

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

IVALDO SALA

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

Orientadora: Diva do Carmo Teixeira

Coorientador: Renato Beozzo Bassanezi

Araraquara
Maio - 2013

IVALDO SALA

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

Orientadora: Diva do Carmo Teixeira

Coorientador: Renato Beozzo Bassanezi

Araraquara
Maio - 2013

IVALDO SALA

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

Araraquara, 21/05/2013

BANCA EXAMINADORA

Dr. Renato Beozzo Bassanezi
Fundecitrus

Dr. Nelson Arno Wulff
Fundecitrus

Dr. Helvécio Della Coletta Filho
Centro APTA Citros “Sylvio Moreira” / IAC

Dedico este trabalho a todos que de alguma forma me auxiliaram e orientaram no desenvolvimento do mesmo.

AGRADECIMENTOS

Através deste pequeno espaço, venho agradecer primeiramente a todos que direta ou indiretamente colaboraram para a concretização deste trabalho. E, em especial agradeço:

A Deus por me propiciar, através de sua força, o conhecimento necessário para buscar o aprimoramento pessoal e a concretização deste trabalho.

Aos meus familiares pelo incentivo, paciência e carinho nos momentos em que mais precisei.

Aos meus amigos, por estarem sempre presentes e dispostos a ajudar no que fosse preciso.

Aos amigos e colegas do Mestrado Profissionalizante do Fundecitrus pelo excelente período de convivência e troca de conhecimento.

Aos professores pela incansável busca ao conhecimento e excelência no ensino aos alunos.

A todos os amigos e colegas que trabalharam e trabalham no Fundecitrus, importante instituição, na qual tenho grande carinho e admiração.

Agradeço também aos funcionários do Fundecitrus: Elaine Cristina Martins, Luis Montesino, Daniela Aparecida Bonoti Coletti, Fabio Luis dos Santos, Eder Alexandre Souza, Jean Michel Martins, Sidnei Ferreira Alkimin, Deividson Fernandes Rodrigues, André Luís Sanches, Fernanda Alves Queirós Benedito, Tatiana M. M. Cardamori, Juliana Silva de Abreu.

Ao Gerente Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento do Fundecitrus Dr. Antonio Juliano Ayres e ao pesquisador e supervisor Dr. José Belasque Junior.

Ao pesquisador Dr. Nelson Arno Wulff pela importante contribuição no desenvolvimento desta dissertação.

Agradeço também meu coorientador Dr. Renato Beozzo Bassanezi pela amizade, apoio e ensinamentos durante a realização deste trabalho.

Finalmente agradeço minha orientadora Dra. Diva do Carmo Teixeira pela paciência, amizade, sabedoria e profissionalismo com que conduziu os ensinamentos e orientação deste trabalho.

RESUMO

A avaliação da frequência de psilídeos asiático dos citros infectivos é importante para (i) estudos de aquisição e inoculação de bactérias por psilídeos, (ii) detecção da doença em zonas ainda livres, mas com a presença de psilídeos (iii) avaliação da eficiência das estratégias de redução de inóculo, (iv) avaliação da frequência de psilídeos infectivos para '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' e da abundância de fontes de inóculo ou prováveis novas infecções de HLB. Para isso, os psilídeos podem ser coletados diretamente ou em armadilhas adesivas amarelas, comumente usadas por produtores brasileiros para monitoramento de psilídeos. As armadilhas adesivas amarelas normalmente são deixadas no campo durante duas semanas, após o que são avaliadas visualmente quanto à presença de psilídeos e, se estiverem presentes podem ser removidos das armadilhas e testados por PCR em tempo real (qPCR) para a presença de psilídeos infectivos, em laboratório de diagnóstico. Estudos anteriores na Flórida mostraram que, a incidência de psilídeos infectivos diminui com o aumento do tempo, em armadilha adesiva amarela (Irey *et al.*, 2011). Assim, o objetivo deste primeiro trabalho foi determinar se o tempo de exposição em armadilhas adesivas amarelas afeta os resultados de detecção de '*Ca. L. asiaticus*' por qPCR e se está relacionado com as condições meteorológicas durante o inverno e verão. Adultos de psilídeos oriundos de ninfas criadas em árvores infectadas com '*Ca. L. asiaticus*' foram colocados em armadilhas adesivas (BUG-Agentes Biológicos) no campo e 20 amostras com 3 indivíduos foram testadas após 0, 1, 3, 9, 12 e 15 dias. Os resultados foram comparados com amostras de psilídeos coletadas diretamente das plantas infectadas sem contato com a cola da armadilha. O experimento foi realizado na cidade de Araraquara nos meses de junho, julho e agosto (inverno) e em janeiro, fevereiro e março (verão). Em contraste com o experimento da Flórida, não houve diferença significativa entre os tempos de exposição em armadilhas adesivas amarelas para detecção de '*Ca. L. Asiaticus*' por até 15 dias em ambas as estações do ano. Os psilídeos coletados diretamente em plantas de citros devem ser armazenados antes de seguirem a um laboratório de diagnose. Dependendo das condições e do tempo de armazenamento de psilídeos infectivos, o DNA da bactéria '*Ca. L. asiaticus*' pode degradar e ocorrer falsos resultados negativos. Assim, este segundo estudo foi realizado para avaliar a detecção de '*Ca. L. asiaticus*' por PCR em tempo real (qPCR) em adultos de psilídeos submetidos a diferentes métodos e tempos de armazenamento. Dois experimentos fatoriais foram conduzidos. Os fatores eram "meio de estocagem" (com etanol 70% e a seco), "temperatura" (-20°C, 4°C e 26°C) e "tempo" (0, 3, 7, 14, 21, 28 e 35 dias). Cada tratamento foi constituído de 20 amostras com 3 adultos de psilídeos oriundos de ninfas criadas em plantas infectadas por '*Ca. L. asiaticus*', e testados por qPCR para a presença da bactéria. Não houve diferenças significativas nas porcentagens de amostras de psilídeos positivas para '*Ca. L. asiaticus*' entre os métodos de armazenamento até 35 dias, exceto uma leve tendência de declínio nas amostras armazenadas sem etanol a 26°C por mais de 14 dias.

Palavras-chave: Psilídeo, '*Candidatus Liberibacter asiaticus*', armadilhas adesivas amarelas, armazenamento, qPCR.

ABSTRACT

The assessment of bacterialiferous Asian Citrus Psyllid (ACP) frequency is important for (i) studies of bacteria acquisition and inoculation by ACP, (ii) disease detection in disease free areas but with ACP presence, (iii) efficiency evaluation of inoculum reduction strategies, (iv) evaluation of frequency of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' (Las)-positive ACP and the abundance of inoculum sources or putative new HLB infections relationships. For that, ACP can be collected directly or on yellow sticky traps (YST) commonly used by Brazilian growers to monitor psyllid population. The YST are usually left in the field for 2 weeks after which time cards are visually evaluated for the ACP presence, and if present, the psyllids are removed from the cards and tested by real-time PCR (qPCR) for the presence of the bacteria. Previous studies in Florida showed that the incidence of Las-positive ACP declined with increasing time on the YST (Irey *et al.*, 2011). Thus the objective of this first work was to determine "how much" the time on YST affects qPCR results in Las detection and if it was related to weather conditions during winter and summer. ACP adults from nymphs reared on Las infected trees were placed on YST (BUG-Agentes Biológicos) in the field and 20 samples with 3 individuals each were tested after 0, 1, 3, 9 12 and 15 days. The results were compared with psyllid samples directly collected from infected plants without trap glue. Experiments were done in June, July and August (winter) and in January, February and March (summer), at Araraquara city. In contrast with previous report in Florida, no difference on the incidence of Las-positive ACP samples was observed up to 15 days on the YST in both seasons. The psyllids collected directly in citrus plants must be stored before moving to a laboratory diagnosis. Depending on the conditions and time of storage of collected psyllids Las DNA in ACP could degraded and Las-false negative results could occur. Thus this second study was conducted to evaluate the detection of Las by real-time PCR (qPCR) in ACP adults submitted to different storage methods and time. Two 2x3x7 factorial experiments were conducted. Factors were 'storage medium' (70% ethanol and dry), 'temperature' (-20°C, 4°C and 26°C) and 'time' (0, 3, 7, 14, 21, 28 and 35 days). For each treatment 20 samples with 3 ACP adults each from nymphs reared on Las infected trees were tested for Las presence by qPCR. No significant differences in percentages of psyllids samples positive for CLas were observed among the storage methods up to 35 days, except a slight trend of decline in Las detection in samples storage without ethanol at 26°C for more than 14 days.

Keywords: Psyllid, '*Candidatus Liberibacter asiaticus*', yellow sticky traps, storage, qPCR

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Criação de *Diaphorina citri* em plantas infectadas com a bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus*. 16
- Figura 2.** Armadilhas adesivas amarelas instaladas em suportes metálicos ao ar livre na sede do Fundecitrus em Araraquara-SP..... 17
- Figura 3.** Disposição dos psíldeos nas armadilhas adesivas amarelas (Três insetos por quadrícula)..... 18
- Figura 4.** Esquema dos tratamentos aplicados em cada mês nos períodos de inverno (Junho, Julho e Agosto) e verão (Janeiro, Fevereiro e Março). Na legenda da figura: ins=insetos; am=amostra 19
- Figura 5.** Psíldeos armazenados em etanol 70% (A) e a seco (B)..... 20
- Figura 6.** Esquema dos tratamentos realizados para avaliar a influência das condições de conservação e armazenamento de amostras de *Diaphorina citri* coletadas diretamente na detecção de *Candidatus Liberibacter asiaticus*. Na legenda da figura: am=amostra; x3 = três insetos por amostra 21
- Figura 7.** Curva padrão da diluição seriada 1:10 do plasmídeo pGEM-T Easy contendo a sequência alvo de amplificação de *Candidatus Liberibacter asiaticus*. 27
- Figura 8.** Aparência dos psíldeos coletados nas armadilhas adesivas amarelas após diferentes tempos de exposição..... 28
- Figura 9.** Concentração média de DNA proveniente das amostras de psíldeos coletados nas armadilhas adesivas amarelas durante o período de inverno. As barras correspondem ao erro padrão da média das repetições realizadas em junho, julho e agosto de 2011 29
- Figura 10.** Concentração média de DNA proveniente das amostras de psíldeos coletados nas armadilhas adesivas amarelas durante o período de verão. As barras correspondem ao erro padrão da média das repetições realizadas em janeiro, fevereiro e março de 2012 29
- Figura 11.** Valor médio de Ct das amostras de psíldeos coletados nas armadilhas adesivas amarelas durante o período de inverno. As barras correspondem ao erro padrão da média das repetições realizadas em junho, julho e agosto de 2011.....31
- Figura 12.** Valor médio de Ct das amostras de psíldeos coletados nas armadilhas adesivas amarelas durante o período de verão. As barras correspondem ao erro padrão da média das repetições realizadas em janeiro, fevereiro e março de 2012.....31
- Figura 13.** Porcentagem média de amostras de psíldeos positivas para *Candidatus Liberibacter asiaticus* coletados das armadilhas em relação às amostras controle coletadas diretamente em função do tempo de exposição nas armadilhas adesivas amarelas durante o período de inverno. As barras correspondem ao erro padrão da média das repetições realizadas em junho, julho e agosto de 2011 32
- Figura 14.** Porcentagem média de amostras de psíldeos positivas para *Candidatus Liberibacter asiaticus* coletados das armadilhas em relação às amostras controle coletadas

diretamente em função do tempo de exposição nas armadilhas adesivas amarelas durante o período de verão. As barras correspondem ao erro padrão da média das repetições realizadas em janeiro, fevereiro e março de 2012 32

