

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Estudos bioecológicos de *Tamarixia radiata* (Waterston, 1922) (Hymenoptera:
Eulophidae) para o controle de *Diaphorina citri* Kuwayama, 1907
(Hemiptera: Psyllidae)**

Mariuxi Lorena Gómez Torres

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Entomologia

**Piracicaba
2009**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Mariuxi Lorena Gómez Torres
Bióloga

**Estudos bioecológicos de *Tamarixia radiata* (Waterston, 1922) (Hymenoptera: Eulophidae)
para o controle de *Diaphorina citri* Kuwayama, 1907 (Hemiptera: Psyllidae)**

Orientador:
Prof. Dr. **JOSÉ ROBERTO POSTALI PARRA**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Entomologia

**Piracicaba
2009**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Gómez Torres, Mariuxi Lorena

Estudos bioecológicos de *Tamarixia radiata* (Waterston, 1922) (Hymenoptera: Eulophidae) para o controle de *Diaphorina citri* Kuwayama, 1907 (Hemiptera: Psyllidae) / Mariuxi Lorena Gómez Torres. - - Piracicaba, 2009.

138 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2009.
Bibliografia.

1. Controle biológico 2. Greening (doença de planta) 3. Hemiptera 4. Insetos parasitóide
5. Insetos sugadores 6. Sistema de informação geográfica 7. Tabelas de vida I. Título

CDD 595.75
G633e

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

A Deus, pela vida, por iluminar e guiar meu caminho e, sobretudo, pelas novas oportunidades.

AGRADEÇO

Aos meus queridos pais, Petita Torres Touriz e Moisés Gómez Martínez, pelo amor, carinho e por terem me guiado e me darem as melhores heranças que são a vida e a educação; a minha admirável e querida irmã, Andrea que me acompanha passo a passo com grande carinho e compreensão e porque a vida da uma é parte essencial da outra; a minha avó, Mérida (*in memoriam*), a meus tios Elida, Nicolas, Felix e Delia María, a meus primos Lourdes e Gustavo, pelo amor, carinho e apoio.

A todos e cada um deles, principalmente, pela união e filosofia de vida...

AGRADEÇO, DEDICO E OFEREÇO

A Guillem Domènec Ruiz, por ser um grande amigo, companheiro e uma pessoa especial... Et convido a creure'm quan dic futur si no creus la meva paraula, creu la lluentor d'un gest... Et vaig conèixer entre els meus somnis benvolguts, per això quan et vaig veure reconèixer la meva destinació. Quan pensava que ja no anava a ser, el que somniés de sobte, vi.

OFEREÇO

A meus amigos e companheiros de jornada, Rosemari Padilha, Rosecler Padilha Scanavaca, Mauritânia Gava Sanches, Archimedes Monteiro Sanches, Francisco de Salles Miranda, Bernardete Aguiar Jordão, Juliana Monteiro Sanches, Renato Scanavaca e Rosemeire Furlan pela amizade, carinho, apoio e incentivo na compreensão do meu caminho para continuar sem esquecer dos meus objetivos.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. José Roberto Postali Parra, professor titular do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, ESALQ-USP, pela oportunidade, confiança e orientação durante todos estes anos;

À Universidade de São Paulo (USP) e à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ) pelas oportunidades oferecidas;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de estudos e pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste projeto;

Ao Fundo de Defesa da Citricultura (FUNDECITRUS), pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste projeto;

Ao Prof. Dr. Gerd Sparovek, professor do Departamento de Ciência do Solo, ESALQ-USP, pela relevante colaboração;

Ao Prof. Dr. Fernando Luís Cònsoli, pelas orientações e por permitir a utilização do Laboratório de Ecologia Nutricional e Molecular, ESALQ-USP;

Ao Flávio L. M. de Freitas e ao André L. C. Assunção, do Departamento de Ciência do Solo, ESALQ-USP, pela imensurável contribuição no processamento dos dados, geração de layouts e discussões no trabalho de geoprocessamento;

Aos engenheiros Patricia Vasconcellos, Paulo B. Paiva, Mauro Fagotti e Frederico Guilherme Ivers pela colaboração e concessão das áreas experimentais;

Aos professores Dra. Marinéia de Lara Haddad e ao Dr. Sinval Silveira Neto, pelas sugestões e auxílio nas análises estatísticas;

Aos professores do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, ESALQ-USP, pelos ensinamentos transmitidos;

Às minhas amigas e companheiras “de todo momento”, Izabela Salvador, Gabriela Salvador e Claudia F. Marinho, pela convivência, apoio, companheirismo e principalmente pela amizade incondicional;

Aos amigos e colegas, Cherre S. Bezerra, Eliane Grisoto, Aline Guidolin, Fabio Dossi, Flávia Moura, Janayne Rezende, Larissa Spoladore, Leandro Delalibera, Marjorie Rodríguez, Mateus V. Spolidoro, Nivia Dias, Patrícia Milano, Tiago C. Lima, Vitalis Wafula Wekesa, e André Signoretti, pela amizade e companheirismo;

Às bibliotecárias Eliana M. Garcia e Silvia Zinsly, pela revisão do trabalho;

A Neide G. Zério pela colaboração, convivência e respeito;

A todos que auxiliaram na realização deste trabalho.

“Posso ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes mas não esqueço que a minha vida é a maior empresa do mundo, e que posso evitar que ela vá à falência.

Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver, apesar de todos os desafios.

Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e tornar-se autor da própria história.

É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar um oásis no recôndito da alma.

É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida.

Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos.

É saber falar de si mesmo. É ter coragem para ouvir um “não”.

É ter segurança para receber uma crítica, mesmo que injusta.

Pedras no caminho? Guardo-as todas, um dia vou construir um castelo...”

Fernando Pessoa

SUMARIO

RESUMO	12
ABSTRACT	13
RESUMEN	14
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Aspectos bioecológicos de <i>Diaphorina citri</i>	17
2.2 Distribuição geográfica e plantas hospedeiras de <i>D. citri</i>	18
2.3 Danos e importância econômica	19
2.4 Controle de <i>D. citri</i> em pomares cítricos	20
2.5 Biologia de <i>Tamarixia radiata</i>	21
2.6 <i>T. radiata</i> como agente de controle biológico	22
Referências	23
3 POLICROMISMO EM POPULAÇÕES DE <i>Tamarixia radiata</i> (Waterston, 1922) (Hymenoptera: Eulophidae)	28
Resumo	28
Abstract	28
3.1 Introdução	29
3.2. Material e Métodos	30
3.2.1 Levantamento populacional de <i>Tamarixia radiata</i> em regiões citrícolas de São Paulo	30
3.2.2 Policromia em populações de <i>T. radiata</i>	32
3.2.3 Caracterização dos marcadores moleculares ITS1 e ITS2 das populações policrômicas de <i>T. radiata</i>	33
3.2.3.1 Extração do DNA genômico	33

3.2.3.2 Clonagem, seqüenciamento e análise	34
3.3 Resultados e Discussão	35
3.3.1 Levantamento populacional de <i>Tamarixia radiata</i> em regiões citrícolas de São Paulo	35
3.3.2 Variação cromática em populações de <i>T. radiata</i>	37
3.4 Conclusões	41
Referências	41
Anexos	46
4 BIOLOGIA E TABELA DE VIDA DE FERTILIDADE DE <i>Tamarixia radiata</i> (Waterston, 1922) (Hymenoptera: Eulophidae) SOBRE <i>Diaphorina citri</i> Kuwayama, 1907 (Hemiptera: Psyllidae) EM DIFERENTES TEMPERATURAS	49
Resumo	49
Abstract	49
4.1 Introdução	50
4.2. Material e Métodos	51
4.2.1 Criação de manutenção de <i>Diaphorina citri</i>	51
4.2.2 Criação de manutenção de <i>Tamarixia radiata</i>	51
4.2.3 Biologia de <i>T. radiata</i> sobre <i>D. citri</i> em diferentes temperaturas	55
4.2.4 Tabela de vida de fertilidade de <i>T. radiata</i> em diferentes temperaturas	55
4.3 Resultados e Discussão	58
4.3.1 Biologia de <i>Tamarixia radiata</i> sobre <i>Diaphorina citri</i> em diferentes temperaturas	58
4.3.2 Tabela de vida de fertilidade de <i>T. radiata</i> em diferentes temperaturas	60
4.4 Conclusões	65
Referências	65

5 CAPACIDADE DE PARASITISMO, EM DIFERENTES TEMPERATURAS, DE <i>Tamarixia radiata</i> (Waterston, 1922) (Hymenoptera: Eulophidae) SOBRE <i>Diaphorina citri</i> Kuwayama, 1907 (Hemiptera: Psyllidae) E LIBERAÇÃO EM DUAS ÁREAS CITRÍCOLAS	68
Resumo	68
Abstract	68
5.1 Introdução	69
5.2. Material e Métodos	70
5.2.1 Preferência da idade hospedeira no parasitismo de <i>Tamarixia radiata</i>	70
5.2.2 Capacidade de parasitismo de <i>T. radiata</i> em diferentes temperaturas	70
5.2.3 Liberação de <i>T. radiata</i> para o controle de <i>Diaphorina citri</i> em condições de campo	72
5.3 Resultados e Discussão	74
5.3.1 Preferência hospedeira no parasitismo de <i>Tamarixia radiata</i>	74
5.3.2 Capacidade de parasitismo e longevidade de fêmeas de <i>T. radiata</i> em diferentes temperaturas	76
5.3.3 Liberação de <i>T. radiata</i> em pomares cítricos	79
5.4 Conclusões	82
Referências	83
6 A ASSOCIAÇÃO <i>Tamarixia radiata</i> - <i>Wolbachia</i> : OCORRÊNCIA E EFEITOS NO PARASITISMO	85
Resumo	85
Abstract	85
6.1 Introdução	86
6.2. Material e Métodos	87
6.2.1 Associação <i>Wolbachia</i> – <i>Tamarixia radiata</i> das populações coletadas no Estado de São Paulo	87

