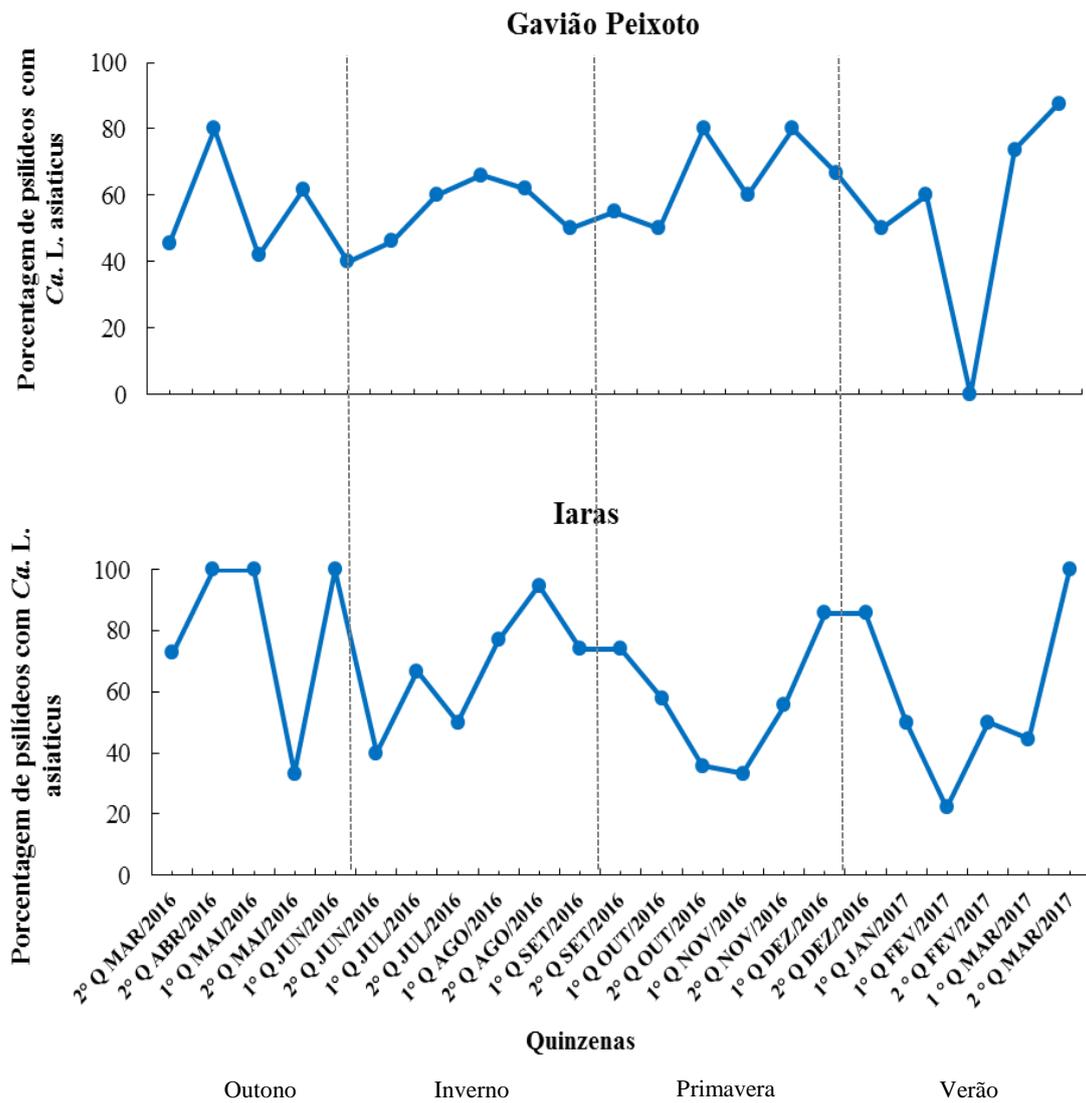


Figura 6. Porcentagem de psilídeos com *Candidatus Liberibacter asiaticus* entre a 2ª quinzena de março de 2016 e a 2ª quinzena de março de 2017 para Gavião Peixoto e Iaras.

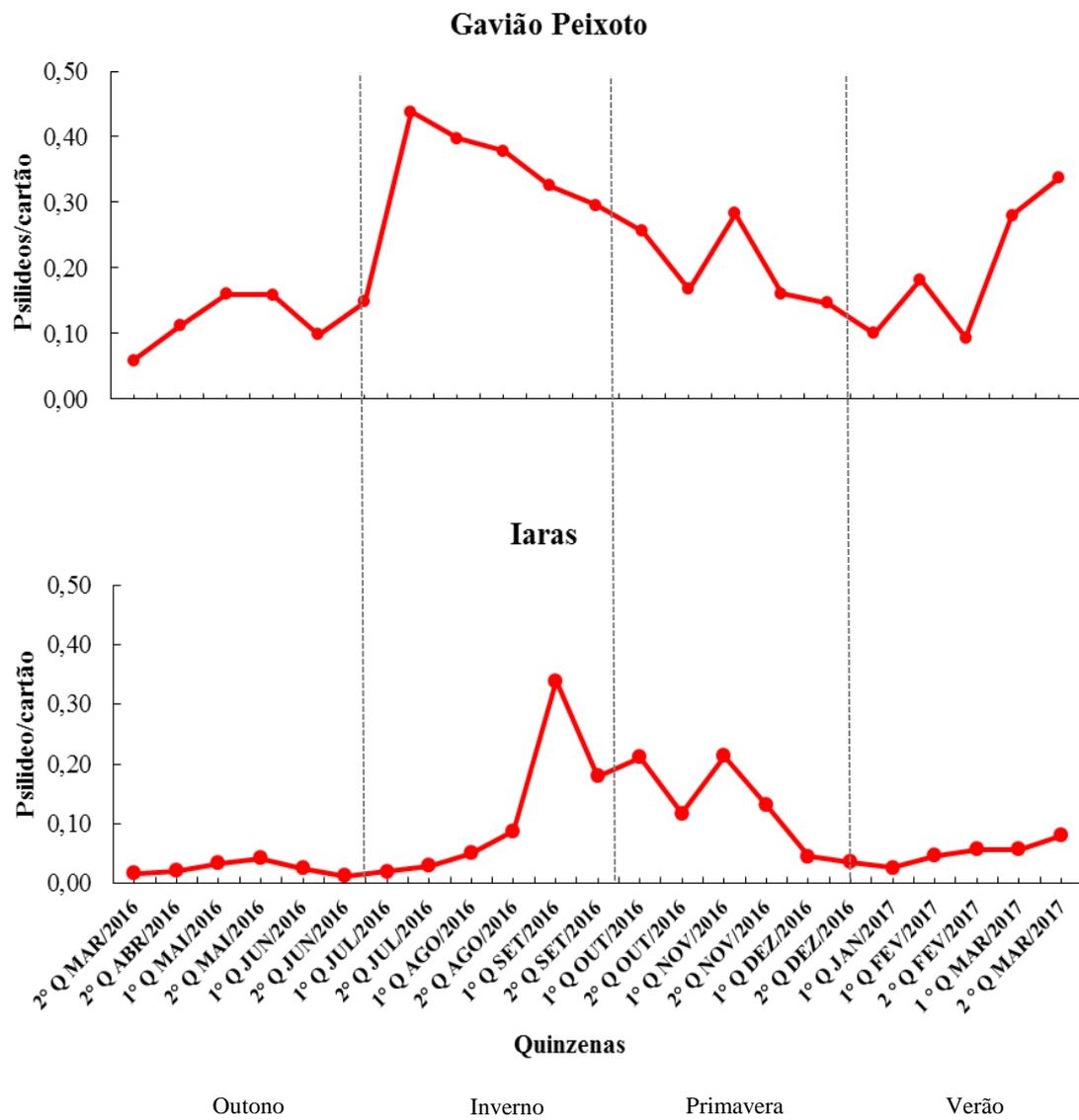


Figura 7. Número médio de psilídeos capturados por cartão entre a 2ª quinzena de março de 2016 e a 2ª quinzena de março de 2017 para Gavião Peixoto e Iaras.

