

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

RODRIGO SOUSA SASSI

**Incidência e distribuição de *Diaphorina citri* portadores de
Candidatus Liberibacter asiaticus em regiões citrícolas com alerta
fitossanitário no estado de São Paulo**

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

Orientador: Dr. Nelson Arno Wulff

Coorientador: Dr. Renato Beozzo Bassanezi

**Araraquara
Janeiro de 2016**

RODRIGO SOUSA SASSI

**Incidência e distribuição de *Diaphorina citri* portadores de
Candidatus Liberibacter asiaticus em regiões citrícolas com alerta
fitossanitário no estado de São Paulo**

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

Orientador: Dr. Nelson Arno Wulff

Coorientador: Dr. Renato Beozzo Bassanezi

**Araraquara
Janeiro de 2016**

RODRIGO SOUSA SASSI

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

Araraquara, 28 de janeiro de 2016

BANCA EXAMINADORA

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

Prof.^a Dr.^a Viviani Vieira Marques
Fundo de Defesa da Citricultura – Fundecitrus, Araraquara/SP.

Prof. Dr. José Belasque Junior
Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ /USP, Piracicaba/SP.

Incidência e distribuição de *Diaphorina citri* portadores de *Candidatus Liberibacter asiaticus* em regiões citrícolas com alerta fitossanitário no estado de São Paulo

Autor: Rodrigo Sousa Sassi

Orientador: Dr. Nelson Arno Wulff

Coorientador: Dr. Renato Beozzo Bassanezi

Resumo

Dentre os problemas fitossanitários ocorrentes no cultivo de citros está o Huanglongbing (HLB), doença que no Brasil está associada majoritariamente a *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las). Sua transmissão e disseminação é feita pelo psilídeo *Diaphorina citri*. Para o monitoramento do psilídeo nos pomares são utilizados cartões adesivos amarelos instalados nas plantas, localizadas na borda dos pomares. Este trabalho teve como objetivo avaliar a porcentagem de insetos portadores de Las (Las+), correlacionando com a população de insetos capturados em cartões e com o manejo adotado para controle do HLB nas propriedades onde os cartões foram instalados. O estudo foi feito ao longo de um ano, em quatro regiões citrícolas do estado de São Paulo, divididas conforme modelo do Sistema de Alerta Fitossanitário do Fundecitrus. Cartões foram instalados, avaliados e substituídos quinzenalmente durante o período de fevereiro de 2014 até fevereiro 2015 em propriedades nas regiões de Avaré, Araraquara, Bebedouro e Santa Cruz do Rio Pardo. Em cada leitura foi realizada a coleta de até 50 psilídeos por região, e a detecção dos insetos Las+, realizadas por meio de qPCR. As propriedades foram classificadas de acordo com o manejo adotado para o controle do HLB: Manejo A (MA) realiza inspeção da doença, erradica plantas sintomáticas e aplica inseticidas para o controle do psilídeo; Manejo B (MB) realiza somente pulverização de inseticidas; e Sem Manejo (SM) não adota as medidas acima. As médias bimestrais de psilídeos Las+ divididos por região e pelo manejo adotado nas propriedades foram comparadas. A região de Santa Cruz do Rio Pardo com 71% das amostras Las+ diferiu da região de Bebedouro que apresentou 56%. As regiões de Avaré e Araraquara não apresentaram diferença estatística das demais regiões. Também foram avaliados o número de insetos capturados por cartão, a porcentagem de psilídeos Las+ em cada região ao longo do tempo e estimado a população de insetos que seriam Las+ por região. A quantidade de psilídeos aumentou gradativamente entre julho e agosto nas regiões de Avaré e de Santa C. do Rio Pardo, a partir de setembro e outubro na região de Araraquara e de forma intermitente a partir de outubro na região de Bebedouro. O período do ano com maiores populações de insetos potencialmente infectivos foi no início da primavera em Avaré e Santa C. do Rio Pardo; a partir de outubro, com pico em dezembro em Araraquara; e na região de Bebedouro em janeiro e fevereiro. A porcentagem média de psilídeos Las+ coletados em propriedades SM foram maiores e diferiram estatisticamente das médias obtidas nas propriedades que adotavam MB. A relação entre porcentagem de psilídeos Las+ e quantidade de insetos capturados na região, em um dado período, sinaliza a época do ano mais crítica que pode ocorrer a entrada de psilídeos Las+ nos pomares. A região de Araraquara possuiu a maior população de insetos Las+ no verão e Bebedouro a menor, o ano inteiro.

Palavras-chave: *Citrus sinensis*, Psilídeo asiático dos citros, Huanglongbing, qPCR.

Incidence and distribution of *Diaphorina citri* carriers of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in citrus regions with phytosanitary alert in São Paulo

Author: Rodrigo Sousa Sassi

Advisor: Dr. Nelson Arno Wulff

Co-Advisor: Dr. Renato Beozzo Bassanezi

Abstract

In citrus crop, the Huanglongbing (HLB), a disease that in Brazil is mainly associated to *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las), is one of the main phytosanitary problems. Transmission and dissemination is by the psyllid *Diaphorina citri*. Yellow sticky cards installed in citrus plants located in the periphery of the orchards are used to monitor psyllids. This work aims to evaluate the percentage of psyllid population with Las (Las+) and its correlation with insect population captured in sticky cards and the management used to control HLB in the properties where the cards were installed, over a year. Assessment was carried out in four citrus regions in São Paulo state according to the Fundecitrus Phytosanitary Alert System. Cards were installed, measured and replaced every two weeks on the period of February 2014 to February 2015 in the regions of Avaré, Santa Cruz do Rio Pardo, Araraquara and Bebedouro. In each reading, up to 50 psyllids per regions were collected and detection of insects Las+ was made by qPCR. Properties were classified according to the management adopted for the control of HLB, as follows: Management A (MA) conduct inspection of disease, eradicate symptomatic plants and spray insecticides to control psyllid; Management B (MB) perform only spray insecticides; and No Management (NM) did not used the above mentioned practices. Bi-monthly averages of the percentage of psyllids Las+ divided by region and by adopted management were compared. Santa Cruz do Rio Pardo region had 71% of Las+ samples and differed from Bebedouro region that had 56%. Avaré and Araraquara regions showed no statistical difference from the other regions. Furthermore, we also evaluated the number of psyllids captured by card per region, the percentage of psyllids with Las+ over time in each region and estimated the insect population that would be Las+ by region. The amount of psyllids increased gradually between July and August in Avaré and Santa Cruz regions, from September to October in Araraquara region and intermittently from October in Bebedouro region. Early spring in Avaré and Santa Cruz had the largest potentially infective psyllid populations; Araraquara occurs from October, peaked in December; Bebedouro region reaches the highest values in January and February. Averages of the percentage of Las+ psyllids collected in SM properties were higher and statistically different from the averages on the properties that adopted MB. The relationship between the percentage of psyllids Las+ and the amount of captured psyllids in the region in a given time denotes the most critical time of year that can occur psyllids Las+ intake in the orchards. The region of Araraquara has the largest insect Las+ population in summer, while Bebedouro has the smallest, during the whole year.

Keywords: *Citrus sinensis*, Asiatic psyllid citrus, Huanglongbing, qPCR.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Mapa do cinturão citrícola no estado de São Paulo com as cinco regiões do Alerta Fitossanitário..... 10
- Figura 2.** Página inicial na Web do Sistema Alerto Fitossanitário do Fundecitrus. Disponível em: <<http://alerta.fundecitrus.com.br>>..... 11
- Figura 3.** Mapa do cinturão citrícola no estado de São Paulo, com destaque para os municípios que fazem parte das quatro regiões que compõem o Alerta Fitossanitário. Localização dos cartões georreferenciados (pontos em branco), monitorados quinzenalmente, e utilizados para coletas das amostras de *Diaphorina citri* no período de fevereiro de 2014 a fevereiro do 2015..... 12
- Figura 4.** Cartão adesivo amarelo instalado no terço superior da planta, com a face exposta à parte externa do pomar. O cartão adesivo está destacado em círculo tracejado em vermelho..... 15
- Figura 5.** Porcentagem de psilídeos com *Ca. L. asiaticus*; número de psilídeos capturados por cartão e número de psilídeos com *Ca. L. asiaticus* estimados por cartão durante a 1^a quinzena de fevereiro/14 até a 2^a quinzena de fevereiro/15 nas quatro regiões avaliadas..... 23
- Figura 6.** Quantidade de psilídeos capturados com *Ca. L. asiaticus* por cartão adesivo nas quatro regiões avaliadas..... 24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Descrição dos municípios que compõem cada região, número médio de cartões monitorados pelo Fundecitrus e avaliados por quinzena, e área monitorada pelo Alerta Fitossanitário de fevereiro de 2014 a fevereiro de 2015.....	13
Tabela 2.	Quantidade e porcentagem de amostras positivas para <i>Ca. L. asiaticus</i> (Las+) divididas por manejo e por região.....	25
Tabela 3.	Porcentagem média bimestral de psilídeos com <i>Ca. L. asiaticus</i> (Las+) em propriedades com Manejo B e Sem manejo nas quatro regiões monitoradas.....	26
Tabela 4.	Porcentagem média de amostras positivas para <i>Ca. L. asiaticus</i> (Las+) divididas por manejo	27

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Huanglongbing	3
2.2. Etiologia do HLB	3
2.3. <i>Diaphorina citri</i>	4
2.4. Detecção de Liberibacter	5
2.5. Alerta fitossanitário	6
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1. Monitoramento de <i>Diaphorina citri</i> e coleta de amostras.....	12
3.2. Extração de DNA	15
3.3. PCR em tempo real (qPCR)	16
3.4. Análise dos dados.....	16
3.4.1. Porcentagem de psílídeos com <i>Ca. L. asiaticus</i> e número de insetos capturados por cartão ao longo do tempo.....	17
3.4.2. Comparação da porcentagem de psílídeos com <i>Ca. L. asiaticus</i> em função do manejo do HLB adotado nas propriedades em cada região.....	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
4.1. Porcentagem de psílídeos com <i>Ca. L. asiaticus</i> e número de insetos capturados por cartão ao longo do tempo.....	19
4.2. Porcentagem de psílídeos com <i>Ca. L. asiaticus</i> em função da região e do manejo de HLB adotado nas propriedades.....	24
5. CONCLUSÕES	29
REFERÊNCIAS	30

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor do mundo de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) e grande parte dos pomares estão localizados no estado de São Paulo, sudoeste de Minas Gerais e sul do Triângulo Mineiro, com um parque citrícola estimado em 174,13 milhões de árvores produtivas e estimativa de produzir 286,14 milhões de caixas de 40,8 kg na safra de 2015/16 (Fundecitrus, 2015a). Grande parte da safra é destinada à produção de suco de laranja. O Brasil detém 50% da produção mundial de suco, exporta 98% do que produz e consegue 85% de participação no mercado mundial (Neves et al., 2010).

Diversos problemas fitossanitários ocorrem no cultivo de citros, e dentre estes o Huanglongbing (HLB), identificado no Brasil pela primeira vez no ano de 2004 no estado de São Paulo (Coletta-Filho et al., 2004; Teixeira et al., 2005a) é um dos mais danosos. É uma doença, que no Brasil está associada a *Candidatus* (*Ca.*) *Liberibacter* (L.) *asiaticus* (Las) e *Ca.* *L. americanus* (Lam). Sua transmissão e disseminação é feita pelo psíldeo *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) (Capoor et al., 1967; Yamamoto et al., 2006). Além de *Liberibacter*, um fitoplasma do grupo IX (Teixeira et al., 2008) foi associado a plantas com sintomas semelhantes ao de HLB no Brasil.

