

**FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA
MESTRADO PROFISSIONAL EM
FITOSSANIDADE DOS CITROS**

GABRIEL FERNANDO GRAZZIANI COSTA

**Incidência de adultos de *Diaphorina citri* portadores de
Candidatus Liberibacter asiaticus no noroeste do Paraná**

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

Coorientadora: Dra. Eliane Cristina Locali

**Araraquara
Abril 2024**

GABRIEL FERNANDO GRAZZIANI COSTA

**Incidência de adultos de *Diaphorina citri* portadores de
Candidatus Liberibacter asiaticus no noroeste do Paraná**

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

Coorientadora: Dra. Eliane Cristina Locali

**Araraquara
Abril 2024**

C838c Costa, Gabriel Fernando Grazziani
Incidência de adultos de *Diaphorina citri* portadores de
Candidatus Liberibacter asiaticus no nordeste do Paraná /
Gabriel Fernando Grazziani Costa, 2024.
36 f.

Orientador: Nelson Arno Wulff

Dissertação (Mestrado) – Fundo de Defesa da
Citricultura, Araraquara, 2024.

1. Greening 2. Psílídeo asiático dos citros 3.
Monitoramento de pragas 4. Infectividade 5. Razão sexual
6. Huanglongbing I. Título

GABRIEL FERNANDO GRAZZIANI COSTA

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

Araraquara, 24 de abril de 2024.

BANCA EXAMINADORA

DocuSigned by:

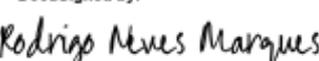
5EE2E8F7CCD8475...

Dr. Nelson Arno Wulff (Orientador)
Fundo de Defesa da Citricultura – FUNDECITRUS, Araraquara/SP

DocuSigned by:

3D37108E756B47C...

Dr. Arthur Fernando Tomaseto
Fundo de Defesa da Citricultura – FUNDECITRUS, Araraquara/SP

DocuSigned by:

474FC4437D274FA...

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

DEDICATÓRIA

Dedico essa conquista as pessoas mais especiais em minha vida. Meu filho, que nasceu no período do mestrado, trazendo alegria, amor e gratidão por tudo que tenho e tudo que será conquistado. A minha esposa, minha companheira de vida, por todo amor, carinho, incentivos e apoio, mostrando que sou capaz de vencer e conquistar coisas novas. Aos meus pais, pessoas simples e trabalhadoras que nunca deixou que nada falta-se, principalmente educação e amor. E a minha irmã, que tenho muito orgulho de acompanhar seu crescimento, com força de vontade e dedicação. Todas as conquistas são dedicadas a vocês.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre estar do meu lado em todos os momentos de minha vida;

Ao meu filho Vicente Mulza Costa e minha esposa Nathalia Mulza Costa, por todo amor, paciência e incentivo para superar mais esse desafio. Saiba que tudo é para vocês, sou muito grato por ter vocês em meu lado;

Ao meu pai José Nilson G. Costa e minha mãe Lourdes Ferreira G. Costa por sempre acreditarem e investirem no meu crescimento, nunca medindo esforços para auxiliar minhas conquistas;

A minha irmã Lorena Renata G. Costa por todo carinho e amor, agradeço por poder acompanhar seu crescimento e seu esforço;

A Amanda Zito representando a Cooperativa Cocamar e a Silvia Podolan representando a Cooperativa Coopsoli, por viabilizarem essa oportunidade de crescimento pessoal e profissional;

Ao Dr. Nelson Arno Wulff e Dra. Eliane Cristina Locali por toda paciência e ensinamentos, saibam que vocês fizeram papel muito importante nessa conquista;

Em nome da Daniela Coletti, agradeço a todos os membros do Laboratório de Pesquisa e Diagnóstico de Greening do Fundecitrus, obrigado por todo apoio nas amostras e todos os ensinamentos transmitidos;

A todos professores do Mastercitrus por todas as aulas e conhecimentos compartilhados;

Ao Juan C. Cifuentes Arenas e Elisa Akemi, por todo apoio nas análises estatísticas;

A todos amigos da Turma 8 do Mastercitrus, obrigado por todas as sextas-feiras de conhecimento de conversas;

Aos amigos do mestrado que vou levar para vida, Julio Veneroso, Vandeclei Rodrigues e João Silveira, por toda parceria, almoços e caronas;

Ao Fundecitrus, por toda excelência e competência das atividades envolvidas.

Incidência de adultos de *Diaphorina citri* portadores de *Candidatus Liberibacter asiaticus* no noroeste do Paraná

Autor: Gabriel Fernando Grazziani Costa

Orientador: Dr. Nelson Arno Wulff

Coorientadora: Dra. Eliane Cristina Locali

Resumo

O huanglongbing (HLB) é a principal doença da citricultura pela sua natureza destrutiva e rápida disseminação. Essa doença está associada às espécies de bactérias *Candidatus Liberibacter*, sendo *Ca. L. asiaticus* (Las) a forma predominante nas áreas citrícolas do Brasil. A disseminação desta bactéria ocorre pelo psílídeo *Diaphorina citri*. As principais medidas de controle são o plantio de mudas saudáveis, erradicação de plantas com HLB e controle do vetor. O objetivo desse trabalho foi avaliar a presença e o título de Las em *D. citri* nos psílídeos capturados em cartões adesivos amarelos em propriedades citrícolas na região noroeste do Paraná. Adicionalmente, a sua relação com a razão sexual e identificar os períodos de maior captura de psílídeos. O levantamento destes dados é importante para conhecermos a população na região, associar a presença de Las nos insetos avaliados e auxiliar na conscientização e melhoria das ações de controle. A captura dos psílídeos foi realizada em cartões dispostos no perímetro das propriedades e avaliados no período de outubro de 2022 a outubro de 2023, em leituras quinzenais. O levantamento foi realizado em 10 municípios do noroeste paranaense, em 28 propriedades, totalizando 3950 cartões no período amostrado. Foram avaliados a quantidade de psílídeos por cartão e realizada a sexagem dos psílídeos. Os insetos capturados foram analisados quanto à presença de *Ca. L. asiaticus* por meio do teste molecular de qPCR, e após isso, calculado a probabilidade de inoculação de Las pelos psílídeos em função do título bacteriano. Os períodos de maiores capturas de psílídeos foram as quinzenas referentes à estação climática do inverno. A razão sexual predominante foi de machos, independente dos municípios avaliados e estações climáticas do ano. O índice médio de psílídeos Las+ foi de 88%, independente da razão sexual e no verão esse índice foi a 78%. A probabilidade de inoculação de Las pelos psílídeos capturados foi de 35,8%, e as fêmeas apresentaram maior probabilidade de inoculação do que os machos.

Palavras-chave: Greening, psílídeo asiático dos citros, monitoramento de pragas, infectividade, razão sexual, huanglongbing.

Incidence of *Diaphorina citri* adult carrying *Candidatus Liberibacter asiaticus* in in northwestern Paraná state

Author: Gabriel Fernando Grazziani Costa

Advisor: Dr. Nelson Arno Wulff

Co-advisor: Dra. Eliane Cristina Locali

Abstract

Huanglongbing (HLB) is the main disease affecting citrus cultivation due to its destructive nature and rapid spread. This disease is associated with *Candidatus Liberibacter* spp., being *Ca. L. asiaticus* (Las) the predominant form in citrus-growing areas of Brazil. The spread of this bacterium occurs through the psyllid *Diaphorina citri*. The main control measures are planting healthy nursery trees, eradicating plants with HLB, and controlling the vector. The aim of this study was to evaluate the presence and titer of Las in *D. citri*, captured on yellow adhesive cards in citrus properties in the northwestern region of Paraná. Additionally, the study aimed to investigate the relationship with sex ratio and identify the periods of highest psyllid capture. Collecting these data is important for understanding the population in the region, associating the presence of Las in the evaluated insects, and aiding in awareness and improvement of control actions. Psyllid capture was conducted using cards placed around the perimeters of properties and evaluated from October 2022 to October 2023, with biweekly readings. The survey was conducted in 10 municipalities in northwestern Paraná, across 28 properties, totaling 3950 cards during the sampling period. The number of psyllids per card was assessed, and sexing of the psyllids was performed. The captured insects were analyzed for the presence of Las using the molecular qPCR test, and probability of Las inoculation by psyllids based on bacterial titer was calculated. The periods of highest psyllid captures were the biweekly periods corresponding to the winter climatic season. The predominant sex ratio was males, regardless of the evaluated municipalities and climatic seasons of the year. The average index of Las+psyllids was 88%, independent of sex ratio, and in the summer, this index was reduced to 78%. The probability of Las inoculation by captured psyllids was 35.8%, with females showing a higher probability of inoculation than males.

Keywords: Greening, Asian citrus psyllid, pest monitoring, infectivity, sex ratio, huanglongbing.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	7
2.1. Regiões e métodos de monitoramento dos psílídeos	7
2.2. Monitoramento climático	8
2.3. Amostras e coletas de <i>Diaphorina citri</i>	8
2.4. Razão sexual.....	9
2.5. Número de adultos de <i>Diaphorina citri</i> capturados e proporção de insetos portadores de <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>	10
2.6. qPCR para identificação e quantificação de <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>	10
2.6.1. Extração de ácido desoxirribonucleico (DNA).....	10
2.6.2. Reação em cadeia de polimerase em tempo real (qPCR).....	11
2.7. Probabilidade de inoculação de <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> por <i>Diaphorina citri</i>	12
2.8. Análise dos dados.....	12
3. RESULTADOS.....	14
3.1. Dados climáticos.....	14
3.2. Capturas de psílídeos nas estações do ano	14
3.3. Razão sexual dos psílídeos capturados	15
3.4. Incidência de psílídeos com <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>	16
3.5. Probabilidade de sucesso na inoculação de <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> pelos psílídeos	17
4. DISCUSSÃO	18
5. CONCLUSÕES	22
REFERÊNCIAS	23

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor de laranja do mundo (FAO, 2021). O levantamento da safra 2023/2024 realizado pelo Fundecitrus no cinturão citrícola no estado de São Paulo e sudoeste de Minas Gerais informa uma área de 169,29 milhões de plantas produtivas, 337.091 hectares plantados, totalizando uma produção de 307,22 milhões de caixas (cada caixa com 40,8 kg), sendo 2,22% menor do que a produção da safra 2022/2023, que finalizou com um volume de 314,21 milhões de caixas (Fundecitrus, 2023a; 2024).