	10
6.2.1.1 Extração de DNA genômico	87
6.2.1.2 Ocorrência e caracterização de <i>Wolbachia</i>	88
6.2.2 Avaliação da associação <i>Wolbachia</i> – <i>Tamarixia radiata</i>	88
6.2.2.1 Obtenção de uma linhagem de <i>T. radiata</i> livre do simbionte <i>Wolbachia</i>	88
6.2.2.2 Influência do simbionte secundário <i>Wolbachia</i> no parasitismo de <i>T. radiata</i>	89
6.2.2.3 Quantificação do simbionte <i>Wolbachia</i> associado a <i>T. radiata</i>	90
6.3 Resultados e Discussão	91
6.3.1 A associação <i>Wolbachia</i> – <i>Tamarixia radiata</i> no Estado de São Paulo	91
6.3.2 Influência do simbionte secundário <i>Wolbachia</i> no parasitismo de <i>T. radiata</i>	93
6.3.3 Quantificação do simbionte <i>Wolbachia</i> associado a geração filial de <i>T. radiata</i>	94
6.4 Conclusões	95
Referências	96
7 EXIGÊNCIAS TÉRMICAS E HIGROMÉTRICAS DE <i>Diaphorina citri</i> Kuwayama, 1907 (Hemiptera: Psyllidae) E <i>Tamarixia radiata</i> (Waterston, 1922) (Hymenoptera: Eulophidae) PARA SEU ZONEAMENTO NO ESTADO DE SÃO PAULO	99
Resumo	99
Abstract	99
7.1 Introdução	100
7.2. Material e Métodos	102
7.2.1 Determinação das exigências térmicas <i>Tamarixia radiata</i>	102
7.2.2 Efeito da umidade relativa sobre o parasitismo e desenvolvimento de <i>T. radiata</i>	102
7.2.3 Utilização de um Sistema de Informação Geográfica (SIG) para determinação do número de gerações de <i>Diaphorina citri</i> e <i>T. radiata</i> no estado de São Paulo	103

7.2.4 Análise da influência da umidade relativa e temperatura na adaptação de <i>D. citri</i> e <i>T. radiata</i> nas regiões citrícolas do estado de São Paulo	104
7.3 Resultados e Discussão	105
7.3.1 Determinação das exigências térmicas <i>Tamarixia radiata</i>	105
7.3.2 Efeito da umidade relativa sobre o desenvolvimento e parasitismo de <i>T. radiata</i>	107
7.3.3 Utilização de um Sistema de Informação Geográfica (SIG) para determinação do número de gerações de <i>Diaphorina citri</i> e de <i>T. radiata</i> no estado de São Paulo	109
7.3.4 Influência da umidade e temperatura na adaptação de <i>D. citri</i> e <i>T. radiata</i> nas regiões citrícolas do estado de São Paulo	126
7.4 Conclusões	134
Referências	135

RESUMO

Estudos bioecológicos de *Tamarixia radiata* (Waterston, 1922) (Hymenoptera: Eulophidae) para o controle de *Diaphorina citri* Kuwayama, 1907 (Hemiptera: Psyllidae)

Desde 2004 foram detectadas, nas áreas citrícolas paulistas, as bactérias responsáveis pela principal doença de citros no mundo, o “huanglongbing” ou “greening”. A ampla distribuição no Brasil do psíldeo vetor, *Diaphorina citri* e a presença do patógeno nas áreas citrícolas é um fator limitante à produção. *Tamarixia radiata* é o principal agente de controle biológico de *D. citri*. Assim, os objetivos do presente estudo foram: a) realizar o levantamento populacional de *T. radiata* nas regiões citrícolas do estado São Paulo; b) caracterizar o policromismo em populações do parasitóide provenientes das principais regiões citrícolas do estado; c) estudar a biologia de *T. radiata* em condições de laboratório; d) avaliar a capacidade de parasitismo em diferentes temperaturas; e) determinar, mediante liberações em pomares cítricos comerciais, a eficiência de *T. radiata* para o controle de *D. citri*; f) determinar a ocorrência e efeitos no parasitismo da associação *T. radiata* - *Wolbachia*; g) realizar o zoneamento agroecológico de *D. citri* e *T. radiata* com base nas exigências térmicas e higrométricas para o estado de São Paulo. As populações de *T. radiata* coletadas em Itirapina, Pederneiras, Piracicaba e São Carlos apresentaram variações cromáticas em relação à espécie típica, sendo que as regiões ITS1 e ITS2 do rDNA das populações analisadas apresentaram de 98 a 99% de identidade. Assim, estas variações cromáticas estão relacionadas à plasticidade fenotípica intra-específica, própria de populações que se encontram em processo de adaptação ecológica. Em 24 horas, o maior parasitismo foi obtido nas temperaturas de 25 e 30°C. Este parasitóide desenvolveu-se na faixa térmica de 15 a 35°C, sendo que 25°C foi a temperatura mais adequada por proporcionar maior viabilidade do período ovo-adulto e os maiores valores da taxa líquida de reprodução (R_0) e da razão finita de aumento (λ). No município de Araras, oito dias após a liberação, a porcentagem de parasitismo de *T. radiata* se manteve entre 51,57 e 72,75%. Nos municípios de Cordeirópolis e Limeira, após três liberações, a porcentagem de parasitismo variou entre 30 e 60%. As populações coletadas em Cafelândia, Ribeirão Bonito e Piracicaba apresentaram infecção múltipla por *Wolbachia*. O limite térmico inferior de desenvolvimento (T_b) foi de 7,13°C e a constante térmica de 188,7GD. Mediante um Sistema de Informação Geográfica, foram obtidos mapas de distribuição do desenvolvimento de *T. radiata* e *D. citri*. Assim, ao longo do ano podem ocorrer, na região norte, de 10 a 13 ciclos de *D. citri* e de 31 a 35 ciclos de *T. radiata*; na região nordeste, o número de ciclos pode variar de 6 a 10 e de 24 a 31 para a praga e para o parasitóide, respectivamente; nas regiões sudoeste e sudeste, o número de gerações pode variar de 3 a 10 e de 19 a 31 para *D. citri* e *T. radiata*. Verificando estes aspectos da interação *T. radiata* e *D. citri*, os dados obtidos no presente trabalho poderão auxiliar para a implementação de um programa de controle biológico, como parte do manejo de *D. citri*, em regiões ecologicamente distintas do estado de São Paulo.

Palavras-chave: Plasticidade genotípica; Variação cromática; Tabela de vida, *Wolbachia*; Sistema de Informação Geográfica; Greening

ABSTRACT

Bioecological studies on *Tamarixia radiata* (Waterston, 1922) (Hymenoptera: Eulophidae) in the control of *Diaphorina citri* Kuwayama, 1907 (Hemiptera: Psyllidae)

Since 2004, have been detected in citrus-growing areas of São Paulo, the bacterias that are responsible for the main disease of citrus worldwide, known as greening or “huanglongbing”. The widespread distribution in Brazil of the vector psyllid, *Diaphorina citri* and the presence of the pathogen in citrus-growing areas is a limiting factor for production. *Tamarixia radiata* is the most important biological control agent against *D. citri*. Therefore, the objectives of this study were to: a) conduct a population survey of *T. radiata* in the citrus-growing regions of the State of São Paulo; b) characterize polychromism in populations of the parasitoid from the main growing regions in the State of São Paulo; c) study the biology of *T. radiata* under laboratory conditions; d) evaluate the parasitism capacity at different temperatures; e) determine, by means of releases in commercial citrus orchards, the effectiveness of *T. radiata* for the control of *D. citri*; f) determine the occurrence and effects on parasitism of the *T. radiata* - *Wolbachia* association; g) prepare an agroecological zoning of *D. citri* and *T. radiata* for the State of São Paulo based on their temperature and humidity requirements. *T. radiata* populations collected in Itirapina, Pederneiras, Piracicaba, and São Carlos showed chromatic variations in relation to the typical species; the ITS1 and ITS2 rDNA regions of the populations analyzed had between 98 and 99% identity. Consequently, these chromatic variations are related to the intraspecific phenotypic plasticity characteristic of populations that are undergoing a process of ecological adaptation. In a 24-hour period, the highest parasitism of *T. radiata* was obtained at 25 and 30°C. This parasitoid developed in the temperature range from 15 to 35°C; the most suitable temperature was 25°C, since it gave the highest viability for the egg-adult period, and the highest net reproductive rate (R_0) and finite rate of increase values (λ). In the municipality of Araras, *T. radiata* parasitism percentage values eight days after release remained between 51.57 and 72.75%. In the areas selected in the municipalities of Cordeirópolis and Limeira, the parasitism percentage of *T. radiata* after three releases ranged between 30 and 60%. The populations collected in Cafelândia, Ribeirão Bonito, and Piracicaba showed multiple infections by *Wolbachia*. The parasitoid’s lower temperature development threshold (T_b) was 7.13°C, with a thermal constant of 188.7 GDD. Distribution maps for *T. radiata* and *D. citri* development in the State of São Paulo were obtained by means of a Geographic Information System (GIS). According to those, from 10 to 13 *D. citri* cycles and from 31 to 35 *T. radiata* cycles may occur in the northern region over the course of one year; in the northeastern region, the numbers of cycles may vary from 6 to 10 and from 24 to 31 for the pest and the parasitoid, respectively; in the southwest and southeast regions the numbers of generations may vary from 3 to 10 and from 19 to 31 for *D. citri* and *T. radiata*. Based on these aspects of the *T. radiata* × *D. citri* interaction, the data obtained in this work can be useful for the implement a biological control program as part of *D. citri* management in ecologically distinct regions of the State of São Paulo.