Figura 15. Média do DNA total das amostras de psilídeos em função do período de armazenamento nos diferentes tratamentos de meio de estocagem (em etanol 70% e a seco) e temperatura de armazenamento (26°C, 4°C e -20°C). As barras correspondem ao erro padrão da média de duas repetições (20 amostras por repetição) 35

Figura 16. Porcentagem média de amostras de psilídeos positivas para *Candidatus Liberibacter asiaticus* em função do período de armazenamento nos diferentes tratamentos de meio de estocagem (em etanol 70% e a seco) e temperatura de armazenamento (26°C, 4°C e -20°C). As barras correspondem ao erro padrão da média de duas repetições (20 amostras por repetição) 37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de Ct obtidos com a diluição seriada de duas amostras positivas na qPCR para <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> e submetidas a qPCR	25
Tabela 2. Valores de Ct obtidos com a diluição seriada do plasmídeo pGEM-T Easy contendo uma cópia do DNA alvo para <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>	26
Tabela 3. Dados das condições climáticas de temperatura média, umidade relativa média do ar e precipitação pluviométrica acumulada durante o período de 15 dias em cada mês que o experimento foi conduzido	30
Tabela 4. Resultado da análise de regressão entre o DNA total extraído das amostras e período de armazenamento (de 0 a 35 dias) para cada meio de estocagem (em etanol 70% ou a seco) e temperatura armazenamento (26°C, 4°C ou -20°C).....	34
Tabela 5. Resultado da análise de regressão entre porcentagem de amostras positivas para ‘ <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> ’ e período de armazenamento (de 0 a 35 dias) para cada meio de estocagem (em etanol 70% ou a seco) e temperatura armazenamento (26°C, 4°C ou -20°C).....	36

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. MATERIAIS E MÉTODOS	16
2.1. Criação e coleta de psilídeos infectivos.....	16
2.2. Experimento de avaliação do tempo de exposição de psilídeos em armadilhas adesivas amarelas	17
2.3. Experimento de avaliação das condições de armazenamento de psilídeos coletados diretamente na planta.....	19
2.4. Extração de DNA das amostras de psilídeos	22
2.5. Quantificação, diluição e volume de DNA das amostras	22
2.6. Detecção de <i>Candidatus. Liberibacter asiaticus</i> nas amostras de DNA de psilídeos.....	23
2.7. Determinação do valor de Ct (<i>Threshold Cycle</i>) máximo para amostras positivas e avaliação da sensibilidade da reação de qPCR.....	23
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
3.1. Determinação do valor de Ct.....	25
3.2. Avaliação da sensibilidade (limite de detecção) da qPCR.	26
3.3. Experimento de avaliação do tempo de exposição de psilídeos em armadilhas adesivas amarelas	27
3.4. Experimento de avaliação das condições de armazenamento de psilídeos coletados diretamente na planta.....	34
4. CONCLUSÕES	39
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de suco de laranja. O país detém 50% da produção, exporta 98% do que produz e consegue 85% de participação no mercado mundial (Neves *et al.*, 2010). Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2013), em 2012 o Brasil possuía área plantada de 861.718 ha de laranja e o estado de São Paulo 569.341 ha, o que corresponde a 66% da área total. Na safra de 2011 foram colhidas no Brasil 486.073 caixas de 40,8 kg de laranja e no estado de São Paulo 375.743.328 caixas de 40,8 kg, que corresponde 77% do total colhido no país. Neves *et al.* (2010) afirma que a citricultura gera entre empregos diretos e indiretos 230 mil vagas e o faturamento total dos elos da cadeia produtiva de citros foi de US\$ 14,6 bilhões em 2009.

As pragas e doenças são ameaças constantes à produção de citros no Brasil e foram responsáveis pela erradicação de 40 milhões de árvores na primeira década deste século (Neves *et al.*, 2010). O Huanglongbing (HLB), também conhecido como Greening, é considerado a pior doença dos citros no mundo. Na China, conhecida há mais de cem anos, foi relatada por Reiking, em 1919, com o nome de Huanglongbing, que significa doença do ramo amarelo (Reiking, 1919; Lin, 1956). No Brasil, o primeiro relato ocorreu no estado de São Paulo, em 2004 (Coleta-Filho *et al.*, 2004; Teixeira *et al.*, 2005a; 2005b; 2005c) e hoje se encontra distribuída em todas as regiões produtoras de São Paulo e em municípios dos estados de Minas Gerais e Paraná.

O HLB é causado por uma bactéria de floema, pertencente ao gênero *Candidatus Liberibacter* e que ainda não foi cultivada “in vitro” com sucesso. Atualmente três liberibacters estão associadas ao HLB: *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Candidatus Liberibacter africanus* e *Candidatus Liberibacter americanus* (Bové *et al.*, 2008). No Brasil, foram identificadas as espécies *Ca. L. americanus* e *Ca. L. asiaticus*, no entanto, ultimamente *Ca. L. asiaticus* prevalece sobre *Ca. L. americanus* nas propriedades citrícolas do estado de São Paulo. Em 2009, aproximadamente 96% das amostras analisadas no Fundecitrus para a ocorrência de HLB estavam associadas à presença de *Ca. L. asiaticus* (Teixeira *et al.*, 2010). E de acordo com dados mais recentes, a prevalência de *Ca. L. asiaticus* sobre *Ca. L. americanus* continua, tendo sido de 99% no período de agosto de 2011 a junho de 2012 (Fundecitrus, dados não publicados).

As bactérias causadoras do HLB podem ser transmitidas por enxertia de material infectado ou por psilídeos. A transmissão natural no campo de *Ca. L. asiaticus* e *Ca. L.*

americanus se dá pelo psílídeo *Diaphorina citri* Kuwayama (Capoor *et al.*, 1974; Yamamoto *et al.*, 2006), comumente chamado de psílídeo asiático dos citros. Este psílídeo é relatado no Brasil desde a década de 40 do século passado (Costa Lima, 1942). *D. citri* é um pequeno inseto que mede de 2 a 3 mm de comprimento, de cor cinza com manchas escuras nas asas, podendo o adulto viver de 3 a 4 meses (Gallo *et al.* 2002). Os ovos são colocados agrupados entre folhas novas, são de coloração amarela, de formato alongado e medem aproximadamente de 0,3 mm de comprimento; as ninfas são achatadas, amareladas e apresentam pernas curtas (Yamamoto, 2008). Para o controle do HLB são recomendadas três medidas que devem ser utilizadas em conjunto e de maneira regional: (i) plantio de mudas saudáveis; (ii) inspeção e eliminação de plantas doentes; (iii) monitoramento e controle do psílídeo vetor (Bové, 2006).

Atualmente, o controle do psílídeo tem sido feito de maneira preventiva ou baseado no seu monitoramento em brotações ou com o auxílio de armadilhas adesivas atraentes, com o nível de ação independente da frequência de indivíduos infectivos na população, isto é, da presença de indivíduos com a bactéria associada ao HLB. Entretanto, o conhecimento da frequência de psílídeos infectivos em uma determinada população permitiria definir o grau de tolerância à presença do psílídeo no campo, com o intuito de se determinar o nível de ação para o controle do mesmo, isto é, quanto mais psílídeos infectivos menor a tolerância à sua presença.

A determinação da frequência de psílídeos infectivos numa população também é essencial para estudos de aquisição e transmissão da bactéria pelo psílídeo. Ainda não há informações consistentes sobre a eficiência de transmissão das espécies de *C. Liberibacter* spp por *D. citri* no Brasil. Os principais estudos foram realizados na Ásia e registraram taxas de transmissão que variaram de 1 a 100% (Capoor *et al.*, 1974; Huang *et al.*, 1984; Xu *et al.*, 1988). Estudos realizados por Capoor *et al.* (1974), indicaram que adultos de *D. citri* podem adquirir ou inocular a forma asiática do patógeno em um tempo mínimo de 15-30 minutos. O monitoramento e detecção da doença em áreas onde a mesma ainda não foi relatada, mas que já têm a presença do vetor seria importante para estabelecer estratégias de controle do vetor e da doença. Sétamou *et al.* (2012) mantiveram no Texas (EUA), durante seis anos, estudos para detecção precoce da doença, que até o ano de 2012 era ausente no Estado. O psílídeo foi detectado no Texas no ano de 2001 e a partir de 2010 houve um esforço para o controle do inseto vetor, visando reduzir sua população e o risco do aparecimento do HLB. A avaliação da efetividade das medidas de redução de fonte de inóculo na propriedade e na região pode também ser determinada pela quantificação da frequência de psílídeos infectivos, pois quanto

maior a eficiência da redução de fontes de inóculo e redução da aquisição do patógeno pelos psilídeos, deve resultar em menor infectividade da população local de psilídeos (Bassanezi *et al.*, 2013).

Outra utilidade em se determinar a infectividade da população, local de psilídeos seria a previsão da quantidade de novas plantas contaminadas no futuro, uma vez que isto depende não somente do número total de psilídeos em uma população, mas também da porcentagem de psilídeos infectados com o patógeno do HLB, sendo fácil entender que uma população com 90% de psilídeos infectados é muito mais eficiente em transmitir a liberibacter do HLB que uma mesma população com apenas 1% de insetos infectivos. Manjunath *et al.* (2008) coletou 1500 amostras de psilídeos vivos em vários locais na Flórida (EUA) em plantas sintomáticas e assintomáticas para HLB e chegou a 105 amostras positivas para *Ca. Liberibacter asiaticus* e sugeriu que uma população infectiva de psilídeos e plantas poderiam disseminar o HLB na Flórida.

Seja qual for o objetivo da detecção das bactérias do HLB nos psilídeos vetores, o modo de captura, o modo de armazenamento ou conservação do inseto e o tempo de armazenamento em determinada condição podem interferir na taxa de detecção da bactéria pelos métodos empregados rotineiramente. Normalmente, os testes de detecção têm sido feitos por meio da extração de DNA dos insetos, juntamente com o DNA da bactéria caso esteja presente, que é posteriormente submetido à reação da polimerase em cadeia (PCR) para a amplificação de determinada sequência do DNA alvo (do patógeno) que se quer determinar. Desta forma, quanto melhor a qualidade do modo de coleta e armazenamento, melhor será a qualidade da amostra, o que pode refletir diretamente na qualidade do DNA usado para a detecção do patógeno.

Em propriedades citrícolas, um dos métodos de monitoramento do movimento e imigração (entrada) de *D. citri* na propriedade envolve o uso de armadilhas adesivas atrativas (amarelas ou verdes) colocadas em pontos estratégicos da propriedade, com posterior avaliação da captura ou não do inseto. Yamamoto, (2008) descreve que o monitoramento do psilídeo pode ser realizado por meio de avaliação visual direta em ramos de plantas cítricas ou em armadilhas adesivas amarelas que devem ser posicionadas na periferia da propriedade e em alguns locais dentro da propriedade, visando monitorar os locais e momento da entrada do vetor e a migração para o interior da mesma. Adicionalmente, em muitos locais do mundo, levantamentos para detectar a presença de HLB antes da descoberta de plantas sintomáticas também são conduzidos com o monitoramento de *D. citri* em armadilhas adesivas atraentes, seguido pelo teste dos psilídeos capturados por PCR convencional ou PCR em tempo real

(qPCR) para verificar a presença das bactérias associadas ao HLB nos insetos. Em ambos os casos onde os psilídeos são monitorados em armadilhas adesivas, estas permanecem no campo por uma a duas semanas, quando são avaliadas visualmente para a presença dos psilídeos, os quais são removidos e levados ao laboratório para os testes de detecção das bactérias.