No estado do Paraná, a laranja é a fruta mais produzida, com destaque na região Noroeste, que detém mais de 50% da produção (SEAB, 2020). De acordo com dados da Secretaria de Agricultura e Abastecimento, a laranja está presente de forma comercial em 286 dos 399 municípios paranaenses. Em 2020, havia aproximadamente 21 mil hectares cultivados, representando de 10 a 11 milhões de plantas, nos quais, em média, produz 700 mil toneladas de laranja (17 milhões de caixas) (SEAB, 2020).

A cultura de citros tem uma continuidade espacial, temporal e genética, reunindo características de monocultura extensa, que em ambiente favorável, apresentam elevada incidência de pragas e doenças (Bassanezi et al., 2014). Dentre todos os desafios fitossanitários na produção e cultivo de citros, o greening ou huanglongbing (HLB) é a principal doença da cultura, por causa de sua natureza destrutiva e rápida disseminação pelo psíldeo asiático dos citros (Teixeira et al., 2010). De 2005 a 2020 cerca de 55,5 milhões de plantas foram erradicadas por causa do HLB no estado de São Paulo (Bassanezi et al., 2020).

O HLB é uma doença causada por bactérias gram-negativas, restritas ao floema das plantas hospedeiras (Garnier et al., 1984). Nos países asiáticos que tem a presença de HLB, está associado a bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las) e na África, associado a bactéria *Ca. L. africanus* (Laf) (Garnier & Bové, 1996). Em 2004, uma nova espécie de liberibacter foi identificada no Brasil, *Ca. L. americanus* (Lam), além da presença de Las (Teixeira et al., 2005). Além dessas bactérias, os fitoplasmas do grupo 16Sr IX (Teixeira et al., 2008a), do grupo 16Sr III (Wulff et al., 2019) e do grupo 16Sr I (Chen et al., 2009) induzem os mesmos sintomas do HLB em citros. Atualmente, Las é predominantemente associada ao HLB nos pomares do estado de São Paulo e Minas Gerais, principal área citrícola do Brasil (Wulff et al., 2019; Bassanezi et al., 2020).

O primeiro relato de HLB (huanglongbing em chinês significa doença do ramo amarelo) foi na China em 1919 (Reinking, 1919; Lin, 1956). No Brasil, o HLB foi relatado pela primeira vez em 2004 (Colleta Filho et al., 2004), ocorrendo em 35 municípios de São Paulo

(Teixeira et al., 2005). Ao longo dos anos a doença se espalhou para 340 municípios produtores de citros de São Paulo, Minas Gerais, Paraná e Mato Grosso do Sul (Bassanezi et al., 2020). Em 2022 foi relatado no estado de Santa Catarina (CIDASC, 2022). Em geral, as folhas das plantas infectadas apresentam sintomas de mosqueado, ou amarelecimento, podendo evoluir para toda a copa (Da Graça, 1991). Os frutos dos ramos afetados são menores, deformados e irregulares, com sementes abortadas e caem prematuramente (Bové, 2006). Plantas doentes, podem chegar a 80% de perda de produção em comparação com plantas sadias (Bassanezi et al., 2011).

Em 2023, a incidência média estimada de plantas com a presença de HLB foi de 38,06%, que corresponde a aproximadamente 77,22 milhões de árvores doentes no estado de São Paulo e sudoeste de Minas Gerais (Fundecitrus, 2023b). No estado do Paraná, não há levantamento oficial que aponte a incidência de HLB. A doença, foi relatada no município de Altônia em 2006, sendo confirmada em 2007 por meio de exame laboratorial através da técnica de PCR (*polymerase chain reaction*) (Nunes et al, 2007). Porém, a incidência de HLB tem aumentado, pelos relatos de técnicos e produtores, gerando preocupação em toda cadeia citrícola. Diante deste cenário, em meados de 2023, ações lideradas pela ADAPAR (Agência de Defesa Agropecuária do Paraná) e IDR (Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná) vêm sendo realizadas, como fiscalização e levantamento da incidência da doença para conscientização da importância e da necessidade do manejo do HLB pelos citricultores.

As espécies de *Ca. Liberibacter* que ocorrem nos citros podem ser transmitidas por meio de material vegetal infectado via enxertia e naturalmente planta a planta pelo psílideo, sendo essa a maneira como ocorre a disseminação da doença no campo (Bové, 2006; Teixeira et al., 2010). O psílideo *Diaphorina citri* mede aproximadamente de 2 a 3 mm na fase adulta, tem cor cinza e asas transparentes com manchas escuras. A fase jovem do inseto apresenta 5 fases ninfais (Hall et al., 2008). O adulto vive em média 45 dias, porém pode ter uma longevidade de até 4 meses (Gallo et al., 2002). A preferência alimentar e de colocar ovos é por brotos novos das plantas, principalmente nos estágios vegetativo V2 e V3 (Cifuentes-Arenas et al., 2018). Uma fêmea pode colocar de 200 a 800 ovos na sua fase adulta (Nava et al., 2007; Parra et al., 2010). Os ovos de coloração amarela são depositados nas brotações novas e as ninfas se desenvolvem acompanhando o crescimento das brotações. A presença de ramos novos nas plantas é determinante para a ocorrência e aumento populacional da *D. citri* (Parra et al., 2010).

A transmissão de Las pelo psílideo adulto é mais eficiente quando as bactérias são adquiridas durante o estágio de ninfa do que quando adulto em plantas sintomáticas (Inoue et

al., 2009). Ninfas de *D. citri* possuem elevada eficiência em adquirir Las também em plantas assintomáticas, quando se desenvolvem no local em que Las foi inoculado (Lee et al., 2015). A bactéria tem capacidade de sobreviver e multiplicar dentro do psílideo, com transmissão persistente e propagativa, com período de latência médio de duas semanas. A partir da aquisição da bactéria no estágio de ninfa, o inseto adulto tem a capacidade de transmiti-la por todo seu ciclo de vida (Ammar et al., 2011a; Canale et al., 2017; Inoue et al., 2009). O sucesso da aquisição de Las pelo psílideo está diretamente ligado ao título de Las na planta: quanto maior o título, maior a chance de aquisição de Las pelo inseto e quanto maior o título de Las no inseto, maior a probabilidade de inoculação de Las nas plantas (Lopes & Cifuentes-Arenas, 2021).

As condições ambientais como temperatura, têm papel importante na relação patógeno-hospedeiro porque influenciam nos fluxos de brotações, no título da bactéria, tanto nas plantas quanto no vetor *D. citri* e na manifestação dos sintomas. Temperaturas mais amenas retardam o amadurecimento das brotações e todas as plantas infectadas na temperatura de 22 a 24 °C desenvolvem sintomas de mosqueado. Na faixa de 24 a 28 °C, plantas infectadas têm elevados títulos bacterianos nos tecidos, enquanto temperaturas acima de 33 °C afetam negativamente o título bacteriano na planta e a aquisição pelo psílideo (Lopes et al., 2009a; 2013; 2017; Lopes & Cifuentes-Arenas, 2021).

O psílideo tem preferência por dispersão a curtas distâncias (Tomaseto et al., 2016). A dispersão a longas distâncias, provavelmente está associada à voos sequenciais curtos ou dispersão pelo vento (Bassanezi et al., 2020). A redução da umidade relativa do ar estimula a dispersão do vetor (Zorzenon et al., 2021).

Dentre as estratégias de manejo, o controle do vetor, a eliminação de plantas infectadas e plantio de mudas sadias são ações importantes para reduzir a infecção (Bové, 2006; Belasque Júnior et al., 2009). A partir de 2005, foi determinada por obrigatoriedade a eliminação de plantas cítricas infectadas com HLB (Instrução Normativa N° 10 de 18/03/2005 substituída pela Instrução Normativa N° 53, de 16/10/2008) (Brasil, 2008). Porém, em meados de 2021, pela portaria do MAPA N° 317 de 21 de maio de 2021, tornou-se obrigatória a erradicação de plantas sintomáticas de HLB até o oitavo ano após o plantio e facultativa para os demais anos, desde que seja realizado o monitoramento e controle do vetor (Brasil, 2021).

O controle de *D. citri* é considerado essencial para o manejo do HLB. Diversos estudos relataram alta eficácia de diferentes grupos químicos de inseticidas sobre a mortalidade de *D. citri* (Bassanezi et al., 2020). Para prevenir infecções primárias e secundárias em pomares, aplicações de inseticidas para o controle de psílideo têm sido realizadas com mais frequência pelos produtores. Pulverizações de inseticidas com intervalos quinzenais oferecem uma

oportunidade para prevenir infecções secundárias (Bassanezi et al., 2020). Porém, nos períodos de maiores brotações, pulverizações com intervalos menores aumentam a eficiência no controle do inseto e conseqüentemente diminuem as chances de infecções secundárias e primárias (De Carli et al., 2018). Além do intervalo de aplicação, outro fator importante no controle do psilídeo é a rotação dos grupos químicos dos inseticidas utilizados, ou seja, uma rotação malfeita e intervalos longos entre as aplicações para controle do vetor, resulta em baixo controle e taxa elevada de ninfas nas brotações (Paulo, 2024). Após o aumento da população de psilídeos no cinturão citrícola de São Paulo e Minas Gerais, estudos mostraram resistência do psilídeo à grupos de inseticidas, como piretróides, neonicotinóides e organofosforados (Fundecitrus, 2023c). A causa provável foi a falta de rotação de inseticidas nas pulverizações, o que corrobora os dados de Tiwari et al (2011) e Chen et al (2020) na Flórida, onde a falta de rotação de modos de ação elevou a razão de resistência, ocasionando baixa mortalidade do inseto.

Diversos trabalhos têm sido realizados a fim de quantificar a presença de Las em *Diaphorina citri* em diferentes regiões e há uma aparente relação entre incidência de plantas com HLB, condições ambientais e proporção de psilídeos portadores de Las (Hall, 2018; Suaste-Dzul et al., 2017; Wulff et al. 2020). No Paraná, um levantamento da ocorrência de psilídeos feito pela ADAPAR em cartões adesivos em pomares não comerciais, teve poucas amostras analisadas através de PCR convencional e que foram negativas para a presença de Las (Nunes et al., 2024).

