

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

FABIO LUIS DOS SANTOS

Relação entre psílídeos *Diaphorina citri* Kuwayama infectivos e a incidência de Huanglongbing em Pirassununga e Leme - SP

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

Orientador:

Diva do Carmo Teixeira

Co-orientador:

Pedro Takao Yamamoto

ARARAQUARA
OUTUBRO-2011

FABIO LUIS DOS SANTOS

Relação entre psílídeos *Diaphorina citri* Kuwayama infectivos e a incidência de Huanglongbing em Pirassununga e Leme - SP

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

Orientador:
Diva do Carmo Teixeira

Co-orientador:
Pedro Takao Yamamoto

Araraquara
2011

FABIO LUIS DOS SANTOS

Relação entre psílídeos *Diaphorina citri* Kuwayama infectivos e a incidência de Huanglongbing em Pirassununga e Leme - SP

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

Araraquara, 28/10/2011

BANCA EXAMINADORA

Dra. Diva do Carmo Teixeira
Fundecitrus

Dr. Nelson Arno Wulff
Fundecitrus

Dr. Rodrigo Neves Marques
Esalq – USP

Dedicatória

Dedico este trabalho a toda minha família:

A meu pai, que sempre com muita honestidade e simplicidade me ensinou as coisas mais simples da vida;

A minha esposa, que acreditou na minha dedicação e esforço e que me apoiou em mais essa etapa incondicionalmente;

Aos meus filhos, Bi e Mi que embora ainda não entendam a sua importância são a razão para que dia após dia eu siga em frente buscando o melhor;

E por fim, dedico a minha finada mãe que sempre me mostrou que nunca é tarde para se fazer o que se quer, e que a única pessoa que pode nos impedir de realizarmos nossos sonhos somos nós mesmos.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente aos funcionários das propriedades de Leme e Pirassununga pelo esforço e dedicação, pois sem o apoio dessas pessoas este trabalho nunca teria sido realizado, agradeço ainda ao proprietário das fazendas, por ter aberto suas portas para a realização deste estudo;

Agradeço também aos funcionários do Laboratório do Fundecitrus: Elaine Cristina Martins, Daniela Aparecida Bonoti Coletti, Juliana Abreu Sampaio, Deividson Fernandes Rodrigues, Eder Alexandre Souza, Fernanda Alves Queirós Benedito, Sidnei Ferreira Alkimin e Jean Michel Martins;

Agradeço ao gerente do Dep Técnico Cícero Augusto Massari

Agradeço ao Fundecitrus por ter me possibilitado a realização deste curso e deste trabalho;

Agradeço aos colegas Dr. Rodrigo Neves Marques e Dr. Nelson Arno Wulff por terem aceitado participarem deste trabalho como banca examinadora e que muito acrescentaram com suas experiências e conhecimento.

Agradeço ainda ao Dr. Pedro Takao Yamamoto como co-orientador e como colega de trabalho que muito me ensinou nos últimos anos

Agradeço por fim a minha orientadora que com muita paciência e dedicação me ensinou muito ao longo deste trabalho, Dra Diva do Carmo Teixeira.

Resumo

A doença Huanglongbing (HLB) é conhecida mundialmente como a pior doença já encontrada nos citros. Foi detectada no Brasil em 2004, ocorrendo as formas asiática (*Candidatus Liberibacter asiaticus* – *Ca. L. asiaticus*) e americana (*Candidatus Liberibacter americanus* - *Ca. L. americanus*). O inseto *Diaphorina citri*. (*D. citri*) é o vetor de ambas as formas da bactéria que tem a forma asiática espalhando-se rapidamente no estado de São Paulo. Atualmente a doença (ambas as bactérias) já atinge 3,8% das árvores dos pomares paulistas, o que corresponde à erradicação de 7,6 milhões de árvores apenas no ano de 2011. O manejo da doença está atualmente apoiado na erradicação de plantas doentes, na supressão do vetor através da aplicação de inseticidas, plantio de mudas saudáveis e manejo regional. A disseminação da doença depende não só da população total de insetos, mas também da população de insetos infectivos nessa população. Assim, tendo em vista a importância do vetor na epidemiologia da doença, faz-se necessário um estudo que mostre se existe uma correlação entre a população de *D. citri* e a presença de plantas sintomáticas. Desta maneira o presente trabalho teve como objetivo verificar a presença de correlação entre a população de psílidos infectivos e a população de plantas sintomáticas, e/ou a correlação entre a proporção de insetos infectivos e a proporção de plantas sintomáticas em duas propriedades situadas nos municípios de Leme - SP e Pirassununga - SP. Nas propriedades, foram realizadas coletas semanais de psílidos e foram inspecionadas as plantas quanto à presença de sintomas do HLB. Os insetos encontrados foram analisados através de PCR convencional para a detecção de *Ca. L. asiaticus* e *Ca. L. americanus*. Também foi usado o método de PCR em Tempo Real (PCR-TR) na detecção da *Ca. L. asiaticus*, que mostrou maior sensibilidade em relação ao método convencional, sendo sua detecção 3 vezes superior ao método PCR convencional. A presença de *Ca. L. americanus* não foi detectada, embora não tenham sido realizadas análises por PCR-TR para essa bactéria, mostrando a redução da presença desta bactéria em comparação com a *Ca. L. asiaticus*. A correlação entre a população de insetos infectivos e o número de plantas sintomáticas foi feita através de quatro testes para cada uma das propriedades estudadas, utilizando o programa Assistat. O presente estudo mostrou não haver correlações entre as variáveis estudadas a 5% de probabilidade, ou seja, nem em números absolutos nem em proporções se encontrou correlação entre a população de psílidos infectivos e a quantidade de plantas sintomáticas presentes nas áreas estudadas. Isso pode estar relacionado com o período de incubação da bactéria que é relativamente longo (6 a 12 meses) com inoculação via enxertia, bem como a baixa amostragem de psílidos realizada rotineiramente nas propriedades. Dessa maneira o presente trabalho mostra a importância de se realizar controle em larga escala do inseto a fim de se reduzir a população deste vetor independentemente de uma área ter mais ou menos plantas sintomáticas e ou psílidos infectivos.

Palavras Chave: *Candidatus Liberibacter* sp., inseto vetor, Greening, doença bacteriana

Abstract

The disease Huanglongbing (HLB) is known worldwide as the worst disease ever found in citrus fruit. It was detected in Brazil in 2004 and two forms of the disease are present: Asian (*Candidatus Liberibacter asiaticus* – *Ca. L. asiaticus*) and American (*Candidatus Liberibacter americanus* *Ca. L. americanus*) forms. The insect *Diaphorina citri* was found to be the vector of both forms and the disease has spread rapidly and today it has already reached 3.8% of the trees of the orchards in São Paulo, which corresponds to the eradication of 7.6 million trees, only in 2011. The management of this disease is currently supported in the eradication of diseased plants, the suppression of the vector through the application of insecticides, planting of healthy seedlings and regional management. The spread of the disease depends not only of the total population of insects, but also the population of infective insects in this population. Thus, in view of the importance of the vector in disease epidemiology, it is necessary a study that shows if there is a correlation between the population of *D. citri* and the presence of symptomatic plants. Thus the present work had as objective to verify the presence of correlation between the population of infective psyllids and symptomatic plant population and / or the correlation between the proportion of infective insects and the proportion of symptomatic plants in two properties located in different in Leme - SP and Pirassununga - SP. In the properties, collections of psyllids were made weekly and plants inspected for the presence of symptoms of HLB. The insects were analyzed by conventional PCR for detection of *Ca. L. asiaticus* and *Ca. L. americanus*. Real Time PCR was also used for detection of *Ca. L. asiaticus*, which showed a higher sensitivity compared to conventional method, being 3 times higher than the conventional PCR. The presence of *Ca. L. americanus* was not detected, although the Real Time PCR was not used to detect these bacteria, showing reduction of the presence of this bacteria in comparison with the *Ca. L. asiaticus*. The present essay has shown that there no correlation between the studied variables, at 5 % of probability, in other words, not in absolute number or even in proportion was found correlation between infective insect population and the number of symptomatic plants present in de studied fields. This can be related with the period of incubation of the bacteria that is relative long (6 to 12 months) incubation by grafting, as well with the low psyllids sampling generally made by the farms. This way, the present essay reports the importance of widespread psyllid control to reduce this vector population being the area with more or less symptomatic plants and or infective psyllids.

Key words: *Candidatus Liberibacter* sp., insect vector, Greening, bacterial disease

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
2.1. LOCALIZAÇÃO E CARACTERÍSTICAS DAS PROPRIEDADES ESTUDADAS.....	11
2.2. COLETA DE INSETOS E INSPEÇÕES VISUAIS	13
2.3. EXTRAÇÃO DE DNA DE D. CITRI	15
2.3.1. Determinação do método de maceração de psílídeos para extração de DNA de liberibacters	15
2.3.2. Quantificação do DNA e avaliação por PCR das amostras de plantas fonte ..	16
2.4. EXTRAÇÃO DE DNA DOS INSETOS COLETADOS EM CAMPO	16
2.5. PCR PARA AS AMOSTRAS DE CAMPO.....	17
2.5.1. PCR convencional para as amostras de campo	17
2.5.2. PCR-TR para as amostras de campo	17
2.6. CORRELAÇÃO ENTRE D. CITRI E INCIDÊNCIA DE HLB	18
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
3.1. AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS DE MACERAÇÃO DE PSILÍDEOS PARA EXTRAÇÃO DE DNA DE LIBERIBACTERS.....	20
3.2. PCR PARA AS AMOSTRAS DE CAMPO.....	22
3.2.1. PCR convencional para as amostras de campo	22
3.2.2. PCR-TR para as amostras de campo	23
3.3. CORRELAÇÃO ENTRE INSETOS D. CITRI INFECTIVOS E HLB	30
4. CONCLUSÕES	36
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37

1. INTRODUÇÃO

O Huanglongbing (HLB) é uma doença associada à patógenos transmitidos por insetos vetores, conhecida há muitos anos nos continentes Africano e Asiático, tendo sido sua ocorrência relatada no estado de São Paulo em 2004 (Coletta - Filho *et al.*, 2004., Teixeira *et al.*, 2005a; 2005b; 2005c). Desde então, a doença vem se expandindo para outros países produtores de citros, como Estados Unidos, Cuba, República Dominicana, Belize e México mais recentemente, Teixeira *et al.*, 2010.