O processo que envolve a coleta dos psilídeos capturados nas armadilhas até o seu processamento no laboratório pode levar até um mês dependendo do fluxo de trabalho dos inspetores de campo e dos técnicos do laboratório. Como a análise dos psilídeos é um método destrutivo com respeito à amostra de insetos, é difícil provar que um resultado de PCR negativo é devido à ausência da bactéria alvo ou devido à degradação do DNA bacteriano durante o tempo de exposição do psilídeo na armadilha e às condições de armazenamento e ao tempo de conservação do psilídeo retirado da armadilha (Irey *et al.*, 2011). São poucas as informações sobre o período que os psilídeos capturados nas armadilhas podem permanecer expostos em contato com a cola ou qual o tempo de armazenamento após a coleta esses insetos podem permanecer sem que tenham alterações que interfiram na detecção da bactéria em laboratório. Apenas dois testes independentes foram realizados por Irey *et al.* (2011) nas condições climáticas da Florida e com as armadilhas utilizadas pelos citricultores locais. Neste caso, os autores observaram que a incidência de amostras positivas para a presença de *Ca. L. asiaticus* por meio de qPCR diminuiu com o aumento do tempo de permanência dos psilídeos nas armadilhas, entretanto, maiores detalhes sobre as condições de armazenamento dos psilídeos coletados não foram divulgadas. Tomando por base esse método de coleta, é importante avaliar o tempo de exposição e permanência dos insetos nas armadilhas para posterior envio ao laboratório e análise, nas condições dos pomares no estado de São Paulo, em diferentes épocas do ano e com as armadilhas adesivas utilizadas pelos citricultores locais.

Outro método de monitoramento da população de psilídeos nos pomares envolve a observação dos insetos em brotações. Neste caso, o psilídeo pode ser coletado diretamente na planta com puçá (rede entomológica) ou sugador e processado em seguida no laboratório. Este método tem sido o mais utilizado em trabalhos de detecção da bactéria em psilídeos (Hung *et al.*, 2004; Teixeira *et al.*, 2005b; Damsteegt *et al.*, 2010), uma vez que os insetos permanecem em melhores condições de manuseio e análise. Quando se pretende conservar os insetos durante o seu transporte a longas distâncias ou por maior tempo até seu processamento no laboratório, os insetos coletados podem ser armazenados em tubos a seco ou contendo substâncias conservadoras, como por exemplo, o etanol e mantidos em diferentes condições de refrigeração. Entretanto, não há no Brasil uma descrição detalhada ou parece não haver um

consenso sobre o efeito das condições de temperatura e do tempo de armazenamento antes do processamento da amostra sobre a eficiência de detecção da bactéria nos insetos. Meyer *et al.* (2007), para estudar a frequência de psilídeos infectados por *Ca. L. asiaticus*, em suas coletas, colocou os psilídeos em etanol 95%, acondicionando-os no gelo durante o seu transporte até o laboratório. Por outro lado, Manjunath *et al.* (2008) estudou a infectividade de psilídeos coletados vivos e conservados em etanol 95% e mantidos a -20°C até o processamento das amostras. Em outro trabalho para determinar a infectividade de psilídeos em estudos de aquisição e transmissão de *Ca. L. asiaticus* por *D. citri*, Pelz-Stelinski *et al.* (2010) mantiveram os psilídeos em etanol 80% e a -20°C até o momento da extração de DNA para a detecção de *Ca. L. asiaticus*. Em seu protocolo de diagnóstico de espécies *Ca. Liberibacter*. por qPCR, o *Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria* (Senasica) do México, responsável pela detecção de HLB neste país, recomenda coletar os psilídeos vivos e armazená-los imediatamente em frascos com etanol 70% e manter as amostras à temperatura ambiente para a detecção da bactéria (SENASICA, 2010). Finalmente, Hall *et al.* (2011), estudando a influência do modo, temperatura e tempo de armazenamento na detecção de *Ca. L. asiaticus* em psilídeos individuais, concluíram que todos os métodos de armazenamento testados (em etanol 70% ou 95% ou propilenoglicol conservados à temperatura ambiente ou a -25°C), com exceção do método a seco a -25°C , foram efetivos em conservar a bactéria nos psilídeos infectados por até 59 dias. Segundo os autores, o armazenamento a seco a -25°C foi eficaz até 38 dias, mas tendeu a perder a efetividade aos 59 dias.

Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar o tempo de exposição em armadilhas adesivas amarelas e as condições de armazenamento de psilídeos adultos na detecção de *Ca. L. asiaticus* por meio da técnica de qPCR. Em um primeiro experimento foi avaliada a influência do tempo de exposição do psilídeo capturado em armadilha adesiva amarela, durante as condições climáticas de inverno e verão na região de Araraquara-SP. Em um segundo experimento foi avaliado a influência do meio de estocagem (a seco ou em etanol 70%), da temperatura de conservação e do tempo de armazenamento dos insetos vivos coletados diretamente. Em função dos resultados obtidos procurou-se estabelecer um protocolo de detecção de psilídeos infectivos, seja eles provenientes de captura direta ou em armadilhas adesivas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Criação e coleta de psíldeos infectivos

Os psíldeos utilizados nos experimentos foram provenientes de criação em laranjeiras doces sabidamente infectadas com *Ca. L. asiaticus* e mantidas em estufa com tela anti-afídica, na sede do Fundecitrus, em Araraquara-SP (Figura 1). O ciclo de *D. citri*, que corresponde às fases de ovo, ninfas e adulto foi completado nessas plantas, de maneira a garantir alta infectividade da população dos insetos utilizados no experimento. Os psíldeos adultos utilizados em cada experimento foram coletados diretamente das plantas com auxílio de um sugador bucal.



Figura 1. Criação de *Diaphorina citri* em plantas infectadas com a bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus*.

2.2. Experimento de avaliação do tempo de exposição de psilídeos em armadilhas adesivas amarelas

Este experimento foi realizado em duas épocas do ano, no inverno, com repetições nos meses de junho, julho e agosto, e no verão, com repetições nos meses de janeiro, fevereiro e março. Para cada repetição foram utilizadas 10 armadilhas adesivas amarelas quadriculadas, dupla face, de 15 x 10 cm (BUG-Agentes Biológicos, Piracicaba-SP) instaladas ao ar livre (Figura 2) na sede do Fundecitrus em Araraquara-SP, cidade localizada a 664 metros de altitude, de clima tropical com inverno seco e possuindo as coordenadas latitude 21°47'40" Sul e longitude 48°10'32" Oeste.



Figura 2. Armadilhas adesivas amarelas instaladas em suportes metálicos ao ar livre na sede do Fundecitrus em Araraquara-SP.

Cada armadilha recebeu 60 psilídeos, dispostos de forma que pudessem ser identificados no momento da coleta, sendo 3 psilídeos por quadricula na armadilha (Figura 3). Para cada repetição do experimento foram colocados 120 insetos a mais do que o necessário nas análises para compensar uma possível perda dos insetos devido à lavagem por chuva ou

degradação do mesmo na época de coleta. Quando o número de psilídeos encontrados, após o tempo de exposição fosse diferente de três em uma das quadrículas, estes não foram coletados para garantir que todos psilídeos utilizados fossem provenientes da criação e não da captura de psilídeos externos ao experimento, ocorrida após a instalação das armadilhas.

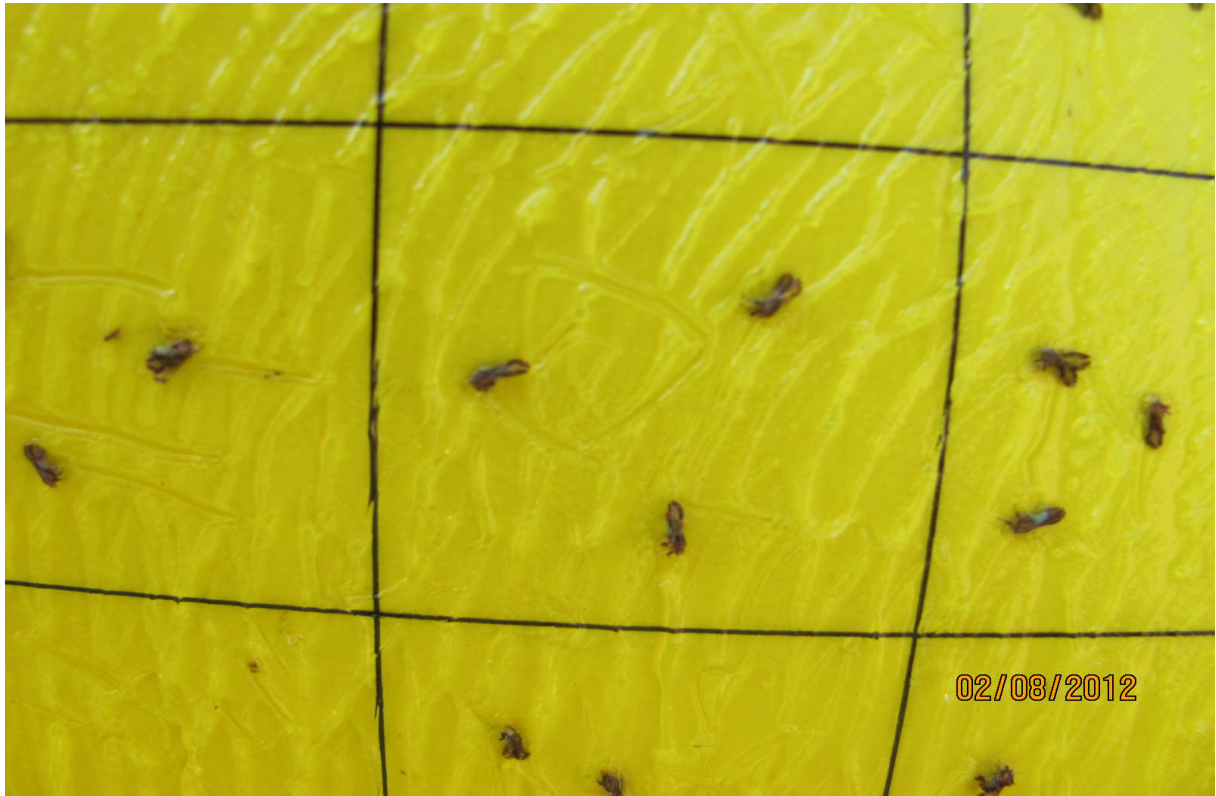


Figura 3. Disposição dos psilídeos nas armadilhas adesivas amarelas (Três insetos por quadrícula).

Os tratamentos testados foram diferentes tempos de exposição dos insetos nas armadilhas (0, 1, 3, 6, 9, 12 e 15 dias) e mais um tratamento “Controle” constituído por insetos infectivos sem passar pelas armadilhas, capturados diretamente na planta fonte e armazenados. O tratamento “0 dias na armadilha” foi constituído por insetos colocados em contato com a cola da armadilha e retirados logo em seguida.

A cada tempo de coleta estabelecido, os insetos foram retirados das armadilhas com auxílio de um arame, transferidos para tubos eppendorf de 1,5 ml e armazenados à temperatura de -20°C . O processamento para a extração de DNA de todas as amostras foi realizado uma semana após a última coleta dos psilídeos expostos por 15 dias.