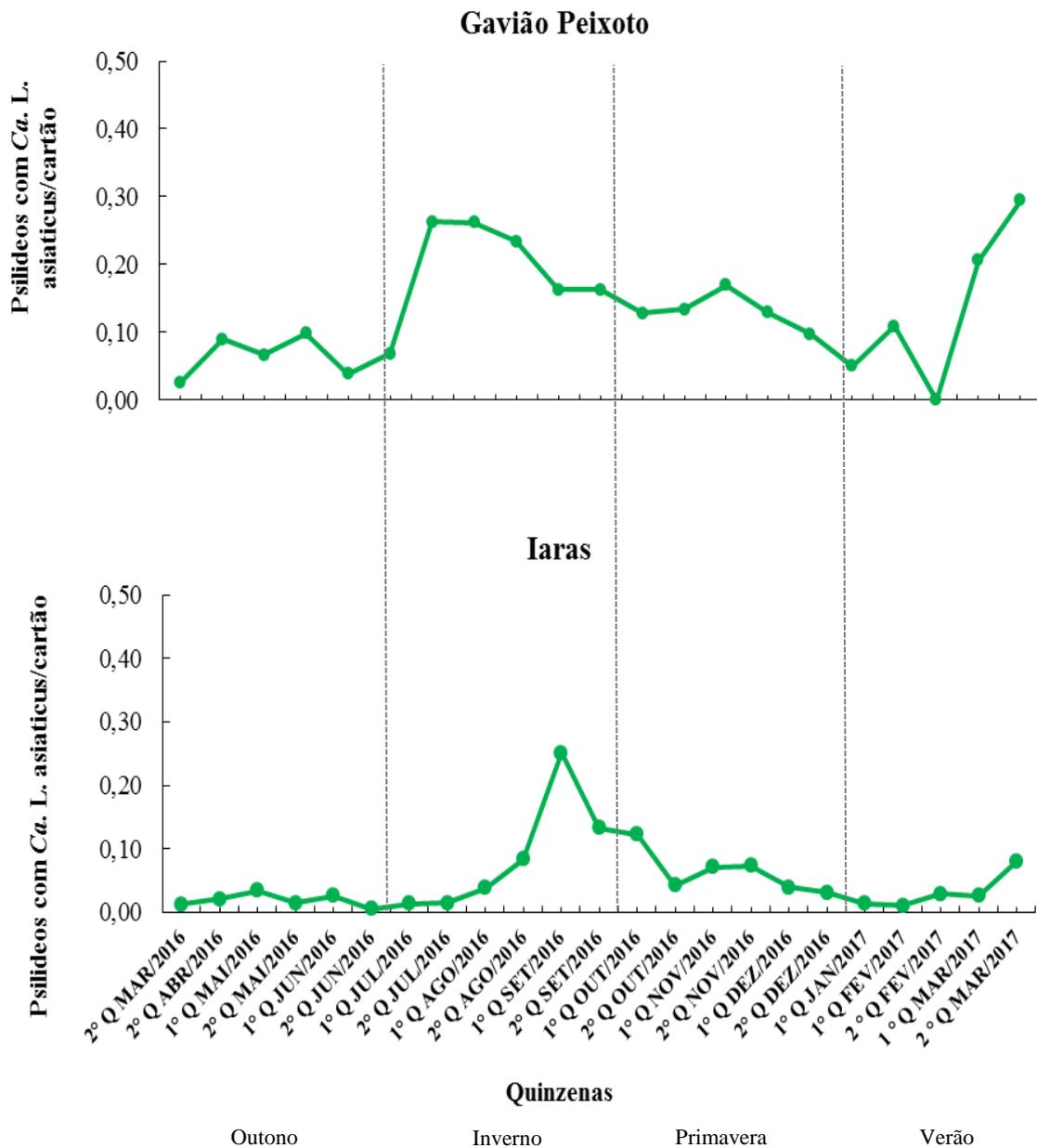


Figura 8. Número estimado de psilídeos com *Candidatus Liberibacter asiaticus* por cartão entre a 2ª quinzena de março de 2016 e a 2ª quinzena de março de 2017 para Gavião Peixoto e Iaras.

3.2. Comparação da proporção de psilídeos com *Candidatus Liberibacter asiaticus* entre diferentes épocas e regiões.

No período de dezembro de 2014 a maio de 2015 e junho de 2015 a novembro de 2015, os dois semestres comparados em Santa Cruz do Rio Pardo não apresentaram diferença estatística entre si, apresentando inclusive a mesma proporção de psilídeos Las+ nos dois semestres (0,73) (Tabela 4). No mesmo período, também não ocorreram diferenças estatísticas

nas regiões de Avaré e Araraquara, $p = 0,061$ e $p = 0,736$, respectivamente. Embora em Avaré a diferença não tenha sido significativa no período de dezembro de 2014 a maio de 2015 a proporção de psilídeos Las+ (0,67) foi menor do que no período de junho a dezembro de 2015 (0,74). Já em Araraquara, as proporções foram muito próximas, 0,60 e 0,59, entre os períodos de dezembro de 2014 a maio de 2015 e junho de 2015 a novembro de 2015, respectivamente. A região de Bebedouro diferiu estatisticamente na comparação dos períodos de dezembro de 2014 a maio de 2015 e junho de 2015 a novembro de 2015, sendo a proporção de psilídeos menor no primeiro período do que no segundo, 0,45 e 0,58, respectivamente ($p < 0,001$). Nas regiões de Avaré e Araraquara, no período de dezembro de 2015 a maio de 2016 e junho de 2016 a novembro de 2016, houve diferença significativamente entre os dois semestres somente na região de Araraquara ($p < 0,001$). Na região de Avaré, no mesmo período, embora a diferença entre os semestres não tenha sido significativa, a proporção foi menor no primeiro semestre do que no segundo semestre (0,77 e 0,80) (Tabela 4).

Tabela 4. Proporção de psilídeos portadores de *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Prop. Las+) entre quatro períodos semestrais, de dezembro de 2014 a novembro de 2016 para as regiões de Avaré e Araraquara e proporção entre dois períodos semestrais, de dezembro de 2014 a novembro de 2015 para as regiões de Santa Cruz do Rio Pardo e Bebedouro.

| Períodos | Santa Cruz do Rio Pardo ^a | | Avaré | | Araraquara | | Bebedouro | |
|--------------------|--------------------------------------|---------|------------|---------|------------|---------|------------|---------|
| | Prop. Las+ | p-value | Prop. Las+ | p-value | Prop. Las+ | p-value | Prop. Las+ | p-value |
| Dez/14 a Mai/15 | 0,73 | 1 | 0,67 | 0,0612 | 0,6 | 0,7361 | 0,45 | 0,0008 |
| Jun/15 a Nov/15 | 0,73 | | 0,74 | | 0,59 | | 0,58 | |
| Dez/15 a Mai/16 | | | 0,77 | 0,408 | 0,66 | 0,0003 | | |
| Jun/16 a Nov/16 | | | 0,8 | | 0,77 | | | |

^a Para cada região, valores de p menores do que 0,05 entre períodos sucessivos indicam diferenças significativas entre as proporções de psilídeos Las positivos.

Quando houve diferença na proporção de psilídeos Las+, mesmo que não tenha sido significativa, o primeiro semestre apresentou valores menores, com exceção da região de Santa Cruz do Rio Pardo no período de dezembro de 2014 a novembro de 2015 e da região de Araraquara no mesmo período.