O HLB está associado às bactérias de floema, pertencentes ao gênero *Candidatus Liberibacter*, e que segundo Bové, 2006, ainda não foram cultivadas “in vitro”: *Candidatus Liberibacter asiaticus* (*Ca. L. asiaticus*), *Candidatus Liberibacter africanus* (*Ca. L. africanus*) e *Candidatus Liberibacter americanus* (*Ca. L. americanus*), entretanto, Davis *et. al.*, 2008, e Sechler *et al.*, 2009, relatam ter conseguido o cultivo em meio de cultura.

No Brasil foram identificadas apenas as espécies *Ca. L. americanus* e *Ca. L. asiaticus*, com uma presença crescente e mais significativa de *Ca. L. asiaticus*, que em 2009 representava 96% das 11000 amostras analisadas no laboratório do Fundecitrus, Texeira *et al*, 2010.

Recentemente, Teixeira *et al.* (2008a) descreveram a associação de zum fitoplasma com os sintomas do HLB. Este apresentou 99% de identidade com o “Pigeon Pea Witches’ broom Phytoplasma” pertencente ao grupo 16SrIX, com base na obtenção da sequência do DNA ribossomal 16S. Chen *et al.*,2009, mostraram a ocorrência de um outro fitoplasma (16SrI-B) em associação com o HLB em regiões produtoras de laranja na China.

Até hoje a caracterização de *Ca. Liberibacter* spp. e fitoplasmas tem sido feita por meio de técnicas moleculares, devido a dificuldade de cultivo desses organismos. A caracterização molecular das bactérias do HLB (Jagoueix *et al.*, 1994; Jagoueix *et al.*, 1996; Hocquellet *et al.*, 1999; Teixeira *et al*, 2005a; 2005b; 2005c; Teixeira *et al*, 2008a) possibilitou a detecção e diagnose tanto em materiais vegetais como em insetos. Assim, foram desenvolvidos “primers” para a região do DNAr 16S e operon *rpI/KAJL-rpoB* (operon beta).

Sondas de DNA também podem ser usadas na detecção de *Ca. liberibacter* em insetos (Villechanoux *et al.*, 1992; Planet *et al.*, 1995; Hocquellet *et al.*, 1997).

O PCR desenvolvido por Jagoueix *et al.* (1996), resulta na amplificação de um fragmento de 1160 pares de base (pb) tanto para a combinação de “primers” Oi1 / Oi2c (específica para *Ca. L. asiaticus*) como para OA1 / Oi2c (específica para *Ca. L. africanus*),

devendo entretanto a diferenciação entre *Ca. L. asiaticus* e *Ca. L. africanus* ser feita por meio da restrição com a enzima *Xba* I. Por outro lado o PCR baseado na sequência do operon *rplKAJL-rpoB* de *Ca. L. asiaticus* e *Ca. L. africanus* tornou possível a diferenciação das duas formas tendo por base apenas o tamanho do produto amplificado. Estes “primers” denominados A2 (“forward” - selecionado na região do gene *rplA*) e J5 (“reverse” - região do gene *rplJ*) amplificam um produto de 703 pb para *Ca. L. asiaticus* e 669 pb para *Ca. L. africanus*, em uma única reação (Hocquellet *et al.*, 1999).

No Brasil, a caracterização de uma nova espécie de *Ca. Liberibacter* associada ao HLB, *Ca. L. americanus* (Teixeira *et al.*, 2005c), também resultou na obtenção de “primers”, específicos para a diagnose desta bactéria, denominados GB1 (“forward”) e GB3 (“reverse”), obtidos com base na sequência do DNA ribossomal 16S (Teixeira *et al.*, 2005a; Teixeira *et al.*, 2005b), sendo empregados em trabalhos de detecção da bactéria em plantas e insetos. Recentemente, uma reação de PCR multiplex foi desenvolvida para a detecção rotineira das três espécies de *Ca. Liberibacter* em uma única reação contendo os pares de “primers” GB1/GB3 para a amplificação de *Ca. L. americanus* e A2/J5 para *Ca. L. asiaticus* / *Ca. L. africanus* (Teixeira *et al.*, 2009).

A PCR em tempo real (PCR-TR) é uma técnica que tem demonstrado certa vantagem em relação aos métodos convencionais, com maior sensibilidade, especificidade, rapidez e menor possibilidade de contaminação. Atualmente são amplamente usadas as sondas TaqMan ou a metodologia de SYBR Green, sendo o primeiro de maior especificidade, uma vez que a sonda usada também é específica para o DNA alvo.

A transmissão das liberibacters é realizada por psílideos: *Diaphorina citri* (*D. citri*) Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), de ocorrência nos países da Ásia e Américas, que transmitem a forma asiática e americana, e *Trioza erythrae* (Del Guercio) presente na África do Sul, transmissora da forma africana.

No Brasil, *D. citri* foi relatado no século XX (Costa Lima, 1942) sendo de ocorrência endêmica, registrada nos estados de São Paulo, Bahia, Sergipe, Ceará, Pernambuco, Amazonas, Pará e Rio de Janeiro.

No Brasil, tanto *Ca. L. asiaticus* como *Ca. L. americanus* são transmitidos por *D. citri* (Yamamoto *et al.*, 2006). O inseto adquire a bactéria enquanto se alimenta nos vasos de floema infectados (Hung *et al.*, 2004). Entretanto, no momento, a transmissão da bactéria para a progênie por meio dos ovos é controversa, pois enquanto afirmam não ocorrer, Pelz-Stelinski *et al.* (2010), afirmam ter resultados positivos obtidos nos EUA.

Desta maneira a redução da população deste inseto nos pomares é uma das estratégias de manejo da doença, bem como a redução da fonte de inóculo através da erradicação de plantas contaminadas (Bové, 2006).

Segundo Belasque et *al.*, 2009, o controle do HLB baseia-se na redução do inóculo através da eliminação de plantas sintomáticas e supressão de insetos vetores, bem como no plantio de mudas sadias, podendo ainda ser utilizadas medidas alternativas como a erradicação de murta (*Murraya paniculata*) que é um hospedeiro alternativo de *Ca. L. asiaticus* e *Ca. L. americanus*,), Lopes et *al.*(2005) e Lopes et *al.*(2006).

Sendo inclusive uma determinação do Ministério da Agricultura, Instrução Normativa nº 53 (IN 53), a inspeção e erradicação de plantas sintomáticas, no máximo com intervalo de três meses, reforçando assim a necessidade de se reduzir as fontes de inóculo.

Outro aspecto importante relativo ao HLB refere-se à velocidade de disseminação da doença por meio de insetos vetores infectivos. A porcentagem de transmissão do HLB depende não somente do número total de psilídeos em uma população, mas também da porcentagem de psilídeos infectados com o patógeno do HLB. A porcentagem de psilídeos nesta condição pode ser determinada pela técnica de PCR onde psilídeos infectivos são confirmados por meio de reações positivas. A informação gerada pode ser útil para o manejo da doença, já que esta determinação pode ser feita ao longo do ano.

Tendo em vista a importância do vetor na epidemiologia da doença, faz-se necessário um estudo que mostre se existe uma correlação entre a população de *D. citri* e a presença de plantas sintomáticas. Assim, este trabalho teve como objetivo verificar a correlação entre a população de plantas sintomáticas e a porcentagem de psilídeos infectados em propriedade de produção de citros. Os resultados discutidos neste trabalho servem de referência para o manejo da doença, contribuindo com os estudos epidemiológicos e a luta contra esta doença que afeta gravemente os pomares cítricos do estado de São Paulo.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Localização e características das propriedades estudadas.

As propriedades, localizadas nos municípios de Pirassununga - SP (21°59'09,45"S; 47°27'47,18"O) e Leme - SP (22°07'09,45"S, 47°13'22,16"O), apresentavam aproximadamente 60 mil plantas e 170 mil árvores no início do trabalho, respectivamente, e ambas estavam cercadas de pomares cítricos com manejos diversos para o HLB, mas de modo geral a tecnologia aplicada pelas fazendas ao redor era inferior ao que a doença exige, como número de inspeções abaixo das 10 realizadas nas fazendas em estudo ou mesmo com erradicações tardias, ou seja, apenas após a colheita de todas as frutas do talhão. Ainda em relação às propriedades vizinhas, na área de Leme havia três propriedades com produção de citros que possuem divisa com a propriedade em estudo destas uma não faz a erradicação de plantas sintomáticas e o monitoramento de *D. citri* não é realizado, sendo o controle do vetor realizado esporadicamente e indiretamente quando são realizadas aplicações de inseticidas para controle de outras pragas. A outra propriedade que faz divisa com a área em estudo realiza controle do vetor esporádico, entretanto, utiliza também coquetéis de fertilizantes com o intuito de adiar a erradicação de plantas sintomáticas detectadas enquanto que a terceira propriedade apresenta apenas pomares jovens e controle do vetor através de aplicações de sistêmicos, porém sem monitoramento da presença do vetor. Ainda em relação a área de Leme esta encontra-se em uma microrregião com menor incidência de HLB quando comparada a propriedade de Pirassununga que está localizada próximo das divisas com os municípios de Porto Ferreira e Descalvado onde a incidência é superior.

Quanto aos arredores da propriedade de Pirassununga, havia várias propriedades com citros que faziam divisa com a área em estudo e que foram erradicadas totalmente devido a grande quantidade de plantas sintomáticas com HLB, das propriedades que persistem com citros estas estão com pomares mais velhos e os proprietários, na sua maioria, não estão erradicando as plantas sintomáticas nem monitorando a presença do vetor, já o controle do *D. citri* é realizado indiretamente quando é realizada alguma aplicação com inseticida na área.