Keywords: Genotypic plasticity; Chromatic variation; Life table; *Wolbachia*; Geographic Information System; Greening

RESUMEN

Estudios bioecológicos de *Tamarixia radiata* (Waterston, 1922) (Hymenoptera: Eulophidae) para el control de *Diaphorina citri* Kuwayama, 1907 (Hemiptera: Psyllidae)

Desde 2004 fueron detectadas, en las áreas citrícolas paulistas, las bacterias responsables por la principal enfermedad de cítricos en el mundo, el “huanglongbing” o “greening”. La amplia distribución en Brasil del psílido vector, *Diaphorina citri* y la presencia del patógeno en las áreas citrícolas es un factor limitante para la producción. *Tamarixia radiata* es el principal agente de control biológico de *D. citri*. De esta manera, los objetivos del presente estudio fueron: a) realizar el levantamiento poblacional de *T. radiata* en las regiones citrícolas del Estado Sao Paulo; b) caracterizar el policromismo en poblaciones del parasitoide provenientes de las principales regiones citrícolas del Estado Sao Paulo; c) estudiar la biología de *T. radiata* en condiciones de laboratorio; d) evaluar la capacidad de parasitismo en diferentes temperaturas; e) determinar, mediante liberaciones en áreas citrícolas comerciales, la eficiencia de *T. radiata* para el control de *D. citri*; f) determinar la ocurrencia y efectos en el parasitismo de la asociación *T. radiata* - *Wolbachia*; g) realizar el zoneamiento agroecológico de *D. citri* y *T. radiata* con base en las exigencias térmicas e higrométricas para el Estado de Sao Paulo. Las poblaciones de *T. radiata* colectadas en Itirapina, Pederneiras, Piracicaba y Sao Carlos presentaron variaciones cromáticas en relación a la especie típica, siendo que las regiones ITS1 e ITS2 del rDNA de las poblaciones analizadas presentaron de 98 a 99% de identidad. Así, estas variaciones cromáticas están relacionadas a la plasticidad fenotípica intra-específica, propia de poblaciones que se encuentran en proceso de adaptación ecológica. En 24 horas, el mayor parasitismo de *T. radiata* fue obtenido en las temperaturas de 25 e 30°C. Este parasitoide se desarrolló en la franja térmica de 15 a 35°C, siendo 25°C la temperatura más adecuada por proporcionar mayor viabilidad del período huevo-adulto y los mayores valores de la tasa líquida de reproducción (R_0) y de la razón finita de aumento (λ). En el municipio de Araras, ocho días después de la liberación, el porcentaje de parasitismo de *T. radiata* se mantuvo entre 51,57 y 72,75%. En los municipios de Cordeirópolis y Limeira, luego de tres liberaciones, el porcentaje de parasitismo de *T. radiata* varió entre 30 a 60%. Las poblaciones colectadas en Cafelândia, Ribeirão Bonito y Piracicaba presentaron infección múltiple por *Wolbachia*. El límite térmico inferior de desenvolvimiento (T_b) del parasitoide fue de 7,13°C y la constante térmica de 188,7GD. Mediante un Sistema de Información Geográfica, se obtuvieron mapas de distribución del desarrollo de *T. radiata* y *D. citri*, en el estado de Sao Paulo. Así, a lo largo del año pueden ocurrir, en la región norte, de 10 a 13 ciclos de *D. citri* y de 31 a 35 ciclos de *T. radiata*; en la región nordeste, el número de ciclos puede variar de 6 a 10 y de 24 a 31 para la plaga y para el parasitoide, respectivamente; en las regiones sudoeste y sudeste, el número de generaciones puede variar de 3 a 10 y de 19 a 31 para *D. citri* y *T. radiata*. Verificando estos aspectos de la interacción *T. radiata* y *D. citri*, los datos obtenidos en el presente trabajo pueden auxiliar en la implementación de un programa de control biológico, como parte del manejo de *D. citri*, en regiones ecológicamente distintas del Estado de Sao Paulo.

Palabras clave: Plasticidad genotípica; Variación cromática; Tabla de vida; *Wolbachia*; Sistema de Información Geográfica; Greening

1 INTRODUÇÃO

Dentre as regiões produtoras de citros, o Brasil, os EUA, o México, a China e a África do Sul destacam-se devido à prática da citricultura estruturada. No Brasil, São Paulo é responsável por 80% da produção nacional e se destaca como uma das principais regiões produtoras do mundo (FNP, 2007). A produção citrícola de aproximadamente 320 municípios paulistas é constantemente ameaçada pelo ataque de pragas e doenças, elevando os gastos com o manejo dessa cultura (detecção e monitoramento, assim como uso de grandes quantidades de agroquímicos) e onerando os custos de produção.

Diaphorina citri Kuwayama, 1907 (Hemiptera: Psyllidae) encontra-se entre os insetos associados à cultura cítrica que ocasionam severos danos indiretos (HALBERT; MANJUNATH, 2004). As maiores perdas nos pomares ocorrem quando *D. citri* está relacionado com a transmissão da bactéria *Candidatus Liberibacter*, agente causal do “huanglongbing” (HLB) ou “greening”. O controle químico, cultural e biológico são as táticas mais utilizadas para diminuir a população do inseto vetor, reduzindo, assim, a incidência e disseminação da bactéria no campo (McFARLAND; HOY, 2001). Esta doença dizimou a citricultura, especialmente em países africanos e do sudoeste asiático (MARTINEZ; WALLACE, 1967).

Apesar de *D. citri* ser registrado no Brasil desde a década de 40 (COSTA LIMA, 1942), esse inseto adquiriu status de praga-chave dos citros apenas em 2004, quando foram detectadas, nas áreas citrícolas do estado de São Paulo, as bactérias *Candidatus Liberibacter americanus*, *Candidatus Liberibacter asiaticum*, e um fitoplasma, responsáveis pelos primeiros focos do “huanglongbing” no país (FUNDECITRUS, 2004; TEIXEIRA et al., 2005; FUNDECITRUS, 2007). Entretanto, com o surgimento do agente causal do HLB, e o seu potencial como agente transmissor, teme-se que a citricultura paulista seja dizimada por essa doença, à semelhança do registrado em outros países, caso medidas de controle e manejo do vetor e da doença não sejam rapidamente desenvolvidas.

O parasitóide *Tamarixia radiata* (Waterston, 1922) (Hymenoptera: Eulophidae) constitui-se no principal agente de controle biológico de *D. citri*. Este parasitóide tem alta eficiência de parasitismo, bem como uma grande capacidade de dispersão, estabelecimento e adaptação em campo. Assim, o sucesso das liberações de *T. radiata*, para o controle de *D. citri*, tem sido relatado nas Ilhas Reunión, Maurícius e Guadalupe (ÉTIENNE et al., 2001), Taiwan (CHIEN;

CHU, 1996) e nos EUA (HOY; NGUYEN, 2000) e nos países onde ocorre naturalmente, *T. radiata* é responsável pela manutenção da praga em equilíbrio (PLUKE et al., 2003; HALBERT; NUÑEZ, 2004; LIZONDO et al., 2007).

Com os estudos iniciais no Brasil, constatou-se a ocorrência natural do parasitóide *T. radiata*, não havendo, portanto, a necessidade de sua importação para controle de *D. citri* (GÓMEZ TORRES et al., 2006). Desta forma, o presente trabalho tem por objetivo estudar a bioecologia de *T. radiata* e sua interação com a praga, *D. citri*, mediante o levantamento de populações deste parasitóide, estudos de biologia, técnica de criação e liberação, avaliação do parasitismo, determinação da associação *T. radiata* - *Wolbachia* e efeitos no parasitismo, assim como o zoneamento agroecológico de *D. citri* e *T. radiata* com base nas exigências térmicas e higrométricas para o Estado de São Paulo. Neste trabalho, a associação de técnicas moleculares, convencionais e de geoprocessamento permitirão a diferenciação das populações de *T. radiata* coletadas no estado de São Paulo, bem como a compreensão dos parâmetros fisiológicos e/ou ecológicos para viabilizar a utilização de *T. radiata* como mais uma estratégia no manejo da praga e como uma tática dentre as medidas que serão aplicadas para o controle da doença na cultura de citros nas diferentes regiões do estado.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos bioecológicos de *Diaphorina citri*

A postura de *Diaphorina citri* Kuwayama, 1907 (Hemiptera: Psyllidae) é realizada nas brotações novas das plantas hospedeiras e os ovos possuem coloração amarelada, tornando-se mais escuros próximo da eclosão. A duração do período embrionário varia de 9,7 dias a 15°C a 3,5 dias a 28°C, sendo a viabilidade superior a 80% (LIU; TSAI, 2000). As formas jovens são achatadas, pouco convexas, com pernas curtas. A fase ninfal apresenta 5 ínstars, sendo que, ninfas de últimos ínstars apresentam tecas alares, geralmente largas no lado do tórax, aumentando assim a largura do corpo (GALLO et al., 2002). As ninfas secretam uma substância característica, semelhante a “honeydew” (ÉTIENNE et al., 2001). Segundo Liu e Tsai (2000), a duração desta fase varia de 10,6 a 39,6 dias, na faixa térmica de 28 a 15°C e a viabilidade também é superior a 80%, sendo que, nos três últimos ínstars supera o valor de 90%. A duração do ciclo biológico (ovo - adulto) varia de 14,1 a 49,3 dias, nas temperaturas de 28 a 15°C, respectivamente, sendo as temperaturas de 25 e 28°C as mais adequadas para o seu desenvolvimento (LIU; TSAI, 2000); estes autores também observaram que nas temperaturas de 33 e 10°C o psilídeo não se desenvolveu.

Os adultos medem de 2,8 a 3,2 mm de comprimento, possuem coloração marrom-clara quando jovens e apresentam manchas escuras com o passar do tempo. Essas formas são muito ativas, saltando de ramo em ramo ou de planta em planta, em contraste com as formas jovens, que são muito restritas em seus movimentos. São ovíparos, vivendo principalmente nos brotos novos, encontrando-se também nas folhas e ramos de plantas cítricas (GALLO et al., 2002).

Em estudos desenvolvidos com *D. citri* sobre os hospedeiros *Murraya paniculata* (murta), *Citrus limonia* e *Citrus sinensis* (variedades Pêra e Natal), Nava et al. (2007) observaram para a fase de ovo, que a duração nestes hospedeiros variou de 8,2 dias a 18°C para 2,6 dias a 32°C e a viabilidade foi drasticamente reduzida a 32°C, embora a duração e a viabilidade tenham sido semelhantes nos quatro hospedeiros. A temperatura base (T_b) do período embrionário dos insetos criados em *M. paniculata*, *C. limonia* e *C. sinensis* (variedades Pêra e Natal), foi semelhante, sendo de 10,98; 11,10; 11,53 e 11,90°C, respectivamente. Para a fase de ninfa, a duração variou de 39,3 dias a 18°C para 10,7 dias a 30°C, sendo a viabilidade reduzida na temperatura de 30°C. A duração e a viabilidade foram semelhantes nos quatro hospedeiros testados. A T_b das ninfas

criadas em *C. limonia* diferiu das ninfas criadas nos demais hospedeiros. A longevidade das fêmeas é influenciada pela temperatura, sendo de 40 dias a 25°C e superior a 88 dias a 15°C. A fecundidade média a 25°C é de 626 ovos (LIU; TSAI, 2000). A longevidade média também é afetada pela umidade relativa do ar (UR); segundo McFarland e Hoy (2001) a 25°C e com 33% de umidade relativa apenas 20% dos adultos de *D. citri* sobreviveram em 30 horas de exposição a estas condições. Por outro lado, 30 horas após uma exposição a 25°C e umidade relativa de 97%, a sobrevivência foi superior a 60%. Estes autores também comprovaram que a longevidade de *D. citri* foi drasticamente reduzida quando os adultos foram submetidos às condições de 30°C e 33 e 97% de UR.