A ocorrência do HLB levou a novas ações de manejo nos pomares brasileiros para minimizar o impacto da doença, como o plantio de mudas saudáveis, a erradicação de plantas com sintomas e o controle do inseto vetor. A Instrução Normativa nº53 de 16 de outubro de 2008 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, determina que os citricultores são obrigados a inspecionar seus próprios pomares para identificar plantas com HLB, tendo no mínimo uma inspeção a cada trimestre. A IN 53 também determina que o produtor é responsável por eliminar as plantas sintomáticas ou os talhões inteiros com mais de 28% de plantas sintomáticas em uma única inspeção, além de enviar relatórios semestrais sobre suas atividades à Coordenadoria de Defesa Agropecuária do Estado de São Paulo (Coordenadoria de Defesa Agropecuária, 2015).

O retrato da disseminação da doença no estado de São Paulo mostra que a eliminação periódica de plantas sintomáticas, juntamente com o controle do inseto vetor da forma como vem sendo conduzidos, não tem sido suficiente para conter o avanço da doença no parque citrícola. Psíldeos portadores de Las (Las+) dispersam para propriedades produtivas, vindos de pomares que não realizam o manejo correto da doença, seja por falta de orientação, problemas financeiros ou até mesmo por descaso com a doença. A eliminação de plantas garante que infecções secundárias, provenientes de plantas infectadas dentro do pomar sejam pouco

frequentes, mas não elimina a doença da área manejada. Boina et al. (2009) relatou o movimento de *D. citri* de pomares sem controle para pomares com controle da doença e o inverso. Esse movimento sugere que o inseto pode utilizar as áreas sem manejo como refúgio e depois re-infestar a área com manejo, o que resulta em novas infecções primárias na área mesmo com o controle de inseticidas.

O método mais utilizado para o monitoramento de psilídeos nos pomares é a instalação de cartões adesivos amarelos, com leituras feitas quinzenalmente. A instalação é feita em plantas de citros, localizadas nas divisas das áreas, permitindo identificar pontos de entrada nos pomares. Em função disso, há a tendência de adotar ações de manejo do HLB fora da propriedade, como a erradicação de plantas, pulverização com inseticidas e a liberação do parasita *Tamarixia radiata* em áreas vizinhas, que servem de criatórios para o psilídeo. Para Bassanezi (2013a) o controle significativo do HLB, será alcançado quando um manejo regional da doença for realizado, incluindo a eliminação também de fontes externas de inóculo e o controle dos psilídeos nestas fontes.

Uma informação que pode ser obtida em relação às populações de psilídeo capturadas em cartões adesivos é, por meio da técnica de PCR em tempo real (qPCR), determinar a frequência de insetos portadores de liberibacter e a relação deste dado com a distribuição e crescimento da doença. De acordo com Bassanezi et al. (2013b), a efetividade das medidas de redução da fonte de inóculo na propriedade e na região, pode também ser determinada pela quantificação da frequência de psilídeos Las+, pois quanto maior a eficiência da redução de fontes de inóculo e a redução da aquisição do patógeno pelos psilídeos, menor será a infectividade natural da população local do inseto. O conhecimento da frequência de psilídeos Las+ pode ajudar a alterar o nível de controle do inseto em determinada região ou época do ano, pois caso apresente baixa incidência, pode até reduzir gastos com pulverizações.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a porcentagem de psilídeos Las+, correlacionando com a população total de insetos capturados em cartões adesivos e com o manejo adotado para controle do HLB nas propriedades onde estão instalados os cartões, ao longo de um ano, em quatro regiões citrícolas do estado de São Paulo, divididas conforme modelo do Sistema de Alerta Fitossanitário do Fundecitrus.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Huanglongbing

O Huanglongbing (HLB) é uma doença que afeta severamente as plantas de citros e que tem obrigado os citricultores a erradicar milhares de plantas todos os anos. O HLB foi relatado por Reinking em 1919 e significa “doença do ramo amarelo” (Reinking, 1919; Lin, 1956).

Até 2004, a ocorrência do HLB era descrita em três grandes áreas do mundo: subcontinente Indiano, Sudeste da Ásia e China; Sul e parte Leste da África; e Península Arábica (Villechanoux et al., 1992). Nos países asiáticos o HLB está associado à presença da bactéria Las, enquanto que na África, à presença de *Ca. L. africanus* (Laf). Em 2004 o HLB foi relatado no Brasil, sendo encontrado em 35 municípios na região central do estado de São Paulo, onde Las foi detectado em menos de 2% das amostras sintomáticas. Nos restantes 98% das amostras sintomáticas foi identificada a presença de Lam (Teixeira et al., 2005a). O HLB se disseminou rapidamente pelas regiões citrícolas do estado paulista e mineiro, atingindo 0,58% das plantas em 2008 e saltando para 6,91% em 2012 (Fundecitrus, 2015b). Atualmente, o HLB está disseminado por todas as regiões citrícolas do estado de São Paulo. Está presente também nos estados de Minas Gerais e Paraná. Na estimativa feita pelo Fundecitrus em 2015, o HLB estava presente em 17,89% das plantas de São Paulo e do Triângulo Mineiro (Fundecitrus, 2015c).

Em condições naturais, *D. citri* transmite as espécies Las e Lam (Capoor et al., 1967; Yamamoto et al., 2006), enquanto *T. erythrae* transmite Laf (McClellan & Oberholzer, 1965). Recentemente foi relatada a presença de *T. erythrae* em Portugal e na Espanha, na região da Galícia e do Rio Minho, na face atlântica da Europa (Pérez-Otero et al., 2015), embora não tenha sido observado a presença de liberibacter.

De acordo com Bassanezi et al. (2009; 2011), plantas com HLB apresentam redução de produtividade, diminuição do tamanho, queda e menor qualidade de frutos e também afetam a qualidade do suco. Queda na produção e qualidade pode ocorrer mesmo em plantas com baixa severidade da doença.

2.2. Etiologia do HLB

Das três espécies de Liberibacter associadas ao HLB dos citros no mundo, Las e Lam ocorrem no Brasil (Coletta-Filho et al., 2004; Teixeira et al., 2005a; Teixeira et al., 2005b; Teixeira et al., 2009). As liberibactérias são bactérias restritas aos vasos do floema das plantas hospedeiras (Lafèche & Bové, 1970). Liberibactérias que ocorrem nos citros podem ser

transmitidas por meio de material vegetal infectado via enxertia, através de cuscuta (*Cuscuta spp.*) e naturalmente, planta a planta, por meio de psilídeos (Bové, 2006), principal modo pelo qual o HLB é disseminado nos pomares.

Embora de menor ocorrência, foi relatada a associação de sintomas de HLB a um fitoplasma do grupo 16Sr IX no Brasil em 2007 (Teixeira et al., 2008) e posteriormente de um fitoplasma do grupo I na China (Chen et al. 2009). No México, ambos os fitoplasmas foram relatados (Arratia-Castro et al., 2014; Wulff et al., 2015).

A distribuição da bactéria por partes e órgãos das plantas doentes é bastante irregular, mas Las e Lam concentram-se em maiores proporções em tecidos sintomáticos (Sousa, 2009). No entanto, a detecção da bactéria em partes assintomáticas dessas plantas demonstra o caráter sistêmico da infecção (Lopes et al., 2009; Li et al., 2009; Sousa, 2009).

2.3. *Diaphorina citri*

O psilídeo *D. citri* foi relatado pela primeira vez no Brasil em 1942 (Costa-Lima, 1942). É um inseto diminuto medindo até 3 mm de comprimento na fase adulta (Gallo et al., 2002). Uma característica marcante do psilídeo é ficar com o corpo na posição de 45° em relação a superfície em que se encontra (Bonani, 2009). Até 2004 era considerado praga secundária para a cultura dos citros, porém, com a descoberta do HLB nos pomares, o psilídeo tornou-se praga chave, pois é o responsável pela disseminação da bactéria associada ao HLB.

O *D. citri* é o único inseto identificado como vetor de Las e Lam no Brasil. Seu controle é fundamental para reduzir a infecção das plantas. Para Belasque Junior. et al. (2010), o controle químico deve ser associado ao monitoramento do vetor, sendo que o nível de ação é a presença do inseto. Porém, como sua detecção é difícil, muitas vezes se aplicam inseticidas constantemente seguindo um calendário de aplicações mensais, quinzenais e até mesmo semanais. De acordo com Diniz (2013), a aplicação de inseticidas é realizada de maneira excessiva, levando ao aumento nos custos de produção, podendo também levar à seleção de indivíduos resistentes e à contaminação do meio ambiente. Ainda assim, estudos indicam que mesmo com pulverizações frequentes de inseticidas, não se tem obtido êxito no controle da epidemia de HLB, principalmente quando a área sob controle é relativamente pequena, existem plantas doentes e psilídeos infectivos na região próxima ao pomar tratado (Gatineau et al., 2010; Bassanezi et al., 2013b).

As técnicas utilizadas para a detecção do inseto são: a inspeção visual de ramos nas suas três formas de desenvolvimento (ovo, ninfa e adulto) e a instalação de cartões adesivos amarelos que atraem o inseto por sua cor. Segundo Santos et al. (2012), o método de monitoramento com

cartões adesivos é o mais preciso, por propiciar a captura de maior quantidade de insetos quando comparado com a inspeção visual. A maior parte dos psílídeos capturados pelo cartão adesivo ocorre durante o dia, onde ela é 3,4 vezes maior quando comparada ao período noturno (Sétamou et al., 2011). Segundo Miranda et al. (2011) o monitoramento por cartões indica a dispersão de *D. citri* dentro da propriedade, entre pomares.

Para maximizar a captura de psílídeos nos pomares é imprescindível a correta instalação destes cartões no perímetro da propriedade, na periferia do pomar e posicionados no terço superior da planta (Miranda et al., 2011). Não existe um número determinado de cartões a serem instalados por área, porém, quanto maior o número de cartões, maior será a probabilidade de captura do inseto.

Outro fator importante é a frequência da leitura dos cartões, assim como o treinamento e condições de leitura dos cartões. Com o aumento do tempo de exposição dos psílídeos nos cartões adesivos, observa-se uma “aparente degradação” dos mesmos, seus “corpos” tornam-se menos firmes e mais escuros, o que pode dificultar sua identificação pelos inspetores, confirmando a necessidade de substituição constante dos mesmos. Segundo Sala (2013), a detecção de Las em psílídeos mantidos por até 15 dias nos cartões não foi prejudicada. A reciclagem no treinamento de inspetores e a realização de leitura dos cartões no escritório, em vez de no campo, aumenta a acurácia na detecção em relação à leitura feita a campo (Leonardo, 2014).

Para confirmação da presença de DNA de *D. citri* em amostras de psílídeos utilizadas para detecção de Las é utilizada uma sonda (DCP), e dois primers que foram desenvolvidos utilizando como base a sequência de um gene (wg), obtida a partir de 26 espécies de psílídeos. Esta sonda amplifica e detecta especificamente 74 pb do gene “wingless” (wg) do *D. citri*. Os primers também foram criados de modo que a temperatura para seu anelamento fosse próxima ao do conjunto de primers utilizado para a detecção de Las, assim os dois primers podem ser utilizados em conjunto (Manjunath et al., 2008).

2.4. Detecção de Liberibacter

Informações acumuladas ao longo dos anos sugerem a existência de associação causal entre liberibactérias e HLB, apesar de outros organismos, como é o caso dos fitoplasmas, também estarem associados a sintomas idênticos aos do HLB em plantas cítricas. O estudo com fitoplasma esbarra nas mesmas dificuldades enfrentadas com liberibactérias: são organismos fastidiosos, transmitidos por insetos vetores sugadores de seiva que colonizam o floema e não estão disponíveis em cultura axênica (Teixeira et al. 2010).