As propriedades estudadas por outro lado faziam aplicações sempre que era detectada a presença de *D. citri* na quadra (no mesmo dia ou no dia seguinte à detecção de indivíduos) ou quando as inspeções semanais não detectavam a presença de psíldeos dentro do mês e a aplicação era então feita preventivamente.

As áreas estudadas apresentavam pomares de diversas idades e variedades, sendo que ao longo do trabalho, talhões foram erradicados devido à idade ou perda de viabilidade econômica e novos talhões foram implantados nas áreas. De modo geral as duas propriedades estudadas tinham 90% da área plantada constituída pelas variedades de copa Hamlin, Pera Rio, Valência e Natal (Figuras 1A e 2A), sendo o porta-enxerto predominante o Limão Cravo, entretanto, também eram empregados os porta-enxertos tangerineiras Cleópatra e Sunki, *Poncirus trifoliata* e citrumeleiro Swingle (Figuras 1B e 2B). Em ambas as propriedades havia talhões com idade superior a 30 anos.

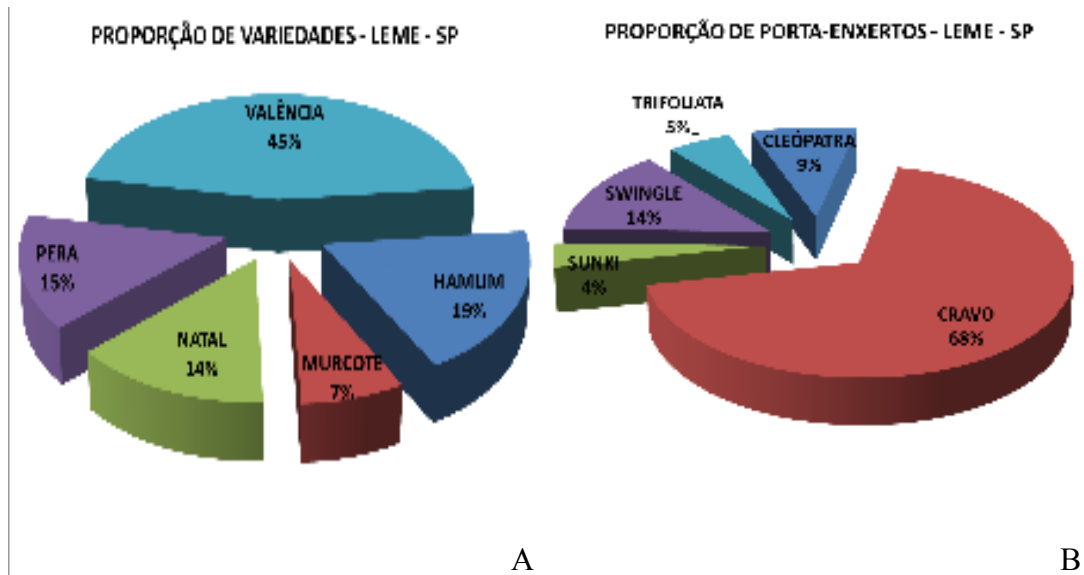


Figura 1: Proporção de variedades de copa (A) e proporção de espécies e híbridos de porta-enxertos (B) utilizados na propriedade de Leme - SP.

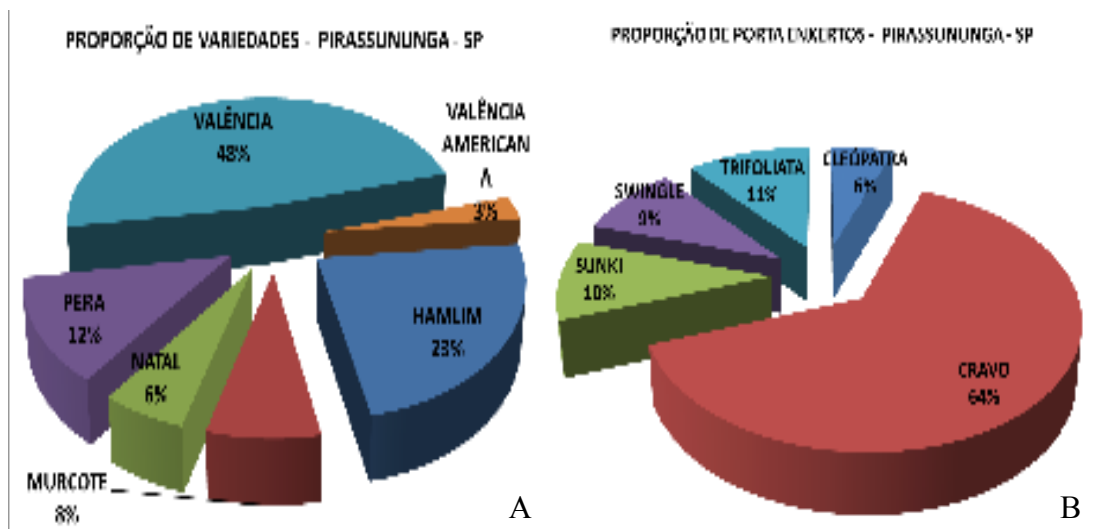


Figura 2: Proporção de variedades de copa (A) e proporção de espécies e híbridos de porta-enxertos (B) utilizados na propriedade de Pirassununga - SP.

2.2. Coleta de insetos e inspeções visuais

As coletas de psilídeos foram feitas num período de 17 meses, iniciadas no mês de outubro de 2009 e finalizadas no mês de fevereiro de 2011, sendo realizadas semanalmente durante a inspeção visual de 1% das plantas de cada talhão pelos pragueiros, devidamente treinados, das próprias fazendas com o auxílio de sugadores (Figura 3A e 3B). Os insetos

capturados eram colocados em tubos “ependorf” de 1,5 mL mergulhados em etanol 70% até o encaminhamento das amostras ao laboratório de Pesquisa e Diagnóstico do Fundecitrus, localizado no município de Araraquara - SP. Lá, os mesmos eram armazenados a -20°C até o momento da separação e extração de DNA.

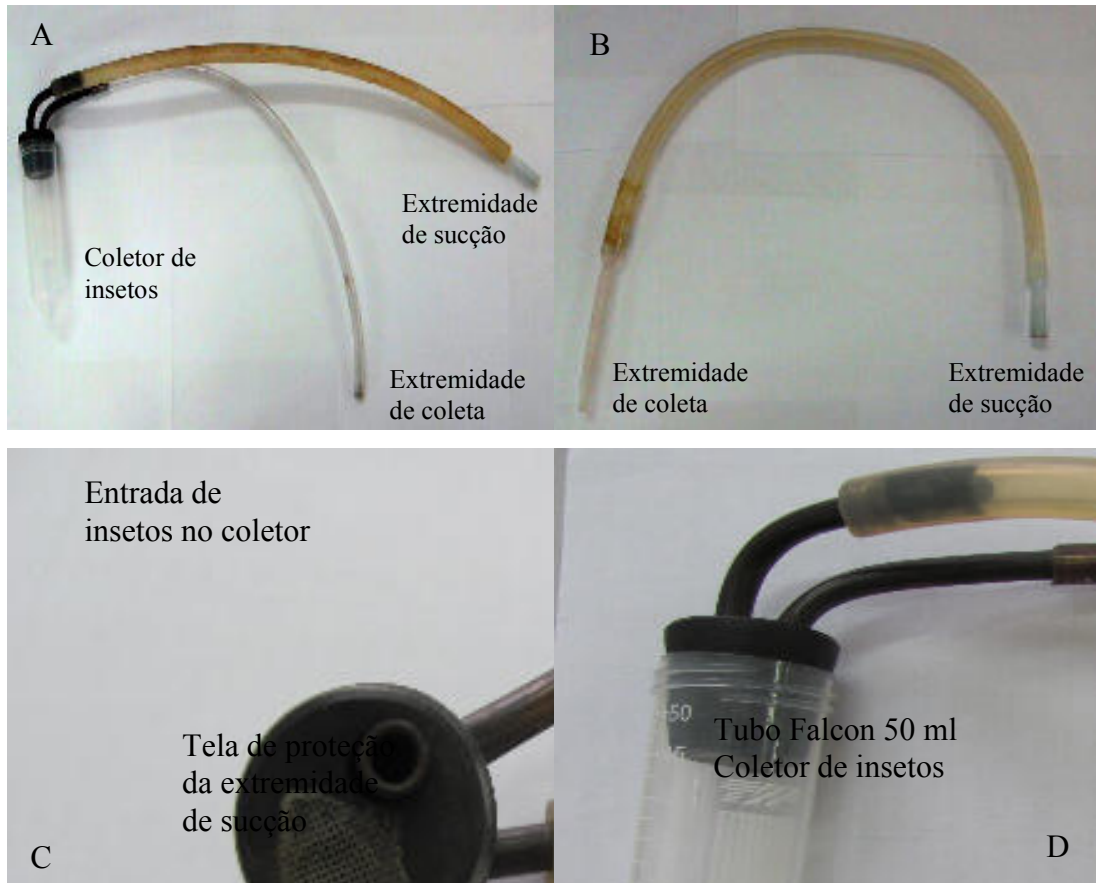


Figura 3: Sugador bucal com coletor de insetos A, Sugador bucal sem coletor B, detalhe do sugador bucal com coletor de insetos (entrada de insetos e tela de proteção da extremidade de sucção) C, coletor de insetos do sugador bucal com coletor D.

Também foram realizadas inspeções visuais de plantas com HLB em todos os talhões das propriedades pelos inspetores das próprias fazendas. Estas inspeções eram realizadas a pé, ou embarcadas em plataformas no caso de pomares adultos ou de grande porte. As plantas com sintomas característicos foram eliminadas das quadras e contabilizadas, já as plantas com sintomas duvidosos eram acompanhadas para a confirmação dos sintomas e/ou eram coletadas amostras de folhas para que fossem realizadas análises por PCR.