Na comparação entre as regiões, no período de junho a novembro de 2014 as regiões de Avaré e Araraquara diferiram significativamente das regiões de Santa Cruz do Rio Pardo e Bebedouro. Na comparação de Avaré com Santa Cruz do Rio Pardo e Bebedouro, os valores de p foram iguais a 0,0001 e 0,033, respectivamente e na comparação da região de Araraquara

com Santa Cruz do Rio Pardo e Bebedouro, os valores de p foram iguais a 0,026 e 0,0001, respectivamente. A região de Santa Cruz do Rio Pardo diferiu da região de Bebedouro ($p < 0,0001$). No semestre seguinte, de dezembro de 2014 a maio de 2015, a proporção de Las+ detectada na região de Avaré diferiu da região de Araraquara, ($p = 0,044$). Neste período, somente Avaré e Santa Cruz do Rio Pardo não apresentaram diferença entre si ($p = 0,065$). De junho a novembro de 2015, Avaré *versus* Araraquara, Avaré *versus* Bebedouro, Araraquara *versus* Santa Cruz do Rio Pardo e Santa Cruz do Rio Pardo *versus* Bebedouro diferiram entre si (valores de $p < 0,05$). A região de Araraquara comparada a Bebedouro, diferente dos dois semestres anteriores não apresentou diferença significativa. Nos períodos de dezembro de 2015 a maio de 2016 e junho a novembro de 2016, somente as regiões de Avaré e Araraquara foram comparadas, ocorrendo diferença significativa somente de dezembro de 2015 a maio de 2016. De maneira geral, a região de Santa Cruz do Rio Pardo diferiu estatisticamente da região de Bebedouro em todos os semestres onde houve comparação, com valores de proporção de psilídeos Las+ sempre maiores para a região de Santa Cruz do Rio Pardo. O mesmo ocorreu com as regiões de Araraquara e Santa Cruz do Rio Pardo (Tabela 5).

Tabela 5. Proporção de psilídeos *Candidatus Liberibacter asiaticus* positivos entre as regiões de Avaré, Araraquara, Santa Cruz do Rio Pardo (Santa Cruz) e Bebedouro, nos quatro semestres entre junho de 2014 e novembro de 2016.

| Jun/14 a Nov/14 | | | | |
|-------------------|--------------|-------------------|-------------------|------------------|
| | Avaré (0,66) | Araraquara (0,72) | Santa Cruz (0,78) | Bebedouro (0,59) |
| Avaré (0,66) | | | | |
| Araraquara (0,72) | 0,0501 | | | |
| Santa Cruz (0,78) | 0,0001 | 0,0259 | | |
| Bebedouro (0,59) | 0,0330 | 0,0001 | 0,001 | |
| Dez/14 a Mai/15 | | | | |
| | Avaré (0,67) | Araraquara (0,60) | Santa Cruz (0,73) | Bebedouro (0,45) |
| Avaré (0,67) | | | | |
| Araraquara (0,60) | 0,0442 | | | |
| Santa Cruz (0,73) | 0,0645 | 0,0001 | | |
| Bebedouro (0,45) | 0,0001 | 0,0001 | 0,0001 | |
| Jun/15 a Nov/15 | | | | |
| | Avaré (0,74) | Araraquara (0,59) | Santa Cruz (0,73) | Bebedouro (0,58) |
| Avaré (0,74) | | | | |
| Araraquara (0,59) | 0,0001 | | | |
| Santa Cruz (0,73) | 0,7587 | 0,0001 | | |
| Bebedouro (0,58) | 0,0001 | 0,7773 | 0,0001 | |
| Dez/15 a Mai/16* | | | | |
| | Avaré (0,77) | Araraquara (0,66) | | |
| Avaré (0,77) | | | | |
| Araraquara (0,66) | 0,0102 | | | |
| Jun/16 a Nov/16* | | | | |
| | Avaré (0,80) | Araraquara (0,77) | | |
| Avaré (0,80) | | | | |
| Araraquara (0,77) | 0,2499 | | | |

Dentro de cada período, valor de p menor do que 0,05 indica diferenças significativas entre as proporções de psilídeos Las positivos de cada região avaliada. Valores entre parênteses indicam a proporção de psilídeos Las positivos para cada região. * Períodos nos quais a proporção de Las positivos nas regiões de Santa Cruz do Rio Pardo e Bebedouro não foram avaliados.

3.3. Comparação da proporção de psilídeos com *Candidatus Liberibacter asiaticus* em função do manejo do huanglongbing adotado nas propriedades em cada região.

Nas duas regiões com comparação do manejo A com o manejo B/C, houve diferença estatística, sendo o valor de psilídeos Las+ maior nos cartões adesivos amarelos posicionados em pomares com manejo menos rigoroso. Para o manejo A (Iaras e Gavião Peixoto) as proporções de psilídeos Las+ encontrados foram de 0,65 e 0,58, respectivamente e no manejo B/C (Avaré e Araraquara) as proporções foram de 0,74 e 0,72, respectivamente. Na comparação regional, entre Iaras (manejo A) com Avaré (manejo B/C) o valor de p foi de 0,0006 e para Gavião Peixoto (manejo A) com Araraquara (manejo B/C) com $p = 0,0001$, a diferença entre as proporções de psilídeos Las+ foi significativa.

Tabela 6. Comparação da proporção de psilídeos positivos para *Candidatus Liberibacter asiaticus* entre Iaras (manejo A) e Avaré (manejo B/C) e entre Gavião Peixoto (manejo A) e Araraquara (manejo B/C), entre março de 2016 e março de 2017.

| Regiões | Iaras - A (0,65) | Gavião Peixoto - A (0,58) |
|-------------------------|------------------|---------------------------|
| Avaré -B/C (0,74) | 0,0006 | |
| Araraquara - B/C (0,72) | | 0,0001 |

Valor de p menor do que 0,05 indica diferenças significativas entre as proporções de psilídeos Las positivos de cada região avaliada. Números entre parênteses indicam a proporção de psilídeos Las positivos na região.

3.4. Frequência da proporção de psilídeos com *Candidatus Liberibacter asiaticus*

O número de ciclos principais de *D. citri* Las+ nas regionais centrais, em Araraquara e Gavião Peixoto e nas regionais sul, Avaré e Iaras, apresentaram diferenças em função do tipo de manejo adotado no controle da doença e do vetor. Na região central, o número de picos principais anuais de psilídeos Las+ foi 2 vezes maior nos cartões adesivos amarelos que estavam em propriedades de manejo B/C quando comparado aos cartões adesivos amarelos instalados em propriedades com manejo A. Nesta região, ocorreram 4 picos principais nas áreas de manejo A, enquanto nas áreas de manejo B/C, ocorreram 8 picos principais. Na região sul, o cenário foi parecido com a região central, encontrando-se 3 picos principais anuais no manejo A e 7 picos principais no manejo B.

Tabela 7. Número de picos principais da proporção de psilídeos portadores de *Candidatus Liberibacter asiaticus* por ano entre março de 2016 a março de 2017 em propriedades de manejo A (Iaras e Gavião Peixoto) e B/C (Avaré e Araraquara).

| Região | Tipo de manejo | Número de picos anuais principais |
|---------------------------------------|----------------|-----------------------------------|
| Central (Gavião Peixoto e Araraquara) | A | 4 |
| | B | 8 |
| Sul (Iaras e Avaré) | A | 3 |
| | B | 7 |

4. DISCUSSÃO

No presente trabalho, devido à amplitude das áreas onde as coletas de psilídeos foram realizadas não foi possível a obtenção das informações de clima de cada localidade onde os cartões estavam instalados. Como alternativa, estabeleceu-se uma relação entre as estações do ano. De maneira geral, em todas as regiões e nos diferentes tipos de manejo, houve aumento na captura de psilídeos por cartão no inverno e na primavera (entre os meses de agosto e outubro), com picos pontuais em outros momentos, variando entre as regiões. Com relação às porcentagens de psilídeos positivos para *Ca. L. asiaticus*, as estações outono e inverno foram os períodos com maiores índices. A mesma tendência foi observada por Sassi (2016), onde as regiões de Avaré e Santa Cruz do Rio Pardo tiveram um aumento na captura de psilídeos por cartão entre agosto e outubro (inverno e primavera), no ano de 2014 e maiores índices de psilídeos Las + no outono.