Para cada tratamento foram coletadas e analisadas 20 amostras compostas por três psilídeos cada, totalizando 160 amostras com 480 insetos em cada mês e 960 amostras ao final do experimento (Figura 4).

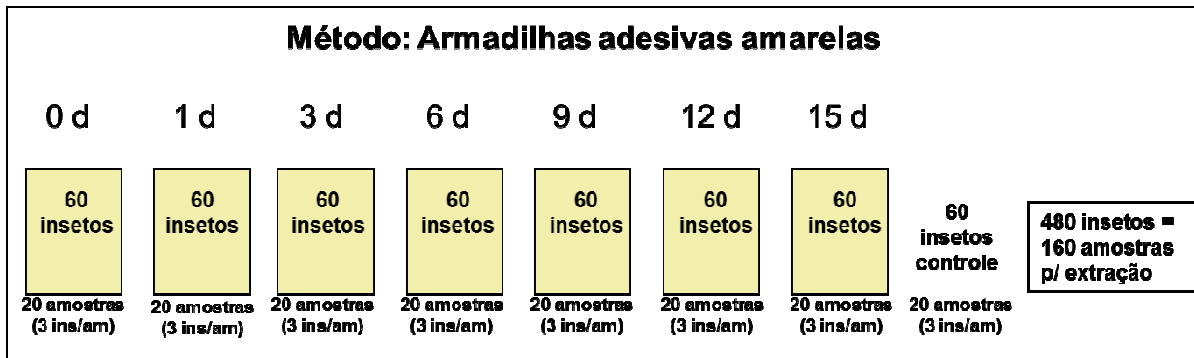


Figura 4. Esquema dos tratamentos aplicados em cada mês nos períodos de inverno (Junho, Julho e Agosto) e verão (Janeiro, Fevereiro e Março). Na legenda da figura: ins=insetos; am=amostra.

Durante a execução de todo o experimento as condições climáticas de temperatura, umidade relativa do ar e precipitação pluviométrica foram monitoradas e registradas.

O efeito do tempo de exposição dos psilídeos nas armadilhas sobre a quantidade média de DNA total extraído nas amostras, o valor médio de Ct e a porcentagem de amostras positivas para *Ca. L. asiaticus* em relação às amostras de psilídeos coletados diretamente (sem passar pela armadilha) foram analisadas por regressão linear considerando os dados de cada um dos três meses de cada estação (inverno ou verão) como repetições. Para a comparação das médias das estações foi realizado o teste t comparando-se os valores dos coeficientes angulares das retas obtidas.

2.3. Experimento de avaliação das condições de armazenamento de psilídeos coletados diretamente na planta

Neste experimento foi realizada a coleta direta de psilídeos adultos vivos por meio de sugadores bucais nas mesmas plantas descritas no item 2.1. Em seguida, os insetos foram colocados em tubos eppendorf de 1,5 ml em número de três insetos por tubo (Figura 5) e submetidos aos diferentes tratamentos. A extração de DNA foi realizada imediatamente ao final de cada tempo de armazenamento estabelecido (Figura 6).

O delineamento experimental foi de blocos casualizados e fatorial 2x3x7, onde os blocos foram as repetições do experimento em diferentes meses (setembro e outubro) e os fatores testados foram:

- “Meio de estocagem”: em etanol 70% ou a seco;
- “Temperatura de armazenamento”: temperatura ambiente (em torno de 26°C), temperatura de geladeira (4°C) e congelador (-20°C);
- “Tempo de armazenamento”: 0, 3, 7, 14, 21, 28 e 35 dias.



Figura 5. Psilídeos armazenados em etanol 70% (A) e a seco (B).

Cada tratamento foi constituído por 20 amostras com três psilídeos por amostra e os resultados foram apresentados como porcentagem de amostras positivas para *Ca. L. asiaticus* (média das duas repetições do experimento).



Figura 6. Esquema dos tratamentos realizados para avaliar a influência das condições de conservação e armazenamento de amostras de *Diaphorina citri* coletadas diretamente na detecção de *Candidatus Liberibacter asiaticus*. Na legenda da figura: am=amostra; x3 = três insetos por amostra.

O efeito do tempo de armazenamento dos insetos na quantidade média de DNA total extraído, no valor de Ct e na eficiência de detecção da bactéria nas amostras de psilídeos em cada combinação “Meio de estocagem” e “Temperatura de armazenamento” foi analisado por regressão linear considerando o tempo de armazenamento como variável independente e a quantidade média de DNA total, o valor de Ct e a porcentagem de amostras positivas para *Ca. L. asiaticus* como variáveis dependentes.

2.4. Extração de DNA das amostras de psilídeos

A extração de DNA a partir dos psilídeos coletados nos dois experimentos foi feita utilizando-se o método do CTAB (Murray & Thompson, 1980). As amostras de insetos foram maceradas, com auxílio de um pistilo, diretamente em tubos de 1,5 ml com 400 µl de tampão CTAB (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 e em seguida, submetidas à incubação a 65°C durante 30 minutos e centrifugação a 960 g por 5 minutos. Foram recuperados 350 µl do sobrenadante e adicionados 350 µl da solução de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Após homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 15300 g por 10 minutos e 300 µl do sobrenadante transferido para novos tubos. Em cada amostra acrescentou-se 0,6 volumes de isopropanol (180 µl) para precipitação do DNA por meio de incubação a -20°C por 30 minutos. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 15300 g por 20 minutos, o sobrenadante descartado e o sedimento lavado duas vezes com 700 µL de etanol 70%. Após a última centrifugação (15300 g por 10 minutos) do processo de lavagem, as amostras foram secas por 5 minutos em *Speed Vac* (Eppendorf) e o *pellet* de DNA ressuspenso em 30 µl de H₂O deionizada autoclavada. As extrações foram realizadas no Laboratório do Centro de Diagnóstico de Doenças e Pragas dos citros do Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento do Fundecitrus, em Araraquara-SP.

2.5. Quantificação, diluição e volume de DNA das amostras

Após a extração, o DNA das amostras foi quantificado em NanoDrop (ND 1000 V 3.7.1). Com base na concentração de DNA as amostras foram divididas em três categorias: amostras com concentração de DNA maior que 100 ng/µl, foram diluídas com água para uma concentração final de 100 ng/µl, sendo utilizado 3 µl de DNA na reação de PCR. Para amostras com concentração de DNA entre 90 e 100 ng/µl, foram utilizados 3 µl de DNA sem diluição na reação de PCR. Para amostras que apresentaram concentração de DNA menor que 90 ng/µl, foram empregados 6 µl de DNA na reação de PCR. Assim, a quantidade de DNA na reação de PCR variou de 25,08 até 538,98 ng. A divisão das amostras com base na concentração de DNA total obtido nas extrações teve como objetivo normalizar ou minimizar as diferenças na quantidade de DNA que seria empregada nas reações de PCR.

2.6. Detecção de *Ca. L. asiaticus* nas amostras de DNA de psilídeos

A detecção de *Ca. L. asiaticus* nas amostras de DNA obtidas dos psilídeos, nos dois experimentos, foi realizada por meio da técnica de qPCR (PCR em tempo real), considerada mais sensível que a PCR convencional para a detecção da bactéria *Ca. L. asiaticus* (Li et al., 2006; Teixeira et al., 2008). Para a detecção da bactéria foram utilizados os oligonucleotídeos (*primers*) e sonda com base na região do DNA ribossomal 16S (DNAr 16S), desenvolvidos por Li *et al.* (2006) e utilizados como padrão pelo *Animal and Plant Health Inspection Service* (APHIS).

Para cada reação de qPCR utilizou-se 3 ou 6 µL de DNA, conforme descrito no item 2.5, Master Mix [1X], 0,5 µM dos *primers* HLBas: 5' TCGAGCGCGTATGCAATACG 3' (*forward*) e HLBr: 5' GCGTTATCCCGTAGAAAAAGGTAG 3' (*reverse*) e 0,2 µM da sonda HLBp: FAN AGACGGGTGAGTAACGCG MGB-NFQ, em um volume final de reação igual a 15 µL. A reação de PCR consistiu de desnaturação inicial por 10 minutos a 95 °C seguidos de 45 ciclos de 15 segundos a 95 °C de desnaturação e 45 segundos a 58 °C de anelamento e extensão. Os controles utilizados foram: sadio (psilídeos sem a presença de *Ca. Liberibacter* spp.), positivo (psilídeos com a presença de *Ca. L. asiaticus*) e negativo (água - ausência de DNA). Todas as amostras, inclusive os controles foram realizadas em duplicata em termociclador StepOnePlus (Applied Biosystem). As reações foram feitas no Centro de Diagnóstico de Doenças e Pragas dos Citros do Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento do Fundecitrus, em Araraquara-SP.

2.7. Determinação do valor de Ct (*Threshold Cycle*) máximo para amostras positivas e avaliação da sensibilidade da reação de qPCR

Com a finalidade de se estabelecer o valor de Ct máximo que pudesse ser adotado para considerar uma amostra positiva por qPCR, duas amostras sabidamente positivas para *Ca. L. asiaticus* foram diluídas serialmente na proporção 1:1 (DNA:H₂O), até a máxima diluição de 1:256. Para ambas as amostras a quantidade inicial de DNA total na reação foi igual a 300 ng. Assim, as diluições subsequentes continham 150, 75, 37,5, 18,7, 9,4, 4,7, 2,3 e 1,2 ng de DNA total nas reações. As diluições foram utilizadas em duplicata.

Para se verificar a sensibilidade ou o limite de detecção do teste de qPCR utilizado, uma reta padrão foi obtida através da utilização de um plasmídeo (pGEMT Easy) contendo a sequência alvo de amplificação. Admite-se que cada molécula do plasmídeo equivale a uma

cópia do alvo da qPCR. Para esta análise foram empregadas oito diluições seriadas com fator de diluição igual a 10, de modo que a menor diluição continha $6,5 \times 10^8$ cópias do inserto enquanto a maior equivaleu a 65 cópias, o que em última análise significa o “número alvos de liberibacter na amostra”. As diluições foram utilizadas em duplicata.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Determinação do valor de Ct

Com a finalidade em se determinar o valor de Ct máximo para considerar uma amostra positiva na avaliação por qPCR, diluições seriadas (na ordem 1:1) de duas amostras sabidamente positivas, e com valores de Ct conhecidos, foram empregadas. Quando se dilui uma amostra 1:1 espera-se ter a metade de alvos da qPCR a cada diluição e conseqüentemente o valor de Ct deve aumentar em 1Ct. Na Tabela 1 são mostrados os resultados de Ct obtidos a partir deste experimento, onde se verificou que a cada diluição, o valor de Ct correspondente aumentou em aproximadamente 1 Ct, sendo esta linearidade observada até as diluições finais de ambas as amostras empregadas (amostras 27 e 54), com poucas discrepâncias observadas nas últimas diluições, o que pode ocorrer devido ao baixo número de cópias na reação.

Ainda que os valores iniciais de Ct tenham variado em função da quantidade inicial de DNA da liberibacter em cada amostra (maior a quantidade de DNA da bactéria na amostra, menor o valor de Ct e vice-versa), verificamos uma boa linearidade nos valores de Ct, de onde se pode estimar que o valor de Ct igual a 35 seria um valor confiável a ser adotado para se considerar uma amostra positiva (o que correspondeu em média a $1,1 \times 10^3$ alvos da qPCR).

Assim, o valor de Ct limite adotado para uma amostra ser considerada como positiva foi de 35, o que corrobora os dados apresentados por Santos *et al.* (2011).