O monitoramento do psilídeo tem papel fundamental para um bom manejo de *D. citri* e, basicamente, consiste em duas formas de avaliação: i) a inspeção visual de brotos, para encontrar as diferentes fases do inseto (ovo, ninfa e adulto), e ii) o monitoramento com cartões adesivos amarelos alocados nas plantas para monitoramento de adultos. O monitoramento de brotos pode servir como parâmetro de qualidade da aplicação de inseticidas. A constatação da presença de ninfa, principalmente de 4º e 5º ínstaes em brotações, pode ser um indicativo de deficiências no manejo do psilídeo, como intervalo e frequência de aplicação, rotação de grupos químicos e qualidade da aplicação. O monitoramento com cartões adesivos amarelos indica a flutuação populacional e a dispersão dos insetos adultos e qual o local da propriedade tem maior pressão externa do vetor. Quando utilizadas as duas formas de inspeções e monitoramento de *D. citri*, a assertividade pode ser maior e conseqüentemente maior a chance de reduzir tanto infecções primárias quanto secundárias (Miranda et al., 2011; Ulian, 2016).

Os cartões adesivos amarelos devem ser instalados em todo o perímetro da propriedade, no terço superior das plantas, com 150 a 250 metros de espaçamento entre eles para aumentar a eficiência da captura dos insetos. Os cartões quando expostos a períodos longos

no campo, perdem qualidade e eficiência na captura dos insetos. As trocas e leituras dos cartões são recomendadas a cada 15 dias (Miranda et al., 2011). Leonardo (2014), comprovou que treinamentos periódicos para os leitores dos cartões mantém uma alta eficiência nas leituras das armadilhas e quando as leituras são realizadas em escritório a assertividade é maior se comparado a leitura no campo. Para a detecção de Las nos psilídeos capturados, o período de exposição é importante para não degradar o inseto e para que não haja degradação do DNA, afetando a detecção da bactéria pelo método molecular (Sala, 2013).

No ano de 2011, o Fundecitrus criou o programa Sistema de Alerta Fitossanitário, com o objetivo de monitorar os psilídeos nos pomares. Nesse programa, os produtores monitoram a população de psilídeo a cada duas semanas com cartões adesivos amarelos. O número de psilídeos capturados por armadilhas e o estágio vegetativo predominantes nas plantas são os dados de entrada para o sistema. Em 2019, o Alerta Fitossanitário contou com 13 grupos de manejo regional (10 em São Paulo, 1 em Minas Gerais e 2 no Paraná) (Bassanezi et al. 2020).

A avaliação das práticas de manejo para a redução de fontes de inóculo de HLB influenciam no número de insetos portadores de Las, visto que quanto menor a presença de plantas fontes de inóculos, resultam em menor número de psilídeos portadores de Las (Bassanezi et al., 2013). Para a determinação da presença da bactéria no inseto, o método mais utilizado é a PCR (Teixeira et al., 2010). Essa ferramenta tem como objetivo mostrar se há ou não a presença do DNA da bactéria no inseto. A técnica de qPCR (PCR em tempo real ou PCR quantitativa), permite quantificar o DNA da bactéria no hospedeiro, assim além da detecção é possível sua quantificação (Teixeira et al., 2008b). Quanto maior é o título de Las nos psilídeos, maior a probabilidade de inoculação de Las com sucesso nas plantas (Lopes & Cifuentes-Arenas, 2021).

Estudos sobre a razão sexual a campo são importantes a descrição de populações, principalmente se associado à presença de Las na população avaliada, e eventualmente de *Wolbachia*. Dados obtidos por Hall (2018) na Flórida, indicam que as fêmeas possuem maiores taxas de infecções que machos, porém a quantidade de macho e fêmea capturado não diferiu em dois de três períodos. Volpe et al. (2024) em levantamento realizado em Mogi Mirim (SP), encontraram 43% mais fêmeas se comparado à machos de *D. citri*. Dados sobre a razão sexual de populações de psilídeos são escassos na literatura, principalmente no Brasil.

Em função do aumento da população de psilídeo no Paraná esse trabalho teve o objetivo de avaliar a presença e título de Las em indivíduos de *D. citri* e avaliar a razão sexual dos psilídeos capturados em áreas endêmicas com HLB na região noroeste do Paraná. O

levantamento destes dados é importante para conhecermos a população de machos e fêmeas na região de estudo e avaliar o potencial de transmissão de Las nesta amostragem de psílídeos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Regiões e métodos de monitoramento dos psilídeos

Durante o período de outubro de 2022 a outubro de 2023, a população de psilídeos foi monitorada na região noroeste do Paraná, englobando a principal área citrícola do estado, nos municípios de Alto Paraná, Floraí, Guairaçá, Inajá, Loanda, Nova Esperança, Ourizona, Paranavaí, Rondon, e Terra Rica (Figura 1), totalizando 10 municípios. O período de avaliação englobou as quatro estações climáticas, a fim de avaliar sua influência na flutuação, captura e infectividade do psilídeo. Foram realizadas análises quinzenais, sendo a primeira leitura até o 14º dia do mês e a segunda até o 30º dia do mês.

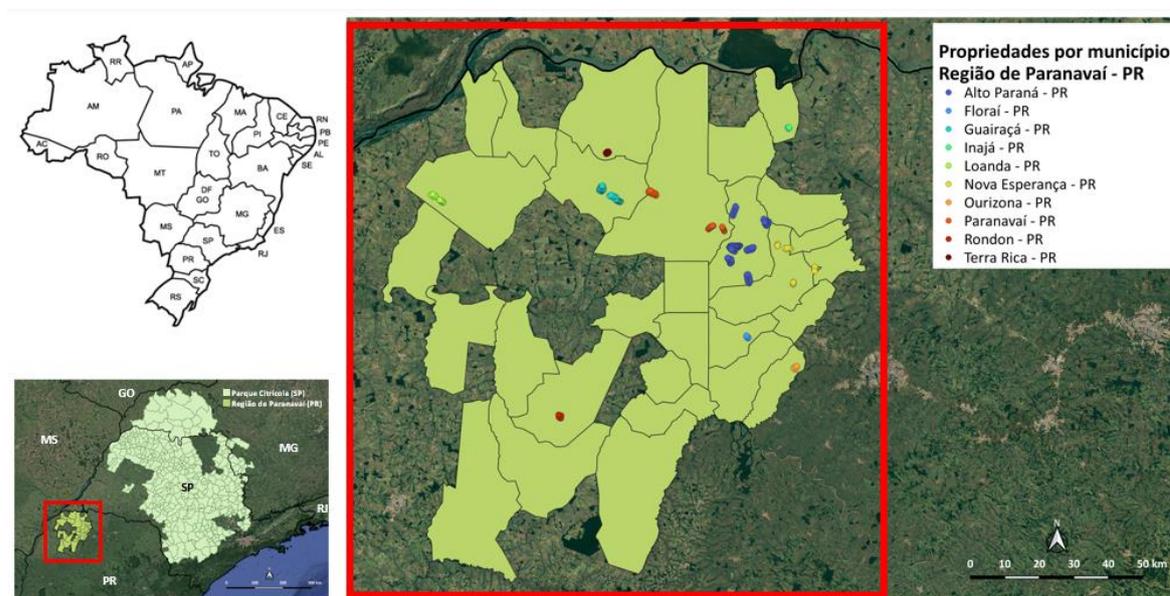


Figura 1. Mapa do sistema do Alerta Fitossanitário mostrando em detalhes a Regional Paranavaí, com destaque aos municípios onde foram realizados monitoramentos e coletas de *Diaphorina citri* em cartões adesivos georreferenciados.

Para a avaliação, foram utilizados cartões adesivos amarelos de 30 cm de comprimento por 10 cm de largura da marca ISCA®, que fazem parte do Sistema Alerta Fitossanitário do Fundecitrus, para a captura dos insetos e cada município mencionado tinha no mínimo uma propriedade monitorada.

Os cartões adesivos foram instalados nos perímetros das propriedades, no terço superior das plantas, voltadas para fora da propriedade para maior eficiência do monitoramento e captura. A avaliação foi realizada em 28 propriedades e os cartões foram trocados e avaliados

a cada quinzena (Tabela 1), totalizando 3.950 cartões ao longo da coleta de dados e 1664 hectares monitorados.

Tabela 1. Propriedades com cartões adesivos amarelos monitorados, área avaliada por município e quantidade de cartões para avaliação da presença de *Diaphorina citri*.

Municípios	Propriedades	Cartões	Área (ha)
Alto Paraná	8	151	813
Florai	1	6	27
Guairaçá	4	75	285
Inajá	1	5	25
Loanda	1	21	100
Nova Esperança	5	56	135
Ourizona	1	15	30
Paranavaí	5	75	144
Paraiso do Norte	1	9	60
Terra Rica	1	12	45
Total	28	425	1664

2.2. Monitoramento climático

Para analisar as informações climáticas, os dados foram agrupados nas estações primavera, verão, outono e inverno. O monitoramento climático foi realizado por meio de uma estação meteorológica, modelo iMetos 3.3 GSM, com dados mensais da estação localizada em Paranavaí, centro da área que foi monitorada (55 km de raio). As informações monitoradas foram a precipitação, umidade relativa do ar e temperatura.

2.3. Amostras e coletas de *Diaphorina citri*

Após leitura dos cartões realizadas em escritório, aqueles em que houve incidência de psilídeos foram identificados quanto a quantidade, sexo do psilídeos e os adultos coletados para detecção de Las. Os adultos foram retirados do cartão com o auxílio de uma pinça e lupa de aumento de 10 vezes e armazenados de forma individual em microtubos contendo 500 µL de etanol 70% para conservação. O processamento dos adultos coletados para a extração de DNA e detecção de Las foram realizadas no Laboratório de Diagnóstico do Fundecitrus. No intervalo entre a coleta das armadilhas e as extrações de DNA, os insetos ficaram armazenados a -20 °C, conforme descrito por Sala (2013).

2.4. Razão sexual

Antes do processamento para extração de DNA, foi realizada a identificação do sexo com auxílio de uma lupa conta fios com 10 vezes de aumento, identificando o dimorfismo sexual da genitália no final do abdômen, de acordo com Aubert (1987). O macho possui o extremo distal do abdômen com base arredondada e ápice na vertical (Figura 2A), enquanto a fêmea possui o extremo distal do abdômen reto e pontiagudo (Figura 2B), características que auxiliam no encaixe do casal durante a cópula. Por meio de tomografia, Alba-Tercedor et al (2021) conseguiram imagens detalhadas do corpo do psilídeo (Figura 3A) macho e (Figura 3B) fêmea. A razão sexual foi calculada pela divisão do número de fêmeas pelo total de indivíduos capturados.