Aubert (1987) observou, em condições de campo, que umidades relativas entre 87 a 90% causaram entre 60 e 70% de mortalidade em ninfas do psíldeo e quando as umidades relativas foram próximas à saturação causaram epizootias por fungos no segundo a quinto ínstares ninfais de *D. citri*.

2.2 Distribuição geográfica e plantas hospedeiras de *D. citri*

O psíldeo *D. citri* é relatado nas regiões Paleártica, Afrotropical, Oriental e na região Neotropical (AUBERT, 1987). A espécie é provavelmente originária do continente Asiático (CRAWFORD, 1917), mas está distribuído por todo o sudeste da Ásia, Índia, Arábia Saudita, Ilhas Maurícius e Reunião, EUA (Flórida), Venezuela, Brasil, Uruguai e em algumas regiões do Caribe e América Central (CERMELI; MORALES; GODOY, 2000; HALBERT; NÚÑEZ, 2004). Este inseto foi registrado no Brasil em meados do século passado (COSTA LIMA, 1942), e segundo Aubert (1987), *D. citri* é de ocorrência endêmica neste país, sendo registrado nos estados de São Paulo, Bahia, Sergipe, Ceará, Pernambuco, Amazonas, Pará e Rio de Janeiro (SILVA et al., 1968).

Os únicos hospedeiros registrados para *D. citri* são plantas da família Rutaceae, especialmente 21 espécies do gênero *Murraya*, sendo que em muitas delas ocorre somente a postura, sem o desenvolvimento ninfal (SILVA et al., 1968; AUBERT, 1987). Segundo Nava et al. (2007) os hospedeiros *Citrus limonia*, *Citrus sunki* e *Murraya paniculata* não afetaram a duração e a viabilidade da fase de ovo de *D. citri*, cujos valores de duração e viabilidade ficaram próximas de 3,6 dias e 88%, respectivamente. Também a duração da fase ninfal foi semelhante

nos três hospedeiros, com valor próximo de 14 dias, sendo a viabilidade significativamente inferior para insetos criados em *C. sunki*, indicando que os melhores hospedeiros para criação do psilídeo são *C. limona* e *M. paniculata*. Para Aubert (1987), embora o psilídeo tenha um número relativamente grande de hospedeiros da família Rutaceae, nem todos possibilitam seu desenvolvimento completo, sendo *M. paniculata* e *C. aurantifolia* as preferidas para alimentação, postura e desenvolvimento ninfal.

2.3 Danos e importância econômica

Ninfas e adultos de *D. citri* causam danos pela sucção de seiva, injeção de toxinas e picadas sucessivas, que induzem o enrolamento de folhas e retorcimento dos brotos, causando a morte da gema apical e impedindo assim, o crescimento normal da planta (CHIEN; CHU, 1996; HALBERT; MANJUNATH, 2004). Se a infestação for intensa, os ramos secam, levando à redução na produção. Ainda favorecem o desenvolvimento da fumagina devido ao líquido açucarado que expelem e atraem formigas que podem conferir proteção contra a ação de inimigos naturais. Os danos causados pela alimentação desse inseto são sempre maiores durante o período de brotação e na presença de condições ambientais favoráveis (GALLO et al., 2002).

As maiores perdas ocorrem quando *D. citri* está relacionada com a transmissão da bactéria causadora do “huanglongbing” ou “greening”, sendo que as ninfas de 4º - 5º ínstaes e adultos do psilídeo podem adquirir o patógeno quando se alimentam por um período mínimo de 30 minutos em uma planta infectada. Segundo Xu et al. (1990), o patógeno *Candidatus Liberibacter* spp. pode ser detectado nas glândulas salivares do vetor, permanecendo no psilídeo por um período de latência de 3 a 20 dias. Estes mesmos autores afirmam que *D. citri* pode adquirir e transmitir o patógeno durante todo seu ciclo de vida.

Os sintomas que apresentam as plantas com “huanglongbing” podem ser divididos em duas fases, sendo a primeira o amarelecimento inicial das folhas, seguido pelo encarquilhamento e aparecimento de manchas cloróticas de várias tonalidades de amarelo, semelhantes às causadas pela deficiência de zinco (SCHNEIDER, 1968; KOEN; LANGENEGGER, 1970; AUBERT, 1975). Os frutos infestados são pequenos, ácidos e com uma pequena concentração de açúcar (KAPUR et al., 1978). Muitos deles caem prematuramente e os que permanecem nas árvores são impróprios para a indústria (McCLEN; SCHWARZ, 1970). Segundo Aubert et al. (1985) e Su e

Huang (1990) o “greening” é a principal doença dos citros no mundo. Na Índia, a doença causou uma catástrofe na produção de citros (FRASER, 1978); nas Filipinas foram eliminadas cerca de 7 milhões de árvores em 1962 (MARTINEZ; WALLACE, 1967) e a área plantada foi reduzida em aproximadamente 60% entre os anos de 1962 a 1970. Na Tailândia, 95% das árvores foram afetadas pela doença (BHAVAKUL et al., 1981) e na Arábia Saudita todas as variedades de laranja doce e mandarinas foram eliminadas (BOVÉ, 1986).

2.4 Controle de *D. citri* em pomares cítricos

O ectoparasitóide idiobionte *Tamarixia radiata* (Waterston, 1922) (Hymenoptera: Eulophidae) e o endoparasitóide *Diaphorencyrtus aligarhensis* (Shaffee, Alam e Agarwal, 1975) (Hymenoptera: Encyrtidae) têm sido utilizados em programas de controle biológico clássico, reduzindo de forma significativa a população de *D. citri* em diferentes regiões do mundo, e devido à sua eficiência, se destacam como estratégia alternativa a ser adicionada às medidas de manejo complementares dessa praga (AUBERT; QUILICI 1984; CHIEN; CHU, 1996; HOY; NGUYEN; JEYAPRAKASH; 1999; HOY; NGUYEN, 2000; SKELLEY; HOY, 2004).

Alguns predadores também são considerados importantes agentes de controle de *D. citri*. As joaninhas *Harmonia axyridis* (Pallas, 1773), *Olla v-nigrum* (Mulsant, 1866), *Cycloneda sanguinea* (Linnaeus, 1763) e *Exochomus childreni* Mulsant, 1850 (Coleoptera: Coccinellidae) foram consideradas os principais predadores na Flórida (MICHAUD, 2004), enquanto *Chrysopa boninensis* Okamoto, 1914 (Neuroptera: Chrysopidae) e *Menochilus sexmaculatus* (Fabricius, 1781) (Coleoptera: Coccinellidae) são importantes em Taiwan (CHIEN; CHU, 1996).

No Brasil, a implementação de um programa de manejo integrado de *D. citri* é impossibilitado pelo uso constante e de forma indiscriminada de agroquímicos nas regiões citrícolas. Segundo Nakano, Leite e Florim (1999), o controle químico empregado para *D. citri* baseia-se na utilização de organofosforados, piretróides, carbamatos e neonicotinóides. Atualmente existe uma grande preocupação com relação à evolução da resistência de *D. citri* a inseticidas, principalmente aos produtos do grupo dos neonicotinóides e piretróides amplamente utilizados para o controle de diversas pragas na citricultura brasileira. Carvalho (2008) registrou diferenças significativas nas suscetibilidades das populações de *D. citri* entre os inseticidas neonicotinóides, sendo que a maior toxicidade para o psíldeo foi observado com thiamethoxam,

seguido por thiacloprid e imidacloprid. Estudos de resistência do psíldeo *Cacopsylla pyri* (Linnaeus, 1758) a inseticidas, identificou populações resistentes a organofosforados, piretróides, ciclodienos e formamidinas (BUÈS; BOUDINHON; TOUBON, 2003); baseando-se neste fato, deveriam ser tomadas medidas adequadas para evitar o desenvolvimento da resistência a estes inseticidas atuando diferencialmente sob os processos evolutivos de mutação, seleção, fluxo gênico e deriva genética de *D. citri*, mediante a busca de estratégias de conservação e aumento de inimigos naturais para o controle desta praga chave dos citros.

2.5 Biologia de *Tamarixia radiata*

T. radiata é um endoparasitóide idiobionte específico de *D. citri* (AUBERT; QUILICI, 1984; CHIEN, 1995). As fêmeas alimentam-se de ninfas jovens e parasitam, preferencialmente, as ninfas de quinto ínstar, podendo reproduzir-se por partenogênese arrenótoca. Devido às ações combinadas de alimentação e parasitismo, uma única fêmea de *T. radiata* pode destruir até 500 ninfas do psíldeo durante todo seu ciclo de vida (CHIEN; CHU, 1996).

O desenvolvimento imaturo e a sobrevivência dos adultos de *T. radiata* são dependentes da faixa térmica e da presença de alimentação, pois em temperaturas constantes entre 20°C e 30°C o tempo de desenvolvimento diminui com o incremento térmico sendo de 17 dias a 20°C e de 8 dias a 30°C. Dentro da mesma faixa de temperatura, a duração de ovo até pupa também diminui com o incremento da temperatura (FAUVERGUE; QUILICI, 1991). O adulto emerge perfurando o tórax da múmia (FAUVERGUE; QUILICI 1991, HOY; NGUYEN 2000). Na faixa de 20 a 35°C, a longevidade do adulto diminuiu também com o aumento térmico (FAUVERGUE; QUILICI; 1991).