Pelos resultados obtidos neste trabalho, com relação à porcentagem de psilídeos Las positivos em cada região, nota-se que embora as flutuações durante os meses sejam similares, em algumas regiões o índice foi menor que em outras. Este fato pode estar relacionado à quantidade de plantas doentes que existem em cada região. Manter plantas infectadas nos pomares podem torná-los inviáveis economicamente em até dez anos após o aparecimento da primeira planta doente (Roistacher, 1996), evidenciando que, quanto mais plantas contaminadas existirem maior é a chance de aquisição da bactéria pelo inseto. Um exemplo foram os valores médios de psilídeos Las positivos encontrados na região de Frutal. No período de março de 2016 a março de 2017, a média foi de 33% enquanto em Araraquara, no mesmo período, foi de aproximadamente 72%. Os índices de HLB no Triângulo Mineiro (MG), região onde Frutal está inserida, foram de 0,4% em 2016 e 0,6% em 2017 e para região de Matão (SP), região onde Araraquara está inserida, 26% em 2016 e 22% em 2017 (Fundo de Defesa da Citricultura, 2016; Fundo de Defesa da Citricultura, 2017c). Portanto, espera-se que em regiões onde a porcentagem de plantas doentes no campo esteja maior, também ocorra uma maior população de psilídeos portando a bactéria.

A dinâmica populacional do inseto vetor *D. citri* está ligada a diversos fatores, dentre eles a emissão de fluxos vegetativos por plantas cítricas. Estes fluxos são influenciados positivamente pelo clima, a exemplo de condições térmicas (Hall et al., 2008; Lopes et al., 2013). As brotações são de extrema importância para a alimentação e reprodução do psilídeo, tendo papel fundamental em picos populacionais do inseto. Porém, outros fatores influenciam

o aumento populacional do inseto no campo, tais como a umidade relativa do ar, que juntamente com a temperatura influenciam nos estágios iniciais de desenvolvimento do inseto, ocasionando alta mortalidade (Parra, 2010). Além disso, altas precipitações podem influenciar diretamente a presença de ovos e ninfas nas vegetações novas, eliminando-as destes locais. Nos momentos onde existem chuvas intensas, os psilídeos adultos tendem a se proteger na região abaxial das folhas e também no terço inferior das plantas, fato este que acaba reduzindo sua dispersão nos pomares (Regmi et al., 1988).

Resultados obtidos neste trabalho mostraram que em áreas de manejo B/C na região de Frutal e Bebedouro ocorreram médias mais baixas de psilídeos *Las* positivos que em outras regiões, pois são regiões que apresentam altas temperaturas durante longos períodos do ano. A exposição de plantas de citros positivas para *Ca. L. asiaticus* a temperaturas superiores a 35 °C durante algumas horas por dia, pode reduzir a titulação da bactéria na planta, diminuindo a aquisição da bactéria por psilídeos (Hall, 2017). Em regiões onde grande parte do ano as temperaturas são amenas, observa-se que brotações duram mais tempo. Em relação à epidemiologia da doença, este fato aumenta as chances destas plantas servirem como fontes de inóculo, caso estejam infectadas com a bactéria ou de serem infectadas caso estejam sadias (Conchal, 2016). Lopes et al. (2017) no período de setembro de 2012 a setembro de 2014, identificaram maiores crescimentos de brotações de citros nas áreas experimentais onde as médias de temperaturas registradas foram mais altas, Frutal e Comendador Gomes (MG) e quantidades menores em Analândia (SP), local onde foram registradas temperaturas mais baixas. Com relação à presença da bactéria na planta, encontraram maior quantidade de brotos contendo *Ca. L. asiaticus* em Analândia, com 53% dos novos brotos contendo cerca de 2,27 log de *Ca. L. asiaticus* por grama de tecido, enquanto em Frutal e Comendador Gomes 46 e 19% dos novos brotos continham 1,83 e 0,70 log de *Ca. L. asiaticus* por grama de tecido, respectivamente. A mesma tendência foi observada por Sauer et al. (2015), no outono e no inverno foram obtidos os menores valores de Ct, sugerindo que o título da bactéria atingiu valores mais altos quando a temperatura média estava mais baixa.

As altas temperaturas influenciam diretamente na multiplicação da bactéria causadora do HLB na planta de citros e conseqüentemente, por apresentarem titulação menor, a aquisição da bactéria pelo psilídeo durante a alimentação é menor (Lopes et al., 2013). Os brotos nestas condições de clima também crescem de forma rápida, ficando expostos por um menor período de tempo (Conchal, 2016). Mendonça (2015) encontrou correlação positiva entre concentração da bactéria *Ca. L. asiaticus* e temperatura, onde em meses de temperaturas mais elevadas obteve-se uma menor concentração da bactéria na parte interna da casca.

A presença das vegetações novas nos pomares atrai e possibilita novos ciclos dos psilídeos. Cifuentes-Arenas et al. (2016) identificaram que as posturas de ovos de *D. citri* ocorreram principalmente nos estádios V2 e V3, dentre a escala que varia de V1 a V6 e representa em qual estágio vegetativo a planta tem seus brotos. Conforme o tecido amadurece, as posturas e a viabilidade dos ovos diminuem (Cifuentes-Arenas et al., 2016). Correlações positivas e significativas foram encontradas por Sales (2015) entre as fases de vida de *D. citri* e brotações cítricas em regiões avaliadas no estado de São Paulo, onde se observou que a oviposição e a alimentação das ninfas ocorrem apenas nas brotações e os insetos adultos podem se alimentar em tecidos mais maduros, mas também possuem preferência por vegetações novas. Portanto, conclui-se que existe uma relação muito próxima entre o estágio vegetativo em que se encontra a brotação e a presença de psilídeos, bem como a capacidade de aquisição ou inoculação da bactéria pelo vetor. Com base nestas informações, dividiu-se os doze meses do ano em dois semestres, de dezembro a maio e junho a novembro. Nestes intervalos, encontrou-se forte tendência da proporção de psilídeos Las positivos serem maiores nos períodos que compreendem os maiores fluxos vegetativos, neste caso, junho a novembro (Anexo 1).

As diferenças na proporção de insetos positivos para Las na comparação dos semestres estudados indicou que no período de junho a novembro a proporção de psilídeos Las positivos foi maior que no primeiro semestre. Sales (2015) encontrou na região de Arthur Nogueira (SP) em plantas de laranja doce “Valência”, variações na produção de brotações durante o ano de 2013, com valores próximos a 30 brotos por amostra durante dezembro a janeiro e 35 brotos por amostra durante julho a setembro. Na região de Botucatu este índice chegou a 70 brotos por amostra em outubro de 2011. Assumido que vegetações novas atraem e possibilitam novos ciclos dos psilídeos (Cifuentes-Arenas et al., 2016) e como no segundo período do presente trabalho (junho a dezembro) as proporções de psilídeos Las positivos foram maiores na maioria das vezes, se houverem plantas doentes na região a possibilidade de existirem índices mais elevados de populações de psilídeos com *Ca. L. asiaticus* é maior. Suaste-Dzul et al. (2017) em trabalho realizado em Colima, México, encontraram resultados parecidos com relação à maior proporção de psilídeos portando a bactéria nas estações de inverno e primavera, entre os meses de dezembro a julho.