Métodos robustos, rápidos e sensíveis de detecção de patógenos são importantes para determinar a presença de patógenos em amostras vegetais e de insetos vetores. Ademais, podem ser utilizados com caráter confirmatório da presença de patógenos em amostras sintomáticas e na certificação de plantas matrizes.

A PCR tem como característica a sua especificidade e sensibilidade, porém, muitas vezes a PCR convencional não é suficientemente sensível para diagnosticar a presença de liberibactérias nos hospedeiros (plantas e psílídeo), principalmente no início da infecção (Coletta-Filho et al., 2010). A técnica de PCR mais sensível utilizada atualmente na diagnose do HLB é a PCR em tempo real (qPCR). A qPCR é descrita como ferramenta de quantificação de DNA por Heid et al. (1996). No caso do HLB, Li et al. (2006) desenvolveram um protocolo de qPCR com sonda fluorogênica (TaqMan®) e primers para a detecção das três espécies de *Ca. Liberibacter* (Laf, Las e Lam).

A grande vantagem da qPCR quando comparada ao PCR convencional é a sua maior sensibilidade. Possibilita assim, a detecção do patógeno em indivíduos de *D. citri* (Santos, 2011) com maior segurança e possibilita a quantificação do patógeno (Teixeira et al., 2008; Li et al., 2006). A quantidade de DNA amplificado é diretamente proporcional à quantidade de DNA alvo inicial da amostra, permitindo a quantificação do produto na fase exponencial (Tichopad et al., 2003). Cada amostra gera um número de Ct (“cycle threshold”), que é o número de ciclos em que a amostra gera fluorescência superior ao limiar de detecção da reação (threshold). O valor de Ct é inversamente proporcional a quantificação do DNA, ou seja, quanto menor o valor de Ct, maior é a quantidade de DNA alvo da amostra (Tichopad et al., 2003).

Segundo Sala (2013), a exposição de psílídeos capturados em cartões adesivos pode ser de até 15 dias, não afetando a detecção de Las na qPCR. O armazenamento das amostras de psílídeos em etanol 70% nas temperaturas ambiente, de geladeira e congelador foram igualmente eficientes para a análise da presença de Las por qPCR por pelo menos 35 dias (Sala, 2013).

2.5. Alerta Fitossanitário

No cenário atual a única alternativa para o produtor manejar o HLB é adotar medidas preventivas por meio da adoção simultânea do plantio de mudas saudáveis, da eliminação de plantas doentes e da redução da população de psílídeos, já que não existem materiais comerciais resistentes ou tolerantes ao HLB e medidas curativas economicamente viáveis, (Bassanezi, 2013b). Entretanto, mesmo adotando com rigor todas estas medidas na propriedade, a doença não é eliminada do pomar, pois constantemente ocorrem movimentações do psílídeo entre áreas

sem e com manejo da doença (Boina et al. 2009). Uma alternativa para maximizar o controle do *D. citri*, e consequentemente do HLB, é a adoção do manejo regional da doença. Este manejo consiste em adotar medidas de controle conjunto entre vários citricultores e em grandes áreas. Ao realizar este manejo, a quantidade de *D. citri* e sua dispersão é reduzida. O manejo regional do HLB é uma alternativa para, no longo prazo, reduzir as perdas de plantas com a doença em uma área maior que a da propriedade. Bassanezi et al. (2013a) relatou diferenças de 90% na incidência de HLB e 75% da taxa de progresso da doença em áreas onde foi aplicado manejo regional quando comparadas com áreas isentas desse manejo, alicerçando o seu uso como base no controle de HLB.

O manejo do HLB de forma regional aumenta a eficiência das pulverizações de inseticidas, porque o controle regional e coordenado do psilídeo em uma área extensa reduz os refúgios para a proliferação do vetor e somente populações provenientes de pomares mais distantes ou de áreas sem manejo, poderão voltar a re-infestar as áreas que estão envolvidas com o manejo.

Foi a partir destes conceitos que surgiu o Alerta Fitossanitário, uma ferramenta desenvolvida pelo Fundecitrus para o auxílio dos citricultores no manejo regional do HLB. O sistema organiza as informações sobre a população de *D. citri* e da presença de brotações nas propriedades das regiões monitoradas. Este serviço permite que os produtores identifiquem os locais e momentos críticos de ocorrência do psilídeo e tomem decisões mais precisas para o controle conjunto e regional do inseto (Fundecitrus, 2015d).

Este trabalho foi iniciado em 2009 com um pequeno grupo de produtores da região de Santa Cruz do Rio Pardo. A ideia surgiu após a viagem de alguns citricultores para a Flórida, onde eles puderam conhecer o Programa CHMAS (“Citrus Health Management Areas”), que traduzindo seria Manejo Sanitário de Áreas Citrícolas. Este programa envolve parcerias com a Universidade da Flórida e com o USDA (“United States Department of Agriculture”) e consiste em agrupar pomares próximos em determinadas regiões onde todos trabalham de forma cooperada para organizar o controle eficiente dos psilídeos (disponível em: <http://www.crec.ifas.ufl.edu/extension/chmas/chma_overview.shtml>).

No Brasil, os participantes fazem o monitoramento do *D. citri* utilizando cartões adesivos e coordenam aplicações conjuntas de inseticidas visando reduzir a movimentação de insetos entre os pomares. Participaram da primeira reunião cinco representantes de produtores e funcionários do Fundecitrus e decidiram realizar a primeira aplicação conjunta de inseticidas no ano de 2009. A partir deste momento, as decisões passaram a ser sempre em conjunto, focadas na redução de insetos nos pomares.

Em 2010, apareceram outros produtores interessados no grupo e novas adesões de citricultores aconteceram. Com essas adesões e com o auxílio do Fundecitrus foram criadas duas regiões que compuseram o primeiro sistema organizado de manejo regionalizado: Região de Santa Cruz do Rio Pardo e Região de Avaré, que englobavam propriedades do próprio município e de cidades vizinhas. Somando as duas regiões, o grupo já possuía 21 produtores participantes. As reuniões aconteciam a cada quatro meses, sempre divulgadas com antecedência e com apoio do Fundecitrus, visando a adesão de novos participantes. Naquele ano foram realizadas duas pulverizações em conjunto nos meses de junho e novembro, envolvendo produtores das duas regiões. Ao todo, o grupo de Santa Cruz do Rio Pardo engloba propriedades produtoras de citros com um raio de aproximadamente 110 km e, somada a Regional de Avaré, o raio de atuação passou a ter 180 km.

No ano de 2011, foi criado o monitoramento de psilídeos nas propriedades que participavam do manejo regional. Este monitoramento, que se mantém até hoje, consiste na instalação de cartões adesivos amarelos georreferenciados na periferia das fazendas. Inicialmente foram instalados aproximadamente 2.000 cartões em 34 propriedades nas duas regiões, onde cada produtor realizava a leitura destes cartões e as informações sobre a captura de psilídeos eram centralizadas. A partir de novembro de 2011, o levantamento quinzenal foi organizado e disponibilizado pelo Fundecitrus. Caso a população de psilídeos aumentasse em determinadas épocas do ano, uma nova reunião com os produtores era convocada e, juntamente com o grupo, eram definidas datas para realizar pulverizações conjuntas nos pomares dos participantes.

A partir deste monitoramento, o trabalho regional passou a ser denominado “Alerta Fitossanitário”, pois o monitoramento de insetos servia como um “alerta” de que a população de psilídeos estava aumentando nos pomares. Com isso, era necessário realizar pulverizações visando diminuir a população dos insetos e, conseqüentemente, minimizar a disseminação do HLB. No ano de 2011 foram realizadas três pulverizações nas duas regiões, nos meses de maio, agosto e dezembro. Em 2012 continuaram as reuniões entre produtores e o Fundecitrus, aumentando o número de participantes. Nas reuniões marcadas, sempre eram discutidas datas para realização de pulverizações, além de organizadas palestras com pesquisadores que traziam informações técnicas sobre manejo de pragas e doenças da citricultura. Neste ano foram realizadas três pulverizações regionais, nos meses de abril, julho e setembro, utilizando como referência as capturas de psilídeos nos cartões monitorados.

No ano de 2013, surgiu uma demanda de produtores da região de Araraquara, que junto ao Fundecitrus, decidiram criar um grupo de trabalho regional envolvendo os municípios da

região central do estado. A primeira reunião ocorreu em junho de 2013 com a presença de 12 produtores e ficando definida a data para realização da primeira aplicação regional do grupo. No mês de setembro do mesmo ano, os produtores começaram a instalar cartões nas propriedades participantes e definir com maior segurança as datas para pulverizações. Neste mês, foi realizada uma segunda reunião para expor o programa para médios e pequenos produtores da região e divulgar propostas para as próximas pulverizações. Neste ano, as regiões de Avaré e Santa Cruz do Rio Pardo definiram quatro aplicações de inseticidas em ambas as regiões (maio, julho, setembro e dezembro), cada uma realizada em um período de 10 dias, utilizando diversas modalidades de aplicação, seja terrestre ou aérea. Para a regional de Araraquara também foram realizadas quatro pulverizações conjuntas nos meses de junho, agosto, setembro e novembro.

No ano de 2014, mais duas regiões do estado de São Paulo se uniram ao Alerta Fitossanitário, a região do município de Bebedouro, ao Norte do estado e a região do município de Casa Branca, no leste de São Paulo. Nestas regiões, o Fundecitrus conseguiu reunir produtores interessados no manejo regional e foram instalados cartões nas propriedades e definidas datas de aplicações conjuntas. A região de Bebedouro realizou cinco pulverizações regionais e a do município de Casa Branca três aplicações. Neste ano, o Fundecitrus passou a instalar cartões para monitorar a presença de psilídeos também em propriedades que não faziam parte do Alerta Fitossanitário. São propriedades rurais que possuem plantas de citros e que, em sua maioria, por não erradicarem plantas com HLB, são locais onde pode ocorrer a reprodução do psilídeo. Diversas propriedades nas regiões de Santa Cruz do Rio Pardo, Avaré, Araraquara e Bebedouro e alimentam o banco de dados de monitoramento regional que compõem o Alerta Fitossanitário.

Para o Sistema de Alerta Fitossanitário definir o momento correto de emitir o “Alerta” para os produtores realizarem pulverizações em conjunto compara as populações de psilídeos capturadas com as capturas dos anos anteriores e também com o período em andamento, levando em consideração os índices de psilídeos e brotações. Caso ocorra uma tendência de aumento da população juntamente com presença de brotações, é previsto que a população tende a aumentar, assim opta-se por divulgar a necessidade de realizar uma pulverização regional, onde os produtores são avisados previamente por e-mail, mensagem de texto e anúncios no site do Fundecitrus.

Até 2015, o Alerta Fitossanitário estava presente em cinco regiões do estado (Figura 1), englobando 85 municípios e monitorando cerca de 19.000 cartões adesivos em propriedades comerciais participantes além das propriedades monitoradas com cartões pelo Fundecitrus.