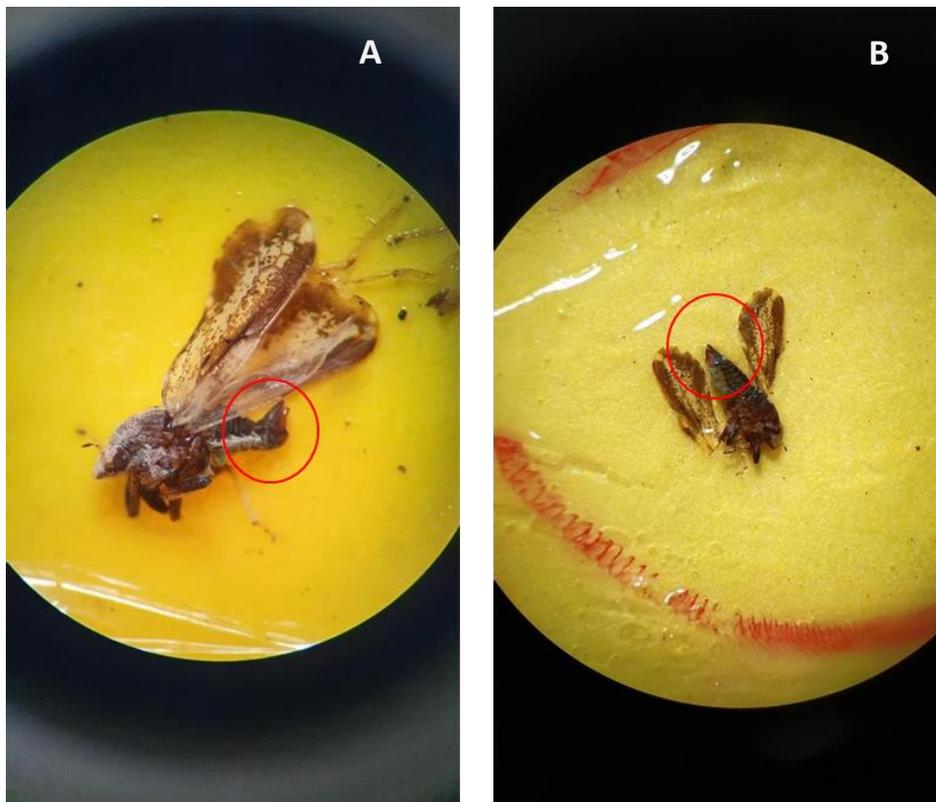


Figura 2. *Diaphorina citri* capturado em armadilhas adesivas. Círculos vermelhos no final do abdômen diferenciam a sexagem. (A) Macho, (B) Fêmea. Fonte: Wérica Valim, Cocamar.

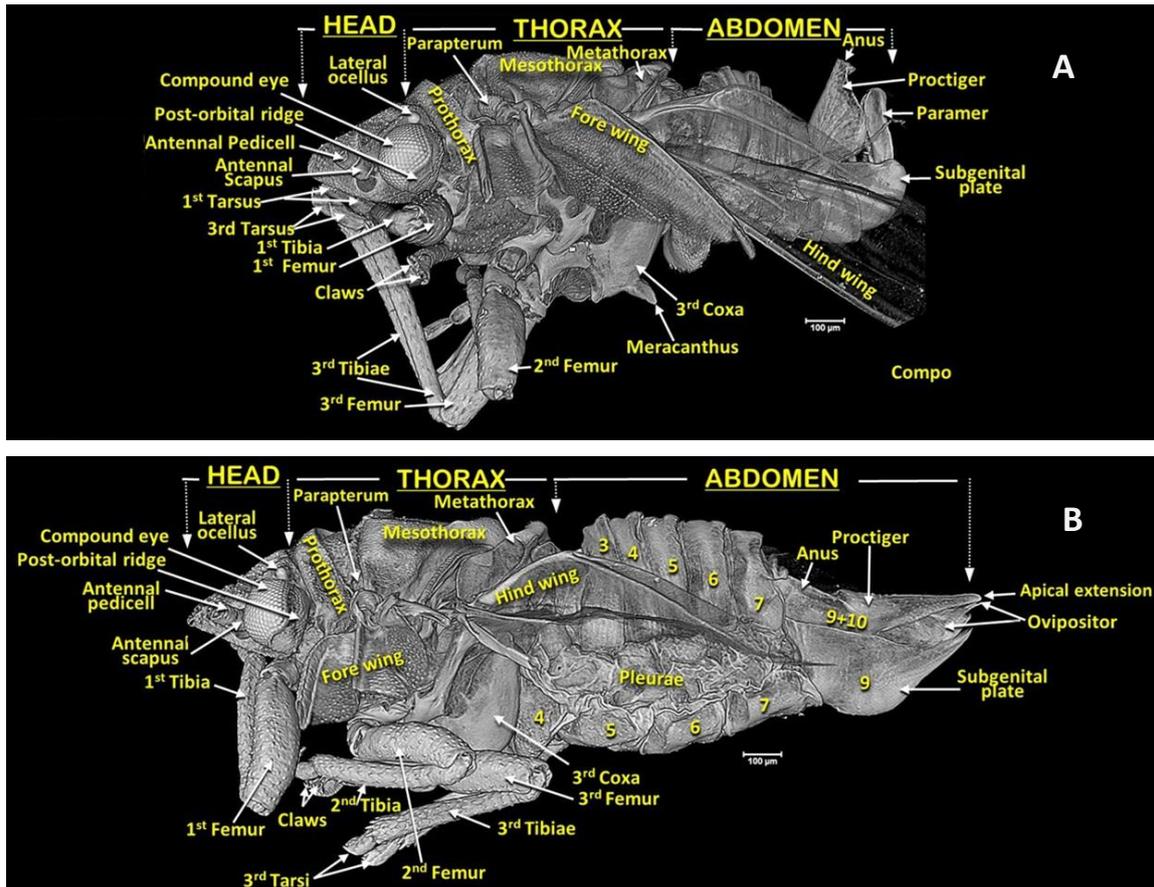


Figura 3. Imagens de tomografia indicando a anatomia do corpo de *Diaphorina citri*. (A) Macho, (B) Fêmea. Fonte: Alba-Tercedor et al (2021).

2.5. Número de adultos de *Diaphorina citri* capturados e proporção de insetos portadores de *Candidatus Liberibacter asiaticus*

Para cada quinzena de avaliação e coleta, foram avaliados o número de psilídeos adultos capturados e a proporção de psilídeos portadores de Las após análise de qPCR. A proporção de *D. citri* com Las, foi obtida pela divisão de insetos positivos para Las pelo número total de insetos capturados, multiplicando por 100, obtendo a porcentagem de psilídeos portadores de Las, nos períodos avaliados.

2.6. qPCR para identificação e quantificação de *Candidatus Liberibacter asiaticus*

Para a detecção do DNA da bactéria Las nas amostras de psilídeos coletados, foi utilizado a técnica de PCR em tempo real (qPCR).

2.6.1. Extração de ácido desoxirribonucleico (DNA)

A extração do DNA dos psílídeos coletados foi realizada seguindo o método CTAB (Murray e Thompson, 1980). Os insetos foram macerados com o auxílio de pistilo em 400 microlitros de tampão de extração (CTAB 2,0%, NaCl 8,2%, PVP 1000 2,0%, Tris 0,01 M pH 8,0 e EDTA 0,05 M pH 8,0) contendo 0,2% de β -mercaptoetanol. Depois da maceração, as amostras foram levadas à incubação por 30 minutos em banho maria a 65 °C seguido de centrifugação a 960 g durante 5 minutos. Do sobrenadante, foram retirados 300 μ L, transferidos para um novo tubo e adicionados 350 μ L de clorofórmio: álcool isoamílico, retornando as amostras para centrifugação a uma rotação de 15.300 g por 10 minutos. Depois, foi retirado 300 μ L do sobrenadante, transferido para um novo tubo e adicionado 180 μ L de isopropanol 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 foi limpo com 700 μ L 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 ressuspendidas em 25 μ L em água deionizada, purificada em sistema Milli-Q e autoclavada, (Daniel, 2019).

2.6.2. Reação em cadeia de polimerase em tempo real (qPCR)

De acordo com a 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 três microlitros da amostra de DNA, aproximadamente 100 nanogramas para cada reação de qPCR; 6 microlitros de Path ID Master Mix da marca Thermo Fischer, contendo DNA polimerase, solução tampão, dNTP, MgCl₂ e corante ROX™, utilizando de acordo com recomendações do fabricante; 0,5 microlitros dos primers HLBas: 5' TCGAGCGCGTATGCAATACG 3' (forward) e HLBr: 5' GCGTTATCCCGTAGAAAAAGGTAG 3' (reverse) com concentração final de 0,5 μ M de cada primer na reação e 0,2 microlitros de sonda HLBp: FAM-AGACGGGTGAGTAACGCG-MGB-NFQ com concentração final da sonda na reação de 0,2 μ M. A detecção simultânea do DNA de psílídeos foi possível pela utilização dos oligonucleotídeos e sonda específicos: 0,35 microlitros dos primers DCF 5' TGGTGTAGATGGTTGTGATCTGATGTG 3' (forward) e DCR 5' ACCGTTCCACGACGGTGA 3' (reverse) com concentração final de 0,35 μ M dos primers na reação e 0,15 microlitros de sonda DCP VIC-TGTGGGCGAGGCTACAGAAC-MGB-NFQ com concentração final da sonda na reação de 0,2 μ M (Manjunath et al., 2008) no volume final da reação de 12 microlitros.

O processo de qPCR iniciou com a desnaturação do DNA alvo por 10 minutos a 95 °C de 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C e 45 segundos a 58 °C para anelamento e extensão dos primers. Como controle foram utilizadas amostras de DNA extraídas de *D. citri* portadores de Las como controle positivo, amostras de DNA extraída de *D. citri* sem Las como controle negativo e água autoclavada e purificada como “branco” da reação. As amostras e os controles foram amplificados em termocicladores Step One Plus da marca Applied Biosystems.