Na comparação das proporções de psilídeos Las positivos entre regiões e semestres distintos, observou-se que a região de Santa Cruz do Rio Pardo diferiu estatisticamente da região de Bebedouro e Araraquara em todos os períodos onde houve a comparação. A região de Santa Cruz do Rio Pardo apresentou a maior proporção de psilídeos Las positivos. A média de psilídeos Las positivos durante o período de março de 2015 a março de 2016 foi maior

também na região de Santa Cruz do Rio Pardo (70,2%) quando comparada com as regiões de Avaré (69,7%), Araraquara (63,9%) e Bebedouro (62,3%). Sassi (2016) na avaliação das mesmas quatro regiões, entre março de 2014 a fevereiro de 2015, identificou a mesma posição de Santa Cruz do Rio Pardo quanto às médias de psilídeos Las positivos, encontrando 73% de amostras positivas. A região de Duartina, pertencente à regional de Santa Cruz do Rio Pardo, apresentou nos últimos anos elevação na incidência de HLB. Nos anos de 2015, 2016 e 2017 foram encontrados índices de HLB de 16, 20 e 23%, respectivamente (Fundo de Defesa da Citricultura, 2016; Fundo de Defesa da Citricultura, 2017c).

Um dos principais objetivos do trabalho foi comparar as proporções de insetos Las+ nos diferentes tipos de manejo. Sabe-se que o baixo rigor em pulverizações com inseticidas para o controle do inseto vetor, possibilita maior chance de novas infecções, tanto primárias quanto secundárias. As proporções de psilídeos Las+ oriundos de locais com manejo B/C (manejo com manutenção de plantas sintomáticas) foram significativamente diferentes de propriedades com manejo A, indicando que há uma porcentagem menor de psilídeos Las+ nas áreas de manejo A em comparação com as áreas de manejo B/C. Este fato é alentador para as propriedades que realizam manejo rigoroso de HLB. As causas desse menor índice de psilídeos Las positivos precisam ser melhor investigadas. Uma das hipóteses era que os psilídeos coletados nos cartões adesivos amarelos presentes no manejo A apresentassem porcentagem similar de psilídeos Las positivos capturados nos cartões de manejo B/C em função de sua disseminação a partir de áreas de manejo menos rigoroso. Sassi (2016) aventa a possibilidade de que os insetos se reproduzissem em locais de baixo manejo e alcançassem as áreas com manejo rigoroso em busca de alimentação (disseminação primária). Temos duas argumentações para o observado no trabalho: i) que no período avaliado tenha ocorrido a reprodução de psilídeos no interior das áreas com manejo A, devido a prováveis falhas de pulverização ou intervalos longos de tempo sem controle adequado. Esta hipótese reforça a necessidade de auditorias internas para certificar que o controle adequado da população de psilídeos está sendo efetivo, evitando o surgimento de plantas com sintomas de HLB; ii) ações externas que visem eliminar plantas sintomáticas no entorno das propriedades que realizam o manejo rigoroso, mantiveram somente um maior número de locais de reprodução de psilídeos sem Las, reduzindo a disseminação primária. Poucas plantas de citros ou murta sem nenhum tipo de manejo e localizadas ao redor de uma propriedade comercial num raio de 5 km podem comprometer o sucesso na formação e condução de pomares (Michigami, 2015). Portanto, uma menor população de plantas com HLB no entorno de áreas comerciais pode gerar, conseqüentemente psilídeos sem *Ca. L. asiaticus*, reduzindo a ocorrência da disseminação primária do HLB.

Entende-se então que a remoção das plantas doentes é fundamental para evitar o avanço do HLB, mas também o emprego de um controle rigoroso do inseto vetor com a utilização de inseticidas é crucial. Nas áreas de manejo A e manejo B/C, no período de março de 2016 a março de 2017, encontrou-se resultados referentes a picos anuais da proporção de psilídeos *Las* positivos. Áreas onde o manejo acontece de forma mais rigorosa (manejo A) apresentaram pelo menos metade dos picos anuais de psilídeos *Las* positivos que ocorreram nas áreas com manejo menos rigoroso (manejo B/C). A comparação ocorreu entre Gavião Peixoto (manejo A) e a região de Araraquara (manejo B/C), onde na primeira região encontraram-se quatro picos anuais principais na proporção de psilídeos *Las* positivos, enquanto na segunda região encontrou-se oito picos anuais principais. A outra comparação ocorreu entre Iaras e a região de Avaré (manejo A e manejo B/C, respectivamente). Na primeira região, ocorreram três picos anuais principais enquanto na segunda região ocorreram sete picos anuais principais de psilídeos *Las* positivos. Este fato se explica pela não remoção de plantas doentes nestas áreas com manejo menos rigoroso, facilitando assim a aquisição da bactéria pelo inseto e a multiplicação do mesmo (Belasque Junior, et al., 2010b). A presença de plantas doentes serve como fonte de inóculo para outras áreas.

Cartões adesivos amarelos que compõem o sistema de alerta fitossanitário do Fundecitrus, indicam altas populações de psilídeos em épocas do ano em que há brotação em citros, como no início do período de chuvas. Esta condição é mais danosa em locais com manejo insuficiente. Os psilídeos que se reproduzem nessas áreas com ausência ou baixa qualidade no manejo, podem se desenvolver em plantas com HLB, aumentando as chances de aquisição e transmissão da bactéria para outras plantas de citros. Além disso, psilídeos adultos provenientes de ninfas criadas em plantas doentes, são mais eficazes na transmissão da bactéria para outras plantas do que psilídeos que adquiriram a bactéria na fase adulta (Inoue et al., 2009; Pelz-Stelinski et al., 2010). Portanto, é essencial a remoção de plantas sintomáticas em áreas de baixa qualidade de manejo, para que estas não sirvam de potenciais fontes de inóculo e disseminação da bactéria para pomares próximos.

Torna-se necessário então, o acompanhamento tanto da população do psilídeo bem como dos fluxos vegetativos que estão ocorrendo ao longo do tempo. Aplicações de inseticidas para o controle do vetor, de forma calendarizada, seja quinzenal ou mensal, podem trazer uma falsa sensação de proteção, pois em alguns momentos as aplicações podem ser assertivas e trazerem um bom resultado no controle, mas em outros momentos podem ser insuficientes quanto ao intervalo e proporcionarem surtos populacionais do inseto vetor (Belasque Junior et al., 2010b). Nesse sentido, o sistema de alerta fitossanitário do Fundecitrus auxilia na obtenção

das informações referentes aos níveis populacionais do inseto vetor e dos fluxos vegetativos das plantas de citros, obtidos através das informações dos cartões adesivos amarelos instalados nas propriedades citrícolas e também em plantas localizadas nos fundos de quintal, possibilitando identificar momentos críticos e agir preventivamente no controle de *D. citri*, principalmente aqueles portadores de Las.

5. CONCLUSÕES

Porcentagens altas de psilídeos Las+ ocorreram com maior frequência nos meses das estações de outono e inverno e foram mais baixas na primavera e verão.

Propriedades com Manejo A apresentam aproximadamente metade dos picos principais anuais de psilídeos Las+ quando comparadas com propriedades de manejo B/C.

Propriedades com Manejo A apresentaram uma proporção menor de psilídeos Las+ quando comparadas com propriedades de manejo B/C.