Segundo Quilici, Joulain e Manikom (1992), a longevidade do macho é ligeiramente menor que a da fêmea. Estes autores comprovaram que a fecundidade e a longevidade dos adultos alimentados com mel aumentou notavelmente quando comparada àquela de insetos aos quais foi oferecida somente água ou que não receberam alimento, neste caso, com uma baixíssima taxa de sobrevivência.

O acasalamento de *T. radiata* ocorre 2 a 3 dias após a emergência dos adultos. Para a oviposição, as temperaturas mais favoráveis são de 25 a 30°C, onde as fêmeas colocam cerca 300 ovos (HOY; NGUYEN; JEYAPRAKASH, 1999; HOY; NGUYEN, 2000) e em condições de

laboratório o número médio de múmias resultante do parasitismo varia de 115 a 230 e segundo Quilici, Joulain e Manikom (1992) predominam fêmeas (66-68%) em relação a machos.

As fêmeas colocam os ovos na parte ventral de ninfas do terceiro a quinto instares de *D. citri* e as larvas do parasitóide sugam a hemolinfa do hospedeiro no final do desenvolvimento. Elas fixam os restos da ninfa do psílideo morto (múmia) à superfície da planta como um mecanismo de proteção para a pupa (FAUVERGUE; QUILICI, 1991; HOY; NGUYEN, 2000).

2.6 *T. radiata* como agente de controle biológico

A transmissão de patógenos por artrópodes constitui-se em um grande problema à agricultura. Por este motivo, o controle biológico como tática de controle visa a redução da praga, mantendo a qualidade do agroecossistema (NORRIS; KOGAN; CASWELL-CHEN, 2003).

A potencialidade de liberações e o sucesso de tais liberações de *T. radiata* para o controle biológico de *D. citri* e conseqüentemente do “huanglongbing”, foi referido nas Ilhas Reunião, Maurícius e Guadalupe (ÉTIENNE et al., 2001), Taiwan (CHIEN; CHU, 1996) e nos EUA (HOY; NGUYEN, 2000). Em países onde ocorre naturalmente, *T. radiata* é responsável pela manutenção da praga em equilíbrio (HALBERT; NUÑEZ, 2004).

O “huanglongbing” foi referido pela primeira vez em 1967, nas Ilhas Reunião, tornando-se o principal problema fitossanitário para a citricultura daquela região. Para solucionar os problemas ocasionados por *D. citri* nessas ilhas, foi feita a importação de *T. radiata* da Índia para a utilização em programas de controle biológico clássico desse vetor entre 1975 e 1980, resultando no renascimento da citricultura nestas ilhas francesas (ÉTIENNE et al., 2001).

De uma população originária das Ilhas Reunião, entre 1983 e 1986, em Taiwan, foram realizadas 41 liberações sucessivas do parasitóide em *Citrus* sp. e 32 em *M. paniculata*, com 3.029 e 7.000 espécimens de *T. radiata*, respectivamente. Após as primeiras liberações, em 1984, além de comprovar a potencialidade de *T. radiata* como agente de controle biológico, também foi possível demonstrar-se a capacidade de dispersão e o estabelecimento em áreas distantes (CHIU; CHIEN, 1989).

Em Guadalupe (território francês), em 1998, foi referida a presença de *D. citri* e se comprovou que não existia parasitismo natural em campo. Em 1999 foi liberado *T. radiata* e

atualmente, o parasitóide encontra-se estabelecido, diminuindo notavelmente a população do psilídeo nesta área (ÉTIENNE et al., 2001).

Na Flórida (EUA), *Diaphorencyrtus aligarhensis* e *T. radiata* foram introduzidos para o controle biológico clássico do psilídeo dos citros. *D. aligarhensis* não conseguiu estabelecer-se após as liberações realizadas, mas *T. radiata* encontra-se distribuído em todos os ecossistemas citrícolas, diminuindo notavelmente a população de *D. citri* (HOY; NGUYEN, 2000).

No Brasil, coletas de ninfas de *D. citri* em *M. paniculata* e *Citrus*, durante 2004, indicaram a ocorrência natural de *T. radiata*, sendo registrado em praticamente todas as áreas citrícolas do estado de São Paulo. As variações populacionais (da praga e do parasitóide) ocorrem em diferentes épocas do ano, e parece estar relacionado à região e manejo adotado para pragas e doenças (GÓMEZ TORRES et al., 2006). Segundo Parra, Gómez Torres e Paiva (2007) oito dias após liberações inoculativas o parasitismo de *T. radiata* variou entre 51,5 a 72,7%, e embora, na observação seguinte, 15 dias após a liberação, estas taxas tenham caído para 10 a 4,7%, ficou demonstrado que estes parasitóides têm potencial para estabelecer-se em condições de campo no estado de São Paulo.

Segundo Chien e Chu (1996) outra característica importante em *T. radiata* é sua alta capacidade de dispersão o que permite o estabelecimento natural, mesmo em áreas onde não foram realizadas liberações, como o ocorrido nos EUA (Texas), Porto Rico, Cuba e Argentina (PLUKE et al., 2003; MICHAUD, 2004; GONZÁLEZ et al., 2007; LIZONDO et al., 2007).

Referências

AUBERT, B. La lutte aménagée contre les ravageurs des agrumes en Afrique du sud et ses applications pour les Mascareignes. **Fruits**, Paris, v. 30, p. 149-159, 1975.

_____. Le psylle asiatique dès agrumes (*Diaphorina citri*) Kuwayama au Brésil. **Fruits**, Paris, v. 42, p. 225-229, 1987.

AUBERT, B.; QUILICI, S. Biological control of the African and Asian citrus psyllids (Homoptera: Psylloidea), through eulophid and encyrtid parasites (Hymenoptera: Chalcidoidea) in Reunion Island. In: CONFERENCE OF THE INTERNACIONAL OF CITRUS VIROLOGISTS, 9., 1984, Riverside. **Proceedings...** Riverside: University of California, 1984. p. 100-108,

AUBERT, B.; GARNIER, D.; GUILLAUMIN, D.; HERBAGYANDONO, B.; SETIOBUDI, L.; NURHADI, F. Le greening, une sérieuse menace pour les productions agrumicoles de l'archipel indonésien. Perspectives de lutte. **Fruits**, Paris, v. 40, p. 549-563, 1985.

BHAVAKUL, K.; INTAVIMOLSRI, S.; VICHITRANANDA, S.; KRATUREUK, C.; PROMMINTARA, M. The current citrus disease situation in Thailand with emphasis on citrus greening. **Proceedings of the International Society of Citriculture**, Davao, v. 1, p. 464-466, 1981.

BOVÉ, J.M. Greening in the Arab Peninsula: towards new techniques for its detection and control. **FAO Plant Protection Bulletin**, Rome, v. 34, p. 7-14, 1986.

BUÈS, R.; BOUDINHON, J.F.; TOUBON, J.F. Resistance of pear psylla (*Cacopsylla pyri* L.; Hom., Psyllidae) to deltamethrin and synergism with piperonyl butoxide. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 127, p. 305-312, 2003.

CARVALHO, L.S.P. **Toxicidade de inseticidas neonicotinóides sobre o psíldeo *Diaphorina citri* Kuwayama e o parasitóide *Tamarixia radiata* (Waterston)**. 2009. 59 p. Tese (Doutorado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

CERMELI, M.; MORALES, P.; GODOY, F. Presencia del psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) em Venezuela. **Boletín de Entomología Venezolana**, Caracas, v. 15, p. 235-243, 2000.

CHIEN, C.C. The role of parasitoids in the pest management of citrus psyllid. In: SYMPOSIUM ON RESEARCH AND DEVELOPMENT OF CITRUS IN TAIWAN, 1995, Taichung. **Proceedings...** Taichung, 1995. p. 245-261,

CHIEN, C.C.; CHU, Y. I. Biological control of citrus psyllid, *Diaphorina citri* in Taiwan. Biological Pest Control in Systems of Integrated Pest Management. **Reprinted from Food and Fertilizer Technology Center Book Series**, Taipei, n. 47, p. 93–104, 1996.

CHIU, S.C.; CHIEN, C.C. Control of *Diaphorina citri* in Taiwan with imported *Tetrastrichus radiatus*. **Frutis**, Paris, v. 44, p. 29-31, 1989.

COSTA LIMA, A.M. **Insetos do Brasil**, Homoptera. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Agronomia. 1942. t. 3, 101 p.

CRAWFORD, D.L. Philippines and asiatic Psyllidae. **Philippines Journal of Science**, Taguig, v. 12, p. 163-175, 1917.

ÉTIENNE, J.; QUILICI, S.; MARINAL, D.; FRANCK, A. Biological control of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in Guadeloupe by imported *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae). **Fruits**, Paris, v. 56, p. 307-315, 2001.

FAUVERGUE, X.; QUILICI, S. Étude de certains paramètres de la biologie de *Tamarixia radiata* (Waterston, 1922) (Hymenoptera: Eulophidae), ectoparasitoïde primaire de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). Vecteur asiatique du greening des agrumes. **Fruits**, Paris, v. 46, p. 179-185, 1991.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. **AGRIANUAL 2007**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2007. 516 p.

FRASER, L.R. Recognition and control of citrus virus diseases in Australia. **Proceedings of the International Society of Citriculture**, Sydney, p. 178-181. 1978.

FUNDECITRUS. Greening chega às regiões Norte e Sul do Estado. **Revista Fundecitrus**, Araraquara, v. 124, p. 8-11, 2004.

_____. Descoberta nova bactéria que causa greening. **Revista Fundecitrus**, Araraquara, v. 141, p. 6-8, 2007.

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.; VENDRAMIM, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920 p.

GÓMEZ TORRES, M.L.; NAVA, D.E.; GRAVENA, S.; COSTA, V.A.; PARRA, J.R.P. Primeiro registro de *Tamarixia radiata* (Waterston) (Hymenoptera: Eulophidae) em *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) no Brasil. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 81, p. 112-117, 2006.

GONZÁLEZ, C.; VERA, A.; HERNÁNDEZ, D.; TAPIA, J.L. Comportamiento de *Diaphorina citri* Kuw. (Hemiptera: Psyllidae) y sus enemigos naturales en Naranja Valencia de Arimao, Cienfuegos. In: SIMPOSIO INTERNACIONAL DE FRUTICULTURA TROPICAL Y SUBTROPICAL, 2., 2007, La Habana. **Memorias...** Ciudad de la Habana: Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical, 2007. p. 1-13.