Para validação da presença de DNA do psilídeo nas amostras avaliadas foi considerado o valor de Ct até 36 para sonda DCP. Com relação às amostras portadoras de Las, foi considerado o valor de Ct até 35 para sonda HLBp (Daniel, 2019).

2.7. Probabilidade de inoculação de *Candidatus Liberibacter asiaticus* por *Diaphorina citri*

A partir do valor de Ct obtido para as amostras positivas de psilídeos com Las, foi estimada a probabilidade de sucesso na transmissão de Las (p_{Las}) para plantas de acordo com o título bacteriano no corpo dos psilídeos, obtida pelo modelo logístico $p_{Las} = 1 / (1 + e^{-(5,04 - 0,22 * Ct)}) * 100$, onde e é o exponencial e Ct é o valor de número de ciclos (*Cycles threshold*) dado calculado pela qPCR (Lopes & Cifuentes-Arenas, 2021). O valor de Ct é inversamente proporcional ao título de Las no corpo do inseto, ou seja, quanto menor o valor de Ct, maior o título de Las no corpo do psilídeo. Utilizando os valores de título bactéria no formato Log, quanto maior esses valores de Las no psilídeo, maiores as possibilidades de inoculação (Lopes & Cifuentes-Arenas, 2021).

2.8. Análise dos dados

Para cada estação climática foram avaliadas as capturas de psilídeos na região. Foram determinadas a razão sexual através da quantidade de psilídeos machos e fêmeas capturados, incidência de psilídeo Las+ e a probabilidade de sucesso na transmissão de Las.

A variável razão sexual foi determinada como a proporção de machos e fêmeas encontrados nas armadilhas em relação quantidade total de psilídeos. A análise foi realizada por meio de tabelas de contingência utilizando o teste Chi² para determinar a independência das capturas de machos e fêmeas entre as estações climáticas do ano e entre os municípios. Foi considerado um nível de significância (α) igual a 0,05.

Por outro lado, as variáveis capturas de psilídeos, incidência de psilídeo Las+ e probabilidade de inoculação com psilídeo portadores de Las em diferentes estações climáticas do ano foram ajustadas com o modelo linear generalizado (GLM), com distribuição binomial ou gaussiana. O sexo dos psilídeos, a estação climática, o município e o número de psilídeos por cartão foram considerados como fatores fixos do modelo. Foi considerado um nível de significância (α) igual a 0,05 e foi utilizado o teste de Tukey como post-test para comparar as médias. Todas as análises foram realizadas com o software R (R versão 4.2.0 softwares, R Core Team, Vienna, Áustria).

3. RESULTADOS

3.1. Dados climáticos

A precipitação total da região, com base na estação localizada no município de Paranavaí foi de 1.565 mm durante o ano. No verão choveu 634 mm, no outono 404 mm, na primavera 382 mm e no inverno 145 mm. A temperatura média foi de 22,6 °C, oscilando entre 24,2 °C no verão, 23,2 °C na primavera, 22,2 °C no outono e 20,8 °C no inverno. A umidade relativa do ar média foi de 74%, com índices de 83,4% no verão, 73,9% no outono, 72,4% na primavera e 66,7% no inverno. No verão foram registradas as temperaturas médias mais altas, e os maiores picos de altas temperaturas chegando a valores de 34 a 36 °C.

3.2. Capturas de psilídeos nas estações do ano

As capturas avaliadas foram maiores nas quinzenas do inverno, com médias de 0,56 psilídeo/cartões, seguido da primavera com 0,17 psilídeo/cartões, do outono com 0,17 psilídeo/cartões e do verão com 0,04 psilídeo/cartões (Figura 3). A flutuação de insetos capturados (Tabela 2) sofreu influência das estações climáticas nas quinzenas de monitoramento ($p=0,0006$).

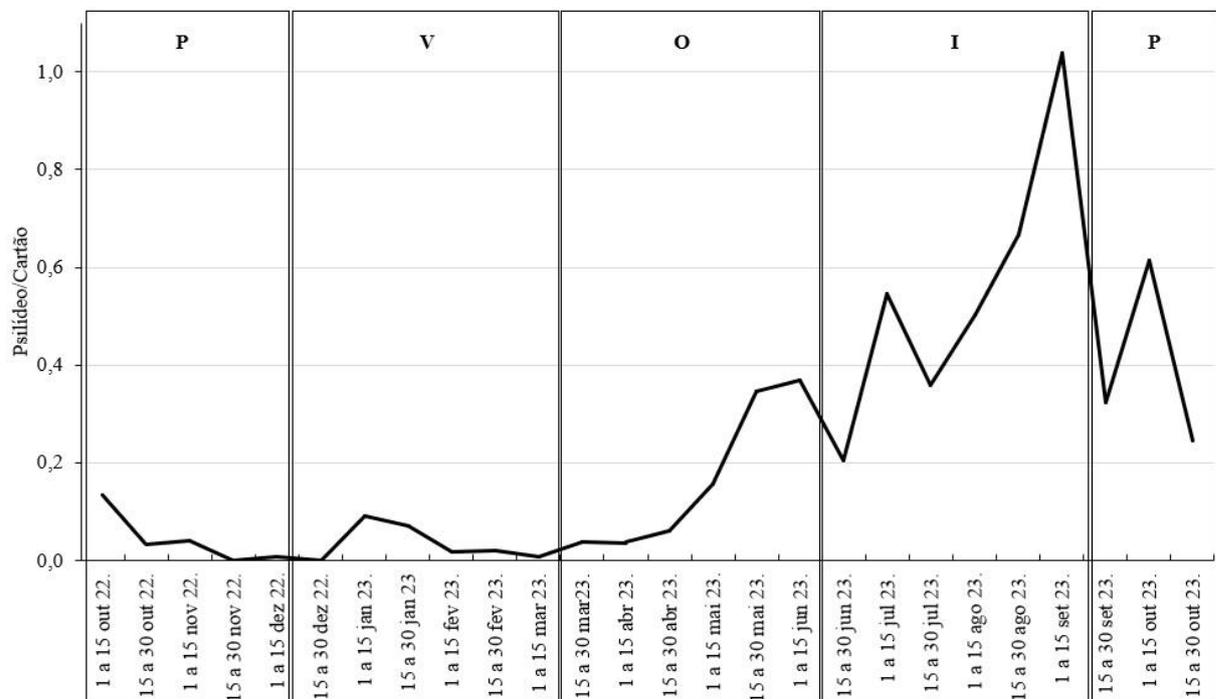


Figura 4. Psilídeos capturados por cartões adesivos no período de outubro 2022 a outubro de 2023, na região noroeste paranaense. P = Primavera; V = Verão; O = Outono e I = Inverno.

Tabela 2. Média de psilídeos capturados por cartões adesivos nas estações climáticas no período de outubro de 2022 a outubro de 2023 na região noroeste paranaense.

Estação do ano	Psilídeos por cartão ($p = 0,0006$)
Inverno	$0,56 \pm 0,12$ a
Primavera	$0,17 \pm 0,08$ b
Outono	$0,17 \pm 0,06$ b
Verão	$0,04 \pm 0,01$ b

Médias com letras diferentes são significativas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

3.3. Razão sexual dos psilídeos capturados

Neste estudo, foram capturados e avaliados 1.106 psilídeos e a razão sexual foi maior para machos do que fêmeas, com 0,65 de valor médio anual entre as estações, enquanto 3,1% do total de insetos não pôde ser identificado em relação ao sexo devido aos danos causados no corpo do inseto durante o manuseio dos cartões. A relação entre machos e fêmeas se manteve em função dos períodos do ano, ou seja, a presença de machos foi maior em todas as estações. No verão e outono, foram encontradas as maiores diferenças entre as populações, com razão de 0,75 de machos. No inverno com 0,64 e na primavera a razão foi mais equilibrada em relação a presença de machos e fêmeas, com 0,56.

A razão entre machos e fêmeas sempre foi favorável para captura de machos, embora tenha sofrido influência da estação do ano. No outono, a frequência de captura de machos foi significativamente maior do que o esperado (res._{aj} 4,17), enquanto na primavera a frequência de captura de fêmea foi significativamente maior que o esperado (res._{aj} 3,19) (Tabela 3). Por outro lado, a predominância de capturas de insetos machos foi independentemente do município ($p = 0,3927$), ou seja, a razão sexual se manteve a mesma entre os municípios avaliados.

Tabela 3. Tabela de frequência de psilídeos machos e fêmeas de acordo com as estações climáticas do ano durante o período de outubro de 2022 a outubro de 2023.

Estação do ano		Chi ² = 26,27 P < 0,0005	
		Macho	Fêmea
Outono	F. observada	139*	39
Inverno	F. observada	414	244
Primavera	F. observada	122	99*
Verão	F. observada	32	9

*F. observada > F. esperada ($p < 0,05$)

3.4. Incidência de psilídeos com *Candidatus Liberibacter asiaticus*

A porcentagem de psilídeos Las+ foi de 88%, sendo 87% dos machos e 89% das fêmeas portadores de Las. A população de psilídeos Las+ foi significativamente maior na primavera (91%) do que no verão (78%), enquanto o outono e inverno foram intermediários (Figura 5).

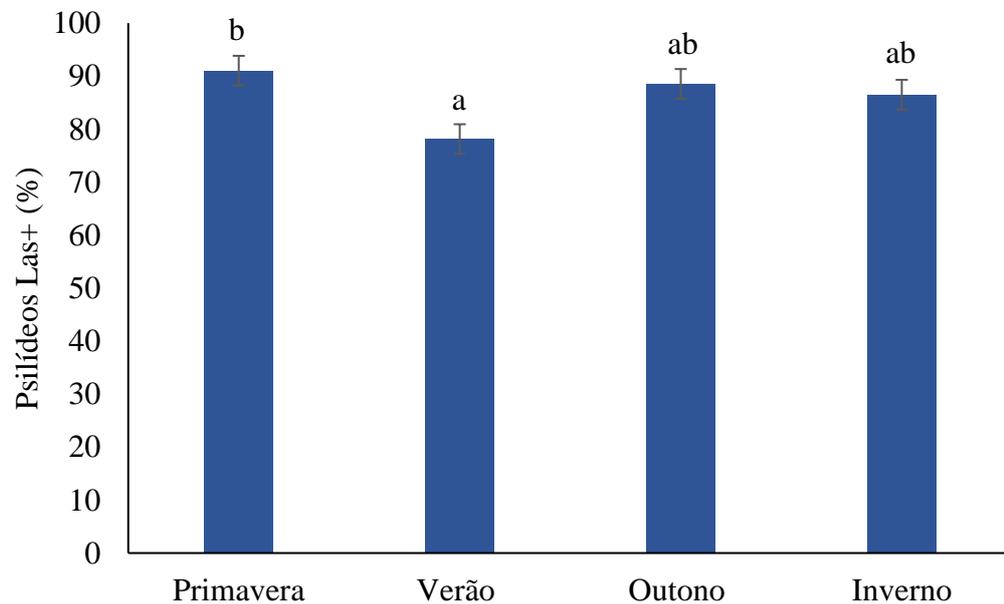


Figura 5. Incidência de adultos portadores de *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las+) de acordo com número de insetos capturados por estação do ano. Médias com letras diferentes tem diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p < 0,0166$).