2.3. Extração de DNA de *D. citri*

2.3.1. Determinação do método de maceração de psilídeos para extração de DNA de *liberibacters*

A fim de se estabelecer o método de extração de DNA, 30 insetos provenientes de plantas fontes de *Ca. L. asiaticus* e que permaneceram em confinamento por 3 semanas, para aquisição deste patógeno, foram utilizados. Estes insetos foram separados em 2 grupos, sendo as extrações feitas com insetos individuais, seguindo o protocolo de Murray & Tompson (1980). A variação do método ocorreu na etapa inicial da extração, sendo que o primeiro grupo de insetos (T1 a T15) foi macerado diretamente em 400 μ L de tampão de extração CTAB (Tris-HCl 1M pH 8 - 100mL; CTAB - 20 gramas; NaCl - 82g; PVP 10 - 20g; H₂O - 400mL), contendo 0,2% de β -mercaptoetanol. O segundo grupo (T16 a T30) foi macerado em eppendorf após congelamento em nitrogênio líquido, acrescentando-se o tampão CTAB (400 μ L) em seguida.

Após maceração, todas as amostras foram incubadas em banho-maria a 65°C por um período de 30 minutos. O tampão juntamente com o β -mercaptoetanol proporciona a solubilização das membranas lipoproteicas com a liberação do conteúdo intracelular, a desnaturação de enzimas como peroxidases e a prevenção da degradação do DNA pela ação de enzimas como DNAses. Por outro lado, o aquecimento facilita a solubilização e homogeneização da suspensão.

Após a incubação, a suspensão foi centrifugada a 956 RCF (Relative Centrifugal Force) por 5 minutos a fim de separar as fases aquosa (DNA) e orgânica (resíduos, lipídeos, proteínas, polissacarídeos). Em seguida, 350 μ L do sobrenadante foram recuperados para um novo tubo, onde se adicionou o mesmo volume de clorofórmio-isoamil (24:1). Após homogeneização em vortex os tubos foram centrifugados a 15.249 RCF por 10 minutos. Recuperou-se 300 μ L do sobrenadante e acrescentou-se 0,6 volumes de isopropanol (180 μ L) para precipitação do DNA através de incubação em freezer -20°C por 30 minutos. Após esse tempo o sobrenadante foi descartado e o “pellet” lavado com 700 μ L de etanol 70%, com uma centrifugação a 15.249 RCF por 10 minutos. Após descarte do etanol, repetiu-se o processo de centrifugação. Em seguida os tubos contendo o DNA foram secos em “speed vac” por 6 minutos e o DNA ressuspense em 25 μ L de água milli Q.

2.3.2. Quantificação do DNA e avaliação por PCR das amostras de plantas fonte

Em seguida, o DNA de ambos os grupos foram quantificados em NanoDrop (ND 1000 V 3.7.1) e diluídos para uma concentração final de 20ng/μL. Cinco microlitros (100ng) foram utilizados em reações de PCR convencional e PCR em Tempo Real (PCR-TR).

As análises dos insetos T1 a T30 (Item 2.3.1) foram feitas utilizando o PCR duplex descrito por Teixeira *et al.* 2009. Cada reação foi feita utilizando-se 5μL de DNA de cada amostra preparada na concentração de 20ng/μL. A reação consistiu de uma desnaturação inicial de 92° C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos de: 94°C por 30 segundos para desnaturação, 62°C por mais 30 segundos para o anelamento e finalizando a extensão com 1 minuto a 72°C.

Após a PCR as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE, com voltagem constante (100 volts) durante aproximadamente uma hora. A visualização do gel foi feita em transiluminador de luz ultravioleta, após coloração em solução de brometo de etídeo a 10mg/mL.

2.4. Extração de DNA dos insetos coletados em campo

Os insetos provenientes do campo foram separados individualmente em tubos “eppendorf” de 1,5ml, classificadas conforme a data de coleta, o talhão, propriedade de origem e estágio de desenvolvimento (adultos ou ninfas). Em seguida os insetos foram armazenados a -20 °C, até o momento da extração.

As extrações foram realizadas seguindo o protocolo descrito no item 2.3.1., empregando-se o método de maceração diretamente em tampão CTAB. O DNA foi quantificados em NanoDrop e em função dos valores encontrados, diluídos em sua maioria na concentração final de 20ng/μL para uso nas análises por PCR. Amostras que apresentaram leituras entre 10 e 18ng/μL não foram diluídas. Estes dois grupos perfizeram um total de 883 amostras de insetos com extrações individualizadas.

Outras 164 amostras com concentração de até 10ng/μL foram transformadas em “pool”, gerando 19 amostras, agrupadas desde que tivessem mais de uma amostra simples da mesma data de coleta e do mesmo talhão. Resumidamente, os conteúdos de cada agrupamento tiveram o DNA precipitado pela adição de 0,1 volume de acetato de sódio e 2 volumes de etanol 100 %, com incubação a -20° C por 24 horas no mínimo. Após recuperação do DNA

por centrifugação, o mesmo foi lavado com etanol 70% e ressuspenso em 25µL de água milli Q e quantificado em Nano Drop. Das 19 amostras obtidas neste processo, 17 apresentaram concentração de DNA inferior a 18ng/µL, e assim não foram diluídas para a reação de PCR, enquanto duas amostras, com concentrações maiores, foram diluídas para 20ng/µL. Assim, a concentração final destas amostras variou de 1 a 20ng/µL.

2.5. PCR para as amostras de campo.

2.5.1. PCR convencional para as amostras de campo

As amostras foram analisadas para a presença de *Ca. Liberibacter* spp. utilizando-se o protocolo de PCR duplex com os “primers” GB1/GB3 e A2/J5 (Teixeira *et al* 2009), para *Ca. L. americanus* e *Ca. L. asiaticus*, respectivamente. Cada reação foi feita utilizando-se 5µL de DNA de cada amostra preparada na concentração de 20ng/µL ou 10µL para as amostras nas concentrações entre 1 e 18ng/µL (item 2.4).

Assim, as reações foram feitas com quantidades de DNA na reação variando de 10 a 200ng.

As condições de PCR convencional e eletroforese foram realizadas conforme protocolo já descrito no item 2.3.2.

2.5.2. PCR-TR para as amostras de campo

As amostras foram analisadas para a presença de *Ca. L. asiaticus*, utilizando-se 5µL de DNA de cada amostra sendo que a quantidade de DNA na reação variou de 5ng a 100ng, em função das concentrações das amostras (item 2.4).

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. Para cada reação foram utilizados 5µL de DNA, Master Mix [1X], “primers” HLBas forward (5' TCGAGCGCGTATGCAATACG 3'), HLBr reverse (5' GCGTTATCCCGTAGAAAAAGGTAG 3') a 0,5µM cada e sonda HLBp (FAN AGACGGGTGAGTAACGCG MGB-NFQ) a 0,2µM (Li *et al.*, 2006), em um volume final de 15µL de reação. As amostras foram feitas em duplicata.

Os controles consistiram de amostras: positiva (insetos com a presença de *Ca. L. asiaticus*) sadia (insetos sem a presença de *Ca. L. spp*) e água (controle do mix; sem adição de DNA), estes também foram utilizados em duplicata.

2.6. Correlação entre *D. citri* e incidência de HLB

Para a área de Leme, a correlação entre insetos infectivos e a incidência de HLB foi feita mensalmente, quadra a quadra. Já na área de Pirassununga os dados foram correlacionados da mesma maneira, porém, trimestralmente, devido à indisponibilidade de dados mensais. Outra análise feita para cada propriedade foi a de correlacionar todos os insetos infectivos com o acumulado de plantas com HLB erradicadas em cada quadra durante todo o período de coleta dos psíldeos (17 meses), Tabela 1.

As plantas sintomáticas como citado no item 2.1. foram levantadas ao longo do período do trabalho pelos inspetores das próprias fazendas, sendo que estas plantas foram tabuladas quadra a quadra e agrupadas por período, mensal (Leme) ou trimestral (Pirassununga).

Para a análise dos dados foi utilizado o programa Assistat, onde foi realizado o teste de correlação simples entre as variáveis.

Tabela 1: Resumo das análises aplicadas nos estudos de correlação entre insetos *D. citri* infectivos e plantas sintomáticas.

Período	Leme	Período	Pirassununga
Mês a mês	Psilídeos infectivos X Plantas sintomáticas	Trimestral	Psilídeos infectivos X Plantas sintomáticas
Total	Psilídeos infectivos X Plantas sintomáticas	Total	Psilídeos infectivos X Plantas sintomáticas
Mês a mês	Proporção de psilídeos infectivos X Proporção de plantas sintomáticas	Trimestral	Proporção de psilídeos infectivos X Proporção de plantas sintomáticas
Total	Proporção de psilídeos infectivos X Proporção de plantas sintomáticas	Total	Proporção de psilídeos infectivos X Proporção de plantas sintomáticas

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Avaliação dos métodos de maceração de psilídeos para extração de DNA de liberibacters

Da quantificação das amostras de DNA obtidas dos insetos T1 a T30 (item 2.3.1), verificou-se que aquelas obtidas a partir da maceração direta em tampão de extração (T1 a T15) resultaram em maiores concentrações de DNA, o que representou rendimento de 21% a mais na concentração média (ng/ μ L) de DNA obtido. Este resultado levou à adoção deste método (sem o uso de nitrogênio) como padrão para a extração de DNA dos insetos provenientes das coletas em campo.

Estas amostras de DNA foram usadas para análises pelo método de PCR convencional. As análises mostraram que 8 das 15 amostras (53,33%) obtidas em ambos os métodos apresentaram resultados positivos para *Ca. L. asiaticus*. Porém, as amostras positivas pelo método de extração direta em tampão CTAB resultaram em ampliações com intensidade de bandas maior (Figuras 4 e 5). Este resultado confirmou, de certa forma, que o método de extração direto em tampão foi superior àquele que emprega maceração prévia em nitrogênio. Tal resultado pode ser pelo fato da maceração ser feita diretamente no tampão, proporcionando uma melhor “proteção” do DNA contra a ação de enzimas degradativas como DNAses, peroxidases e oxidases.