Tabela 1. Valores de Ct obtidos com a diluição seriada de duas amostras positivas na qPCR para *Candidatus Liberibacter asiaticus* e submetidas a qPCR.

Diluição	DNA (ng)	Valores de Ct		
		Amostra 27	Amostra 54	Amostra sadia
1 (Original)	300	28,7	26,8	Indeterminado
1/2	150	30,6	27,6	-
1/4	75	31,4	28,4	-
1/8	37,5	32,4	29,3	-
1/16	18,7	33,4	30,5	-
1/32	9,4	34,2	31,6	-
1/64	4,7	35,4	32,5	-
1/128	2,3	38,6	33,9	-
1/256	1,2	37,6	35,3	-

3.2. Avaliação da sensibilidade (limite de detecção) da qPCR

O valor de Ct (*Threshold Cycle* ou ciclo limiar) em uma reação de qPCR representa o ciclo da PCR no qual ocorre a interseção entre a curva de amplificação de uma amostra e a linha do *threshold*, ou em outras palavras, o número de ciclos requeridos para que o sinal de fluorescência gerado em uma determinada amplificação ultrapasse o *threshold* (nível de *background*) da reação. Ele é a medida relativa da concentração de um alvo na reação de qPCR. Os valores de Ct são inversamente proporcionais à quantidade de DNA alvo na amostra, assim, quanto maior a quantidade deste na amostra, menor será o valor de Ct.

Na tabela 2, os valores de Ct obtidos com as diluições do plasmídeo seguem uma linearidade (intervalo médio de $3,61 \pm 0,21$ Ct para diluições 1:10) até a amostra contendo $6,5 \times 10^2$ cópias. Entretanto, o intervalo de Ct para a diluição seguinte (65 cópias) foi de 0,74, diferente de 3,6, indicando perda de linearidade na detecção de alvos da PCR.

Tabela 2. Valores de Ct obtidos com a diluição seriada do plasmídeo pGEM-T Easy contendo uma cópia do DNA alvo para *Candidatus Liberibacter asiaticus*.

Cópias do plasmídeo	Ct médio
$6,5 \times 10^8$	15,05
$6,5 \times 10^7$	18,29
$6,5 \times 10^6$	21,85
$6,5 \times 10^5$	25,62
$6,5 \times 10^4$	29,34
$6,5 \times 10^3$	32,89
$6,5 \times 10^2$	36,70
65	37,44

Observa-se que o limite de detecção (menor concentração que pode ser detectada) foi de 65 cópias. Entretanto para fins de quantificação, ainda que não nos propuséssemos a quantificar as amostras, deve-se considerar a faixa de linearidade da reta, o que neste caso ficou em torno de 650 cópias (Ct igual a 36,7). Esse resultado corrobora o valor de Ct máximo de 35 estabelecido anteriormente para se considerar uma amostra positiva, o que nos da segurança no valor adotado, evitando considerar amostras negativas como positivas (falsos

positivos) nas análises das reações de qPCR. A reta padrão é mostrada na Figura 7 abaixo, tendo sido obtido valor de eficiência igual a 93,75%.

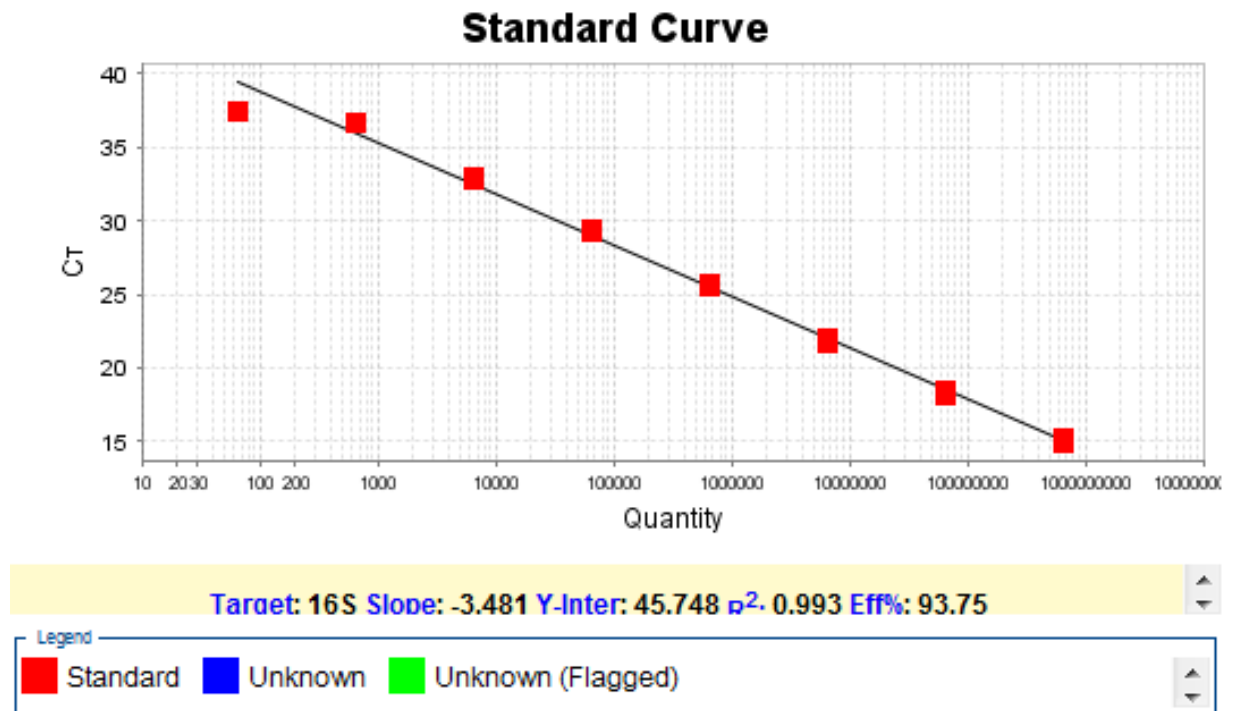


Figura 7. Curva padrão da diluição seriada 1:10 do plasmídeo pGEM-T Easy contendo a sequência alvo de amplificação de *Candidatus Liberibacter asiaticus*.

3.3. Experimento de avaliação do tempo de exposição de psílídeos em armadilhas adesivas amarelas

Em todas as repetições, tanto no inverno como no verão, a frequência de amostras positivas para os psílídeos coletados diretamente sem contato com a armadilha, variou entre 95 e 100%, indicando alta infectividade das populações de psílídeos adultos obtidos da criação em plantas sintomáticas. Isto corrobora com os resultados de Nascimento *et al.* (2010) que ao manter ninfas de *D. citri* de quarto instar por um período de acesso à aquisição (PAA) de 48 horas em plantas sintomáticas, obteve 84% de adultos infectados com *Ca. L. asiaticus* 21 dias após o início do PAA.

Com o aumento do tempo de exposição dos psílídeos nas armadilhas adesivas, observou-se uma “aparente degradação” dos mesmos, seus “corpos” tornaram-se menos firmes e mais escuros (Figura 8).

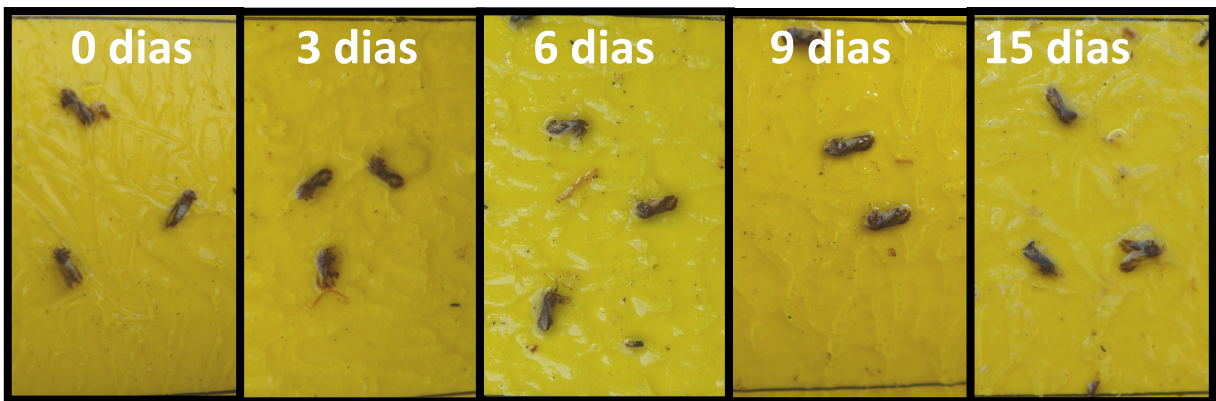


Figura 8. Aparência dos psilídeos coletados nas armadilhas adesivas amarelas após diferentes tempos de exposição.

Como pode ser observado nas Figuras 9 e 10, tanto no inverno como no verão, quanto maior o tempo de exposição dos psilídeos nas armadilhas menor a quantidade de DNA total obtido das amostras após a extração, sendo observada uma redução mais expressiva ainda, principalmente a partir do terceiro dia de exposição dos insetos nas armadilhas, indicando haver um efeito da cola e/ou do clima na degradação do DNA total.

Tanto no inverno quanto no verão o coeficiente angular da reta (α) entre a média do DNA total e o tempo de exposição dos psilídeos nas armadilhas adesivas amarelas foi negativo e significativamente diferente de zero. No inverno, $\alpha = -6,86$, erro padrão = 1,06 e $P = 0,000007$; e no verão, $\alpha = -8,38$, erro padrão = 1,26 e $P = 0,000002$. Não houve diferença significativa do α entre o verão e o inverno ($P = 0,3627$), indicando que apesar das diferenças climáticas de temperatura média, umidade relativa média e precipitação entre as duas estações do ano (Tabela 3), a degradação do psilídeo capturado durante os 15 dias de exposição foi semelhante.

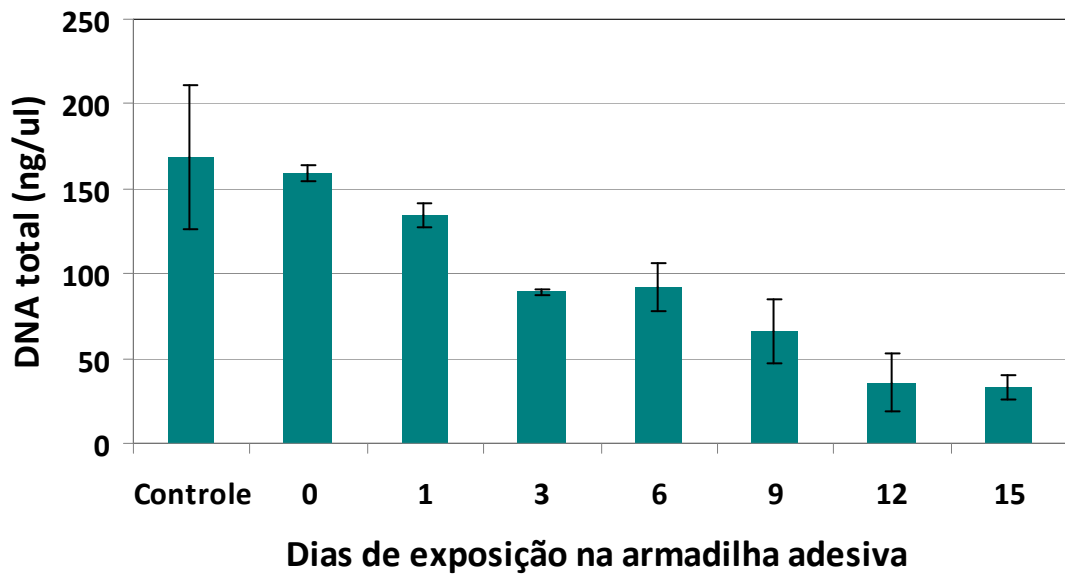


Figura 9. Concentração média de DNA proveniente das amostras de psilídeos coletados nas armadilhas adesivas amarelas durante o período de inverno. As barras correspondem ao erro padrão da média das repetições realizadas em junho, julho e agosto de 2011.