A porcentagem dos insetos portadores de Las não apresentou diferenças significativas em função do sexo ($p = 0,74028$) ou dos municípios ($p = 0,07327$).

3.5. Probabilidade de sucesso na inoculação de *Candidatus Liberibacter asiaticus* pelos psilídeos

Considerando o título de Las nos psilídeos, que tem uma relação direta com a probabilidade de sucesso na inoculação, não houve influência significativa das estações climáticas do ano. Enquanto a probabilidade média de inoculação foi de 35,80%, durante o ano todo, houve tendências variando entre 32,8 % no verão, 35,4% no inverno, 35,6 % na primavera, e 39,4% no outono (Tabela 4). A probabilidade de um psilídeo infectar uma planta durante sua alimentação, foi significativamente maior nas fêmeas 37,4%, do que nos machos 34,1% (Tabela 5).

Tabela 4. Probabilidade média de sucesso na inoculação de *Candidatus Liberibacter asiaticus* por psilídeos em função da estação climática durante o período de outubro de 2022 a outubro de 2023.

Variável		Probabilidade de inoculação		
Estação climática	Verão	32,8 ± 4,3	a	$p = 0,2159$
	Primavera	35,6 ± 1,9	a	
	Inverno	35,4 ± 1,4	a	
	Outono	39,4 ± 2,0	a	

Médias com letras iguais não tem diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Tabela 5. Probabilidade média de sucesso na inoculação de *Candidatus Liberibacter asiaticus* por psilídeos em função do sexo durante o período de outubro de 2022 a outubro de 2023.

Variável		Probabilidade de inoculação		
Sexo	Macho	34,1 ± 1,7	a	$p = 0,0193$
	Fêmea	37,4 ± 1,8	b	

Médias com letras diferentes tem diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

4. DISCUSSÃO

No presente trabalho, foram avaliados resultados conjuntos da região noroeste paranaense, monitorada pelo sistema de alerta fitossanitário do Fundecitrus, devido ao tamanho da área avaliada, de 1.665 hectares, 55 km de raio entre os municípios, diferenças no número de armadilhas por propriedade, quantidade de propriedades dentro de cada município e forma de manejo do HLB.

De maneira geral, as capturas de psíldeos sofreram influência da estação climática. O inverno foi o período de maior captura, corroborando com os dados observados no cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo Mineiro (Sassi, 2016; Daniel, 2019; Zorzenon, 2019). Isso reflete a maior dispersão de psíldeos que ocorre nos meses de julho a novembro (Zorzenon, 2019). Outro fator importante foi a menor umidade relativa do ar no inverno. Além disso, o inverno foi a estação com a menor temperatura máxima do ar, que segundo Zorzenon (2019) também estimula a dispersão do psíldeo. Dados obtidos por Zito (2019) no noroeste do Paraná mostraram que nos meses de agosto a outubro, com as características climáticas da região, foi caracterizado a presença de um pico de brotações que, conseqüentemente, estimula o aumento da população dos psíldeos e sua dispersão. Esta série de fatores pode ter levado aos resultados de maiores capturas nos meses que compõe o inverno.

A razão sexual dos insetos capturados nesse trabalho, tendendo a maior ocorrência de machos (0,65 com variação de 0,56 a 0,75), com proporção aproximada de 2 machos para 1 fêmea no verão e outono, foi distinta de outros trabalhos realizados a campo. Em um levantamento para avaliação de um feromônio sexual, Volpe et al. (2024) capturaram uma população cerca de 43% maior de fêmeas do que de machos. Por outro lado, Hodkinson (2009), Perez et al (2011) e Hall (2018), na Flórida, encontraram proporções iguais de machos e fêmeas, aproximadamente 1:1. Muitos fatores, incluindo a dispersão dos insetos, podem contribuir para a razão e a proporção sexual de uma população. Um dos fatores que podem explicar a maior captura de machos neste levantamento está ligado a dispersão e infectividade da população avaliada. Martini et al. (2015) observaram que machos adultos exibiram maior comportamento de dispersão após serem expostos a plantas infectadas com Las, ou seja, psíldeos Las+ tem uma dispersão maior que psíldeos sem a bactéria, diferente do observado em fêmeas. O alto índice de bactéria nos insetos capturados (88%), independente da razão sexual, poderia indicar que a maior taxa de dispersão possa ocorrer ao longo do ano. Além disso, machos têm maior atração por fêmeas com elevados títulos de Las, podendo aumentar ainda mais a dispersão dos machos para novos hospedeiros. O aumento da dispersão a curta distância pelo vetor infectado,

pode favorecer múltiplas infecções nos mesmos hospedeiros ou hospedeiros próximos e dispersão a longa distância pode favorecer a propagação para novos hospedeiros (Martini et al. 2015). Outro fator importante é que psíldeos machos tendem a ser mais ativos que as fêmeas (Hodkinson, 2009), aumentando a possibilidade de capturas por cartões adesivos. A presença de endossimbiontes como *Wolbachia* é uniforme nas populações brasileiras de psíldeos e, portanto, não deve afetar a razão sexual (Volpe et al., 2024; Guidolin & Consoli, 2013).

Entre as estações climáticas, a predominância de capturas de machos se manteve, porém a quantidade de machos capturados no outono foi maior que o esperado, diferente da primavera que teve menos capturas de machos que o esperado. Os fatores acima podem afetar esta característica, mas seria necessária uma avaliação com maior extensão de tempo, para consolidar o resultado, assim como comparar a razão sexual na forma de captura com cartões adesivos amarelos e via sucção, como realizado por Volpe et al. (2024). Dados adicionais como avaliação comportamental dos psíldeos, manejo fitossanitário, erradicações de plantas sintomáticas nas áreas monitoradas e principalmente fluxos de brotações das plantas, seriam relevantes para a compreensão do efeito da estação.

A presença de Las em determinada população de psíldeos está ligada à diversos fatores relacionados à interação patógeno/hospedeiro, dentre eles: abundância do vetor, tipos de hospedeiro suscetíveis ou resistentes à Las e seu estado de infecção (Martini et al., 2015), aquisição da bactéria pelo vetor, condições ambientais e climáticas, presenças de brotações novas, manejo fitossanitário como o intervalo de aplicação e rotação de grupos químicos adotados pelas propriedades, erradicação ou não de plantas com HLB. Em resumo, uma série de fatores isolados ou em conjuntos que resultam em uma população de psíldeos portadores de Las. Entretanto, fatores críticos para gerar populações com Las são a presença de plantas infectadas e brotações que permitem o crescimento populacional do vetor. A reprodução de fêmeas infectadas pode gerar progênes hábeis a adquirirem a bactéria no local de inoculação de Las pela fêmea (Lee et al., 2015).

A região citrícola paranaense sofre com a falta de informações e levantamentos do seu parque citrícola. Até a finalização desse trabalho, não havia nenhum relato sobre a estimativa de incidência de plantas com HLB no estado do Paraná. No momento está sendo realizada uma grande movimentação para quantificar a presença de plantas sintomáticas na região, porém, os resultados obtidos nesse trabalho acendem um alerta com relação a progressão da epidemia de HLB na região.

A frequência média de psíldeos portadores de Las capturados na região foi de 88%. Na Flórida, no período de 2010 a 2012 observou-se que 17,5% dos psíldeos eram Las+ (Hall

2018). Em Colima no México, no período de 2012 a 2014, 58% dos psilídeos eram Las+ (Suaste-Dzul et al., 2017). Em um levantamento realizado no cinturão citrícola, a incidência média de Las em psilídeos amostrados no período de 2014 a 2017 foi de 65,3%, porém em regiões com boas práticas de manejos local e regional de HLB a porcentagem de psilídeos Las+ é menor (Wulff et al., 2020).

No Paraná, o tamanho médio das propriedades que foram avaliadas é de 60 hectares, na região de Paranaíba 90% das propriedades possuem menos de 100 mil plantas (Costa et al., 2021), ou seja, áreas relativamente pequenas que dificultam o manejo do HLB por estarem mais sujeita a pressão externa do psilídeo, sofrendo o efeito de borda. Outra característica importante é a proximidade entre as propriedades, pois, mesmo que uma determinada área seja caracterizada com um bom manejo, propriedades vizinhas com manejos ruins e com plantas com HLB serão fontes de inóculo de psilídeos, aumentando a possibilidade de dispersão para outras propriedades. A alimentação de psilídeos em plantas infectadas com Las, é menor que em plantas não infectadas, ou seja, plantas com Las são um recurso alimentar de qualidade inferior e por isso a dispersão das plantas doentes para plantas sadias (Mann et al., 2012; Martini et al., 2015).

Outro fator importante é o manejo externo. Desde 2023 vem sendo realizado um trabalho de erradicação de plantas doentes em áreas externas e propriedades comerciais em todos os municípios citrícolas da região noroeste do estado. Nos resultados obtidos nesse trabalho, não houve diferença dos psilídeos Las+ capturados entre os municípios, entretanto a partir desse trabalho de erradicação, os municípios que conseguirem eliminar o maior número de plantas hospedeiras e manejar de forma mais efetiva o vetor, conseguirá manter índices mais baixos de plantas com HLB e conseqüentemente menor psilídeos Las+.