HALBERT, S.E.; MANJUNATH, K.L. Asian citrus psyllids (Stenorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: A literature review and assessment of risk in Florida. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 87, p. 330-352, 2004.

HALBERT, S.E.; NUÑEZ, C.A. Distribution of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) in the Caribbean basin. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 83, p. 401-402, 2004.

HOY, M.A.; NGUYEN, R. Classical biological control of Asian citrus psylla. **Citrus Industry**, Tampa, v. 81, p. 48-50, 2000.

HOY, M.A.; NGUYEN, R.; JEYAPRAKASH, A. Classical biological control of Asian citrus psylla. **Citrus Industry**, Tampa, v. 80, p. 20-22, 1999.

HOY, M.A.; JEYAPRAKASH, A.; MORAKOTE, R.; LO, P.K.C.; NGUYEN, R. Genomic analyzes of two populations of *Ageniaspis citricola* (Hymenoptera: Encyrtidae) Suggest that a cryptic species may existe. **Biological Control**, Orlando, v. 17, p. 1-10, 2000.

KAPUR, S.P.; KAPOOR, S.K.; CHEEMA, S.S.; DHILLON, R.S. Effect of greening disease on tree and fruit characters of kinnow mandarin. **Punjab Horticulture Journal**, Punjab, v. 18, p. 176-179, 1978.

KOEN, T.J.; LANGENEGGER, W. Effect of greening virus on the macroelement content of citrus leaves. **Farming in South Africa**, Pretoria, v. 45, p. 65, 1970.

LIU, H.Y.; TSAI, J.H. Effects of temperature on biology and life table parameters of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae), **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 137, p. 201-206, 2000.

LIZONDO, M.J.; GASTAMINZA, G.; COSTA, V.A.; AUGIER, L.; GÓMEZ TORRES, M.L.; WILLINK, E.; PARRA, J.R.P. Records of *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae) in Northeastern Argentina. **Revista Industrial y Agrícola de Tucumán**, Tucumán, v. 84, p. 21-22, 2007.

MARTINEZ, A.L.; WALLACE, J.M. Citrus leaf mottle-yellows disease in the Philippines and transmission of the causal virus by a psyllid, *Diaphorina citri*. **Plant Disease Reporter**, Washington, v. 58, p. 692-695, 1967.

McCLEN, A.P.D.; SCHWARZ, R.E. Greening of blotchy-mottle disease of citrus. **Phytophylactica**, Pretoria, v. 2, p. 177-194, 1970.

McFARLAND, C.D.; HOY, M.A. Survival of *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae), and its two parasitoids, *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae) and *Diaphorencyrtus aligarhensis* (Hymenoptera: Encyrtidae), under different relative humidities and temperature regimes. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 84, p. 227-233, 2001.

MICHAUD, J.P. Natural mortality of Asian citrus psyllid (Homoptera: Psyllidae) in central Florida. **Biological Control**, Orlando, v. 29, p. 260-269, 2004.

NAKANO, O.; LEITE, C.A.; FLORIM, A.C.P. Controle químico do psilídeo dos citros, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). **Laranja**, Cordeirópolis, v. 20, p. 319-328, 1999.

NAVA, D.E.; GÓMEZ TORRES, M.L.; RODRIGUES, M.D.A.; BENTO, J.M.S.; PARRA, J.R.P. Biology of *Diaphorina citri* (Hem., Psyllidae) on diferent hosts and at different temperatures. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 131, p 709-715, 2007.

NORRIS, R.; KOGAN, M.; CASWELL-CHEN, E. **Concepts in integrated pest management**. Prentice Hall: Hardcover, 2002. 608 p.

PARRA, J.R.P.; GÓMEZ TORRES, M.L.; PAIVA, P.E.B. Eficiência do parasitóide *Tamarixia radiata* para o controle biológico do psílideo *Diaphorina citri* em São Paulo. **Citricultura Atual**, Cordeirópolis, v. 61, p. 18-19, 2007.

PLUKE, R.W.H.; ESCRIBANO, A.; MICHAUD, J.P.; STANSLY, P.A. Potential impact of lady beetles on *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) in Puerto Rico. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 88, p. 123-128, 2003

QUILICI, S.; JOULAIN, H.; MANIKOM, R. Étude de la fécondité de *Tamarixia radiata* (Waterston, 1922) (Hymenoptera: Eulophidae), ectoparasitoide primaire du psylle asiatique *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae), vecteur du greening des agrumes. **Fruits**, Paris, special, p. 184-194, 1992.

SCHNEIDER, H. Anatomy of greening diseased sweet orange shoots. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 58, p. 1155-1160, 1968.

SILVA, A.G.A.; GONÇALVES, C.R.; GALVÃO, D.M.; GONÇALVES, A.J.L.; GOMES, J.; SILVA, M.N.; SIMONI, L. **Quarto catálogo dos insetos que vivem nas plantas do Brasil: seus parasitos e predadores**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1968. 622 p. pt. 2, t. 1, Insetos, hospedeiros e inimigos naturais.

SKELLEY, L.H.; HOY, M.A. A synchronous rearing method for the Asian citrus psyllid and its parasitoids in quarantine. **Biological Control**, Orlando, v. 29, p. 14-23, 2004.

SU, H.J.; HUANG, A.L. The nature of Likubin organism, life cycle, morphology and possible strains. In: CONFERENCE, UNITED NATIONS DEVELOPMENT PROGRAM - FOOD AGRICULTURE ORGANIZATION REGIONAL PROJECT FOR CITRUS GREENING CONTROL, 4., 1990, Zimbabwe. **Proceedings...** Zimbabwe: United Nations Development, 1990. p. 106-110.

TEIXEIRA, D.C; SAILLARD, C.; EVEILLARD, S.; DANET, J.L; DA COSTA, P.I; AYRES, A.J.; BOVÉ, J. *Candidatus Liberibacter americanus*, associated with citrus huanglongbing (greening disease) in São Paulo State, Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 55, p. 1857-1862, 2005.

XU, C.; XIA, Y.; LI, K.; KE, C. Study on latent period of pathogen of citrus huanglungbing in citrus psylla, *Diaphorina citri* Kuwayama. **Acta Phytopathologica Sinica**, Beijing, v. 20, p. 25-31. 1990.

3 POLICROMISMO EM POPULAÇÕES DE *Tamarixia radiata* (Waterston, 1922) (Hymenoptera: Eulophidae)

Resumo

O ectoparasitóide *Tamarixia radiata* (Waterston, 1922) (Hymenoptera: Eulophidae) constitui-se no principal agente de controle biológico de *Diaphorina citri* Kuwayama, 1907 (Hemiptera: Psyllidae) e tem sido registrado em praticamente todas as áreas citrícolas paulistas. Nas populações amostradas foram detectados espécimes que apresentaram variações cromáticas com pernas e extremidade do gáster escurecidos, diferentes daqueles espécimes típicos de *T. radiata*. Populações deste parasitóide coletadas no estado de São Paulo, e que apresentavam variações cromáticas, foram comparadas com outras provenientes da Argentina e Flórida (EUA) para verificar se a possível origem destas variações era de caráter genotípico ou fenotípico. As análises morfométricas dos caracteres selecionados não indicaram diferenças nas dimensões e nas proporções dos caracteres selecionados (cabeça, escapo, pedicelo, segmentos funiculares, clava, mesossoma, escutelo, dorselo, propódeo, fêmur e tibia posteriores, asa anterior, célula costal, nervuras marginal e estigmal, ovipositor, franjas da asa anterior) das populações selecionadas com relação aos espécimes com características típicas de *T. radiata*. A alta similaridade encontrada para os diferentes marcadores moleculares utilizados (ITS1 e ITS2), indicam que as variações cromáticas presentes nas populações deste parasitóide é um caráter plástico, normalmente decorrente da resposta ao ambiente diante da variação intra-específica natural dessa espécie.

Palavras-chave: Plasticidade genotípica; Variação cromática; DNA genômico; ITS

Abstract

The ectoparasitoid *Tamarixia radiata* (Waterston, 1922) (Hymenoptera: Eulophidae) is the main biological control agent of *Diaphorina citri* Kuwayama, 1907 (Hemiptera: Psyllidae) and has been recorded in practically all citrus-growing areas of the State of São Paulo. Specimens with chromatic variations were detected in the sampled populations, with the legs and tip of the gaster darkened, differing from typical *T. radiata* specimens. Populations of this parasitoid collected in the State of São Paulo showing chromatic variations were compared with others from Argentina and Florida (USA) to verify whether the possible source of those variations was of a genotypic or a phenotypic nature. The morphometric analyses of the selected characters did not indicate differences in their dimensions and proportions (head, scape, pedicel, funicle segments, club, mesosoma, scutellum, dorsellum, propodeum, hind femur and tibia, forewing, costal cell, marginal and stigmal veins, ovipositor, forewing fringes) from selected populations with regard to specimens that have typical *T. radiata* traits. The high similarity found for the various molecular markers used (ITS1 and ITS2) indicated that the chromatic variations present in populations of this parasitoid constitute a plastic character, normally resulting from a response to the environment in face of natural intraspecific variation in this species.

Keywords: Genotypic plasticity; Chromatic variation; Genome DNA; ITS

3.1 Introdução

Variações cromáticas em resposta à influência da temperatura têm sido freqüentemente relatadas para diferentes grupos de insetos (CAPY; DAVID; ROBERTSON, 1988; LAUDONIA; VIGGIANI, 1993; PÉTAVY et al., 2002), pois temperaturas mais baixas produzem maior pigmentação em locais específicos do corpo nos insetos, desde que cores mais escuras absorvem mais radiação solar, visível ou infravermelho, sob estas condições (DAVID et al., 1985; DAVID; CAPY, 1990; KINGSOLVER; WIERNASZ, 1991; SOLENSKY; LARKIN, 2003; GIBERT et al., 2004). A taxonomia de Hymenoptera é exclusivamente baseada na comparação de caracteres morfológicos; assim, podem ser cometidos erros quando as espécies são diferenciadas baseando-se em caracteres morfológicos de origens desconhecidas (ASKEW, 1971).