REFERÊNCIAS

- Arratia-Castro, A.A., Santos-Cervantes, M.E, Fernández-Herrera, E, Chávez-Medina, J.A, Flores-Zamora, G.L, Camacho-Beltrán, E, Méndez-Lozano, J, Leyva-López, N.E. 2014. Occurrence of ‘*Candidatus Phytoplasma asteris*’ in citrus showing Huanglongbing symptoms in Mexico. **Crop Protection** 62:144-151.
- Artiles, L.P. 2017. Aspectos bioecológicos de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) em variedades de citros. **Tese de Doutorado**. Jaboticabal, SP: Universidade Estadual Paulista.
- Bassanezi, R.B, Montesino, L.H, Busato, L.A, Stuchi, E.S. 2006. Damages caused by huanglongbing on sweet orange yield and quality in São Paulo. **Proceedings of the Huanglongbing-Greening International Workshop**. Ribeirão Preto, SP. p. 39.
- Bassanezi, R.B., Montesino, L.H., Stuchi, E.S. 2009. Effects of Huanglongbing on fruit quality of sweet orange cultivars in Brazil. **European Journal Plant Pathology** 125:565– 572.
- Bassanezi, R.B., Lopes, S.A., Belasque Junior, J., Spósito, M.B., Yamamoto, P.T., Miranda, M.P., Teixeira, D.C., Wulff, N.A. 2010. Epidemiologia do huanglongbing e suas implicações para o manejo da doença. **Citrus Research & Technology** 1:11-23.
- Bassanezi, R.B., Montesino, L.H., Gasparoto, M.C.G., Bergamin Filho, A., Amorim, L. 2011. Yield loss caused by huanglongbing in different sweet orange cultivars in São Paulo, Brazil. **European Journal Plant Pathology** 130:577–586.
- Bassanezi, R.B., Montesino, L.H., Gimenes-Fernandes, N., Yamamoto, P.T., Gottwald, T.R., Amorim, L., Bergamin Filho, A. 2013. Efficacy of area-wide inoculum reduction and vector control on temporal progress of huanglongbing in young sweet orange plantings. **Plant Disease** 97:789-796.
- Belasque Junior, J., Bergamin Filho, A., Bassanezi, R.B., Barbosa, J.C., Gimenes-Fernandes, N., Yamamoto, P.T., Lopes, S.A., Machado, M.A., Leite Junior, R.P., Ayres, A.J., Massari, C.A. 2009. Base científica para a erradicação de plantas sintomáticas e assintomáticas de huanglongbing (HLB, greening) visando o controle efetivo da doença. **Tropical Plant Pathology** 34:137-145.
- Belasque Junior, J., Bassanezi, R.B., Yamamoto, P.T., Ayres, A.J., Tachibana, A., Violante, A.R., Tank Junior, A., Di Giorgi, F., Tersì, F.E.A., Menezes, G.M., Dragone, J., Jank Junior, R.H., Bové, J.M. 2010a. Lessons from huanglongbing management in São Paulo State, Brazil. **Journal of Plant Pathology** 92:285-302.
- Belasque Junior, J., Yamamoto, P.T., Miranda, M.P., Bassanezi, R.B., Ayres, A.J., Bove, J.M. 2010b. Controle do huanglongbing no Estado de São Paulo, Brasil. **Citrus Research & Technology** 31(1):53-64.
- Bové, J.M. 2006. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. **Journal Plant Pathology** 88(1):7-37.

Bové, J.M., Teixeira, D.C., Wulff, N.A., Eveillard, S., Saillard, C., Bassanezi, R.B., Lopes, S.A., Yamamoto, P.T., Ayres, A.J. 2008. Several Liberibacter and Phytoplasma species are individually associated with HLB. **Proceedings of the International Research Conference on Huanglongbing**. Orlando. 2008. p. 152-155.

Cardinali, M.C.B. 2012. Diagnóstico de Huanglongbing (HLB) em citros utilizando técnicas fotônicas. **Dissertação de Mestrado**. São Carlos, SP: Universidade de São Paulo.

Chatfield. 2004. **The analysis of time series: an introduction**. New York: Chapman & Hall. 357 p.

Chen, J., Pu, X., Deng, X., Liu, S., Li, H., Civerolo, E. 2009. A phytoplasma related to “*Candidatus Phytoplasma asteris*” detected in citrus showing Huanglongbing (yellow shoot disease) symptoms in Guangdong, PR China. **Phytopathology** 99:236-242.

Cifuentes-Arenas, J.C., Oliveira, H.T., Góes, A., Miranda, M.P., Lopes, S.A. 2016. Monitoring citrus flush shoot ontogeny as a potential strategy for HLB and psyllid management. Abstracts of Presentations. **20th International Organization of Citrus Virologists (IOCV)**. Chongqing. 2016. p. 4.

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

Coletta Filho, H.D., Carlos, E.F. 2010. Ferramentas para diagnóstico de huanglongbing e seus agentes associados: dos sintomas aos ensaios de laboratório. **Citrus Research & Technology** 31(2):129-143.

Conchal, R.R. 2016. Influência do clima e fontes externas de inóculo na evolução de huanglongbing em três propriedades citrícolas. **Dissertação de Mestrado**. Araraquara, SP: Fundo de Defesa da Citricultura.

Costa Lima, A.M. 1942. **Insetos do Brasil: homópteros**. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Agronomia. p. 7-35. v. 3.

Ferreira, R.V. 2013. Influência do tipo de controle de Huanglongbing em áreas citrícolas na dispersão de *Diaphorina citri* e na disseminação da doença para pomares próximos. **Dissertação de Mestrado**. Araraquara, SP: Fundo de Defesa da Citricultura.

Fundo de Defesa da Citricultura. 2016. **Levantamento de doenças**. Disponível em: <<https://www.fundecitrus.com.br/cursos/palestras>>. Acesso em: 25 fev. 2019.

Fundo de Defesa da Citricultura. 2017a. **Alerta Fitossanitário**. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/alerta-fitossanitario>>. Acesso em: 02 abr. 2017.

Fundo de Defesa da Citricultura. 2017b. **Fundecitrus monitora presença de inseto transmissor da pior doença da citricultura em 60% do parque citrícola**. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/noticias/integra/fundecitrus--monitora-presenca-de-inseto-transmissor-da-pior-doenca-da-citricultura-em--60-do-parque-citricola/523>>. Acesso em: 02 abr. 2017.

Fundo de Defesa da Citricultura. 2017c. **Levantamento de doenças**. Disponível em: <<https://www.fundecitrus.com.br/cursos/palestras>>. Acesso em: 25 fev. 2019.

Fundo de Defesa da Citricultura. 2017d. **Projeto de Estimativa de Safra**. Disponível em: <https://www.fundecitrus.com.br/pdf/pes_relatorios/2017_12_05_Invent%C3%A1rio_e_Estimativa_do_Cinturao_Citricola_2017-2018.pdf>. Acesso em: 25 fev. 2019.

Fundo de Defesa da Citricultura. 2017e. **Projeto de Estimativa de Safra**. Disponível em: <https://www.fundecitrus.com.br/pdf/pes_relatorios/0418_Orange_Forecast_Update.pdf>. Acesso em: 25 fev. 2019.

Fundo de Defesa da Citricultura. 2018. **Incidência do greening no cinturão citrícola**. Disponível em: <<https://www.fundecitrus.com.br/levantamentos/greening>>. Acesso em: 11 fev. 2019.

Gallo, D., Nakano, O., Silveira Neto, S., Carvalho, R.P.L., Baptista, G.C., Berti Filho, E., Parra, J.R.P., Zucchi, R.A., Alves, S.B., Vendramin, J.D., Marchini, L.C., Lopes, J.R.S., Omoto, C. 2002. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ. 920 p.

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

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

Hall, D.G. 2017. Incidence of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” in a florida population of Asian citrus psyllid. **Wiley journal of applied entomology** 42:97-10.