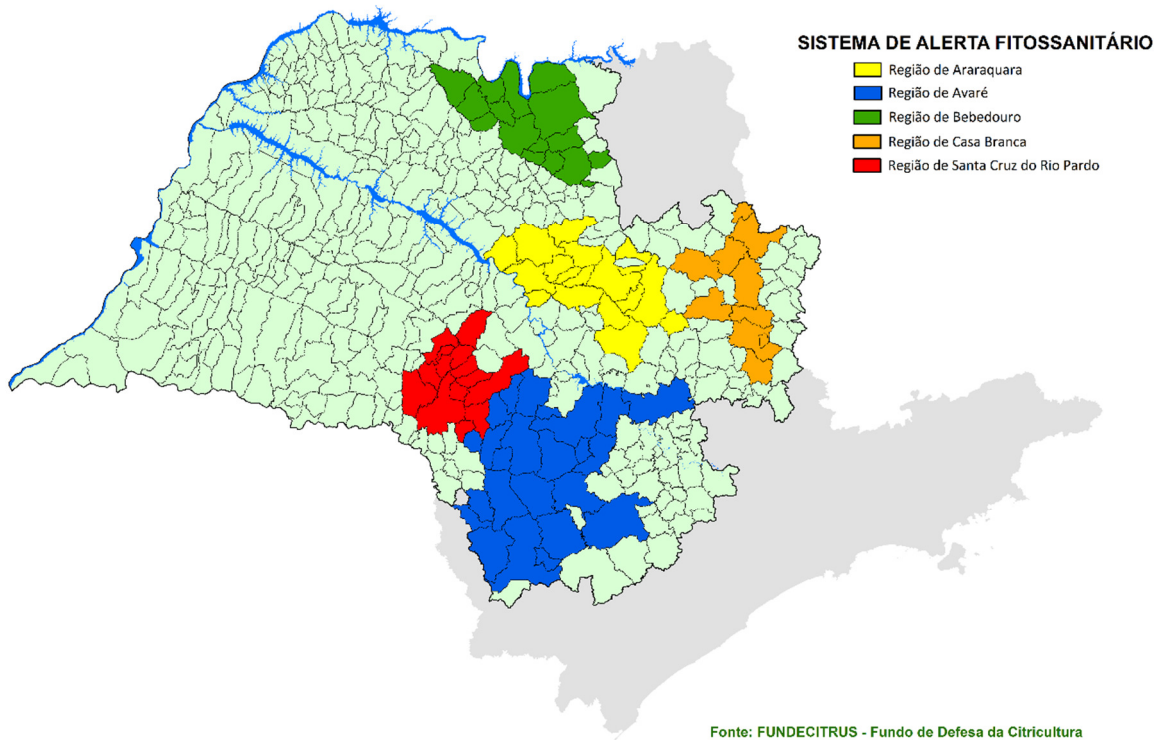


Figura 1. Mapa do cinturão citrícola no estado de São Paulo com as cinco regiões do Alerta Fitossanitário em 2015.

Entre as possíveis vantagens do sistema podemos destacar i) o conhecimento dos momentos críticos de aumento populacional e de dispersão do psilídeo nas propriedades e regiões monitoradas e sua relação com brotações; ii) pode gerar economia na realização das pulverizações, pois são feitas no momento mais adequado, apenas quando há a tendência de aumento do psilídeo na região; iii) maior durabilidade do efeito das aplicações de inseticidas, pois com o controle realizado em várias propriedades vizinhas ao mesmo tempo, é possível reduzir a dispersão do inseto entre pomares não pulverizados para outros recém-pulverizados, aumentando o período entre as re-infestações; iv) disponibilidade das informações regionais para todos os citricultores e v) disponibilidade de informações exclusivas para os produtores cadastrados que contribuem regularmente com os dados de suas propriedades. Conseqüentemente, esta ferramenta permite ao produtor conhecer o momento e locais de entrada do psilídeo em sua propriedade e com isso gerenciar melhor o controle deste inseto (Fundecitrus, 2015d).

Em outras culturas também são adotadas ações de manejo que envolvem grandes áreas visando reduzir problemas fitossanitários. Um exemplo é o vazio sanitário adotado para o

controle da ferrugem asiática da soja. Na safra 2015/16 esse manejo foi adotado em 11 estados mais o distrito federal, onde por um período de 60 a 90 dias o produtor não pode ter plantas de soja, estando sujeito a multa em caso de descumprir esta regra, (disponível em: <<http://www.projetosojabrasil.com.br/vazio-sanitario-e-principal-arma-de-manejo-contr-a-ferrugem>>).

O Alerta Fitossanitário do Fundecitrus pode ser acessado através do site do Fundecitrus, disponível em <<http://alerta.fundecitrus.com.br>> (Figura 2).

Figura 2. Página inicial na Web do Sistema Alerto Fitossanitário do Fundecitrus. Disponível em: <<http://alerta.fundecitrus.com.br>>.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Monitoramento de *Diaphorina citri* e coleta de amostras

Com base na divisão das regiões adotadas pelo Sistema de Alerta Fitossanitário do Fundecitrus (Figura 3), foram utilizados somente os cartões adesivos amarelos instalados pelo Fundecitrus em propriedades distribuídas em quatro regiões do estado de São Paulo: Avaré, Araraquara, Bebedouro e Santa Cruz do Rio Pardo. A região de Casa Branca, que também faz parte do Alerta Fitossanitário, não foi incluída no levantamento pois, quando este trabalho foi iniciado, a região ainda estava em processo de implantação no Sistema. Os municípios que compunham cada região, o número médio de cartões avaliados e a área de cada região que participa do Alerta Fitossanitário está descrito na Tabela 1.

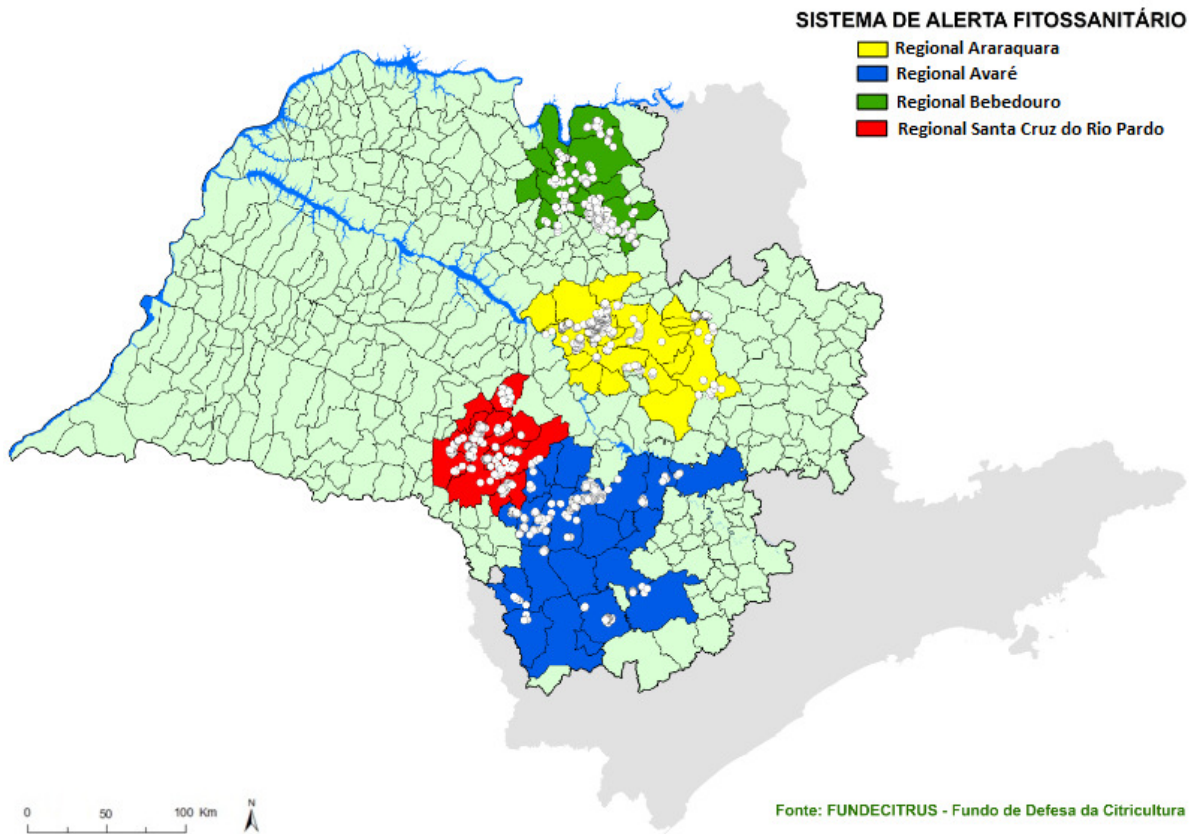


Figura 3. Mapa do cinturão citrícola no estado de São Paulo, com destaque para os municípios que fazem parte das quatro regiões que compõem o Alerta Fitossanitário. Localização dos cartões georreferenciados (pontos em branco), monitorados quinzenalmente, e utilizados para coletas das amostras de *Diaphorina citri* no período de fevereiro de 2014 a fevereiro do 2015.

Tabela 1. Descrição dos municípios que compõem cada região, número de cartões monitorados pelo Fundecitrus e avaliados por quinzena, e área monitorada pelo Alerta Fitossanitário de fevereiro de 2014 a fevereiro de 2015.

	Municípios	Número médio de cartões monitorados pelo Fundecitrus*	Número médio de cartões monitorados por produtores	Hectares monitorados no Alerta Fitossanitário	Porcentagem da área total de citros monitorada na região
Região de Avaré	Angatuba, Anhembi, Arandu, Avaré, Bofete, Borebi, Botucatu, Buri, Cerqueira César, Coronel Macedo, Iaras, Itaberá, Itaí, Itapeva, Itapetininga, Itatinga, Lençóis Paulista, Manduri, Paranapanema, Pardinho, Piracicaba, Pratânia e Taquarituba.	300 (289/308)**	1.377 (377/3.919)	37 mil	82%
Região de Araraquara	Américo Brasiliense, Analândia, Araraquara, Boa esperança do Sul, Borborema, Brotas, Gavião Peixoto, Ibaté, Ibitinga, Itaju, Itápolis, Matão, Nova Europa, Ribeirão Bonito, Reginópolis, Rincão, São Carlos, Tabatinga e Taquaritinga.	385 (344/411)	1.667 (699/2.327)	26 mil	70%
Região de Bebedouro	Altair, Barretos, Bebedouro, Cajobi, Colina, Colômbia, Guaraci, Ícem, Monte Azul Paulista, Nova Granada, Olímpia, Onda Verde, Palestina, Severínia, Taquaral e Viradouro.	288 (273/303)	4.675 (1.557/7.785)	33,3 mil	72%
Região de Santa Cruz do Rio Pardo	Águas de Santa Bárbara, Agudos, Avaí, Cabrália Paulista, Duartina, Espírito Santo do Turvo, Fernão, Gália, Lucianópolis, Óleo, Paulistânia, Santa Cruz do Rio Pardo, São Pedro do Turvo e Ubirajara.	188 (160/304)	1.951 (1.122/2.526)	15,6 mil	54%

*Psilídeos capturados nestes cartões foram utilizados para a detecção de *Ca. L. asiaticus*.

** Quantidade mínima e máxima de cartões lidos por quinzena.

Todos os pontos que tiveram cartões instalados e utilizados para coletas de amostras de *D. citri* foram georreferenciados (Figura 3). Estes cartões foram avaliados e substituídos quinzenalmente durante o período de fevereiro de 2014 até fevereiro 2015, cobrindo um ano de coletas. O número de psílídeos capturados em cada quinzena foi incluído no banco de dados do Sistema de Alerta Fitossanitário. Para maximizar a captura de insetos a instalação dos cartões foi no terço médio a superior das plantas, na parte externa da copa e na extremidade dos ramos (Miranda et al. 2011) (Figura 4). Foram escolhidas propriedades que não participam do Alerta fitossanitário e algumas que adotam algum manejo do HLB, que inclui pulverização com inseticidas e erradicação de plantas, e propriedades que não adotam manejo para controle da doença.