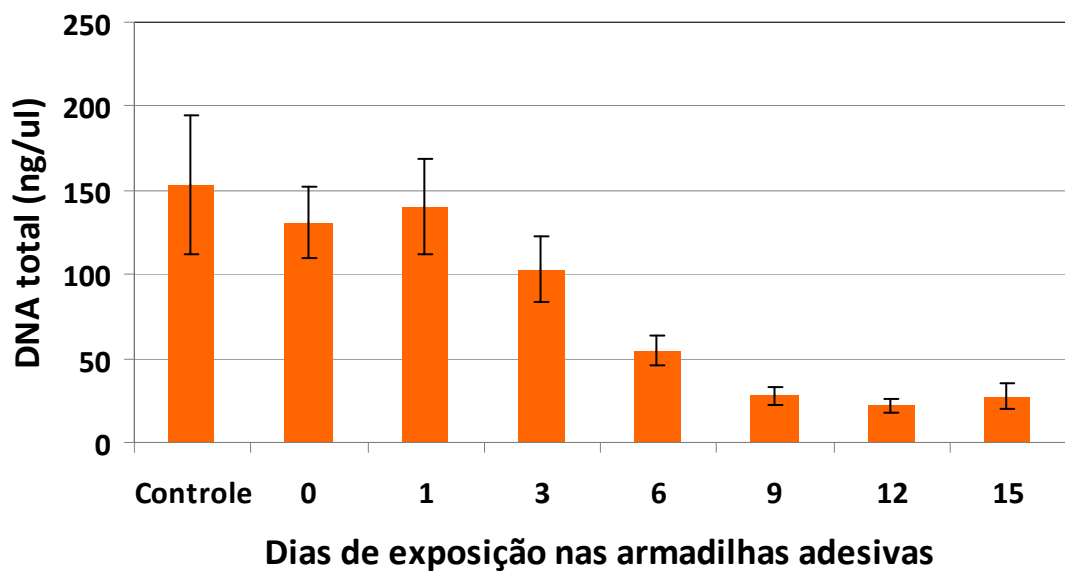


Figura 10. Concentração média de DNA proveniente das amostras de psilídeos coletados nas armadilhas adesivas amarelas durante o período de verão. As barras correspondem ao erro padrão da média das repetições realizadas em janeiro, fevereiro e março de 2012.

Esta redução na quantidade de DNA total extraído em função do tempo de exposição nas armadilhas foi refletida no aumento dos valores médios de Ct obtidos para as amostras, tanto no verão (Figura 11), quanto no inverno (Figura 12). Nos dois períodos o coeficiente angular da reta (α) entre a média do valor de Ct e o tempo de exposição dos psilídeos nas armadilhas adesivas amarelas foi positivo e significativamente diferente de zero. No inverno, $\alpha = 0,18$, erro padrão = 0,07 e $P = 0,022$; e no verão $\alpha = 0,26$, erro padrão = 0,08 e $P = 0,003$. Entretanto, não houve diferença significativa do α entre o verão e o inverno ($P = 0,4527$).

Tabela 3. Dados das condições climáticas de temperatura média, umidade relativa média do ar e precipitação pluviométrica acumulada durante o período de 15 dias em cada mês que o experimento foi conduzido.

Mês/Clima	Temperatura (° C)	Umidade Relativa (%)	Precipitação (mm)
Junho	17,7	77,0	46
Julho	17,9	72,9	0,5
Agosto	19,3	64,0	11
Inverno	18,3	71,3	19,2
Janeiro	21,5	76,3	316
Fevereiro	24,6	76,3	180
Março	24,0	77,7	159
Verão	23,4	76,8	218,3

Embora tenha havido uma menor quantidade de DNA total extraído nas amostras e um maior valor de Ct com o aumento do tempo de exposição nas armadilhas, os valores de Ct na maioria dos casos ficou abaixo do limiar ($Ct \leq 35$) para considerar a amostra positiva e não foi observada redução na porcentagem relativa de amostras detectadas positivas pelo qPCR em função do tempo de exposição das amostras nas armadilhas, tanto no inverno como no verão (Figuras 13 e 14), isto é, os valores de α não foram significativamente diferentes de zero. No inverno $\alpha = -0,49$, erro padrão = 0,34 e $P = 0,1647$; no verão $\alpha = -0,77$, erro padrão = 0,38 e $P = 0,0562$.

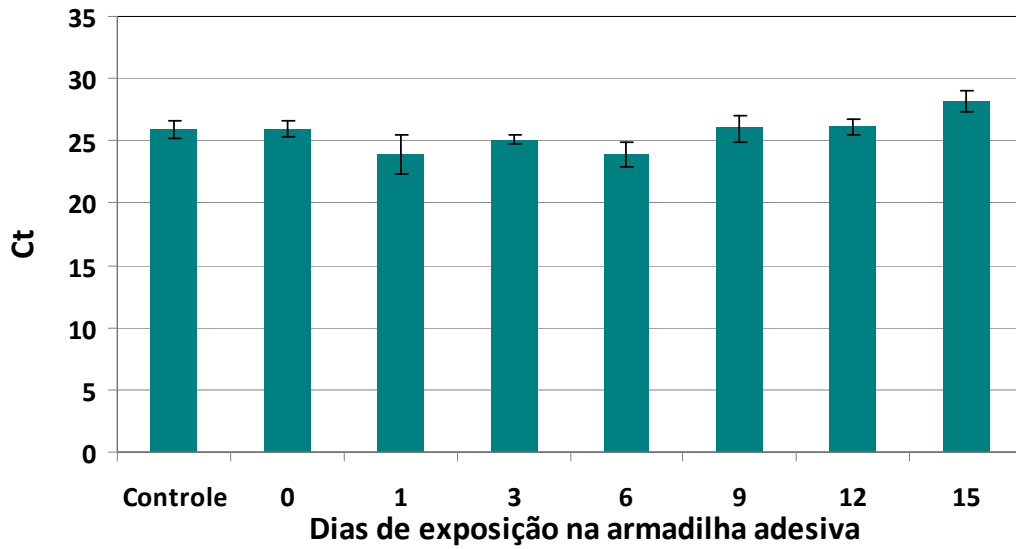


Figura 11. Valor médio de Ct das amostras de psilídeos coletados nas armadilhas adesivas amarelas durante o período de inverno. As barras correspondem ao erro padrão da média das repetições realizadas em junho, julho e agosto de 2011.

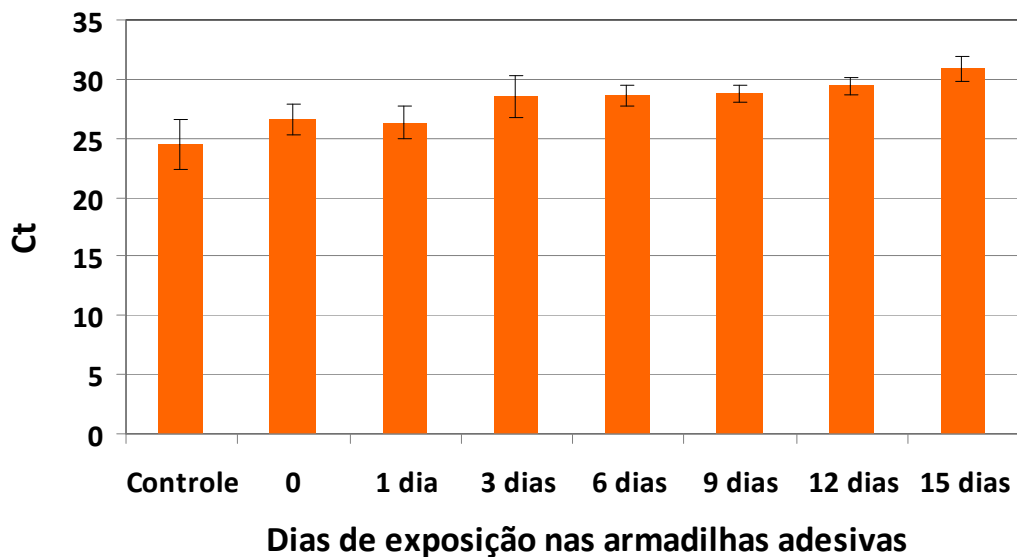


Figura 12. Valor médio de Ct das amostras de psilídeos coletados nas armadilhas adesivas amarelas durante o período de verão. As barras correspondem ao erro padrão da média das repetições realizadas em janeiro, fevereiro e março de 2012.

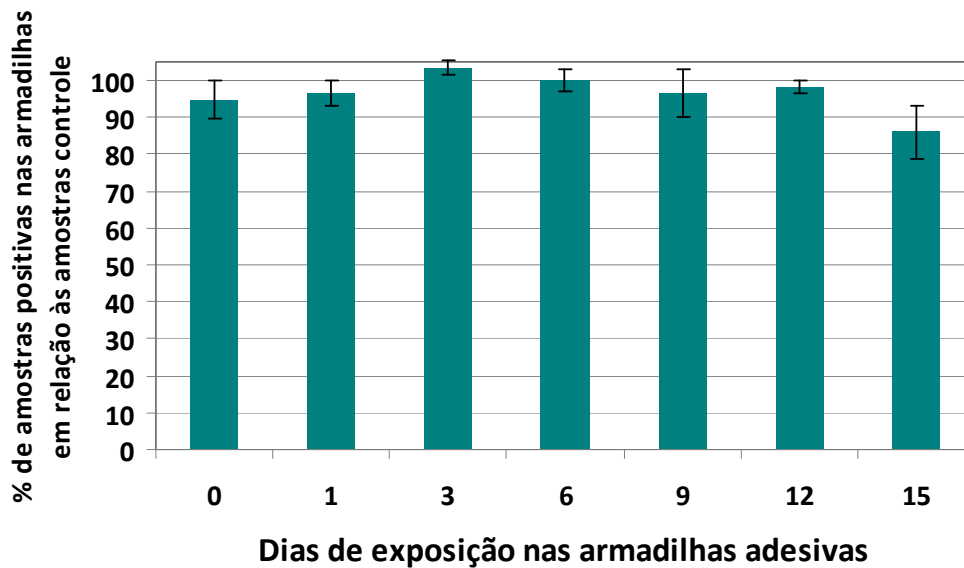


Figura 13. Porcentagem média de amostras de psilídeos positivas para *Candidatus Liberibacter asiaticus* coletados das armadilhas em relação às amostras controle coletadas diretamente em função do tempo de exposição nas armadilhas adesivas amarelas durante o período de inverno. As barras correspondem ao erro padrão da média das repetições realizadas em junho, julho e agosto de 2011.