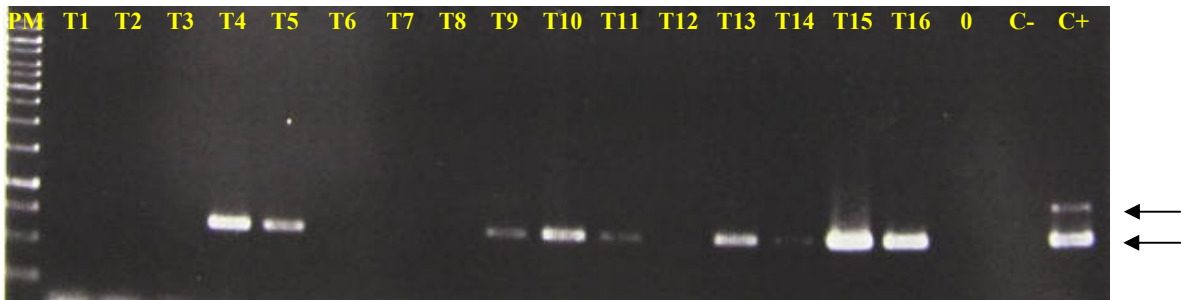


Figura 4: Eletroforese em gel de agarose 1%, mostrando resultado de PCR para as amostras T1 a T16. T1 a T15: DNA de inseto obtido através de extração direta em tampão CTAB. Amostras positivas: T4, T5, T9, T10, T11, T13 e T15; T16: DNA de inseto obtido através de extração após maceração em nitrogênio líquido, amostra positiva; 0: controle negativo (água); C-: controle negativo (DNA de planta sadia); C+: controle positivo (DNA de planta infectada por *L. asiaticus* e *L. americanus*. PM: marcador de peso molecular 1Kb. As setas superior e inferior indicam, respectivamente, as amplificações para o controle positivo: *Ca. L. americanus* (1027pb) e *Ca. L. asiaticus* (703pb).

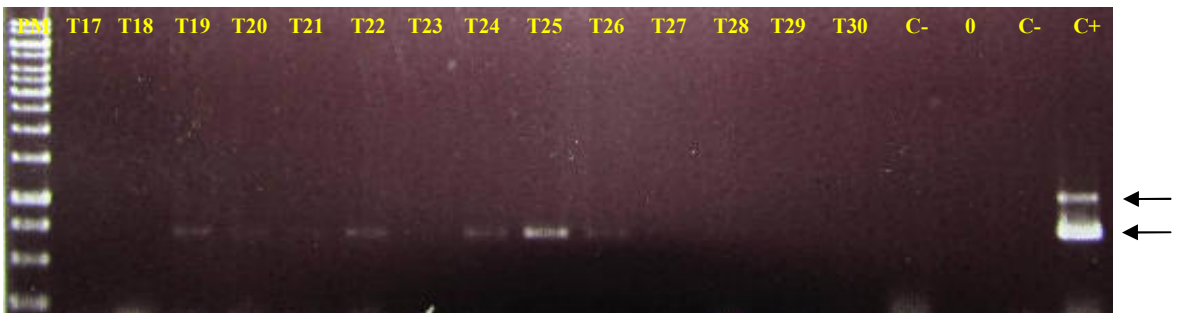


Figura 5: Eletroforese em gel de agarose 1%, mostrando resultado de PCR para as amostras T17 a T30: DNA de inseto obtido através de extração após maceração em nitrogênio líquido. Amostras positivas T19, T20, T21, T22, T24, T25 e T26; 0: controle negativo (água); C-: controle negativo (DNA de planta sadia); C+: controle positivo (DNA de planta infectada por *L. asiaticus* e *L. americanus*. PM: marcador de peso molecular 1Kb. As setas superior e inferior indicam, respectivamente, as amplificações para o controle positivo: *Ca. L. americanus* (1027pb) e *Ca. L. asiaticus* (703pb).

3.2. PCR para as amostras de campo

3.2.1. PCR convencional para as amostras de campo

Dos 1.047 insetos coletados nas duas propriedades estudadas, nenhuma amostra apresentou resultado positivo para *Ca. L. americanus*, mas sim para *Ca. L. asiaticus*. Esses dados, de certa maneira, corroboram com aqueles verificados nos últimos anos, onde vem se verificando uma diminuição da proporção de plantas infectadas por esta bactéria em relação a *Ca. L. asiaticus*, com uma inversão na ocorrência das liberibacters presentes no estado de São Paulo a partir de 2006. Já em 2009 a presença de *Ca. L. asiaticus* detectado por PCR convencional em plantas era de 96% (Teixeira *et al.*, 2010).

Das 883 amostras de insetos individuais analisadas por PCR convencional apenas 47 resultaram positivas para *Ca. L. asiaticus*, sendo 11 amostras da propriedade de Leme e 36 amostras da propriedade localizada em Pirassununga. Mesmo a PCR sendo um método bem sensível, tal resultado pode ser devido a um título muito baixo de bactéria nos insetos, de maneira que a detecção não ocorre, resultando em falsos negativos. Segundo Coletta-Filho e Carlos (2010) muitas vezes somente a PCR convencional não é suficientemente sensível para diagnosticar liberibacters nos hospedeiros (plantas e psíldeos), principalmente nos estágios iniciais de infecção. Ainda, como a concentração destas amostras variou de 10 a 20ng/μL, de maneira que a concentração final de DNA na reação fosse de 100ng a 200ng, isto não seria suficiente para provocar efeito inibitório da reação de PCR, fortalecendo a idéia da não detecção devido a um baixo título de bactéria na amostra usada. Por outro lado, não foi possível realizar as reações de PCR com uma concentração maior de DNA, uma vez que a maioria das amostras apresentou concentrações de DNA inferior a 100ng/μL, assumindo-se trabalhar com a concentração de 20ng/μL, que representaria a maioria das amostras. Tal dificuldade caracterizou uma desvantagem em se trabalhar com amostras de insetos individualizados.

As 19 amostras resultantes do agrupamento de 164 amostras acabaram por conter quantidades variáveis de insetos agrupados, já que cada amostra composta deveria conter insetos com a mesma data de coleta e ser da mesma quadra. A análise destas amostras pelo PCR convencional não apresentou resultados positivos para *Ca. L. asiaticus* ou *Ca. L. americanus*. Neste caso, os resultados negativos podem ter sido pelo baixo título de bactérias

nas amostras ou ainda por baixa concentração de DNA empregada na reação (14 de 19 amostras apresentaram concentração inferior a 8 ng/ μ L ou 80ng de DNA na reação).

3.2.2.PCR-TR para as amostras de campo

Devido ao baixo número de insetos infectivos nas análises realizadas por PCR convencional, as mesmas amostras foram avaliadas por PCR-TR para *Ca. L. asiaticus*, tendo sido consideradas positivas aquelas amostras que apresentaram valor de Ct de até 35 (análise qualitativa), para *Ca. L. americanus* não foram realizadas as análises de PCR-TR devido a redução na proporção desta bactéria como já citado no item 1, bem como pela ausência de amostras positivas para essa espécie nas análises por PCR convencional. O valor de Ct de até 35 foi adotado após análise da reação de PCR-TR onde se empregou a diluição seriada de uma amostra sabidamente positiva para *Ca. L. asiaticus*.

As concentrações de DNA nas diluições da amostra positiva para *Ca. L. asiaticus* compreenderam: 100ng/ μ L, 20ng/ μ L, 10ng/ μ L, 1ng/ μ L, 0,1ng/ μ L, 0,01ng/ μ L e 0,001ng/ μ L, sendo que na reação 5 μ L de cada diluição foi usado (em triplicata), e assim, as quantidades de DNA por reação corresponderam a 500ng, 100ng, 50ng, 5ng, 0,5ng, 0,05ng e 0,005ng, respectivamente. Obteve-se reação positiva até a sexta diluição (0,05ng de DNA) com valor de Ct médio igual a 34,4 (para duas de três réplicas) (Tabela 2).

Ou seja, para a curva padrão utilizou-se uma diluição seriada 1/10, empregando quantidades de DNA relativas a 10pg até 0,001fg correspondendo a $1,1 \times 10^7$ cópias de liberibacter até 1,1 cópias de liberibacter, respectivamente. Por meio desta curva padrão o LOD (menor concentração que pôde ser detectada) foi igual a $1,1 \times 10^3$ cópias, e ainda que o trabalho não tivesse o objetivo de quantificar as amostras positivas em PCR, através da reta obtida, verificou-se através da curva padrão que o LOQ (Limite de Quantificação = menor quantidade de analito que pode ser quantificado) foi também igual a $1,1 \times 10^3$ cópias, tendo em vista a baixa eficiência da PCR (77,5%) (dados não apresentados).

Tabela 2: Relação entre quantidade de DNA infectado, quantidade de bactérias e valor de Ct médio.

Amostra	ng de DNA infectado	Número de bactérias	Valor de Ct médio
1	500ng	$1,71 \times 10^6$	19,8
2	100ng	$0,61 \times 10^6$	21,7
3	50ng	$0,34 \times 10^6$	22,7
4	5ng	$0,36 \times 10^5$	26,9
5	0,5ng	$0,40 \times 10^4$	31
6	0,05ng	$0,63 \times 10^3$	34,4
7	0,005ng	—	Indeterminado

Ainda, para se verificar a sensibilidade ou o Limite de Detecção (LOD) do teste empregado, uma curva padrão foi obtida pelo uso de plasmídeo (pGem T easy) clonado com um fragmento de *Ca. L. asiaticus* contendo a sequência alvo de amplificação (dados não apresentados).

Dessa forma quando realizadas as análises através de PCR-TR, das 883 amostras totais avaliadas individualmente, o número de insetos positivos passou de 47 pelo método convencional para 152, mostrando que um número maior de insetos infectivos pôde ser detectado pela técnica de PCR em Tempo Real (incremento de 223,40%). Estratificando por propriedade, em Leme o número de insetos positivos passou de 11 para 69 (incremento de 527,27%), enquanto que em Pirassununga o número passou de 36 para 83 insetos positivos para a bactéria *Ca. L. asiaticus* (incremento de 130,55%). Essa diferença pode ser explicada pela diferença no título da bactéria das duas áreas, sendo que na área de Pirassununga o Ct médio das amostras positivas foi de 28,8 enquanto que na área de Leme o Ct médio foi igual a 31,91

Já para as 19 amostras analisadas em pool (item 3.2), nenhuma foi positiva por PCR convencional, enquanto no PCR-TR, 10 amostras apresentaram-se positivas. A tabela 3 mostra os valores de Ct médios obtidos para as amostras de insetos consideradas positivas: 10 para a propriedade de Leme.