A cada leitura quinzenal foi realizada a coleta de psílídeos respeitando as seguintes condições: i) no máximo dois psílídeos por cartão ou por propriedade, visando ter uma maior distribuição das coletas dentro da região; ii) máximo de 50 psílídeos foram coletados e analisados por quinzena/região.

Os insetos coletados foram armazenados individualmente em microtubos plásticos de 1,5 ml, contendo 100 µL de etanol 70% e encaminhados ao Laboratório de Pesquisa & Diagnóstico do Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento do Fundecitrus, em Araraquara-SP, para determinar a frequência de insetos portadores da bactéria Las. Segundo Sala (2013), o armazenamento de amostras de psílídeos em etanol 70% na temperatura ambiente, é eficiente para análise da presença de Las por qPCR por pelo menos 35 dias.

Cada inseto representou uma amostra, o qual foi avaliado em uma reação de qPCR duplex, com sonda para detectar DNA de *D. citri* (Manjunath et al., 2008) e outra sonda para detectar o DNA de Las (Li et al., 2006).



Figura 4. Cartão adesivo amarelo instalado no terço superior da planta, com a face exposta à parte externa do pomar. O cartão adesivo está destacado em círculo tracejado em vermelho.

3.2. Extração de DNA

Para a extração do DNA das amostras foi realizado o método do CTAB (Murray & Thompson, 1980). As amostras de insetos foram maceradas, com auxílio de um pistilo, diretamente em tubos de 1,5ml com 400 μ L de tampão CTAB (CTAB 2,0 %, NaCl 8,2 %, PVP 10000 2,0 %, Tris 0,01 M pH 8,0, EDTA 0,05 M pH 8,0 e 0,2 % de β -mercaptoetanol) e submetidas à incubação a 65°C durante 30 minutos e centrifugação a 960g por 5 minutos. Foram recuperados 350 μ L do sobrenadante e adicionados 350 μ L da solução de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Após homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 15.300 g por 10 minutos e 300 μ L do sobrenadante transferido para novos tubos. Em cada amostra acrescentou-se 0,6 volume de isopropanol (180 μ L) para precipitação do DNA por meio de incubação a -20°C por 30 minutos. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 15.300 g por 20 minutos, o sobrenadante descartado e o sedimento lavado duas vezes com 700 μ L de etanol 70%. Após a última centrifugação (15.300 g por 10 minutos) do processo de lavagem, as amostras foram secas por seis minutos em Speed Vac (Eppendorf) e o pelete de DNA dissolvido em 30 μ L de H₂O deionizada autoclavada.

3.3. PCR em tempo real (qPCR)

O teste utilizado para determinar a porcentagem de psilídeos portadores de *Ca. L. asiaticus* (Las+) foi a qPCR seguindo o protocolo desenvolvido por Li et al. (2006) com modificações. Como cada amostra possuía somente um psilídeo e, como garantia de que não houve a perda de DNA do inseto durante o processo de extração, foi incluído no protocolo, a sonda DCP (Manjunath et al., 2008), confirmando no final da análise a presença do DNA do inseto.

Para a detecção de Las nas amostras de DNA extraídas dos psilídeos através da técnica de qPCR foram utilizados os oligonucleotídeos e sonda com base na região do DNA ribossomal 16S (DNAr 16S), desenvolvidos por Li et al. (2006). Para cada reação de qPCR utilizou-se 3 µL de DNA, obtidos conforme descrito no item 3.2, 6 µL de Path ID Master Mix (Ambion), 0,5 µM dos primers HLBas: 5' TCGAGCGCGTATGCAATACG 3' (forward) e HLBr: 5' GCGTTATCCCGTAGAAAAAGGTAG 3' (reverse), 0,2 µM da sonda HLBP: FAN-AGACGGGTGAGTAACGCG-MGB-NFQ, 0,35 µM dos primers DCF 5' TGGTGTAGATGGTTGTGATCTGATGTG 3' (forward) e DCR 5' ACCGTTCCACGACGGTGA 3' (reverse) e 0,15 µM de sonda DCP VIC-TGTGGGCGAGGCTACAGAAC-MGB-NFQ (Manjunath et al., 2008) em volume final de 12 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 para a desnaturação e 45 segundos a 58 °C para anelamento e extensão. Os controles utilizados foram: positivo (psilídeos Las+); negativo (água - ausência de DNA) e positivo para *D. citri*, porém sem a presença de Las. Todas as amostras e os controles foram amplificadas em termociclador StepOnePlus (Applied Biosystem).

Para a determinação de psilídeos Las+, dois valores de Ct ("threshold cycle" ou ciclo limiar) foram avaliados: para a confirmação da presença de DNA de *D. citri* é observado o valor de Ct até 36,0 para a sonda DCP. Amostras que não resultaram no valor de Ct até 36 foram excluídas das avaliações. Para determinar se a amostra é portadora de Las é observado o valor de Ct até 35,0 para a sonda HLBP. Segundo Sala (2013) e Santos (2011), o valor de Ct até 35,0 para sonda HLBP é um valor confiável a ser adotado para se considerar uma amostra Las+.

3.4. Análise dos dados

Foram determinadas as médias bimestrais das amostras Las+ para cada região, onde foi realizada à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

3.4.1. Porcentagem de psilídeos com *Ca. L. asiaticus* e número de insetos capturados por cartão ao longo do tempo

Todas as amostras foram coletadas em armadilhas monitoradas pelo Fundecitrus (Tabela 1), passando pela análise PCR. As amostras Las+ foram somadas por quinzena e determinada a porcentagem de amostras Las+ em relação ao total de amostras coletadas em cada região divididas por quinzenas. A partir desta classificação foi possível avaliar qual a variação da porcentagem de psilídeos Las+ ao longo do período de coletas.

Também foi avaliado e comparado entre as regiões a quantidade de psilídeos capturados pelo conjunto de cartões. Para esta comparação foram utilizados dois bancos de dados: i) das capturas de psilídeos nos cartões instalados pelo Fundecitrus, ii) dos psilídeos que foram capturados em cartões instalados pelos próprios produtores nas propriedades que participam do Alerta Fitossanitário em cada região (Tabela 1). Estas propriedades monitoram o psilídeo quinzenalmente com cartões adesivos georreferenciados e incluem diretamente no site do Fundecitrus a leitura destes cartões. Nestes cartões não houve coleta de amostras para análise de psilídeos com Las, somente os dados de captura de psilídeos do banco de dados foi utilizado. Foram somados o número de psilídeos capturados e divididos pelo número total de cartões instalados em cada região, dos dois bancos de dados, obtendo o índice de psilídeos/cartão que foram divididos por quinzena em cada região.

Também foi estimada, por quinzena, a quantidade total de psilídeos na região que seriam Las+. Isto foi calculado multiplicando a porcentagem de psilídeos Las+ obtidos na análise de qPCR pela quantidade de *D. citri* capturados em cartões na mesma quinzena em cada região. Para esta estimativa, foi realizada comparação entre as regiões.

3.4.2. Comparação da porcentagem de psilídeos com *Ca. L. asiaticus* em função do manejo do HLB adotado nas propriedades em cada região

As propriedades que tiveram cartões instalados e utilizados para a coleta dos psilídeos foram classificadas de acordo com o Manejo adotado para controle do HLB:

- Propriedade com Manejo A (MA): realizava pelo menos quatro inspeções e erradicações de plantas sintomáticas e o controle do inseto vetor com pelo menos uma pulverização mensal de inseticida.
- Propriedade com Manejo B (MB): realizava somente o controle do inseto vetor com pelo menos uma pulverização mensal de inseticida.
- Propriedade Sem Manejo (SM): não realizava inspeção, nem erradicação de plantas, nem controle sistemático do inseto vetor.

Foram determinadas as porcentagens médias bimestrais das amostras de psilídeos Las+ divididas por manejo e por região. As amostras coletadas em propriedades com MA foram descartadas das análises devido ao baixo número de amostras coletadas nas regiões de Araraquara e Avaré, o que não representaria as propriedades com este manejo.

A partir disto foi realizada a análise de variância considerando-se um delineamento fatorial 4x2, sendo o fator região com quatro níveis (Santa Cruz do Rio Pardo, Avaré, Araraquara e Bebedouro) e o fator manejo com dois níveis (MB e SM). Considerou-se a porcentagem de amostras Las+ em cada bimestre como uma repetição. Se significativo o valor de F da análise de variância para cada fator e interação região x manejo, as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Porcentagem de psilídeos com *Ca. L. asiaticus* e número de insetos capturados por cartão ao longo do tempo

Na região de Avaré (Figura 5A), a porcentagem de psilídeos Las+ foi alta nos meses de maio e junho/14, com valores entre 78% e 100%, porém a captura de insetos/cartão/quinzena, de abril a junho, variou de 0,013 a 0,044. Apesar da alta porcentagem de insetos Las+, a população presente na região neste período foi menor, reduzindo a probabilidade de plantas serem contaminadas. Na 2ª quinzena de agosto/14 a porcentagem de insetos Las+ apresentou a menor porcentagem do período de avaliações com 15,3%, e aumentou gradativamente a cada mês chegando a 90% na 2ª quinzena de novembro/14, apresentando uma leve queda e se mantendo entre 65% e 78% até fevereiro/15. A captura de psilídeos também apresentou um crescimento gradativo no 2º semestre de 2014, com 0,084 insetos por cartão na 1ª quinzena de agosto/14, chegando a 0,233 insetos por cartão na 1ª quinzena de novembro/14. Estes índices mais altos quando comparados ao 1º semestre, ocorreram no período de emissão de fluxos vegetativos, no qual o controle do inseto deve ser mais rigoroso, devido a presença de maiores populações de psilídeos Las+.

Na região de Santa Cruz do Rio Pardo, a porcentagem de psilídeos Las+ variou de 54% (1ª quinzena de fevereiro/14) a 97% (2ª quinzena de junho/14), apresentando sempre valores superiores a 50% (Figura 5B). Em relação a captura de insetos/cartão/quinzena, os valores do 1º semestre variaram entre 0,021 a 0,179, e foram maiores no 2º semestre, variando de 0,031 a 0,336 insetos por cartão. Da mesma forma que Avaré, na região de Santa Cruz do Rio Pardo, o aumento da captura de psilídeos por cartão iniciou no mês de agosto e teve seu pico em outubro. Segundo o levantamento do Fundecitrus divulgado em maio de 2015 (Fundecitrus, 2015e), a região do município de Duartina, que pertence a região de Santa Cruz do Rio Pardo, possui 1.889 hectares de pomares abandonados, sendo considerada a maior área de pomares abandonados das regiões avaliadas no estudo e ainda possui 2.554 hectares de pomares mal cuidados. Estas são áreas consideradas refúgios para a criação do psilídeo e locais onde eles adquirem a bactéria, pois não existem nenhum ou muito pouco controle do inseto e eliminação de plantas com sintomas de HLB. Monteiro (2013), também observou que psilídeos completam seu ciclo em plantas com HLB na área sem manejo, e posteriormente, dispersam para propriedades que realizam o controle a procura por brotos para alimentar e realizar a postura

dos ovos. A região de Santa Cruz do Rio Pardo é a que apresenta o menor engajamento no manejo regional em termos proporcionais (Tabela 1).

Nas regiões de Avaré e Santa Cruz do Rio Pardo, que são geograficamente limítrofes, o comportamento da população de psilídeos é semelhante, apresentando picos populacionais no 2º semestre, período que os pomares estão emitindo novos surtos vegetativos e onde *D. citri* se reproduz. Isto concorda com o observado por Catling (1970) que verificou que a flutuação populacional do *D. citri* está relacionada com a época de maior fluxo vegetativo das plantas de citros, pois os ovos são colocados preferencialmente nos brotos novos e as ninfas se desenvolvem em folhas jovens. Portanto, o monitoramento da população com cartões é fundamental para identificar o mês que ocorrerá aumento da população, indicando a necessidade de reforçar o controle do inseto para minimizar a entrada da doença nos pomares.