Hall, D.G. 2008. Biology, history and world status of *Diaphorina citri*. **I Taller Internacional sobre Huanglongbing de los Citricos (*Candidatus liberibacter spp*) y El Psilidio Asiatico de Los Citricos (*Diaphorina citri*)**. Hermosillo. 2008. p. 1-11.

Hall, D.G., Hentz, M.G., Adair Junior, R.C. 2008. Population ecology and phenology of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in two Florida citrus groves. **Environmental Entomology College Park** 37(4):914-924.

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

Leal, R.M. 2009. Distribuição espacial de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) e sua relação com a expansão do greening em laranja valência, utilizando geoestatística. 97 f. **Tese de Doutorado**. Jaboticabal, SP: Universidade Estadual Paulista.

- Leonardo, A. 2014. Otimização da leitura de cartão adesivo amarelo para o monitoramento de adultos de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae). **Dissertação de Mestrado**. Araraquara, SP: Fundo de Defesa da Citricultura.
- Li, W., Hartung, J.S., Levy, L. 2006. Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus* Liberibacter species associated with citrus huanglongbing. **Journal of Microbiol Methods** 66:104-115.
- Lin, K.H. 1956. Observation on yellow shoot of citrus. Etiological study of yellow shoot of citrus. **Acta Phytopathologica Sinica** 2:1-42.
- Lopes, S.A., Luiz, F.Q.B.Q., Martins, E.C., Fassini, C.G., Barbosa, J.C., Beattie, G.A.C. 2013. *Candidatus* Liberibacter asiaticus titers in citrus and acquisition rates by *Diaphorina citri* are decreased by higher temperature. **Plant Disease** 97(12):1563-1570.
- Lopes, S.A., Luiz, F.Q.B.F., Oliveira, H.T. 2017. Seasonal variation of “*Candidatus* Liberibacter asiaticus” titers in new shoots of citrus in distinct environments. **Plant Disease** 101:583-590.
- Mendonça, W.J.Q.F. 2015. Evolução da infecção por *Candidatus* Liberibacter asiaticus e dos sintomas de huanglongbing em plantas cítricas no sul do Triângulo Mineiro e região central do Estado de São Paulo. **Dissertação de Mestrado**. Araraquara, SP: Fundo de Defesa da Citricultura.
- Michigami, F.A.B. 2015. Benefícios das medidas de manejo adotadas interna e externamente a uma propriedade comercial de citros na redução do progresso do Huanglongbing. **Dissertação de Mestrado**. Araraquara, SP: Fundo de Defesa da Citricultura.
- Miranda, M.P., Yamamoto, P.T., Noronha Junior, N.C. 2011. Utilização de cartões adesivos para monitoramento de *Diaphorina citri*. **Citricultura Atual** 81:8-9.
- Murray, M.G., Thompson, W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Res** 239:487-91.
- Nava, D.E., Gomes Torres, M.L., Rodrigues, M.D., Bento, J.M.S., Haddad, M.L., Parra, J.R.P. 2010. The effects of de host, geographic origin, and gender on the thermal requirements of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). **Environmental Entomology** 39(2):678-684.
- Neves, F.N., Trombin, V.G., Milan, P., Lopes, F.F., Cressoni, F., Kalaki, R. 2010. **O Retrato da Citricultura Brasileira**. Ribeirão Preto, SP: FEA/USP. 137 p.
- Novais, C.M., Pires-Alves, M. 2004. PCR em tempo real. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento** (33):10-13.
- Paiva, P.E.B. 2009. Distribuição espacial e temporal, inimigos naturais e tabela de vida ecológica de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) em citros em São Paulo. 64 f. **Tese de doutorado**. Piracicaba, SP: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

Parra, R.J.P., Lopes, J.R.S., Gomez-Torres, L.M., Nava, D.E., Paiva, P.E.B. 2010. Bioecologia do vetor *Diaphorina citri* e transmissão de bactérias associadas ao huanglongbing. **Citrus Research & Technology** 31(1):37-51.

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

Regmi, C., Lama, T.K. 1988. Greening incidence and Greening vector population dynamics in Pokhara. Proc. **10th International Organization of Citrus Virologists (IOCV)**. Riverside. 1988. p. 238-242. Disponível em: <http://www.ivia.es/iocv/archivos/proceedingsX/10th238_242.pdf>. Acesso em: jan. 2019.

Reinking, O.A. 1919. Diseases of economic plants in South China. **Philippine Agriculturist** 8:109-135.

Roistacher, C.N. 1996. The economics of living with citrus diseases: huanglongbing (greening) in Thailand. Proc. **13th Conference of International Organization of Citrus Virologists**. Riverside. p. 279-285.

Sala, I. 2013. Avaliação do tempo de exposição em armadilha adesiva amarela e das condições de armazenamento de adultos de *Diaphorina citri* na detecção de *Candidatus Liberibacter asiaticus*. **Dissertação de Mestrado**. Araraquara, SP: Fundo de Defesa da Citricultura.

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

Santos, F.L., Miranda, M.P., Marques, R.N. 2012. Eficiência de métodos de monitoramento de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) em pomares no estado de São Paulo. Resumos. **Congresso Brasileiro de Entomologia**. Curitiba. 2012.

Sassi, R.S. 2016. Incidência e distribuição de *Diaphorina citri* portadores de *Candidatus Liberibacter asiaticus* em regiões citrícolas com alerta fitossanitário no estado de São Paulo. **Dissertação de Mestrado**. Araraquara, SP: Fundo de Defesa da Citricultura.

Sauer, A.V., Zanutto, C.A., Nocchi, P.T.R. 2015. Seasonal variation in populations of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” in citrus trees in Paraná state, Brazil. **Plant Disease** 99:1125-1132.

Sehler, A., Schuenzel, E.L., Cooke, P., Donnua, S., Thaveechai, N., Postnikova E., Stone, A.L., Schneider, W.L., Damsteegt, V.D., Schaad, N.W. 2009. Cultivation of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*”, “*Ca. L. africanus*”, and “*Ca. L. americanus*” associated with huanglongbing. **Phytopathology** 99(5):480- 486.

Sousa, M.C. 2009. Distribuição de *Candidatus Liberibacter americanus* e *Candidatus Liberibacter asiaticus* em plantas cítricas. 53 f. **Dissertação de Mestrado**. Jaboticabal, SP: Universidade Estadual Paulista.

Suaste-Dzul, A., Gallou, A., Félix-Portillo, M., Moreno-Carrillo, G., Sánchez-González, J., Palomares-Perez, M., Arredondo-Bernal, H. 2017. Seasonal incidence of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” (Rhizobiales: Rhizobiaceae) in *Diaphorina citri* (Hemiptera Liviidae) in Colima, Mexico. **Tropical Plant Pathology** 42:410-415.

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

Teixeira, D.C., Danet, J.L., Eveillard, S., Martins, E.C., Jesus Junior, W.C., Yamamoto, P.T., Lopes, S.A., Bassanezi, R.B., Ayres, A.J., Saillard, C., Bové, J.M. 2005b. Citrus huanglongbing in São Paulo state, Brazil: PCR detection of the “*Candidatus*” *Liberibacter* species associated with the disease. **Molecular and Cellular Probes** 19:173-179.

Teixeira, D.C., Saillard, C., Couture, C., Martins, E.C., Wulff, N.A., Eveillard-Jagoueix, S., Yamamoto, P.T., Ayres, A.J., Bové, J.M. 2008a. Distribution and quantification of *Candidatus Liberibacter americanus*, agent of huanglongbing disease of citrus in São Paulo State, Brasil, in leaves of an affected sweet orange tree as determined by PCR. **Molecular and Cellular Probes** 22:139-150.