Tabela 3: Relação de amostras positivas pelos métodos PCR-TR para amostras do “pool”, propriedades de Leme e Pirassununga, Talhão de origem, quantidade de amostras simples agrupadas e Ct médio encontrado.

Propriedade	Talhão	Data	Quantidade de amostras	PCR-TR: HLBas forward - HLBr reverse (valor médio de Ct)
Leme	18	10/12/2009	3	-
Leme	27F	22/02/2010	16	34,2
Leme	28D	22/02/2010	3	31,8
Leme	2A	22/02/2010	5	-
Leme	5	23/02/2010	8	34,3
Leme	24	23/02/2010	8	32,3
Leme	27E	02/03/2010	10	34,3
Leme	28E	03/03/2010	2	-
Leme	27D	03/03/2010	8	-
Leme	13	03/03/2010	2	-
Leme	22	03/03/2010	6	34,6
Leme	16	05/03/2010	3	-
Leme	28A	15/03/2010	8	33,6
Leme	27B	15/03/2010	36	-
Leme	27C	30/03/2010	15	34,9
Leme	19	05/05/2010	8	33,7
Leme	22	17/05/2010	8	-
Pirassununga	26	04/01/2010	5	-
Leme	19	11/10/2010	3	34,4

De maneira geral, os resultados obtidos através da análise por PCR convencional, quando comparados àqueles obtidos por PCR-TR mostrou que a detecção por este método foi superior àquele, revelando maior sensibilidade (aproximadamente 3 vezes mais sensível). Esses resultados reforçam dados obtidos de vários trabalhos que relatam a maior sensibilidade da PCR-TR seja pelo método SYBR ou TaqMan, em relação à métodos convencionais (Teixeira *et al.*, 2008b; Lin *et al.*, 2010; Coletta - Filho e Carlos, 2010).

Algumas amostras que quando analisadas por PCR-TR apresentaram resultados positivos com valor de Ct abaixo de 30, não apresentaram resultado positivo no método convencional. Isso foi considerado, um resultado não esperado, uma vez que outras amostras com valores de Ct de até 32,9 foram positivas pelo primeiro método, embora estas tenham sido exceção, sendo que 3 de 47 apresentaram resultados positivos pelo método convencional e apresentaram Ct acima de 30, enquanto que 7 amostras apresentaram Ct menor que 30, das 152 positivas pelo método PCR-TR, e apresentaram resultado negativo pelo PCR convencional.

As figuras 6 e 7, mostram os talhões onde foram encontrados insetos positivos por PCR - convencional e por PCR - TR, nas propriedades estudadas, esses dados de forma

quantitativa foram correlacionados aos dados das tabelas 4 e 5 (número de plantas por quadra e número de plantas erradicadas por quadra), a fim de se verificar a correlação entre plantas com HLB e psíldeos infectivos, foram ainda correlacionadas as proporções de plantas sintomáticas com a proporção de psíldeos infectivos.

Tabela 4: Relação de quadras, variedade de copa, porta-enxerto, idade das quadras, quantidade de plantas e quantidade de plantas erradicadas no período total do experimento, propriedades de Leme - SP

QUADRA	VARIETADES	PORTA ENXERTO	PLANTIO	Nº PLANTAS	Nº PLANTAS ERRADICADAS
1	NATAL	CRAVO	1.976	5667	28
2	PERA	CLEÓPATRA	1.995	4862	66
3	NATAL	CRAVO	1.983	590	20
4	VALÊNCIA	CRAVO	2.001	1675	21
5	PERA	CLEÓPATRA	1.995	2049	23
6	HAMLIM	CRAVO	2.002	10275	124
7	NATAL	CRAVO	1.983	3060	24
8	NATAL	CRAVO	1.983	2798	16
9	NATAL	CRAVO	1.986	8518	0
10	PERA	CLEÓPATRA	1.995	1862	26
11	VALÊNCIA	CRAVO	2.008	11145	98
13	HAMLIM	CLEÓPATRA	1.995	1574	45
14	VALÊNCIA	TRIFOLIATA	1.968	3695	16
15	VALÊNCIA	CLEÓPATRA	1.995	4172	84
16	HAMLIM	TRIFOLIATA	1.998	1110	0
17	VALÊNCIA	CRAVO	2.008	11200	94
18	HAMLIM	CRAVO	1.983	380	67
19	HAMLIM	SWINGLE	2.004	290	5
20	NATAL	CRAVO	1.986	2593	6
21	VALÊNCIA	SUNKI	2.004	6339	36
22	VALÊNCIA	CRAVO	2.001	3385	55
23	MURCOTE	CRAVO	1.998	12210	52
24	VALÊNCIA	SWINGLE	2.001	900	17
25	VALÊNCIA	TRIFOLIATA	1.980	4392	49
27	PERA	CRAVO	1.996	15963	90
28	VALÊNCIA	SWINGLE	2.001	8061	92
29	VALÊNCIA	CRAVO	2.007	10066	31
30	HAMLIM	SWINGLE	2.007	7604	18
31	VALÊNCIA	CRAVO	2.009	6631	0
11A	HAMLIM	CRAVO	1.978	3200	0
12A	HAMLIM	CRAVO	1.978	1146	75
17A	VALÊNCIA	CRAVO	1.975	3658	0
17E	VALÊNCIA	CLEÓPATRA	1.995	507	0
3B	HAMLIM	SWINGLE	2.004	5731	0

Tabela 5: Relação de quadras, variedade de copa, porta-enxerto, idade das quadras, quantidade de plantas e quantidade de plantas erradicadas no período total do experimento, propriedades de Pirassununga - SP

QUADRA	VARIETADES	PORTA ENXERTO	PLANTIO	Nº PLANTAS	Nº PLANTAS ERRADICADAS
1	MURCOTE	CRAVO	1.998	1742	0
2	PERA	CLEÓPATRA	1.996	4775	0
4	MURCOTE	CRAVO	1.998	5137	23
6	VALÊNCIA	SWINGLE	2.000	4532	357
7	VALÊNCIA	CRAVO	2.006	1146	63
9	NATAL	CRAVO	1.985	2000	127
10	NATAL	CRAVO	1.986	2000	18
11	VALÊNCIA	CRAVO	1.988	4500	0
12	HAMLIM	CRAVO	1.988	6575	589
13	NATAL	CRAVO	1.988	1150	0
14	VALÊNCIA	CRAVO	1.988	1000	0
15	VALÊNCIA	CRAVO	1.988	1450	10
16	VALÊNCIA	SWINGLE	2.010	531	0
18	HAMLIM	CRAVO	2.011	5150	0
19	HAMLIM	CRAVO	1.990	728	11
20	VALÊNCIA	CRAVO	1.988	2290	0
21	HAMLIM	SWINGLE	2.003	1640	11
22	VALÊNCIA AMERICANA	TRIFOLIATA	1.995	2532	15
23	HAMLIM	CLEÓPATRA	1.995	300	6
24	VALÊNCIA	SWINGLE	2.010	793	0
25	VALÊNCIA	SUNKI	2.004	269	6
26	VALÊNCIA	SUNKI	2.004	210	0
27	VALÊNCIA	SUNKI	2.004	1050	0
17A	HAMLIM	CRAVO	2.011	3696	0
17B	HAMLIM	CRAVO	1.990	2994	0
28A	VALÊNCIA	TRIFOLIATA	2.010	4139	0
28B	VALÊNCIA	TRIFOLIATA	2.010	3317	0
28C	VALÊNCIA	SWINGLE	2.010	793	0
3	VALÊNCIA	CRAVO	2.008	9505	6
5	PERA	CRAVO	2.000	6306	429
8A	VALÊNCIA	SUNKI	2.006	2000	0
8B	VALÊNCIA	SUNKI	2.003	3085	0
8C	VALÊNCIA	SUNKI	2.004	2553	0

3.3. Correlação entre insetos *D. citri* infectivos e HLB

As coletas de insetos de *D. citri* nas duas propriedades estudadas resultaram num total de 1047 insetos durante o período de 17 meses, iniciando em outubro de 2009 e finalizando em fevereiro de 2011. A maioria das amostras, 883, foi analisada individualmente, sendo 406 provenientes da propriedade de Leme e 477 da propriedade de Pirassununga. Um grupo de 164 insetos (159 provenientes de Leme e 5 de Pirassununga) foram agrupados em função da baixa concentração de DNA obtido durante a extração individual dos mesmos, originando 19 amostras compostas.

A maior parte dos insetos coletados em ambas as áreas foi no período de primavera/verão, entretanto, no período de outono de 2010 a coleta de insetos na área de Leme foi superior as coletas nos períodos de primavera/10 e verão10/11, esse fato pode estar relacionado a inspeção que é realizada em apenas 1% de plantas e que por vezes não representa a população real presente na área, ou mesmo pelo número de coletas, pois não necessariamente todos os indivíduos de *D. citri* encontrados foram coletados. A baixa amostragem, associado a dificuldade de coleta, dependendo da posição em que o inseto se encontra na planta, também pode justificar a maior coleta de insetos no inverno de 2010 na área de Pirassununga, em relação a Primavera e Verão de 2009 (Figura 8).

Esses dados se assemelham aos dados encontrados por Yamamoto *et al.* (2001) que verificaram que o pico populacional de adultos de *D. citri* em alguns pomares cítricos das cidades do norte do estado de São Paulo ocorreu no final da primavera e início do verão enquanto que no outono e inverno a população foi reduzida, provavelmente devido ao menor fluxo vegetativo. Esse comportamento foi também relatado por Tsai *et al.*(2002), onde os autores verificaram que o pico populacional de *D. citri*, no estado da Flórida coincidia com o período de maior fluxo vegetativo.