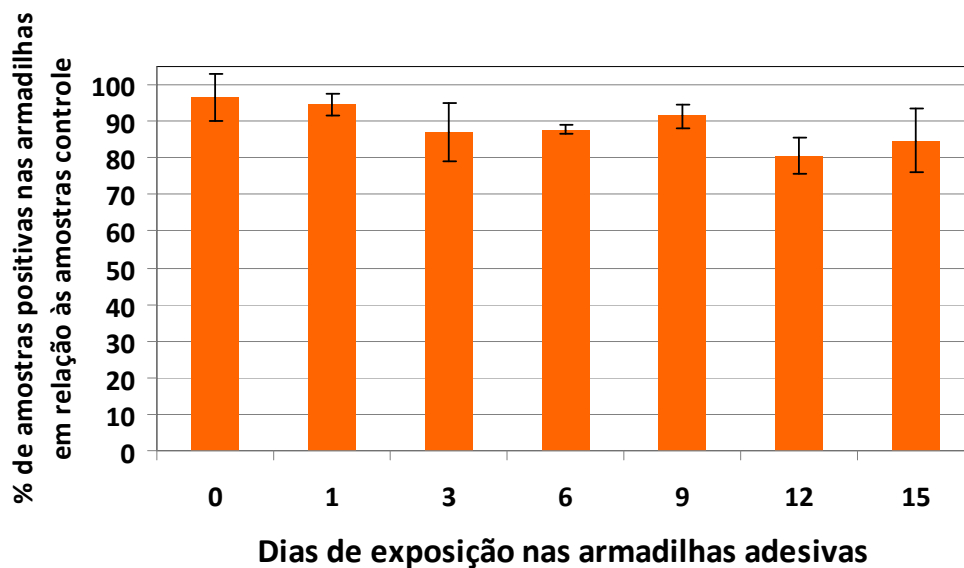


Figura 14. Porcentagem média de amostras de psilídeos positivas para *Candidatus Liberibacter asiaticus* coletados das armadilhas em relação às amostras controle coletadas diretamente em função do tempo de exposição nas armadilhas adesivas amarelas durante o período de verão. As barras correspondem ao erro padrão da média das repetições realizadas em janeiro, fevereiro e março de 2012.

Os resultados de detecção de ‘*Ca. L. asiaticus*’ (Figuras 13 e 14) são discrepantes dos obtidos nos experimentos realizados por Irey *et al.* (2011). Estes autores constataram num primeiro ensaio, quando as armadilhas com os psilídeos foram colocadas em estufas climatizadas para cultivo de citros, que o percentual de amostras positivas diminuiu com o tempo de exposição nas armadilhas. Depois de 3 e 5 dias de exposição nas armadilhas, a percentagem de detecção de psilídeos positivos para *Ca. L. asiaticus* por qPCR reduziu entre 50 e 75% em relação à percentagem de psilídeos infectivos detectados no tratamento controle sem contato com a armadilha e no tratamento de 0 dias (contato mínimo com a armadilha). No 7º dia de exposição não foram detectadas amostras positivas. No segundo ensaio, quando as armadilhas foram colocadas sob a copa de uma amoreira, houve também redução significativa do percentual de amostras positivas já a partir do primeiro dia de exposição dos psilídeos nas armadilhas, e a partir de 14 dias não foi possível detectar mais a bactéria causadora do HLB. Neste caso, algumas diferenças entre os experimentos poderiam explicar os resultados: (i) No trabalho de Irey *et al.* (2011) a percentagem de amostras positivas no tratamento controle foi de 30 a 35%, enquanto que neste trabalho a percentagem de amostras positivas no tratamento controle foi de 95 a 100%. (ii) No trabalho de Irey *et al.* (2011) as amostras analisadas foram constituídas por um único inseto, enquanto que neste trabalho as amostras continham três indivíduos, portanto três vezes mais psilídeos, procedimento que pode ter influenciado a presença e conseqüentemente a quantidade e a detecção da bactéria *Ca. L. asiaticus*. (iii) No trabalho de Irey *et al.* (2011) a quantidade de DNA total utilizada nas reações de PCR não foi ajustada, enquanto que neste trabalho foi realizada uma correção da quantidade de DNA total utilizado nas reações de qPCR. Para amostras com concentração de DNA menor que $100 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ de DNA total, foi utilizado um maior volume da amostra de DNA na reação de qPCR. (iv) Neste trabalho o valor de Ct foi 35, enquanto que para Irey *et al.* (2011) foi considerado o valor de 30. Outras diferenças relacionadas ao protocolo de extração de DNA e à quantidade de DNA total extraído nos dois trabalhos também poderiam contribuir para as diferenças nos resultados. Assim, pode-se dizer que mesmo havendo a redução da quantidade de DNA total extraído nas amostras expostas por um período maior nas armadilhas, a maior percentagem de amostras positivas no tratamento controle, a correção da quantidade de DNA total utilizado nas reações e, principalmente, a quantidade de indivíduos utilizada foram suficientes para garantir a mesma eficiência de detecção de *Ca. L. asiaticus* por qPCR nas amostras mesmo após 15 dias dos psilídeos nas armadilhas adesivas expostas às intempéries climáticas.

3.4. Experimento de avaliação das condições de armazenamento de psilídeos coletados diretamente na planta

Como no experimento anterior, em todas as repetições a frequência de amostras de psilídeos positivos coletados e analisados no mesmo dia, variou entre 95 e 100%.

Após extração, como no primeiro experimento, todas as amostras tiveram o DNA quantificado para posterior análise por qPCR. Na Figura 15 estão apresentadas as variações das médias de DNA total, extraído das amostras de psilídeos para cada método de conservação e armazenamento, obtidas ao longo do período de armazenamento. Independente da temperatura de armazenamento, as amostras conservadas em etanol 70% mantiveram a quantidade de DNA extraído estável até 35 dias de armazenamento (Tabela 4). O mesmo foi observado para as amostras conservadas a seco e mantidas nas temperaturas de -20°C e 4°C. Entretanto, nas amostras conservadas a seco e mantidas à temperatura ambiente, a concentração de DNA total extraído foi negativamente relacionada com o período de armazenamento, iniciando sua redução a partir de 14 dias da coleta das amostras (Tabela 4, Figura 13).

Tabela 4. Resultado da análise de regressão entre o DNA total extraído das amostras e período de armazenamento (de 0 a 35 dias) para cada meio de estocagem (em etanol 70% ou a seco) e temperatura armazenamento (26°C, 4°C ou -20°C).

Temperatura de armazenamento	Meio de estocagem	Coefficiente angular	<i>P</i>
26 °C	Etanol 70%	0.039	0.965 ns
26 °C	A seco	-3.910	0.0002**
4 °C	Etanol 70%	-1.479	0.053 ns
4 °C	A seco	-0.995	0.562 ns
-20 °C	Etanol 70%	-1.112	0.157 ns
-20 °C	A seco	0.365	0.544 ns

ns = o coeficiente angular da reta de regressão não difere estatisticamente de zero a 5% de significância.

** = o coeficiente angular da reta de regressão difere estatisticamente de zero a 1% de significância.

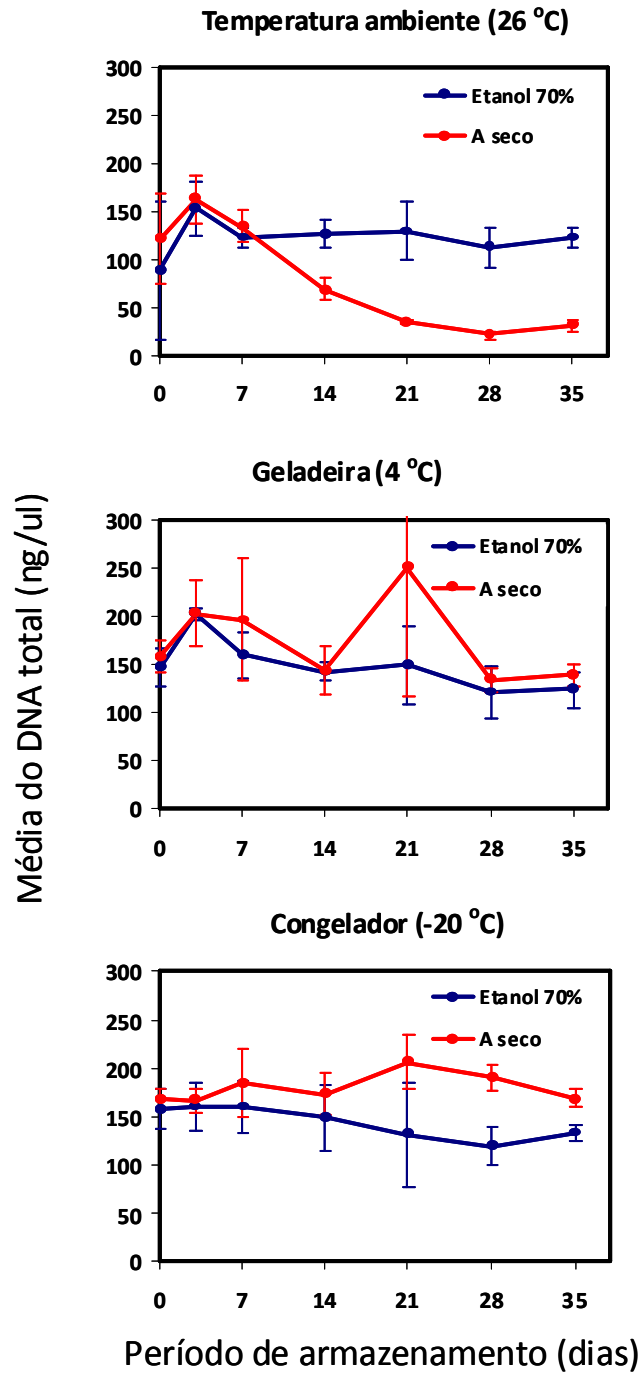


Figura 15. Média do DNA total das amostras de psilídeos em função do período de armazenamento nos diferentes tratamentos de meio de estocagem (em etanol 70% e a seco) e temperatura de armazenamento (26°C, 4°C e -20°C). As barras correspondem ao erro padrão da média de duas repetições (20 amostras por repetição).

As amostras conservadas em etanol 70%, independente da temperatura que foram mantidas, permaneceram estáveis em relação à porcentagem de amostras positivas para *Ca. Liberibacter asiaticus*, durante os 35 dias de armazenamento (Tabela 5). O mesmo foi observado para as amostras conservadas a seco e mantidas nas temperaturas de -20°C e 4°C. Entretanto, semelhante aos dados observados com a concentração de DNA total, nas amostras conservadas a seco e mantidas à temperatura ambiente de 26°C, a porcentagem de amostras positivas foi negativamente relacionada com o período de armazenamento, iniciando sua redução a partir de 21 dias da coleta das amostras (Tabela 5, Figura 16).

Tabela 5. Resultado da análise de regressão entre porcentagem de amostras positivas para ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ e período de armazenamento (de 0 a 35 dias) para cada meio de estocagem (em etanol 70% ou a seco) e temperatura armazenamento (26°C, 4°C ou -20°C).

Temperatura de armazenamento	Meio de estocagem	Coefficiente angular	P
26 °C	Etanol 70%	0.082	0.387 ns
26 °C	A seco	-0.438	0.002**
4 °C	Etanol 70%	0.042	0.438 ns
4 °C	A seco	-0.132	0.288 ns
-20 °C	Etanol 70%	0.040	0.456 ns
-20 °C	A seco	0.023	0.826 ns

ns = o coeficiente angular da reta de regressão não difere estatisticamente de zero a 5% de significância.