Teixeira, D.C., Wulff, N.A., Martins, E.C., Kitajima, E.W., Bassanezi, R.B., Ayres, A.J., Eveillard, S., Saillard, C., Bové, J.M. 2008b. A phytoplasma closely related to the pigeon pea witches’-broom phytoplasma (16Sr IX) is associated with citrus huanglongbing symptoms in the state of Sao Paulo, Brazil. **Phytopathology** 98:977-984.

Teixeira, D.C., Wulff, N.A., Leite, A.P.R., Martins, E.C., Ayres, A.J., Bové, J.M. 2009. Identification, PCR detection and occurrence in São Paulo state, Brazil, of citrus huanglongbing-associated agents: *Candidatus Liberibacter americanus*, *Ca. L. asiaticus*, and the 16Sr group IX phytoplasma. **Tropical Plant Pathology** 34:S7.

Teixeira, D.C., Wulff, N.A., Lopes, S.A., Yamamoto, P.T., Miranda, M.P., Spósito, M.B., Belasque Junior, J., Bassanezi, R.B. 2010. Caracterização e etiologia das bactérias associadas ao *huanglongbing*. **Citrus Research & Technology** 2:115-128.

Tichopad, A., Dilger, M., Schwarz, G., Pfaffl, M.W. 2003. Standardized determination of real time PCR efficiency from a single reaction setup. **Nucleic Acids Research** 31(21):122.

Ulian, L.F. 2016. *Diaphorina citri* e Huanglongbing: dinâmica, relações epidemiológicas e monitoramento do vetor em pomar de laranja com manejo da doença. 40 f. **Dissertação de Mestrado**. Araraquara, SP: Fundo de Defesa da Citricultura.

Zanardi, O.Z., Volpe, H.X., Favaris, A.P., Silva, W.D., Luvizotto, R.A.G., Magnani, R.F., Esperança, V., Delfino, J.Y., Freitas, R., Miranda, M.P., Parra, J.R.P., Bento, J.M.S., Leal, W.S. 2018. Putative sex pheromone of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, breaks down into attractant. **Scientific reports** 8:455.

Wulff, N.A., Teixeira, D.C., Martins, E.C., Toloy, R.S., Bianco, L.F., Colletti, D.A.B., Kitajima, E.W., Bové, J.M., 2015. Sunn hemp, a major source-plant of the phytoplasma associated with Huanglongbing symptoms of sweet orange in São Paulo State, Brazil. **Journal**

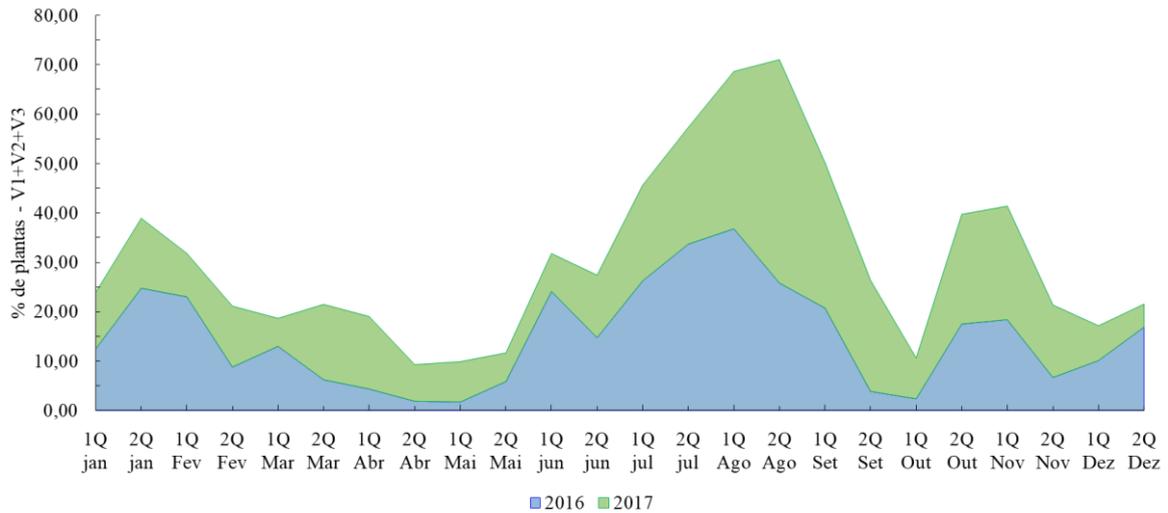
Citrus Pathology 2(1). Disponível em: <<http://escholarship.org/uc/item/1dx6w52z>>. Acesso em: 08 nov. 2015.

Wulff, N.A., Fassini, C.G., Marques, V.V., Martins, E.C., Coletti, D.A.B., Teixeira, D.C., Sanches, M.M., Bové, J.M. 2019. Molecular characterization and detection of 16SrIII group phytoplasma associated with Huanglongbing symptoms. **Phytopathology** 109(3): 366-374.

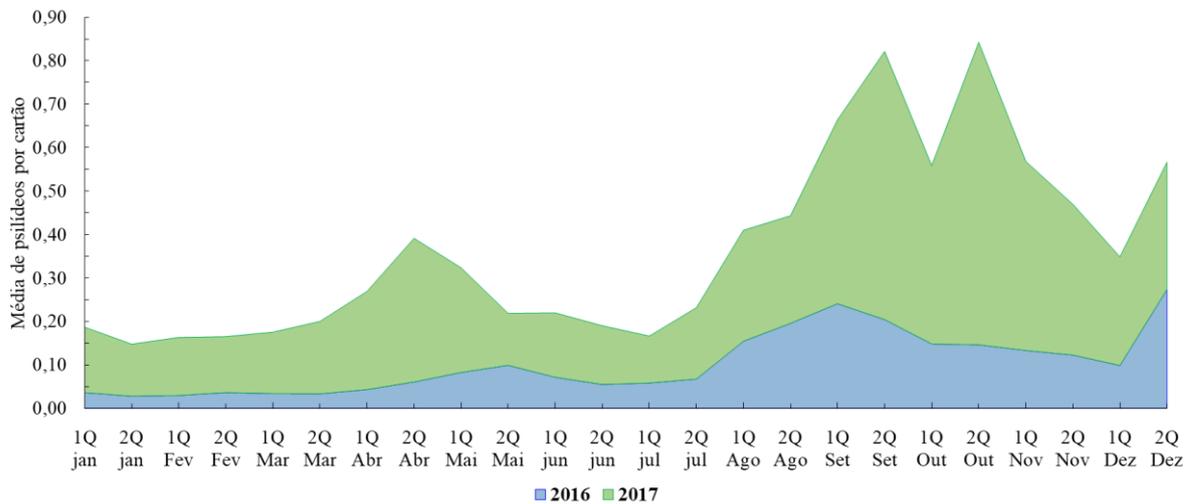
Yamamoto, P.T. 2008. **Manejo Integrado de Pragas**. Piracicaba: CP 2. 336 p.

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

ANEXO



Anexo 1. Porcentagem de plantas de citros nos estádios vegetativos V1+V2+V3 avaliadas no sistema de Alerta Fitossanitário do Fundecitrus, nos anos de 2016 e 2017, nas regiões de Avaré (SP), Bebedouro (SP), Casa Branca (SP), Franca (SP), Frutal (MG), Itapetininga (SP), Limeira (SP), Lins (SP), Novo Horizonte (SP) e Santa Cruz do Rio Pardo (SP).



Anexo 2. Média de psilídeos capturados nos cartões adesivos amarelos avaliados no sistema de Alerta Fitossanitário do Fundecitrus, nos anos de 2016 e 2017, nas regiões de Avaré (SP), Bebedouro (SP), Casa Branca (SP), Franca (SP), Frutal (MG), Itapetininga (SP), Limeira (SP), Lins (SP), Novo Horizonte (SP) e Santa Cruz do Rio Pardo (SP).