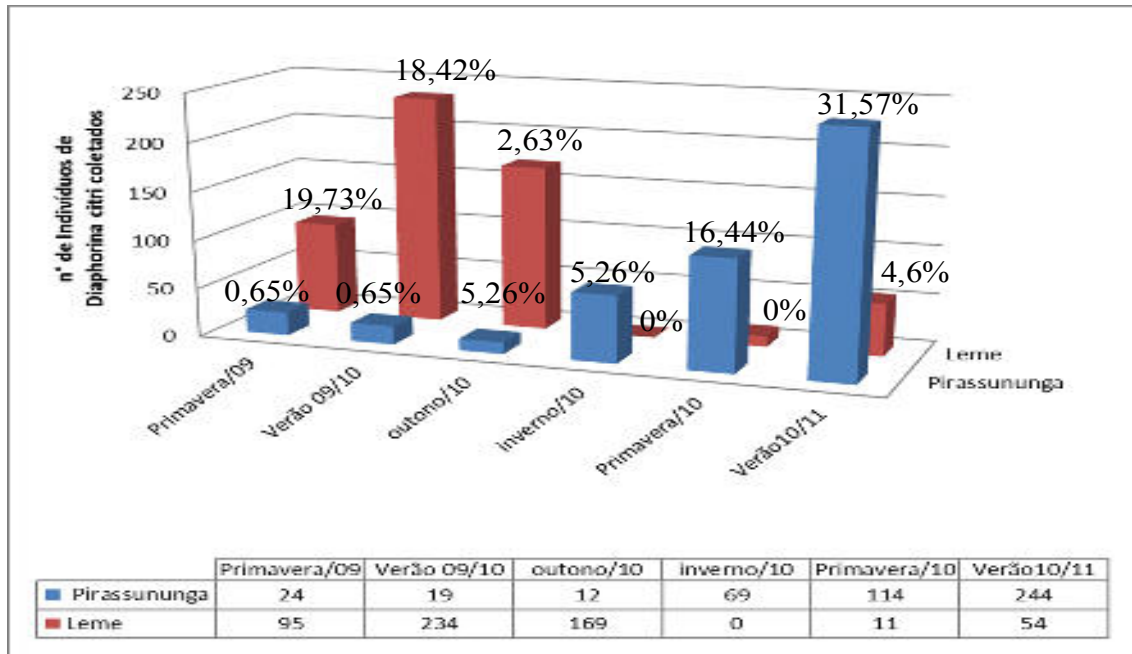


Figura 8: Coletas de *Diaphorina citri*, por estação do ano nas propriedades de Leme e Pirassununga e percentual de insetos infectivos por estação.

Entretanto, os dados das primeiras coletas (Primavera/09; Verão 09/10) para a propriedade de Pirassununga mostraram haver uma baixa população de insetos quando comparados àqueles encontrados nas mesmas épocas dos anos seguintes (Primavera/10; Verão10/11). Tal comportamento foi verificado de maneira inversa na propriedade de Leme (Figura 8). Esses dados mostram ainda que no período da primavera o número de insetos infectivos foi maior, alcançando um índice de 30,6 % na propriedade de Leme (2009) e 23,8% em Pirassununga (2010).

Também a quantidade de insetos infectivos encontrados nas áreas estudadas teve predominância nos períodos de primavera e verão (Figuras 9 e 10), ou seja, nos períodos de maior fluxo vegetativo das plantas, onde a aquisição da bactéria é mais eficiente. Esse dado está de acordo com aqueles encontrados por Bonani (2009), que verificou taxas de infectividade de 60,0% a 71,4% dos insetos testados em folhas novas enquanto a taxa de infectivos em folhas velhas foi nula.

E embora adultos e ninfas possam adquirir a bactéria, as ninfas são mais eficientes na aquisição conforme Vichin Neto *et al.*, 2008, esse relato justifica a presença de ninfas com a presença de *Ca. L. asiaticus*, já que mesmo em período de incubação da bactéria na planta ainda pode ocorrer aquisição mesmo nas áreas com menor fonte de inóculo como a propriedade de Leme onde as erradicações de plantas sintomáticas é intensa e imediata, bem como na área de Pirassununga onde a fonte de inóculo externa é alta, mas a erradicação de

plantas sintomáticas também é feita assim que as plantas são detectadas (10 positivas em 60 coletadas e 18 positivas em 147 coletadas , em Leme e Pirassununga respectivamente).

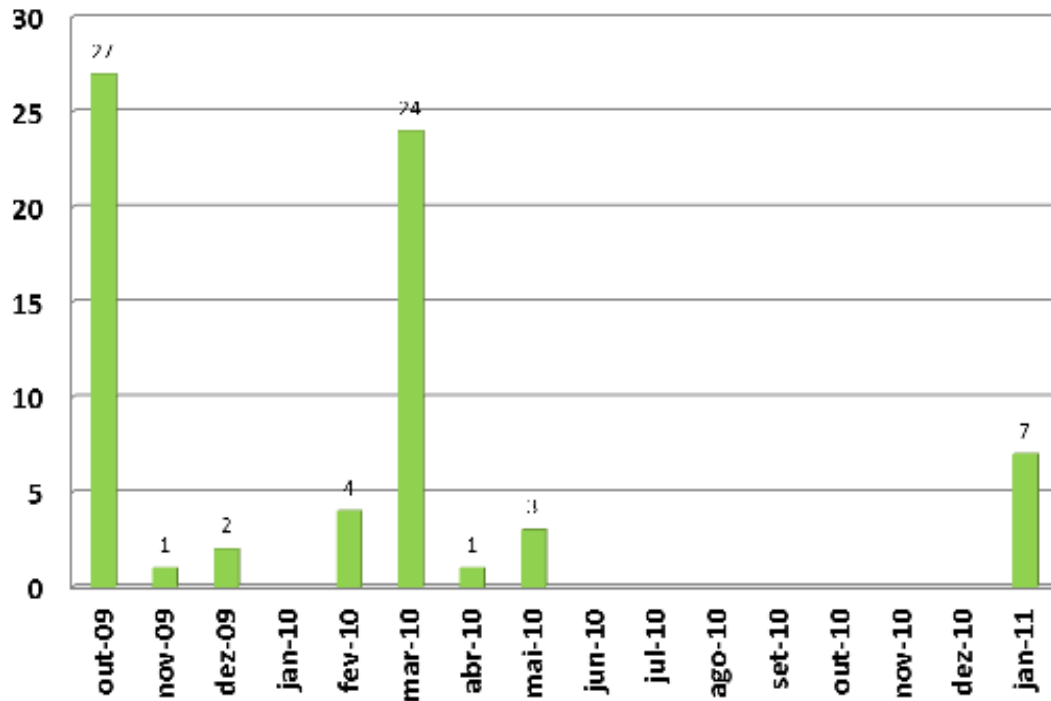


Figura 9: Número de psilídeos infectivos (positivos por PCR-TR) encontrados nos vários meses de coleta. Propriedade de Leme -SP.

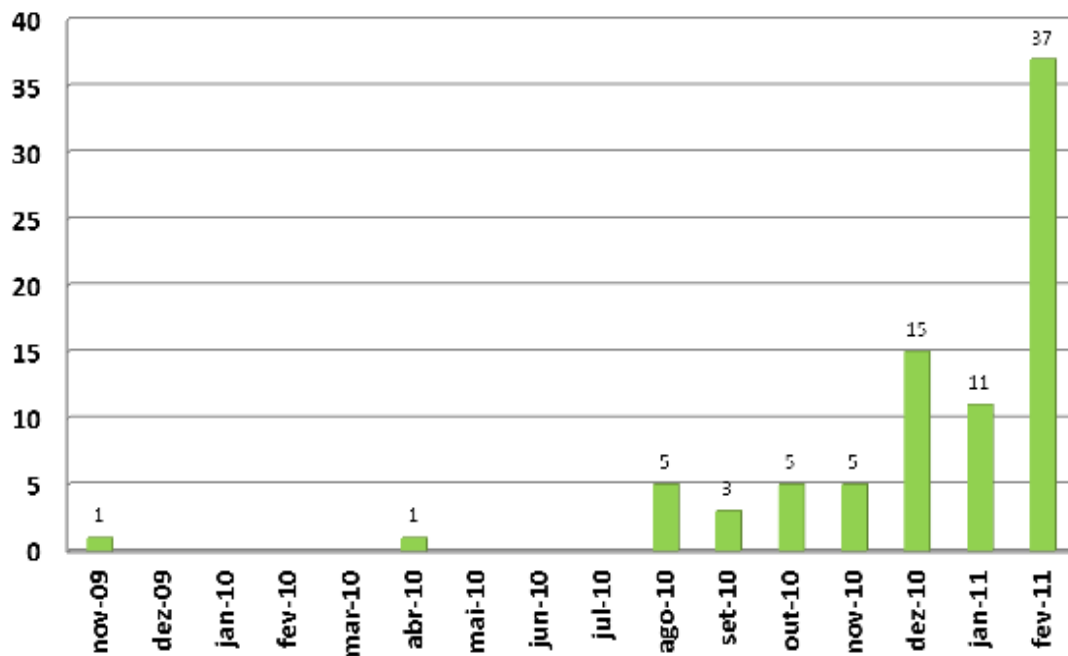


Figura 10: Número de psilídeos infectivos (positivos por PCR-TR) encontrados nos vários meses de coleta. Propriedade de Pirassununga - SP.

Tabela 6. Resumo das análises aplicadas nos estudos de correlação entre insetos *D. citri* infectivos e plantas sintomáticas e seus respectivos resultados

Período	Leme	Período	Pirassununga

A primeira correlação foi entre a população de psíldeos infectivos e a quantidade de plantas sintomáticas quadra a quadra e mês a mês para a propriedade de Leme, mas trimestralmente para a propriedade de Pirassununga. Nesta análise foram utilizados os valores brutos do número de insetos com o número de plantas, sendo que os resultados obtidos não foram significativos a 5 % de probabilidade, com valores de r^2 iguais a -0,1739 e -0,1023 para as propriedades de Leme e Pirassununga, respectivamente.