Na região de Araraquara, a porcentagem de psilídeos Las+ foi variável nas quinzenas do 1ª semestre de 2014, com valores entre 42% e 97%. A quantidade total de insetos capturados por cartão entre fevereiro e agosto de 2014 foi menor, quando comparada com as quinzenas subsequentes, atingindo o máximo de 0,131 insetos/cartão/quinzena na 1ª quinzena de abril/14 (Figura 5C). A partir da 2ª quinzena de agosto/14, o número de capturas aumentou, chegando a 2,4 insetos/cartão/quinzena em novembro e em dezembro/14. Estes foram os maiores valores de capturas de insetos por cartões quando comparadas com as demais regiões avaliadas. Estes dados são corroborados pelos apresentados por Santos (2013), que obteve maiores capturas de adultos de *D. citri* em pomares no município de Boa Esperança do Sul em comparação à Iaras, municípios que compõem respectivamente as regiões do Alerta Fitossanitário de Araraquara e de Avaré. Sales (2015) também observou que em municípios da região centro do estado de São Paulo ocorrem intensos crescimentos de fluxos vegetativos nos pomares a partir do mês de outubro, e estas brotações permanecem elevadas até o final do verão, favorecendo a reprodução de *D. citri*. No mês de novembro/14, apesar da captura de psilídeos ter sido alta, a porcentagem de insetos portadores da bactéria na 1ª quinzena foi de 21%, enquanto na quinzena seguinte atingiu 49%. Na segunda quinzena de dezembro/14, a região atingiu 62% de amostras Las+ e um índice de 2,4 insetos por cartão. Considerando esta porcentagem, estima-se que o número de psilídeos Las+ chegou a 1,48 insetos por cartão nesta quinzena. O aumento da população de *D. citri* nesta época do ano já foi relato por Beloti et al. (2007), que constataram maior incidência de adultos nos meses de novembro e dezembro de 2006 e janeiro de 2007 na região de Matão. Yamamoto et al. (2001) também observaram picos populacionais do psilídeo no final da primavera e início do verão de 1993/1994 e 1994/1995, em pomares localizados nos municípios de Catanduva e Monte Alto (SP).

A região de Bebedouro foi a que apresentou a menor captura média de psilídeos/cartão/quinzena, variando de 0,012 (2ª quinzena de maio/14) até 0,097 (2ª quinzena de fevereiro/15) (Figura 5D). Yamamoto et al. (2001) constataram que em municípios com maior déficit hídrico, como Bebedouro e Monte Azul Paulista (SP), houve menor captura de adultos em comparação à Catanduva, indicando que existem outros fatores que favorecem a elevada população da praga. Em relação a porcentagem de *D. citri* Las+ a variação foi grande, sendo 86% na 2ª quinzena de agosto/14 e apenas 15% na 1ª quinzena de novembro/14. Nesta região, no período amostrado, o mês de janeiro mostrou ser importante para o controle do inseto, já que a porcentagem de psilídeos Las+ chega a 65%, o número de insetos/cartão/quinzena chegou em média a 0,055 e a média de psilídeos Las+ na 2ª quinzena deste mês foi de 0,044 insetos/cartão, a maior média em todo o período de avaliações. No ano de 2014, a partir de março, apesar da porcentagem de insetos Las+ ter se mantido alta, o número de psilídeos na região diminuiu até a 1ª quinzena de junho/14.

No período amostrado, para as quatro regiões avaliadas, a porcentagem de psilídeos Las+ foi alta, acima de 50% (Tabela 2), o que é muito preocupante para o sucesso do manejo do HLB nestas regiões. À exceção de Santa Cruz do Rio Pardo, que manteve alta porcentagem de insetos Las+ praticamente de forma constante, onde a menor porcentagem foi observada em janeiro/14 com 56%, Avaré houve um declínio em março e agosto de 2014. Na região de Araraquara, um declínio acentuado ocorreu em novembro/14 e, na região de Bebedouro, o declínio na quantidade de insetos Las+ iniciou em setembro/14 e continuou baixa até dezembro/14.

A quantidade de psilídeos quantificados em cartões adesivos amarelos aumentou gradativamente entre julho e agosto/14 nas regiões de Avaré e de Santa Cruz do Rio Pardo, a partir de setembro e outubro/14 na região de Araraquara e de forma intermitente a partir de outubro/14 na região de Bebedouro. Este pico populacional passou a declinar também de forma diferenciada, atingindo valores similares em janeiro/15 em Avaré, Santa Cruz do Rio Pardo e Araraquara e na região de Bebedouro manteve-se alto até fevereiro de 2015. Ferreira (2014) avaliando a flutuação populacional do inseto em propriedades da região de Anhembi/SP observou variações na captura de *D. citri* entre 0,02 e 0,21 insetos/cartão, onde o pico ocorreu em novembro/12, corroborando com os dados obtidos da região de Avaré, onde o pico de capturas também ocorreu no mês de novembro/14.

A partir da relação entre captura de psilídeos e a média de psilídeos Las+ nas quinzenas, foi estimado e avaliado a quantidade média de psilídeos Las+ por cartão, de forma a representar a probabilidade de ocorrência de psilídeos Las+ em função da população total de psilídeos na

região por quinzena (Figura 6). Esta quantidade de insetos representa o período do ano em que há maiores populações de psílídeos potencialmente infectivos; que é no início da primavera na região sudoeste (Avaré e Santa Cruz do Rio Pardo), ultrapassando a média do primeiro semestre entre setembro e outubro/14. Na região de Araraquara, aumenta a partir de outubro, mas dispara em dezembro, enquanto na região de Bebedouro atingiu os maiores valores somente em janeiro e fevereiro de 2015. Santos (2011) também observou que a quantidade de insetos portadores da bactéria foi maior nos períodos de primavera/verão em propriedades do município de Leme e Pirassununga, concordando com Ferreira (2014) que observou pico populacional de psílídeos Las+ em janeiro/13, nos insetos capturados em cartões adesivos.

Entretanto, em valores absolutos, os maiores índices foram obtidos em Araraquara, seguido de Avaré e Santa Cruz do Rio Pardo. Na região de Bebedouro os valores foram cerca de 4 vezes menores que no Sudoeste e 30 vezes menores do que em Araraquara. Belasque Junior. et al. (2010) relataram que as populações de *D. citri* geralmente aumentam nos períodos em que as plantas apresentam maior fluxo vegetativo, com picos populacionais na primavera e verão, contudo, a fase adulta do inseto pode estar presente o ano todo, tornando imprescindível seu monitoramento contínuo em toda a propriedade. Segundo Paiva (2009) não há um padrão de distribuição temporal de *D. citri* para o estado de São Paulo, sendo tal distribuição variável em função da disponibilidade e abundância de ramos novos, embora os fatores climáticos também sejam responsáveis pelo tamanho de suas populações.

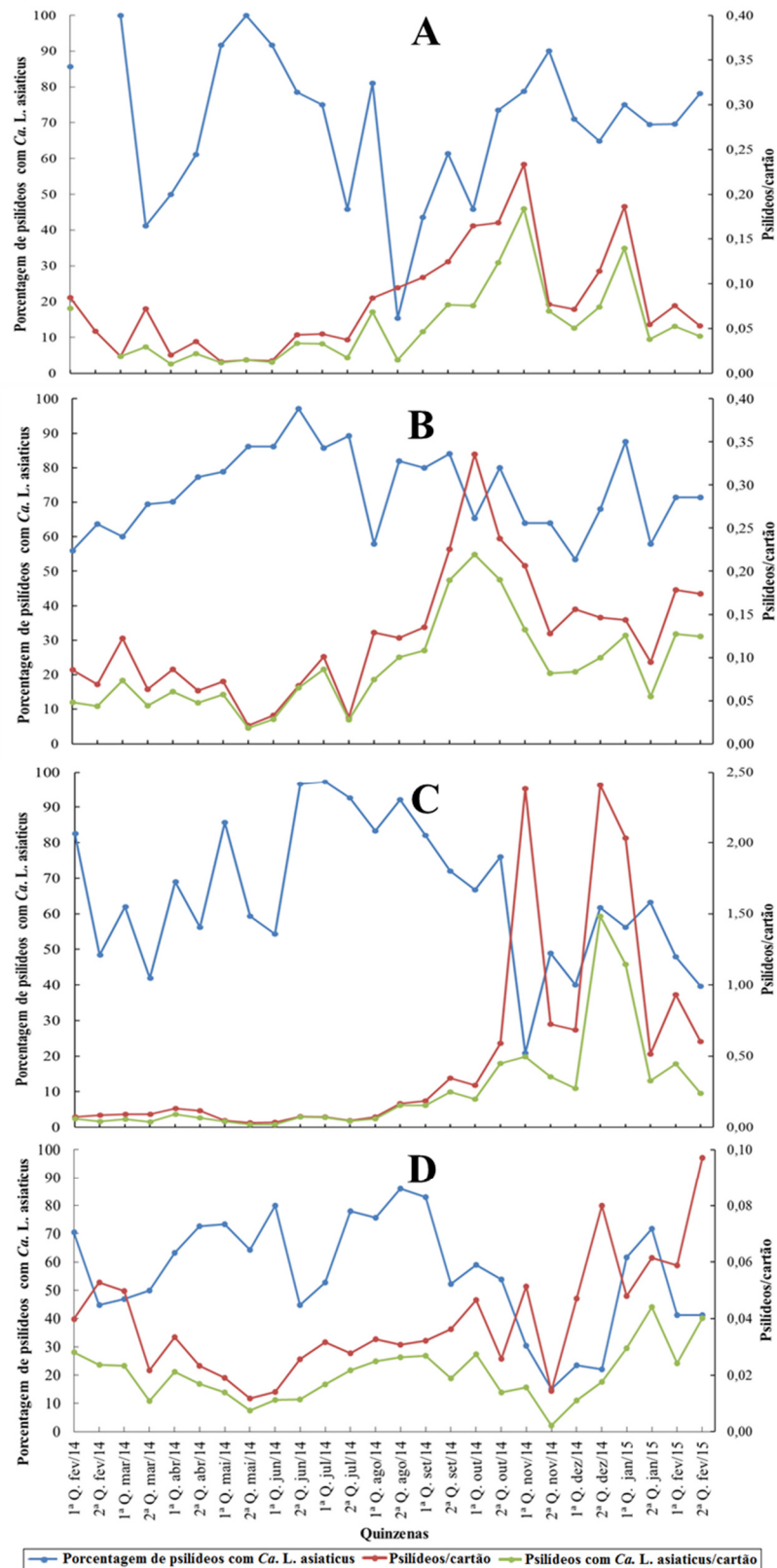


Figura 5. Porcentagem de psilídeos com *Ca. L. asiaticus*; número de psilídeos capturados por cartão e número de psilídeos com *Ca. L. asiaticus* estimados por cartão durante a 1ª quinzena de fevereiro de 2014 até a 2ª quinzena de fevereiro de 2015 nas quatro regiões avaliadas. *Q.: quinzena. A:Avaré, B:Santa Cruz do Rio Pardo, C:Araraquara, D:Bebedouro.