Os psilídeos amostrados nas quinzenas dos meses do verão apresentaram menor proporção de insetos portadores de Las (78%) diferindo-se das demais estações. Alguns fatores influenciaram nesses resultados, entre eles, o número médio de amostragem e capturas por quinzena dentro das estações, que foi menor no verão. As condições ambientais como temperatura, têm papel importante na relação patógeno e hospedeiro, influenciando nos fluxos de brotações, título da bactéria na planta, sintomas e infecções, tanto nas plantas quanto no vetor *D. citri*. Na faixa de 24 a 28 °C, plantas infectadas têm altos títulos bacterianos nos tecidos, resultando em maiores infecções pelo psilídeo em contato com os tecidos infectados. Porém, quanto maior o tempo de temperaturas acima de 33 °C, menor o título bacteriano nos tecidos e conseqüentemente menor aquisição de Las por *D. citri* e conseqüentemente menor

probabilidade de inoculação de Las em plantas por psilídeos (Lopes et al., 2009b; 2013; 2017; Lopes & Cifuentes-Arenas, 2021).

Há elevada probabilidade de sucesso na inoculação de *Ca. L. asiaticus* por *D. citri* encontrados na região noroeste do Paraná, maior inclusive do que relatado no estado de São Paulo, entretanto para coletas realizadas entre 2014 e 2017 (Sassi 2016, Daniel 2019). Ou seja, além de ter uma alta proporção de psilídeos Las+ no noroeste paranaense, também se tem uma alta probabilidade de inoculação de plantas pelos insetos Las+. Porém, locais com bom manejo fitossanitário e baixos índices de plantas com HLB, tendem a ter uma menor probabilidade de inoculação, que é o caso do triângulo mineiro (Fundecitrus, 2023b) e segundo Daniel (2019) bom manejo do vetor. No estado de São Paulo, a maior probabilidade de inoculação foi observada na região de Santa Cruz do Rio Pardo, também com dados de 2014 a 2017 e que tem atualmente 54,8% de plantas sintomáticas (Fundecitrus, 2023b).

A maior probabilidade de inoculação de Las pelas fêmeas quando comparado aos machos pode estar ligada a atratividade alimentar e atratividade para oviposição, ou seja, as fêmeas são mais propensas em explorar novas fontes de alimento e locais para botar ovos (Mann et al., 2012; Martini et al., 2014; Martini et al., 2015) ficando mais tempo nas brotações e, conseqüentemente, maior probabilidade de adquirir Las e posteriormente realizar a inoculação. O título de Las nas glândulas salivares e no canal alimentar, é maior que em outros órgãos do psilídeo, porém não diferem entre machos e fêmeas (Ammar et al., 2011a). Além de encontrar Las nas glândulas salivares dos psilídeos, foi encontrado Las na maioria dos órgãos, incluindo nos ovários das fêmeas (Ammar et al., 2011b). Em ensaios controlados, a eficiência de inoculação de Las por fêmeas foi superior a machos, enquanto o título de Las foi o dobro nas fêmeas do que nos machos (Lopes & Cifuentes-Arenas, 2021).

Realizar uma estimativa da quantidade de plantas sintomáticas de HLB no estado do Paraná auxiliaria nas tomadas de decisões pelos órgãos fiscalizadores, por técnicos e produtores da região. A elevada porcentagem de psilídeo portador de Las e a probabilidade de inoculação da bactéria exigem atenção no manejo do psilídeo e do HLB, em função do potencial de crescimento da transmissão e conseqüente aumento de plantas com HLB.

5. CONCLUSÕES

O período de maior captura de psilídeos na região noroeste do Paraná foi no inverno.

Há predominância de psilídeos machos, independente do período do ano e municípios avaliados. O sexo dos insetos e os municípios avaliados não diferem nas porcentagens de psilídeos Las+.

A porcentagem de psilídeos Las+ foi alta, maior na primavera e menor no verão.

A probabilidade de inoculação de Las por psilídeos fêmeas são maiores que dos machos e iguais em todas as estações climáticas do ano.

REFERÊNCIAS

- Alba-Tercedor, J., Hunter, W.B., Alba-Alejandre, I. 2021. Using micro-computed tomography to reveal the anatomy of adult *Diaphorina citri* Kuwayama (Insecta: Hemiptera, Liviidae) and how it pierces and feeds within a citrus leaf. **Scientific Reports** 11:1135.
- Aubert, B. 1987. Le psylle asiatique des agrumes (*Diaphorina citri* Kuwayama) au Brésil. Situation actuelle et perspectives de lutte. **Fruits**. 42(4):225–229.
- Albrecht, U., Hall, D.G e Bowman, K.D. 2014. Transmission efficiency of *Candidatus Liberibacter asiaticus* and progression of huanglongbing disease in graft and psyllid-inoculated citrus. **Hort Science**. 49:367-377.
- Ammar, E.D.D.E., Shatters, R.G.R., Hall, D.GD. 2011a. Localization of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, associated with citrus huanglongbing disease, in its psyllid vector using fluorescence *in situ* hybridization. **Journal of Phytopathology** 159(11-12):726-734.
- Ammar, E.D.D.E., Shatters, R.G.R., Lynch, C., Hall, D.GD. 2011b. Detection and relative titer of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in the salivary glands and alimentary canal of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) vector of citrus huanglongbing disease. **Annals of Entomological Society of America**. 104 (3): 526-533.
- Bassanezi, R.B., Montesino, L.H., Gasparoto, M.C.G., Bergamin Filho, A., Amorim. 2011. Yield loss caused by huanglongbing in different sweet orange cultivars in São Paulo, Brazil. **European Journal of Plant Pathology** 130(4):577-586.
- Bassanezi, R.B., Montesino, L.H., Gimenes-Fernandes, N., Yamamoto, P.T., Gottwald, T.R., Amorim, L. & Bergamim Filho, A. 2013. Efficacy of area-wide inoculum reduction and vector control on temporal progress of huanglongbing in young sweet orange plantings. **Plant Disease**. 6:789-796.
- Bassanezi, R.B., Ayres, A.J., Massari, C.A., Belasque Júnior, J., Barbosa, J.C. 2014. Progressão e distribuição espacial das principais pragas dos citros. **Aspectos da Fitossanidade em Citros**. 1:31-50.
- Bassanezi R.B., Lopes S.A., Miranda M.P., Wulff N.A., Linhares H.X., Ayres J.A. 2020. Overview of dissemination and management strategies for citrus huanglongbing in Brazil. **Tropical Plant Pathology**. 45:251-264.
- Belasque Júnior, J., Bergamin Filho, A., Bassanezi, R.B., Barbosa, J.C., Gimenes Fernandes, N., Yamamoto, P.T., Lopes, S.A., Machado, M.A., Leite, R.P. Junior., 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.
- Bové, J.M. 2006. Huanglongbing: a destructive, newly emerging, century-old disease of citrus. **Journal Plant Pathology**88:7-37.
- Brasil. Instrução Normativa nº 10, de 18 de março de 2005 substituída pela Instrução Normativa nº 53, 16 de outubro de 2008. **Diário Oficial da União**. Brasília. Disponível em: <<https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/instrucao-normativa-mapa-53-de-16-10-2008,830.html>>. Acesso em: 02/ set.2023.
- Brasil. Portaria Nº 317, de 21 de maio de 2021. **Diário Oficial da União**. Brasília. 97:1-97.

Canale, M.C., Tomaseto, A.F., Haddad, M.L., Coletta-Filho, H.D., Lopes, J.R.S. 2017. Latency and persistence of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” in its psyllid vector, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae). **Phytopathology** 107(3):264-272.

Cidasc. 2022. **Cidasc reforça ações contra o greening (HLB)**. Disponível em:<<https://www.cidasc.sc.gov.br/blog/2022/10/19/cidasc-reforca-acoes-contr-o-greening-hlb/>> Acesso em 29 fev. 2024.

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.

Chen, X.D., Neupane, S., Gossett, H., Pelz-Stelinski, S. K., Stelinski, L.L. 2020. Insecticide rotation scheme restores insecticide susceptibility in thiamethoxam-resistant field populations of Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae), in Florida. **Pest Management Science** 77:464-473.

Cifuentes-Arenas, J.C., Goes, A., Miranda, M.P., Beattie, G.A.C., Lopes, S.A. 2018. Citrus flush shoot ontogeny modulates biotic potential of *Diaphorina citri*. **PLoS One**13:0190563.

Coletta Filho, H.D., Targon, M.L.P.N., Takita, M.A., De Netri, 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.

Costa, G.V., Neves, C.S.V.J., Bassanezi, R.B., Junior, R.P.L., Telles, T.S. 2021. Economic impact of Huanglongbing on Orange production. **Revista Brasileira de Fruticultura**. 43(3):472.

Daniel, B. 2019. Levantamento populacional de adultos de *Diaphorina citri* portadores de *Candidatus Liberibacter asiaticus* em regiões e em áreas com diferentes manejos de huanglongbing. **Tese de Mestrado**. Araraquara, SP: Fundo de defesa da citricultura. 15 p.

Da Graça, J.V. 1991. Citrus greening disease. **Annual Review Phytopathology** 29:109-136.

De Carli, L.F., Miranda, M.P., Volpe H.X.L., Zanardi O.Z., Vizoni M.C., Martini F.M., Lopes J.P.A. 2018. Leaf age affects the efficacy of insecticides to control Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). **Journal of Applied Entomology** 142(7):689-695.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2021. **Citrus fruit fresh and processed statistical bulletin 2020**. Disponível em: <https://www.fao.org/3/cb6492en/cb6492en.pdf>. Acesso em 25 mar. 2024.

Fundecitrus. 2023a. **Inventário de árvores e estimativa de safra de laranja do cinturão citrícola de São Paulo e triângulo mineiro 2023/2024**. Disponível em: <https://www.fundecitrus.com.br/pdf/pes_relatorios/2023_05_10_Sum%C3%A1rio_Executivo_o_da_Estimativa_da_Safra_de_Laranja_2023-2024.pdf>. Acesso em 05 ago. 2023.

Fundecitrus. 2023b. **Levantamento da incidência das doenças dos citros no cinturão citrícola de São Paulo e triângulo mineiro 2022**. Disponível em:<https://www.fundecitrus.com.br/pdf/levantamentos/Levantamento_de_doencas_2023_completo.pdf>. Acesso em 05 ago. 2023.

Fundecitrus. 2023c. **Pesquisa confirma resistência de psilídeos a piretróides e neonicotinoide**. Disponível

em:<<https://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/noticias/integra/pesquisa-confirma-resistencia-de-psilideos-a-piretroides-e-neonicotinoides/1324>>. Acesso em 29 fev. 2024.