A segunda correlação foi feita entre plantas sintomáticas com o número de psíldeos infectivos quadra a quadra para as propriedades de Leme e Pirassununga, entretanto levando-se em consideração o número total de insetos infectivos (no período de 17 meses) e plantas sintomáticas. Esta análise, assim como a anterior, também não apresentou resultados significativos a 5 % de probabilidade, tendo sido encontrados valores de r^2 iguais a 0,1175 e de 0,1417 para as propriedades de Leme e Pirassununga, respectivamente.

Em uma terceira análise foram correlacionadas as proporções de insetos infectivos em relação ao número total de psíldeos com a proporção de plantas sintomáticas em relação ao total de plantas, quadra a quadra, mês a mês para Leme e trimestralmente para Pirassununga. As análises não apresentaram resultados significativos a 5% de probabilidade e os r^2 foram iguais a -0,0663 e -0,0761 para Leme e Pirassununga, respectivamente.

Finalmente foi feita uma correlação entre as proporções de insetos infectivos em relação à proporção de plantas sintomáticas, porém levando-se em conta o número total de

insetos coletados nos 17 meses de estudo, com todas as plantas encontradas em cada quadra. As análises, novamente, não mostraram resultados significativos a 5% de probabilidade, com valores de r^2 iguais a -0,2187 e 0,1252 para Leme e Pirassununga, respectivamente.

Um dos fatores que contribuíram para esses resultados de ausência de correlação pode ter sido pelo fato do período de incubação da doença ser muito prolongado; estudos com inoculação desta bactéria através de enxertia de borbulhas contaminadas mostram que o período de incubação é de 6 à 12 meses. O período de incubação do HLB, ou seja, o período de tempo entre a infecção e o aparecimento dos sintomas da doença, depende de vários fatores como o ambiente (principalmente temperatura), a idade e espécie ou variedade da planta hospedeira, da concentração bacteriana na transmissão, da espécie de *Ca. Liberibacter*, da época do ano, entre outros. Por essa razão, o período de incubação para HLB varia, geralmente, de seis a doze meses (Bové, 2006) e o presente trabalho teve como duração apenas 17 meses, porém através de inoculação natural por vetor (*D. citri*) onde por vezes a quantidade de bactéria inoculada é muito inferior a uma inoculação via borbulha de planta fonte, prolongando ainda mais o período de incubação na planta.

Outro ponto importante que pode estar relacionado a falta de correlação dos dados é que estamos tratando de um vetor, *D. citri*, que se dissemina facilmente por voos ou pela ação de correntes de ar, desta maneira insetos que apresentaram resultados positivos podem ser insetos originados em propriedades vizinhas, ou mesmo em talhões com maiores incidência da doença. Segundo Boina *et al.* 2009, *D. citri* tem a capacidade de se mover de áreas tratadas com inseticidas para não tratadas a distâncias entre 60 e 100 metros.

Desta maneira a interferência de pomares próximos da área de manejo é muito expressiva, de forma que negativa ou positivamente a interferência ocorre. Sendo que mesmo em áreas com controle intenso do vetor, os poucos indivíduos que restam na área ou que migram das áreas ao redor sem controle são suficientes para tornar o pomar improdutivo, Bassanezi, 2011, afirma que após 5 anos um pomar com aplicações a cada 14 dias de inseticidas para controle de *D. citri* apresentou uma incidência de HLB foi superior a 50 %, mesmo com um raio de 700 metros de cana de açúcar.

Com base nos resultados do presente trabalho o que podemos inferir é que a recomendação de controle de psílídeos visando a redução da população deste vetor bem como a redução da doença nas áreas, não pode ser baseada apenas no controle do inseto nos talhões em que o mesmo é encontrado, ou em talhões que apresentem uma maior incidência da doença, mas sim em um controle em larga escala.

Ainda segundo Bassanezi, 2011, para um controle efetivo da doença é necessário a realização de um manejo regional, tanto no que se refere a controle do vetor com em relação a redução de fonte de inóculo, de maneira que quanto maior a área manejada melhor.

4. CONCLUSÕES

1. Não houve correlação entre o número de psílídeos infectivos e a quantidade de plantas sintomáticas ou entre a proporção de psílídeos infectivos e a proporção de plantas sintomáticas, em qualquer das propriedades estudadas;
2. A presença da bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus* foi a única espécie detectada nas amostras de insetos;
3. O controle de *Diaphorina citri* não deve ser realizado apenas nas quadras ou propriedades que mostrem um grande número de plantas sintomáticas, e ou psílídeos infectivos, mas sim em uma escala maior, como microrregião;
4. O método de PCR-TR mostrou-se mais sensível que o PCR convencional, em relação às amostras estudadas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bassanezi, R.B., (2011) Manejo regional do huanglongbing: estratégia essencial para o controle da doença. *Citricultura Atual*. v. 82: 22-23.
- Belasque Jr. J, Bergamin Filho A., Bassanezi R.B., Barbosa J.C., Gimenes Fernandes N, Yamamoto P.T., Lopes S.A., Machado M.A., Leite Jr R.P., Ayres A.J. & Massari C.A. (2009) Base científica para a erradicação de plantas sintomáticas e assintomáticas de Huanglongbing (HLB, Greening) visando o controle efetivo da doença. **Tropical Plant Pathology** 34:137-145.
- Boina, R. D., 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: **Envirn. Entomol.** 38 (4): 1250 – 1258.
- Bonani, J. P., (2009). Quantifying Dispersal of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) by Immunomarking and Potential Impact of Unmanaged Groves on Commercial Citrus Management. **Tese de doutorado**. Piracicaba – SP: Escola Superior Luiz de Queiros – USP.
- Bové, J. M., (2006) Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. **Journal of Plant Pathology**, v. 88, n. 01, p.07-37.
- 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, P. R. China. **Phytopathology** 99 (3):236-242.
- Coletta-Filho, H.D., Targon, M.L.P.N., Takita, M.A., De Negri, J.D., Pompeu JR., J, Amaral, A.M., Muller, G.W. & 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 detecção de agentes associados: dos sintomas aos ensaios de laboratório: **Citrus Research and technology**, Cordeirópolis, v31, n.2, p129-143.
- Costa Lima A.M. (1942) Insetos do Brasil, Homoptera. Rio de Janeiro: Escola **Nacional de Agronomia** 3: 101.
- Davis M.J., Mondal S.N., Chen H, Rogers M.E. & Brlansky R.H. (2008) Co-cultivation of Candidatus Liberibacter asiaticus with Actinobacteria from citrus with huanglongbing. **Plant Disease** 92:1547-1550.
- Hocquellet A., Bové J.M. & Garnier M. (1999) Detection and identification of the two Candidatus Liberibacter species associated with citrus Huanglongbing by PCR amplification of ribosomal protein genes of the β operon. **Molecular and Cellular Probes** 13:373-379.
- Hung, T. H., Hung, S. C, Chen, C. N, Hsu, M. S and 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.

Jagoueix S., Bové J.M. & Garnier M. (1994) The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the α subdivision of the proteobacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology** 44 (3):379-386.

Jagoueix S., Bové J.M. & Garnier M. (1996) PCR detection of the two "Candidatus" Liberibacter species associated with greening disease of citrus. **Molecular and Cellular Probes** 10:43-50.

Li, W., J. S. Hartung, and L. Levy. (2006). Quantitative real-time PCR for detection and identification of Candidatus Liberibacter species associated with Huanglongbing. **J. Microbiol. Methods** 66: 104 -115.

Lin, H., Chen, C., Doddapaneni, H., Duan, Y., Civerolo, E. L., Bai, X., Zhao, X. (2010). A new diagnostic system for ultra-sensitive and specific detection and quantification of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the bacterium associated with citrus Huanglongbing. **Journal of Microbiological Methods** 81:17-25.

Lopes S.A., Martins E.C. & Frare G.F. (2005) Detecção de *Candidatus Liberibacter americanus* em *Murraya paniculata*. **Summa hytopathologica** 31:448-449.

Lopes S.A., Martins E.C. & Frare G.F. (2006) Detecção de *Candidatus Liberibacter asiaticus* em *Murraya paniculata*. **Fitopatologia Brasileira** (Suplemento) 31:3303.

Murray M. & Thompson W.F. (1980) Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA. **Nucleic Acids Research** : 321-4325.

Pelz-Stelinski, K. S., Brlansky, R. H., Ebert, T. A. and Rogers, M. E. (2010) Transmission Parameters for *Candidatus Liberibacter asiaticus* by Asian Citrus Psyllid (Hemiptera: Psyllidae), **Journal of Economic Entomology**. 103(5): 1531-1541.

Planet P., Jagoueix S., Bové J.M. & Garnier M. (1995) Detection and characterization of the African citrus greening Liberibacter by amplification, cloning and sequencing of the rplKJL-rpoBC operon. **Current Microbiology** 30:137-141.

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

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., Saillard, C., Eiveillard, S., Danet, J. L. da Costa, P. I., Ayres, A. J. & Bové, J. (2005c) '*Candidatus Liberibacter americanus*', associated with citrus huanglongbing (greening disease) in São Paulo State, Brazil. **International Journal Of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p.1857-1862, 2005c. DOI: 10.1099/ijs.0.63677-0.

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

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

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, Brasil, 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 A.S., Yamamoto, P.T., Miranda M.P., Spósito, M.B., Belasque, J., Bassanezi, R.B., (2010). Caracterização e etiologia das bactérias associadas ao *huanglongbing*: **Citrus Research and technology**, Cordeirópolis, v31, n.2, p115-128.

Tsai J.H., Wang J.J. & Liu Y.H. (2002) Seasonal abundance of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (HHomoptera:Psyllidae) in southern Florida. **Florida Entomologist** 85: 46-4451.

Vichin Neto R., Nascimento F.E., Balbinotte J., Coletta-Filho H. & Lopes J.R.S (2008) Comparação da capacidade de aquisição de *Candidatus Liberibacter asiaticus* em citros por ninfas e adultos de *Diaphorina citri* Kuwayama (HHemiptera:PPsullidae). **Resumos do 16º Simpósio Internacional de Iniciação Científica -USP**. São Paulo, SP.

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.

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*. In: **Proceedings of the Huanglongbing-Greening International Workshop**, Ribeirão Preto, SP, Brazil. p.96.

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