** = o coeficiente angular da reta de regressão difere estatisticamente de zero a 1% de significância.

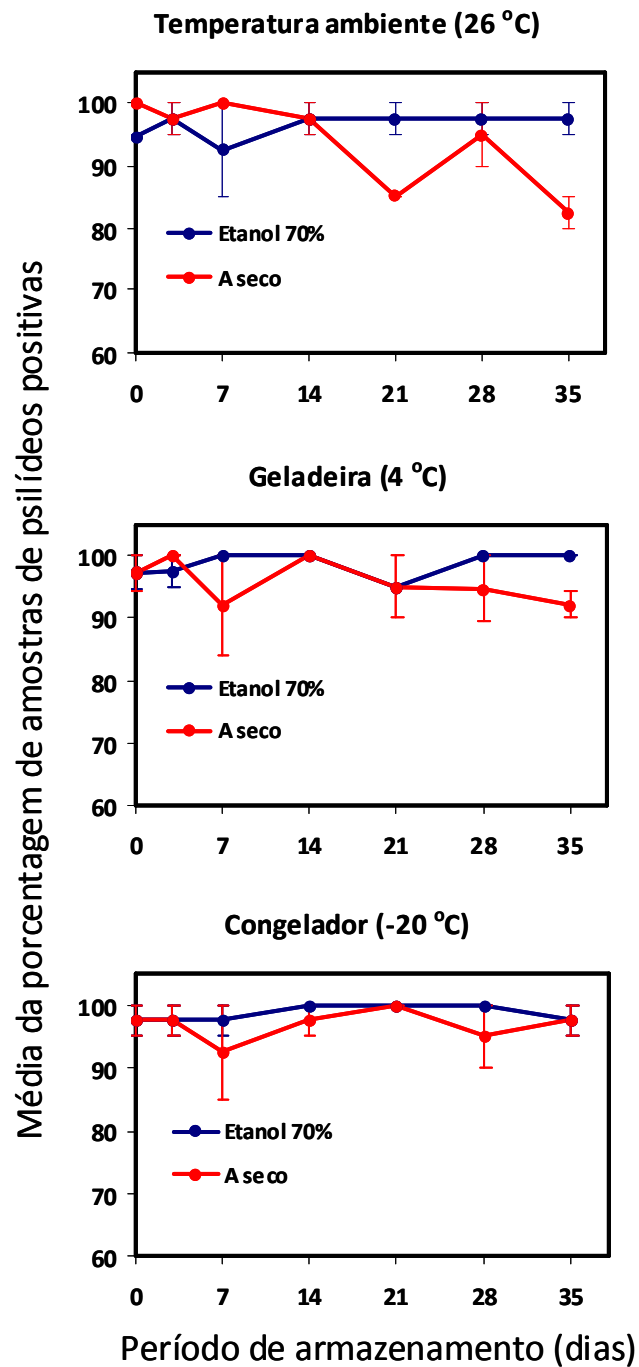


Figura 16. Porcentagem média de amostras de psilídeos positivas para *Candidatus Liberibacter asiaticus* em função do período de armazenamento nos diferentes tratamentos de meio de estocagem (em etanol 70% e a seco) e temperatura de armazenamento (26°C, 4°C e -20°C). As barras correspondem ao erro padrão da média de duas repetições (20 amostras por repetição).

Os resultados obtidos neste trabalho podem ser comparados àqueles obtidos por Hall *et al.* (2011) que estudaram, na Flórida (EUA), seis (6) métodos de armazenamento de adultos de *D. citri* e detecção da bactéria *Ca. L. asiaticus*. Os tratamentos do trabalho em questão eram etanol 95% à temperatura de -25 °C, sem fluido de conservação à temperatura de -25°C e etanol a 95%, etanol a 70%, propileno glicol, DNAGard à temperatura ambiente. Os pesquisadores concluíram que até 59 dias não houve diferença significativa entre psilídeos armazenados em etanol 70%, etanol 95% e propileno glicol, conservados à temperatura ambiente e -25 °C. Os resultados dos trabalhos são semelhantes quando comparados os tratamentos com armazenamento em etanol 70% eficiente na conservação da bactéria até 35 dias neste trabalho e 59 dias no trabalho de Hall *et al.* (2011), assim como, os tratamentos a seco na temperatura de - 20°C, eficaz até 35 dias neste experimento, e a seco a -25°C, eficaz até 38 dias no experimento citado. A porcentagem de amostras positivas manteve-se alta variando entre 82,5% e 100%, bem acima do experimento da Flórida que variou entre 20,0% e 56,7%. A menor detecção de amostras de psilídeos positivas para liberibacter no trabalho de Hall *et al.* (2011) se deve aos mesmos fatores citados no experimento de armadilhas adesivas amarelas. (i) No trabalho de Hall *et al.* (2011) a porcentagem de amostras positivas no tratamento controle para armazenamento de psilídeos já começou baixa, entre 30 e 35%, enquanto que neste trabalho a porcentagem de amostras positivas no tratamento controle foi de 94 a 100%. (ii) Neste trabalho, foi realizado o ajuste da quantidade de DNA total utilizada nas reações de qPCR. (iii) As amostras de psilídeos continham três indivíduos neste experimento e apenas um no trabalho de Hall *et al.* (2011). (iv) Diferenças nos protocolos de extração de DNA, na quantidade de DNA total extraído e nos valores de Ct também podem ter contribuído para as diferenças de infectividade entre os dois trabalhos.

Entretanto, a menor porcentagem de amostras positivas foi observada quando os psilídeos foram conservados a seco na temperatura ambiente de 26°C. Neste tratamento houve redução significativa da quantidade de DNA total a partir de 14 dias, acompanhado de redução também significativa da porcentagem de amostras positivas para *Ca. L. asiaticus* a partir de 21 dias.

4. CONCLUSÕES

Nas condições adotadas neste trabalho, referentes aos procedimentos de extração, número de psilídeos na amostra, concentração do DNA total para a reação de qPCR e armazenamento das amostras, pode-se concluir que:

1. O tempo de exposição dos psilídeos em armadilhas adesivas amarelas, até um período de 15 dias, não influenciou na detecção da bactéria *Ca. L. asiaticus* em amostras de psilídeos, quer seja nos períodos de inverno ou de verão. Assim, a coleta de psilídeos em armadilhas adesivas amarelas para análise da presença de *Ca. L. asiaticus* por qPCR pode ser feita até pelo menos quinze dias após a captura dos insetos nas mesmas.
2. O armazenamento das amostras de psilídeos em etanol 70% nas temperaturas ambiente (26°C), geladeira (4°C) e congelador (-20°C), assim como, o armazenamento a seco nas temperaturas de geladeira (4°C) e congelador (-20°C), foi eficiente para análise da presença de *Ca. L. asiaticus* por qPCR por até 35 dias, entretanto, o armazenamento a seco na temperatura ambiente (26°C) foi eficiente por até 14 dias.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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**, First Look (doi: <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-03-12-0314-RE>).

Bové, J.M. (2006). Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. **Journal of Plant Pathology** 88 (1):07-37.

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, p.152-155.

Capoor, S.P., Rao, D.G. & Viswanath, S.M. 1974. Greening disease of citrus in the Deccan Trap Contry and its relationship with the vector, *Diaphorina citri* Kuwayama. In: Weathers LG & Cohen M (Eds.) **Proceedings of the 6th Conference of the International Organization of Citrus Virologists**, University of California, Division of Agricultural Sciences, p.43-49.

Coletta-Filho, H.D. 2004. First report of the causal agent of Huanglongbing (“*Candidatus Liberibacter asiaticus*”) in Brazil. **Plant Disease** 88:1382.

Costa Lima, A.M. 1942. **Insetos do Brasil, homóptera**. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Agronomia. Série didática, 3, tomo.,101p.

Damsteegt, V.D., Postnikova, E.N., Stone, A.L., Kuhlmann, M., Wilson, C., Sechler, A., Schaad, N.W., Brlansky, R.H. & Schneider, W.L. 2010. *Murraya paniculata* and related species as potential hosts and inoculum reservoirs of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’, causal agent of Huanglongbing. **Plant Disease** 94:528-533.

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. 920p.

Hall, D., Irej, M., Levesque, C.S., Madishetty K. & Polek, M. 2011. Comparative analysis of various short-term storage methods for preserving *Candidatus Liberibacter asiaticus* In Its vector, *Diaphorina citri*. **Proceedings of the 2nd Annual Citrus Health Research Forum**. Visalia. (Abstract).

Huang, C.H., Tsai M.Y & Wang C.L. 1984. Transmission of citrus likubin by a psyllid, *Diaphorina citri*. **Journal of Agricultural Research of China** 33: 15-72.

Hung, T.H., Hung, S.C., Chen, C.N., Hsu, M.H. & Su, H.J. 2004. Detection by PCR of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the bacterium causing citrus huanglongbing in vector psyllids: application to the study of vector–pathogen relationships. **Plant Pathology** 53: 96-102.

IBGE. Banco de Dados Agregados. **Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA**. Disponível em <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em 11 jan. 2013. Ltd.

Irey, M., Gadea, P. & Hall, D. 2011. Detection of *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las) on yellow sticky traps by real-time PCR. **Proceedings of the 2nd International Research Conference on Huanglongbing**. Orlando. (Abstract).

Lin, K.H. 1956. Observation on yellow shoot of citrus. Etiological study of yellow shoot of citrus. **Acta Phytopathologica Sinica** 2:1-42.

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.

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.

Meyer, J.M., Hoy, M. A., Singh, R. 2007. Low Incidence of *Candidatus Liberibacter Asiaticus* in *Diaphorina Citri* (Hemiptera: Psyllidae) Populations Between Nov 2005 and Jan 2006: Relevance to Management of Citrus Greening Disease in Florida. **Florida Entomologist** 90 (2): 347-397.

Murray, M.G., Thompson, W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Res** 239:487-91.

Nascimento, F.A. 2010. Estudos sobre aquisição e concentração de "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" e "*Candidatus Liberibacter americanus*" em *Diaphorina citri* Kuwayama. **Dissertação de Mestrado**. Piracicaba SP. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

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, v.1. 137 p.

Pelz-Stelinski, K.S., Brlansky, 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(5): 1531-1541.

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

Santos, F.L. 2011. Relação entre psílídeos *Diaphorina citri* Kuwayama infectivos e a incidência de Huanglongbing em Pirassununga e Leme – SP. **Dissertação de Mestrado**. Araraquara SP. Fundecitrus.

SENASICA. 2010. **Protocolo de Diagnóstico de Candidatus Liberibacter spp mediante la Técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en Tiempo Real**. Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Dirección General de Sanidad Vegetal.

Sétamou, M., Da Graça J. V., Kunta, M. 2012. First Detection of Huanglongbing and Implementation of its Mitigation Efforts in Texas. **Proceedings 3rd International Research Conference on huanglongbing**. Feb. 4-8. 2013. Orlando, Florida, USA.

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., Eveillard, S., Danet, J.L., Da Costa, P.I., Ayres, A.J. & Bové, J.M. 2005c. PCR detection of the two liberibacter species associated with citrus huanglongbing (HLB) in São Paulo State, Brazil, **Proc. 16th Conference of the International Organization of Citrus Virologists**, Riverside, CA, p.432-438.

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. 2008 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., Wulf, 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, **Cordeirópolis** **31(2):115-128**.

Xu C.F., Xia Y.H., Li K.B. & Ke C. 1988. Further study of the transmission of citrus huanglongbing by a psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama. In: Timmer LW, Garnsey SM & Navarro L (Eds). **Proceedings of the 10th Conference of the International Organization of Citrus Virologists**. University of California, Riverside. p.243-248.

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*. In: **Proceedings of the Huanglongbing – greening International Workshop**, 1. Ribeirão Preto: Fundecitrus, p.96.

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