Fundecitrus. 2024. **Estimativa da Safra de Laranja Parque Citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro.** Disponível em: <<https://www.fundecitrus.com.br/pes/estimativa>>. Acesso em 15 abr. 2024.

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: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz – FEALQ. 920p.

Garnier, M., Daniel, 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.

Garnier, M., & Bové, J.M. 1996. Distribution of the Huanglongbing (Greening) *Liberibacter* species in fifteen African and Asian countries. **13th Conference of International Organization of Citrus Virologists.** Riverside: University of California. P. 392-394.

Guidolin, A.S., Côsoli, F.L. 2013. Molecular characterization of *Wolbachia* strains associated with the invasive Asian citrus psyllid *Diaphorina citri* in Brazil. **Invertebrate Microbiology.** 65:475-486.

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** 37(4):914-924.

Hall, D.G. 2018. Incidência de “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” em uma população da Flórida de psilídeos cítricos asiáticos. **J. Appl. Entomol.**142:97-103.

Hodkinson, I.D. 2009. Life cycle variation and adaptation in jumping plant live (Insecta: Hemiptera: Psylloidea) A global synthesis. **Journal of Natural History.** 43:65-179.

Inoue, H., Ohnishi J., Ito, T., Tomimura, K., Miyata, S., Iwanami, T., Ashihara, W. 2009. Increased proliferation and efficient transmission of *Candidatus Liberibacter asiaticus* by adult *Diaphorina citri* after acquisition of food in the nymphal stage. **Anuais de Biologia Aplicada** 155:29-36.

Leonardo, A. 2014. Otimização da leitura de cartão adesivo amarelo para o monitoramento de adultos de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae). **Tese de Mestrado.** Araraquara SP: Fundo de defesa da citricultura. 25 p.

Lee, J.A., Halbert, S.A., Dawson, W.O., Robertson, C.J., Keesling, J.E., Singer, B.H. 2015. Asymptomatic spread of huanglongbing and implications for disease control. **Proceedings of the Nacional Acad. Sci USA** 112:7605-7610.

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., Bertolini, E., Frare, G.F., Martins, E.C., Wulff, N.A., Teixeira, D.C., Fernandes, N.G., Cambra, M. 2009a. Graft transmission efficiencies and multiplication of “*Candidatus*

Liberibacter americanus” and “*Ca. Liberibacter asiaticus*” in citrus plants. **Phytopathology** 99:301-306.

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

Lopes, S.A., Luiz, F.Q.B.F., Martins, E.C., Fassini, C.G., Sousa, M.C., 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 Dis**. 97:1563-1570.

Lopes, S.A., Luiz, F.Q.B.F., Oliveira, H.T., Cifuentes-Arenas, J.C., Raiol-Junior, L.L. 2017. Seasonal variation of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ titers in new shoots of citrus in distinct environments. **Plant Dis** 101:583-590.

Lopes, S.A., Cifuentes-Arenas, J.A. 2021. Protocol for successful transmission of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ from citrus to citrus using *Diaphorina citri*. **Phytopathology** 111:2367-2374.

Martini, X., Kuhns, E.H., Hoyte, A., Stelinski, L.L. 2014. Plant volatiles and density-dependent conspecific female odors are used by Asian citrus psyllid to evaluate host suitability on a spatial scale. **Arthropod Plant Interact.** 8: 453-460.

Martini, X., Hoffmann, M., Coy, M.R., Stelinski, L.L., Pelz-Stelinski, K.S. 2015. Infection of and insect vector with a bacterial plant pathogen increases its propensity for dispersal. **PLoS One.** 10: 129373.

Mann, R.S., Ali, J.G., Hermann, S.L., Tiwari, S., Pelz-Stelinski, K.S., Alborn, H.T. 2012. Induced release of a plant-defense volatile “deceptively” attracts insect vectors to plants infected with a bacterial pathogen. **PLoS Pathog.** 8: 100260.

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

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., Torres, M.L.G., Rodrigues, M.D.L., Bento, J.M.S., Parra, J.R.P. 2007. Biology of *Diaphorina citri* (Hem., Psyllidae) on different hosts and at different temperatures. **Journal of Applied Entomology** 131:709-715).

Nunes, W.M.C., Zanutto, C.A. Rinaldi, D.A.M., Croce Filho, J., Azevedo, M.L., Leite Júnior, R.P., Coletta-Filho, H.D., Vicentini, S., Nunes, M.J.C. 2007. Primeira constatação de huanglongbing em pomar comercial de citros no Estado do Paraná. **Fitopatologia Brasileira** 32 (Suplemento): 1094.

Nunes, E.L., Silva, J.L.F.S., Tessmann, D.J., Filho, J.C., Zanutto, C.A., Hata, F.T., Nunes, W.M.C. 2024. Distribuição de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) e detecção de *Candidatus Liberibacter asiaticus* em regiões do Paraná. **Contribuciones a Las Ciencias Sociales.** 2:291.

- Parra, J.R.P., Lopes, J.R.S., Torres, M.L.G., Nava, D.E., Paiva, P.E.B. 2010. Bioecologia do vetor *Diaphorina citri* transmissão de bactérias associadas ao huanglongbing. **Citrus Research & Technology** 31(1):37-51.
- Paulo, F.F.L. 2024. Ocorrência de ovos e ninfas de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera:Psyllidae) em laranjeiras doces em função do intervalo entre aplicações de inseticidas, da rotação de produtos com diferentes modos de ação e da população externa de psilídeos. **Tese de Mestrado**. Araraquara SP: Fundo de Defesa da Citricultura. 45 p.
- Pérez, L., Fernandez, C. G., Espinosa, D.H., Tapia, J.L.R., Argudin, F.M. 2011. Ciclo de vida de *Diaphorina citri* Kuw. (Hemiptera: Psyllidae) en *Citrus aurantifolia* L. y *Murraya paniculata* (L.) Jack en condiciones de laboratorio. **CitriFrut**. 28:2.
- Reinking, A.O., 1919. Diseases of economic plants in South China. **Philippine Agriculturist**8:109-135.
- Sala, I. 2013. Avaliação do tempo de exposição em armadilha adesiva amarela e das condições de armazenamento de adultos de *Diaphorina citri* detecção de *Candidatus Liberibacter asiaticus*. **Dissertação de Mestrado**. Araraquara, SP: Fundo de Defesa da Citricultura.
- 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.
- Secretaria do estado e abastecimento. 2020. **Produção de laranja e suco no noroeste do Paraná**. Disponível em: <<https://www.agricultura.pr.gov.br/Noticia/Noroeste-lidera-producao-de-laranja-e-do-suco-da-fruta-no-Estado#:~:text=A%20laranja%20est%C3%A1%20presente%2C%20de,rendimento%20de%20R%24%20401%20milh%C3%B5es>>. Acesso em 28 jun. 2022.
- Suaste-Dzul, A., Gallou, A., Félix-Portillo, M., Moreno-Carrillo, G., Sánchez-González, J., Palomares-Pérez, M., Arredondo-Bernal, H. 2017. Incidência sazonal de ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus* (Rhizobiales: Rhizobiaceae) em *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) em Colima, México. **Trop. Plant Pathol**. 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. 2005. 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., Wulff, N.A., Martins, E.C., Kitajima, E.W., Bassanezi, R.B., Ayres, A.J., Eveillard, A., Saillard, C., Bové, J.M. 2008a. 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., Saillard, C., Couture, C., Martins, E.C., Wulff, N.A., Eveillard-Jagoueix, S., Yamamoto, P.T., Ayres, A.J., Bové, J.M. 2008b. Distribution and quantification of *Candidatus Liberibacter americanus*, agent of huanglongbing disease of citrus in São Paulo State, Brazil, 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., Lopes, S.A., Yamamoto, P.T., Miranda, M.P., Spósito, M.B., Belasque Júnior., Bassanezi, R.B. 2010. Caracterização e etiologia das bactérias associadas ao huanglongbing. **Citrus e Research & Technology** 31:115-128.

- Tiwari, S., Mann, S.R., Rogers, E.M., Stelinski, L.L. 2011. Insecticide resistance in field populations of Asian citrus psyllid in Florida. **Pest Management Science** 67:1258-1268.
- Tomaseto, A.F., Krugner, R., Lopes, J.R.R. 2016. Effect of plant barriers and citrus leaf age on the dispersal of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). **Journal of Applied Entomology** 140:91-102.
- Ulian, L.F. 2016. *Diaphorina citri* e Huanglongbing: dinâmica, relações epidemiológicas e monitoramento do vetor em pomar de laranja com manejo da doença. **Tese de Mestrado**. Araraquara SP: Fundo de defesa da citricultura. 35 p.
- Volpe, H.X.L., Souza, M.C., Luvizotto, R.A.G., Freitas, R., Esperança, V., Darolt, J.C., Pegoraro, A.A.L., Magalhães, D.M., Favaris, A.P., Wulff, N.A., Miranda, M.P., Bento, J.M.S., Leal, W.S. 2024 The greening-causing agent alters the behavioral and electrophysiological responses of the Asian citrus psyllid to a putative sex pheromone. **Scientific reports**, 14:455.
- 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.
- Wulff, N.A., Daniel, B., Sassi, R.S., Moreira, A.S., Bassanezi.R.B., Sala, I., Coletti.D.A.B., Rodrigues, J.C. 2020. Incidence of *Diaphorina citri* carrying *Candidatus Liberibacter asiaticus* in Brazil's citrus belt. **Insects** 11:672.
- Zito, A.C., 2019. Dinâmica de brotação em laranjeiras e eficiência de inseticidas no controle e *Diaphorina citri*. **Tese de Mestrado**. Araraquara SP: Fundo de defesa da citricultura. 12 p.
- Zorzenon, F.P.F., 2019. Fatores abióticos e bióticos associados ao período crítico de dispersão de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) em regiões do estado de São Paulo. **Tese de Mestrado**. Araraquara SP: Fundo de defesa da citricultura. 27 p.
- Zorzenon, F.P.F., Tomaseto, A.F., Daugherty, M.P., Lopes, J.R.S., Miranda, M.P. 2021. Factors associated with *Diaphorina citri* immigration into commercial citrus orchards in São Paulo State, Brazil. **Journal of Applied Entomology** 145:326-335.