Tamarixia radiata (Waterston, 1922) (Hymenoptera: Eulophidae) é um dos principais parasitóides de *Diaphorina citri* Kuwayama, 1907 (Hemiptera: Psyllidae) e o potencial de liberações deste ectoparasitóide como tática para racionalizar o controle destes psilídeo já foi relatado em vários países (ÉTIENNE et al., 2001, CHIEN; CHU, 1996; HOY; NGUYEN, 2000). Estes parasitóides apresentam altas taxas de parasitismo e alta capacidade de dispersão (CHIEN; CHU 1996), estabelecendo-se naturalmente mesmo em áreas onde não foram realizadas liberações, como o ocorrido nos EUA (Texas), Porto Rico Brasil e Argentina (PLUKE et al., 2003; MICHAUD, 2004; GÓMEZ TORRES et al., 2006; LIZONDO et al., 2007).

A coloração das pernas é um caráter taxonômico importante para o gênero *Tamarixia* (GRAHAM, 1991). *T. radiata* foi descrita como tendo todas as pernas de coloração branca ou amarelo clara e a parte ventral do gáster inteiramente amarelo clara (WATERSTON, 1922). Este parasitóide é a única espécie do gênero registrada no Brasil. Na região Neotropical ocorrem ainda *T. leucenae* Bouček (BOUČEK, 1988; McCLAY, 1990) e *T. triozae* (Burks) (LOMELI-FLORES; BUENO PARTIDA, 2002). Na região Neártica, são relatadas *T. dyra* (Burks) (BURKS, 1944; LaSALLE, 1994), *T. triozae* (BURKS, 1944), *T. leucenae* (LaSALLE, 1994) e *T. radiata* (HOY, 2000; MICHAUD, 2004), sendo esta última somente registrada sobre *D. citri* (NOYES, 2003).

Apesar da presença de *D. citri* já ser relatada no Brasil desde 1942 (COSTA LIMA, 1942), foi apenas durante 2004 e em decorrência da intensificação dos estudos devido à constatação do “huanglongbing” ou “greening” no país (FUNDECITRUS, 2004; TEIXEIRA et

al., 2005; FUNDECITRUS, 2007), que a ocorrência natural de *T. radiata* foi relatada (GÓMEZ TORRES et al., 2006); estes últimos autores também verificaram que as variações populacionais da praga e do parasitóide ocorrem em diferentes épocas do ano e parecem estar relacionadas à região e ao manejo adotado para pragas e doenças.

Muitos organismos vivem em ambientes onde as condições mudam periodicamente, o que favorece a hipótese de que tais variações ambientais exercem pressão de seleção que favorecem a evolução constante dos ciclos de vida destes organismos até aperfeiçoar diversos caracteres morfológicos e/ou fisiológicos que conferem resistência às condições adversas. Desta maneira, em muitas espécies ectodérmicas, tem sido relatada uma alta variabilidade relacionada à pigmentação do corpo devido à plasticidade fenotípica ou polimorfismo genético (KINGSOLVER; WIERNASZ, 1991; HOLLOWAY; MARRIOTT; CROCKER, 1997). Assim, o objetivo do presente estudo foi realizar o levantamento populacional de *T. radiata* em pomares cítricos do estado de São Paulo e caracterizar os diferentes tipos cromáticos observados.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Levantamento populacional de *Tamarixia radiata* em regiões citrícolas de São Paulo

Para identificar os parasitóides associados a *Diaphorina citri* Kuwayama, 1907 (Hemiptera: Psyllidae) em pomares cítricos comerciais, foram realizadas amostragens nos municípios de Barretos (20°33'26"S - 48°34'04"W), Botucatu (22°53'09"S - 48°26'42"W), Cafelândia (21°48'09"S - 49°36'36" W), Casa Branca (21°46'26"S - 47°05'11"W), Guarantã (21°53'47"S - 49°35'25"W), Itaju (21°58'50"S - 48°48'15"W), Itirapina (22°15'10"S - 47°49'22"W), Pederneiras (22°21'06"S - 48°46'30"W), Piracicaba (22°43'31"S - 47°38'57"W), Pongá (21°44'10"S - 49°21'22"W), Ribeirão Bonito (22°03'59"S - 48°10'42"W) e São Carlos (22°01'04"S - 47°53'27"W) (Figura 1).

Em cada levantamento, foi feita a coleta de cinco ramos de brotações novas em dez plantas contendo ninfas de *D. citri*. A coleta foi feita de forma cuidadosa, com tesoura de poda, de modo a não perturbar os insetos presentes até o acondicionamento para transporte. Os ramos coletados foram colocados em sacos de papel devidamente etiquetados (Figura 2) e acondicionados em caixas de isopor para serem transportados até o laboratório,

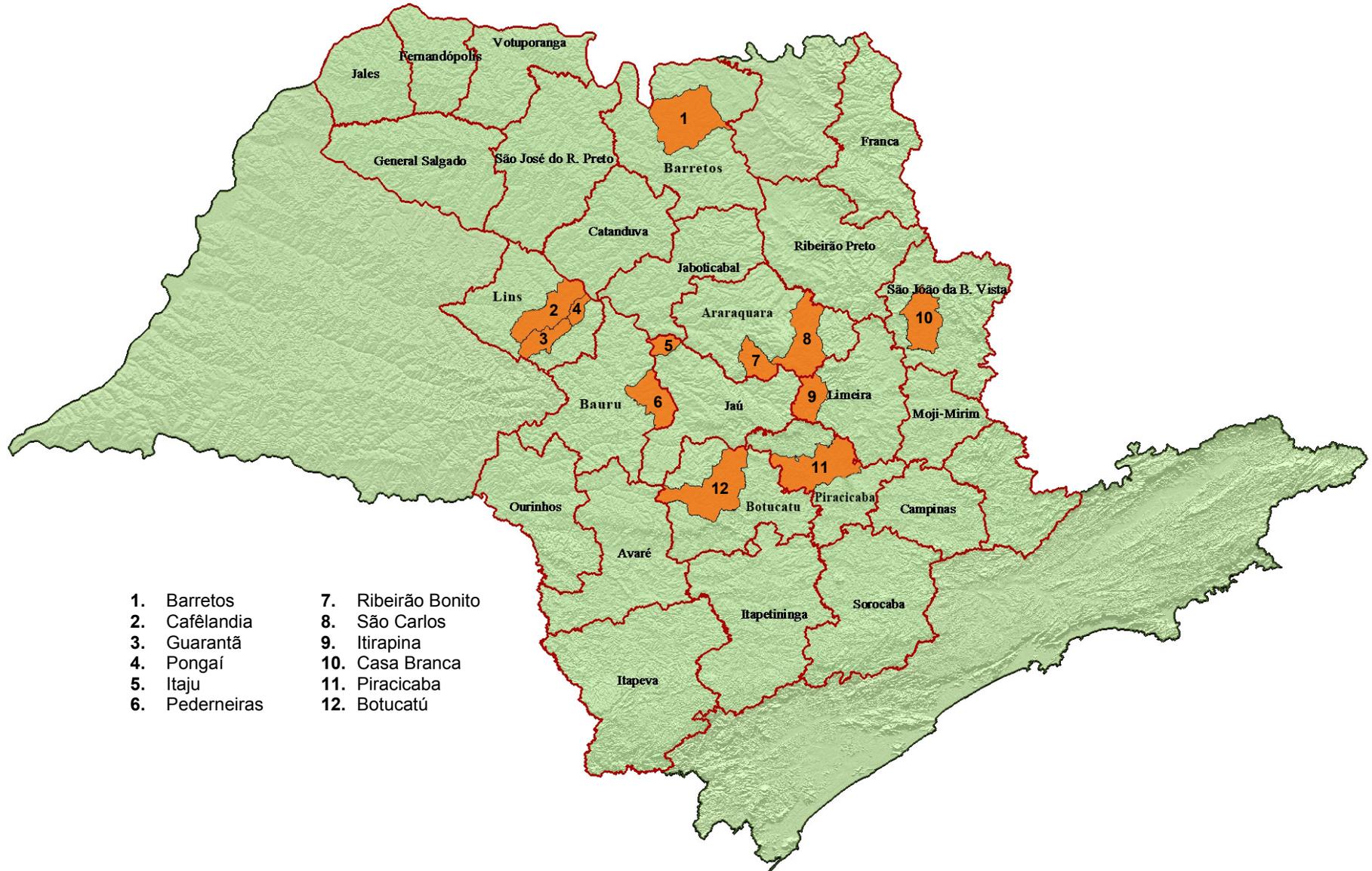


Figura 1 - Locais do levantamento populacional de *Tamarixia radiata* parasitando ninfas de *Diaphorina citri* em áreas cítricas do estado de São Paulo. Amostragens realizadas entre setembro de 2004 e março de 2007, sendo os locais de coleta marcados com a coloração laranja

onde foram mantidos a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 14 horas sobre uma folha de papel de filtro umedecida em gaiolas de $35 \times 45 \times 35$ cm.

Para se determinar a porcentagem de parasitismo e de emergência, as gaiolas contendo as ninfas foram vistoriadas diariamente para a retirada dos parasitóides emergidos, sendo uma parte destes parasitóides fixada em álcool 70% e enviada para o Dr. Valmir A. Costa, do Laboratório de Controle Biológico, do Centro Experimental do Instituto Biológico em Campinas, SP, para identificação. A outra parte dos parasitóides coletados foi transferida ao Laboratório de Biologia de Insetos do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da ESALQ - USP para dar continuidade à criação de manutenção de *Tamarixia radiata* (Waterston, 1922) (Hymenoptera: Eulophidae) em condições de laboratório.



Figura 2 - Material coletado em campo contendo ninfas de *Diaphorina citri*. **A**- Amostras acondicionadas em sacos de papel, etiquetados para serem levados até o laboratório e mantidas à temperatura $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\%$ UR e fotofase de 14 horas; **B**- Ninfa de quinto instar de *Diaphorina citri*, instar preferencial do parasitóide

3.2.2 Policromia em populações de *T. radiata*

Do material coletado nos diferentes municípios citrícolas do estado de São Paulo (item 3.2.1), de alguns espécimes provenientes da província de Tucumán, norte da Argentina (amostras cedidas pelos pesquisadores Lucrecia Augier e Gerardo Gastaminza da Estación Experimental “Obispo Colombes”), e daqueles de Gainesville, Flórida, EUA (amostras enviadas pela

Dra. Marjorie A. Hoy da Universidade da Flórida), foram observadas variações cromáticas em populações de *T. radiata*.