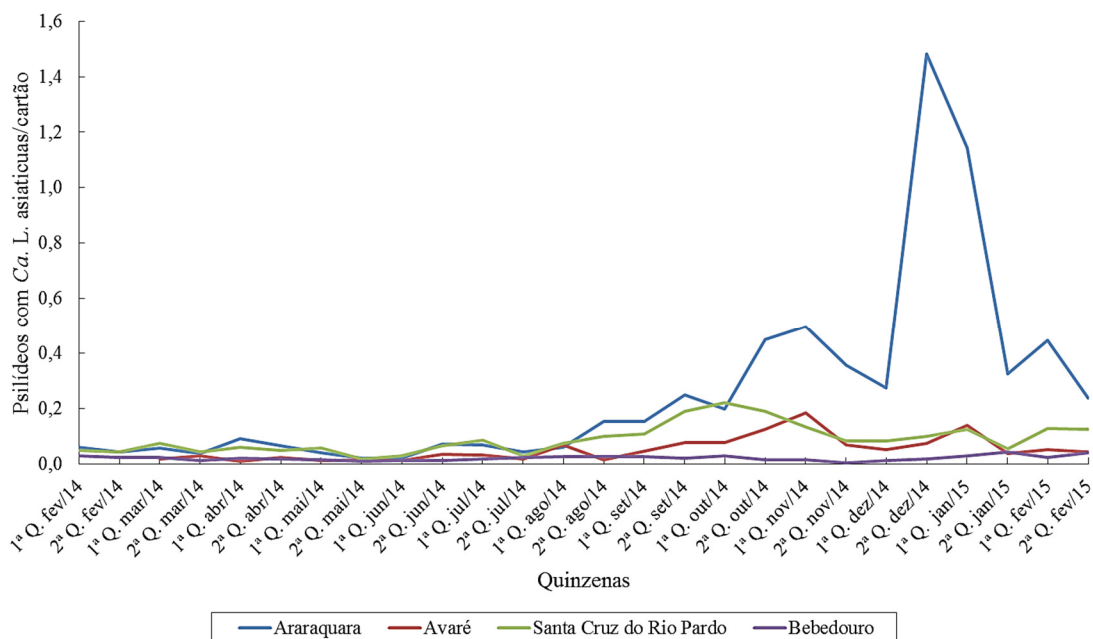


Figura 6. Quantidade de psílídeos capturados com *Ca. L. asiaticus* por cartão adesivo nas quatro regiões avaliadas. *Q.: quinzena

4.2. Porcentagem de psílídeos com *Ca. L. asiaticus* em função da região e do manejo de HLB adotado nas propriedades

Das 3.893 amostras coletadas para determinar a quantidade de psílídeos Las+ nas quatro regiões, 3.762 (97%) foram positivas para a sonda DCP (*D. citri*), confirmando que possuíam DNA do inseto vetor. As amostras negativas para a sonda DCP foram descartadas, pois algumas situações podem ter ocorrido, fatores como: i) o DNA do psílídeo ter sido perdido durante a fase de extração; ii) somente uma parte do psílídeo ter sido coletada e portanto, insuficiente para detectá-lo adequadamente; iii) inibição da reação de qPCR; iv) coleta de outro inseto e não *D. citri*.

Das amostras positivas para sonda DCP, 2.446 (65%) foram positivas para sonda HLBp (Las+). Os valores de Ct para a sonda HLBp, indicativo da presença de Las, tiveram variação entre 13,2 e 35.

Na divisão das amostras entre as quatro regiões, Santa Cruz do Rio Pardo obteve a maior média de psílídeos Las+, dentre as 1.066 amostras avaliadas, 780 foram positivas (73%). A região de Bebedouro obteve a menor média de insetos Las+, com 966 amostras avaliadas, resultando em 526 positivas (54%) (Tabela 2). A região de Avaré teve 665 amostras avaliadas, onde 462 foram positivas (69%). Em Araraquara foram 1.065 amostras, resultando em 689 positivas (65%).

Tabela 2. Quantidade e porcentagem de amostras positivas para *Ca. L. asiaticus* (Las+) divididas por manejo e por região.

Manejo	Santa Cruz do Rio Pardo		Avaré		Araraquara		Bebedouro	
	n*	%	n	%	n	%	n	%
A	41	73	3	67	1	100	81	46
B	137	64	161	65	505	58	334	58
Sem manejo	888	75	501	71	559	70	551	61
Total	1.066	73	665	69	1.065	65	966	54

*n.: número de amostras positivas para sonda DCP.

Como houve muito poucas amostras de propriedades com MA para as regiões de Araraquara e Avaré, e o número destas amostras nas outras regiões também foi bem menor que o coletado para propriedades com os outros dois tipos de manejo, optou-se por excluir da análise todas as amostras destas propriedades com MA.

A interação Região x Manejo não foi significativa ($p>0,05$), e, portanto, não houve diferença na porcentagem de psilídeos Las+ entre as regiões com os diferentes tipos de manejo, assim como, entre cada tipo de manejo dentro de cada região.

Foi observada diferença significativa nas médias bimestrais somadas as amostras Las+ coletadas em propriedades com MB e SM em Santa Cruz do Rio Pardo quando comparadas as médias bimestrais da região de Bebedouro (Tabela 3). Já para as regiões de Avaré e Araraquara não ocorreram diferenças significativas em comparação com as demais regiões. A região de Bebedouro, que apresentou a menor média de psilídeos Las+, está localizada no norte do estado de São Paulo e apresenta as maiores temperaturas ao longo do ano, quando comparada as temperaturas da região de Santa Cruz do Rio Pardo, que está localizado no sudoeste do estado de São Paulo. Em temperaturas como as encontradas na região norte, a multiplicação da bactéria do HLB na planta é menor e, conseqüentemente, sua aquisição pelo psilídeo é reduzida (Lopes et al. 2013), o que concorda com Mendonça (2015) que observou menores concentrações de Las em ramos coletados no local e nos meses que apresentavam temperatura mais elevada, demonstrando haver efeito da temperatura alta sobre a bactéria.

Segundo dados do Fundecitrus (2015c), a região de Avaré apresentou no último levantamento 5,68% das plantas contaminadas por HLB, índice baixo quando comparado a média de 17,89% do estado de São Paulo. Porém, com a porcentagem média de psilídeos portadores de bactéria próxima a 70%, é esperado que a incidência de plantas contaminadas na

região aumente nos próximos anos, reforçando a necessidade da adoção e expansão do manejo regional para o maior número de propriedades.

De acordo com os dados do Fundecitrus (2015e) a região de Matão, que engloba a regional de Araraquara atingiu 24,17% de plantas com HLB, é uma região onde muitos produtores têm optado pela manutenção das plantas doentes, além de ter 1.353 hectares de pomares abandonados e 3.289 hectares de áreas mal cuidadas, mostrando ser áreas que podem prejudicar a eficiência do manejo regional do HLB para a região.

A média elevada de psilídeos Las+ nas quatro regiões, acima de 50%, confirma a necessidade de se manter um controle rigoroso do inseto vetor, e principalmente, a erradicação de plantas doentes, buscando reduzir fontes de inóculo onde o psilídeo possa adquirir Las.

Tabela 3. Porcentagem média bimestral de psilídeos com *Ca. L. asiaticus* (Las+) em propriedades com Manejo B e Sem manejo nas quatro regiões monitoradas*.

Região	Porcentagem média de psilídeos Las+
Santa Cruz do Rio Pardo	71 a
Avaré	68 ab
Araraquara	66 ab
Bebedouro	56 b

* Médias que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Na comparação da porcentagem de psilídeos Las+ entre propriedades que adotam MB e SM, a diferença foi significativa (Tabela 4), sendo maior em propriedades SM. Propriedades que adotam estes manejos possuem constantemente plantas infectadas com HLB, entretanto, as aplicações de inseticidas adotadas nas propriedades com MB podem reduzir a aquisição da bactéria nestas plantas e a transmissão secundária de Las, que ocorre quando o psilídeo adquire a bactéria dentro da propriedade e a transmite para plantas saudáveis na mesma propriedade. Assim, possivelmente, o avanço da incidência da doença nestes pomares com MB ocorrerá muito mais por infecções causadas pela entrada de psilídeos Las+ provenientes de outras áreas (infecções primárias) que pelas infecções provenientes de psilídeos Las+ do próprio pomar (infecções secundárias). Propriedades SM, como não adotam nenhuma prática para reduzir o HLB ou

controlar o psilídeo, são áreas utilizadas como refúgio e criatórios para o psilídeo, que pode adquirir Las das plantas contaminadas na fase de ninfa ou adulto e transmiti-la tanto dentro da propriedade como para propriedades vizinhas.

Embora a porcentagem de psilídeo Las+ tenha sido significativamente menor nas propriedades com MB que nas SM, esta porcentagem é relativamente alta (média de 61%). Isto pode ocorrer por dois motivos: 1) O rigor do controle químico adotado nas propriedades com MB pode não estar sendo suficiente para impedir que haja a aquisição da bactéria nas plantas doentes mantidas no pomar; e 2) A alta dispersão dos psilídeos Las+ dos pomares SM para os pomares MB, uma vez que as armadilhas são dispostas nas plantas da periferia da propriedade. A segunda hipótese parece ser a mais correta neste caso, porque mesmo havendo poucas amostras coletadas das propriedades com MA, insuficientes para uma comparação estatística, a média de psilídeos Las+ nestas propriedades também foi relativamente alta (média de 56%). Nos pomares com MA, a eliminação das plantas sintomáticas e o controle do psilídeo reduz bem a quantidade de psilídeos Las+, minimizando muito as infecções secundárias. Tanto os pomares com MA como os pomares com MB estão sendo influenciados pela alta quantidade de inóculo e psilídeos Las+ provenientes dos pomares SM.

Tabela 4. Porcentagem média de amostras *Ca. L. asiaticus* (Las+) divididas por manejo*.

Manejo	Porcentagem de psilídeos Las+
Manejo B	61 a
Sem manejo	70 b

* médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

A preferência para reprodução do inseto é nas brotações, e segundo Montesino (2011) plantas com sintomas de HLB têm maior número de brotações quando comparadas a plantas assintomáticas, o que reforça a probabilidade de a reprodução do inseto ocorrer primeiro nestas plantas, gerando adultos Las+, que disseminam a doença para dentro da propriedade e para outras propriedades na região. Ferreira (2014) e Monteiro (2014), concluíram que pomares comerciais sem manejo do HLB, foram importantes fontes de inóculo, influenciando diretamente o progresso do HLB em uma propriedade referência mantida com rigoroso manejo da doença. Michigami (2015), observou que poucas plantas doentes distribuídas em pomares não comerciais ou quintais, ao entorno da propriedade que maneja o HLB, cuja a reprodução

do psílídeo era permitida, também foram suficientes para incrementar o progresso da incidência da doença em propriedade comercial com rigorosa aplicação de inseticidas e remoção de plantas sintomáticas.

Portanto, ações que envolvam a eliminação de plantas doentes e o controle de psílídeo (liberação da *T. radiata* ou aplicação de inseticidas) em áreas sem manejo, devem ser incorporadas a um manejo regional da doença, visando reduzir populações de psílídeos Las+.

5. CONCLUSÕES

- A porcentagem de psílídeos adultos Las+ coletados em cartões adesivos amarelos foi alta em todas regiões estudadas, com pequenas variações entre as regiões na flutuação ao longo do ano.
- A região de Santa Cruz do Rio Pardo teve a maior porcentagem de psílídeos Las+ e a região de Bebedouro a menor.
- A região de Araraquara teve a maior quantidade estimada de insetos Las+ ao longo do ano e a região de Bebedouro a menor.
- A época do ano mais crítica para a ocorrência de novas infecções, determinada pelo produto da porcentagem de psílídeos Las+ pela quantidade de insetos capturados na região em um dado período, foi variável entre as quatro regiões estudadas, porém de maneira geral iniciou-se na segunda quinzena de agosto.
- As maiores populações de insetos Las+ foram encontradas em propriedades que não adotam manejo do HLB. Entretanto, a porcentagem de psílídeos Las+ nas propriedades com MB e MA também foi alta (>50%).
- Visando melhorar a eficiência do manejo do HLB nas propriedades com MA e MB, há necessidade de executar ações para diminuir a ocorrência de psílídeos Las+ nas áreas sem o manejo da doença. Estas ações devem objetivar principalmente a erradicação de plantas doentes em pomares abandonados, quintais e áreas residenciais, e também o combate ao inseto vetor com o controle químico ou biológico.

REFERÊNCIAS

- Arratia-Castro, A.A., Santos-Cervantes, M.E, Fernández-Herrera, E, Chávez-Medina, J.A, Flores-Zamora, G.L, Camacho-Beltrán, E, Méndez-Lozano, J, Leyva-López, N.E. 2014. Occurrence of ‘*Candidatus Phytoplasma asteris*’ in citrus showing Huanglongbing symptoms in Mexico. **Crop Protection** 62:144-151.
- Bassanezi, R.B., Montesino, L.H., Stuchi, E.S. 2009. Effects of Huanglongbing on fruit quality of sweet orange cultivars in Brazil. **European Journal Plant Pathology** 125:565– 572.
- Bassanezi, R.B., Montesino, L.H., Gasparoto, M.C.G., Bergamin Filho, A., Amorim, L. 2011. Yield loss caused by huanglongbing in different sweet orange cultivars in São Paulo, Brazil. **European Journal Plant Pathology** 130:577–586.
- Bassanezi, R.B. 2013a. Epidemiologia e manejo regional do Huanglongbing (HLB). Resumos. Congresso Paulista de Fitopatologia, 36. São Paulo, Associação Paulista de Fitopatologia; Instituto Biológico. 2013. **Summa Phytopathologica**. (Suplemento v. 39).
- Bassanezi, R.B., Montesino, L.H., Gimenes-Fernandes, N., Yamamoto, P.T., Gottwald, T.R., Amorim, L, Bergamim-Filho, A. 2013b. Efficacy of area-wide inoculum reduction and vector control on temporal progress of huanglongbing in young sweet orange plantings. **Plant Disease** 97(6):789-796.
- Belasque Junior, J., Yamamoto, P.T., Miranda, M.P., Bassanezi, R.B., Ayres, A.J., Bove, J.M. 2010. Controle do *huanglongbing* no Estado de São Paulo, Brasil. **Citrus Research & Technology** 31(1):53-64.
- Beloti, V.H., Rugno, G.R., Felipe, M.R., Yamamoto, P.T. 2007. Incidência de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) em pomares de citros em produção e em pomar em formação. Resumos. **Reunião Anual do Instituto Biológico**, 20. São Paulo: Biológico. 2007. 69(2):164.
- Boina, D.R., Meyer, W.L., Onagbola, E.O., Stelinski, L.L. 2009. Quantifying Dispersal of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) by Immunomarking and Potential Impact of Unmanaged Groves on Commercial Citrus Management. **Environmental Entomology** 38(4):1250-1258.
- Bonani, J. P. 2009. Caracterização do aparelho bucal e comportamento alimentar de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) em *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. 86 f. **Tese de Doutorado**. Piracicaba, SP: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- Bové, J.M. 2006. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. **Journal Plant Pathology** 88(1):7-37.
- Capoor, S.P., Rao, D.G., Viswanath, S.M. 1967. *Diaphorina citri* Kuwayama. A vector of the greening disease of citrus in India. **Indian Journal of Agricultural Science** 37:572-576.
- Catling, H.D. 1970. Distribution of the psyllid vectors of citrus greening disease, with note on the biology and bionomics of *Diaphorina citri*. **Fao Plant Protection Bulletin** 18(1):8-15.

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

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

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

Coordenadoria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 53, de 16 de outubro de 2008. **Diário Oficial da União**. 17 out. 2008 - Seção 1. Disponível em: <<http://www.cda.sp.gov.br/www/legislacoes/popup.php?action=view&idleg=830>>. Acesso em: 17 fev. 2015.

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

Diniz, A.J.F. 2013. Otimização da criação de *Diaphorina citri* Kuwayama, 1908 (Hemiptera: Liviidae) e de *Tamarixia radiata* (Waterston, 1922) (Hymenoptera: Eulophidae), visando a produção em larga escala do parasitoide e avaliação do seu estabelecimento em campo. 128 f. **Tese de Doutorado**. Piracicaba, SP: Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

Ferreira, R.V. 2014. Influência do tipo de controle de huanglongbing em áreas citrícolas na dispersão de *Diaphorina citri* e na disseminação da doença para pomares próximos. 58 f. **Dissertação de Mestrado**. Araraquara, SP: Fundo de Defesa da Citricultura.

Fundecitrus. 2015a. **Produção de laranjas de São Paulo é reestimada em 286,14 milhões de caixas**. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/noticias/integra/producao-de-laranjas-de-sao-paulo-e-reestimada-em-28614-milhoes-de-caixas/345>>. Acesso em: 04 jan. 2016.

Fundecitrus. 2015b. **Levantamentos: greening**. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/levantamentos/greening/10>>. Acesso em: 23 nov. 2015.

Fundecitrus. 2015c. **Greening atinge 18% dos pés de laranja**. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/noticias/integra/greening-atinge-18-dos-pes-de-laranja/327>>. Acesso em: 30 set. 2015.

Fundecitrus. 2015d. **Alerta fitossanitário**. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/alerta>>. Acesso em: 05 jul. 2015.

Fundecitrus. 2015e. Levantamento aponta queda da cvc e alta do hlb. **Revista Citricultor** (31):8-12. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/revista/n-31---levantamento-aponta-queda-da-cvc-e-alta-do-hlb/148>>. Acesso em: 04 out. 2015.

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: Ceres. 649 p.

Gatineau, F., Bonnot, F., Yen, T.T.H., Tuan, T.M., Tuyen, N.D., Truc, N.T.N. 2010. Effects of imidacloprid and fenobucard on the dynamics of the psyllid *Diaphorina citri* Kuwayama and on the incidence of *Candidatus Liberibacter asiaticus*. **Fruits** 65:209-220.

Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., Williams, P.M. 1996. Real time quantitative PCR. **Genome Research** 6:986-994.

Leonardo, A. 2014. Otimização da leitura de cartão adesivo amarelo para o monitoramento de adultos de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae). **Dissertação de Mestrado**. Araraquara, SP: Fundo de Defesa da Citricultura.

Lafèche, D., Bové, J.M. 1970. Structures de type mycoplasme dans les feuilles d'orangers atteints de la maladie du greening. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Paris** 270:1915-1917.

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.

Li, W., Levy, L., Hartung, J.S. 2009. Quantitative distribution of 'Candidatus Liberibacter asiaticus' in citrus plants with citrus huanglongbing. **Phytopathology** 2:139-144.

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. 2009. Transmission Efficiencies and Multiplication of *Candidatus Liberibacter americanus* and *Ca. Liberibacter asiaticus* in Citrus Plants. **Phytopathology** 99: 301-306.

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 Disease** 97(12):1563-1570.

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.

McClellan, A.P.D., Oberholzer, P.C.J. 1965. Citrus psylla, a vector of the greening disease of sweet orange. **South Africa Journal of Agricultural Science** 8:297-298.

Mendonça, W.J.Q.F. 2015. Evolução da infecção por *Candidatus Liberibacter asiaticus* e dos sintomas de huanglongbing em plantas cítricas no sul do Triângulo Mineiro e região central do Estado de São Paulo. **Dissertação de Mestrado**. Araraquara, SP: Fundo de Defesa da Citricultura.

Michigami, F.A.B. 2015. Benefícios das medidas de manejo adotadas interna e externamente a uma propriedade comercial de citros na redução do progresso do Huanglongbing. **Dissertação de Mestrado**. Araraquara, SP: Fundo de Defesa da Citricultura.

Miranda, M.P., Yamamoto, P.T., Noronha Junior, N.C. 2011. Utilização de cartões adesivos para monitoramento de *Diaphorina citri*. **Citricultura Atual** 81:8-9.

Monteiro, A.B. 2013. Efeito de um pomar sem manejo de Huanglongbing sobre a ocorrência de *Diaphorina citri* e incidência de plantas doentes em uma área vizinha com manejo da doença. **Dissertação de Mestrado**. Araraquara, SP. Fundo de Defesa da Citricultura.

Montesino, L.H. 2011. Evolução dos sintomas de Huanglongbing em laranjeiras jovens: relação com época do ano, fenologia das plantas, flutuação populacional de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) e medidas de controle do vetor. **Dissertação de Mestrado**. Araraquara SP. Fundo de Defesa da citricultura.

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

Neves, M.F., Trombin, V.G., Milan, P., Lopes, F.F., Cressoni, F., Kalaki, R. 2010. **O retrato da citricultura brasileira**. Ribeirão Preto: Markestrat. 137 p.

Paiva, P.E.B. 2009 Distribuição espacial e temporal, inimigos naturais e tabela de vida ecológica de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) em citros em São Paulo. 64 f. **Tese de doutorado**. Piracicaba, SP: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

Pérez-Otero, R., Mansilla, J.P, Del Estal, P. 2015. Detección de la psila africana de los cítricos, *Trioza erytreae* (Del Guercio, 1918) (Hemiptera: Psylloidea: Triozidae), en la Península Ibérica. **Archivos Entomológicos** 13:119-122.

Reinking, O.A. 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* na detecção de *Candidatus Liberibacter asiaticus*. **Dissertação de Mestrado**. Araraquara, SP: Fundo de Defesa da Citricultura.

Sales, T.M. 2015. Dinâmica populacional de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) em pomares cítricos do Estado de São Paulo. 143 f. **Tese de Doutorado**. Piracicaba, SP: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.

Santos, F.L. 2011. Relação entre psilídeos *Diaphorina citri* Kuwayama infectivos e a incidência de Huanglongbing em Pirassununga e Leme – SP. **Dissertação de Mestrado**. Araraquara, SP: Fundo de Defesa da Citricultura.

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

Santos, T.R. 2013. Flutuação populacional e distribuição espacial de *Diaphorina Citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) em Propriedades Citrícolas com manejo intensivo do Huanglongbing. 41 f. **Dissertação de Mestrado**. Jaboticabal, SP: Universidade Estadual Paulista.

Sétamou, M., Sanchez, A., Patt, J.M., Nelson, S.D., Jifon J., Louzada E.F. 2011 Diurnal patterns of flight activity and effects of light on host finding behavior on the Asian citrus psyllid. **Journal of Insect Behavior** 25:264–276.

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

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

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

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

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

Villechanoux, S., Garnier, M., Renaudin, J., Bové, J.M. 1992. Detection of several strains of the bacteriumlike organism of citrus greening disease by DNA probes. **Current Microbiology** 24:89-95.

Wulff, N.A., Teixeira, D.C., Martins, E.C., Toloy, R.S., Bianco, L.F., Colletti, D.A.B., Kitajima, E.W., Bové, J.M., 2015. Sunn hemp, a major source-plant of the phytoplasma associated with Huanglongbing symptoms of sweet orange in São Paulo State, Brazil. **Journal Citrus Pathology** 2(1). Disponível em: <<http://escholarship.org/uc/item/1dx6w52z>>. Acesso em: 08 nov. 2015.

Yamamoto, P.T., Paiva, P.E.B., Gravena, S. 2001. Flutuação populacional de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) em pomares de citros na região norte do estado de São Paulo. **Neotropical Entomology** 30(1):165- 170.

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, Abrahao D.P, Braz J.D. 2006. *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera: Psyllidae): vector of the bacterium *Candidatus Liberibacter americanus*. **Proceedings of the Huanglongbing-Greening International Workshop**. Ribeirão Preto, SP. p. 96.