Os espécimes que apresentaram variações cromáticas foram analisados pelo Dr. Valmir A. Costa, que avaliou as proporções dos seguintes caracteres: cabeça, escapo, pedicelo, segmentos funiculares, clava, mesossoma, escutelo, dorselo, propódeo (medido na região mediana), fêmur e tibia posteriores, asa anterior, célula costal, nervuras marginal e estigmal, ovipositor e franjas da asa anterior. Também foram comparados a textura do tegumento, a posição dos soquetes antenais, o número de setas na nervura marginal e as cores das pernas e gáster.

As dimensões foram obtidas com o uso de microscópio estereoscópico Leica MZ16 equipado com câmara digital Leica DCF420, após captura de imagens com auxílio do programa Leica Application Suite (Leica Microsystems, Heerbrugg, Suíça) e análise no programa Auto-Montage Pro (Synoptics Ltd., Cambridge, Reino Unido).

3.2.3 Caracterização dos marcadores moleculares ITS1 e ITS2 de populações policrômicas de *T. radiata*

3.2.3.1 Extração do DNA genômico

Para comprovar as análises morfométricas preliminares desenvolvidas, as amostras foram submetidas à análise molecular das regiões ITS1 e ITS2 do rDNA. Os insetos coletados foram mantidos a -80°C em etanol absoluto até o momento de extração do DNA. Foi utilizado um indivíduo de cada população selecionada para extração do DNA, utilizando-se o sistema PureLink™ Genomic DNA Purification Kit (Invitrogen™, catálogo no. K1810-01), seguindo as instruções do fabricante. A qualidade do material extraído foi verificada em gel de agarose 0,8%, visualizado em fonte de luz ultravioleta. O DNA extraído foi utilizado em reações de amplificação das regiões ITS1 e ITS2 do rDNA de cada população analisada.

As regiões ITS1 e ITS2 do rDNA foram detectadas em reações de amplificação utilizando os conjuntos de iniciadores universais CAS18sF1 (5'- TACACACCGCCCGTCGCTACTA-3') e CAS28sB1d (5'- TTCTTTTCCTCCSCTTAYTRATATGCTTAA-3') para o ITS1 e CAS5p8sFc (5'-TGAACATCGACATTTYGAACGCACAT-3') e CAS28sB1d (5'-TTCTTTTCCTCCSCTTAYTRATATGCTTAA-3') para ITS2 (YA-JIE; DE-XING; LI-JUN,

2003). As amplificações foram realizadas em termociclador programado a 94°C por 4 min (1 ciclo); 30 ciclos a 95°C por 20s, 60°C por 40s e 72°C por 1 minuto. As reações de PCR foram realizadas em volume final de 25 µL, contendo 5 µL de 5x Green GoTaq Flex Buffer, 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 400 pMol de cada iniciador e 0,5 unidades de GoTaq Flexi DNA e 1µl do DNA genômico. Os fragmentos de DNA assim amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídeo, em tampão TAE, para a coloração dos fragmentos de DNA, sendo os amplicons visualizados e fotografados sob luz ultravioleta.

3.2.3.2 Clonagem, seqüenciamento e análise

Todos os produtos de amplificação obtidos foram visualizados em gel de agarose 1,5% para a verificação da amplificação de amplicon de tamanho esperado. Para confirmar a especificidade dos conjuntos de iniciadores utilizados e a identificação das regiões estudadas, os amplicons produzidos em todas as reações foram inseridos em sistema vetor PGENT-Easy (Promega) e clonados em células competentes de *Escherichia coli* 5α (Invitrogen), seguindo recomendações do fabricante. Resumidamente, as células competentes foram colocadas em gelo, foram adicionados 2µL da reação de ligação do inserto-plasmídeo, e as mesmas foram submetidas a tratamento térmico (30 seg a 42°C e novamente colocadas no gelo). A seguir, foram adicionados 125µL de meio SOC e as amostras incubadas sob agitação (125rpm a 37°C). Os transformantes foram selecionados em placas LB agar-ampicilina, acrescidas de 50 µg/ml de X-GAL (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo). Para cada transformante analisado foram isolados três clones positivos, cultivados em meio LB líquido acrescido de ampicilina (100 µg/ml) (37°C por 16 h) e submetidos à extração do DNA plasmidial. O DNA plasmidial foi extraído após sedimentação das células (12000g x 1 min.). O pellet de células foi ressuspensão em 110 µl de tampão de ressuspensão (50mM Tris-HCl, pH 7,5; 10mM EDTA), acrescido de 10 µl de RNase A (100 µg/ml). Após a ressuspensão das células, adicionou-se 100 µl de tampão de lise (400 mM NaOH, SDS 2%), e o tubo foi gentilmente agitado por inversão (x3). A reação de lise foi interrompida com a adição de 120 µl de tampão neutralizador (5M acetato de potássio, pH 5,5) e a amostra foi novamente agitada por inversão do tubo, sendo incubada à temperatura ambiente por 3 min com centrifugação final a 12000g (2 min) para sedimentação dos restos

celulares. O sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo, ao qual foram adicionados 200 µl de isopropanol gelado, e incubado por 1 min à temperatura ambiente. O DNA foi então sedimentado após centrifugação a 14000g por 1 min, o sobrenadante descartado e o pellet de DNA lavado em banhos sucessivos de 70% etanol, antes de ser seco à temperatura ambiente e ressuspenso em água Milli-Q autoclavada. O DNA plasmidial coletado foi armazenado a -20°C até sua utilização.

Os insertos dos diferentes transformantes foram seqüenciados pela reação do ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing, no Centro de Estudos do Genoma Humano - USP. As seqüências obtidas foram alinhadas utilizando-se o software *Blastn*, disponível no “National Center for Biotechnology Information (NCBI)” (www.ncbi.nlm.nih.gov). Após o alinhamento inicial de todas as seqüências, as discrepâncias foram corrigidas manualmente e os intervalos das seqüências removidos utilizando-se como referência os traços impressos dos seqüenciamentos. O método de distância foi utilizado na avaliação das seqüências para as diferentes populações de *T. radiata* estudadas, sendo as distâncias analisadas utilizando o programa MEGA 4.0 (TAMURA et al., 2007).

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Levantamento populacional de *Tamarixia radiata* em regiões citrícolas de São Paulo

Os parasitóides coletados em ninfas de *Diaphorina citri* Kuwayama, 1907 (Hemiptera: Psyllidae) foram identificados como *Tamarixia radiata* (Waterston, 1922) (Hymenoptera: Eulophidae). Entre os insetos coletados e que não são parasitóides de *D. citri*, foram encontrados os gêneros *Aphelinus*, *Aphidius* e *Lysiphlebus*, que são parasitóides de *Toxoptera citricida*, presente em abundância nos ramos com *D. citri*. *Ceraphron* foi outro gênero coletado e que parasita uma grande gama de hospedeiros, atuando inclusive como parasitóide secundário. É possível que também estivesse parasitando outro inseto e não *D. citri*. O díptero pertencente à família Cecidomyiidae, também coletado, pode ser um predador de ninfas de *D. citri*.

Com estes estudos iniciais no Brasil, constatou-se a ocorrência natural do parasitóide *T. radiata* em diversas regiões, apresentando, em condições de campo, taxas de parasitismo e emergência variáveis de 20 a 80% (Tabela 1). Deve-se considerar que estas taxas de parasitismo ocorreram em pomares com adequado manejo de pragas e doenças. Desta forma, variações

populacionais da praga e do parasitóide podem ocorrer ao longo das diferentes épocas do ano, dependendo da região e do manejo adotado para pragas e doenças da cultura.

É importante salientar que em estudos realizados entre 1993 e 1994 por Gravena et al. (1996), em pomares de citros de todo o Estado de São Paulo não se constatou a presença de parasitóides de *D. citri* nas plantações brasileiras. Posteriormente ele apareceu em observações mais recentes, constatou-se a eliminação de grande parte da população deste parasitóide que, aparentemente, mantinha a população da praga em equilíbrio até julho de 2004, provavelmente devido à aplicação indiscriminada de produtos químicos em citros utilizados para o controle de insetos e ácaros, assim como do psílideo vetor e, conseqüentemente, do “huanglongbing”.

Tabela 1 - Parasitismo e emergência, por localidade, de *Tamarixia radiata* coletada sobre ninfas de *Diaphorina citri* em áreas citrícolas do estado de São Paulo, no período de abril de 2005 a março de 2007

Municípios	<i>T. radiata</i>	
	Parasitismo (%)	Emergência (%)
Barretos	56,79 ± 3,00	65,76 ± 3,26
Botucatu	37,50 ± 4,05	62,50 ± 9,12
Cafêlandia	21,41 ± 1,34	41,52 ± 5,11
Casa Branca	27,53 ± 0,84	78,47 ± 1,74
Gurantã	39,33 ± 4,47	79,66 ± 2,71
Itaju	24,10 ± 2,15	55,21 ± 2,54
Itirapina	48,84 ± 2,85	79,17 ± 5,52
Piracicaba	74,80 ± 2,65	77,25 ± 2,27
Pederneiras	57,94 ± 1,97	64,52 ± 2,36
Pongá	36,49 ± 3,37	43,18 ± 7,36
Riberão Bonito	80,00 ± 7,86	50,00 ± 4,82
São Carlos	76,86 ± 1,68	77,06 ± 1,62

3.3.2 Variação cromática em populações de *T. radiata*

Do material coletado nos diferentes municípios citrícolas do estado de São Paulo, Tucumán (Argentina) e de Gainesville (Flórida, EUA), foram identificados os seguintes grupos cromáticos:

1. *T. radiata* típica, com a extremidade ventral do gáster e pernas amarelas, com o fêmur posterior, às vezes, levemente escurecido (Figura 3A);
2. *T. radiata* com a extremidade ventral do gáster e pernas escurecidas (Figura 3B).

Entre estes dois grupos principais, duas variações foram observadas:

3. *T. radiata* de pernas amarelas e extremidade ventral do gáster escurecida (Figura 3C);
4. *T. radiata* de pernas escuras e extremidade ventral do gáster clara (Figura 3D).

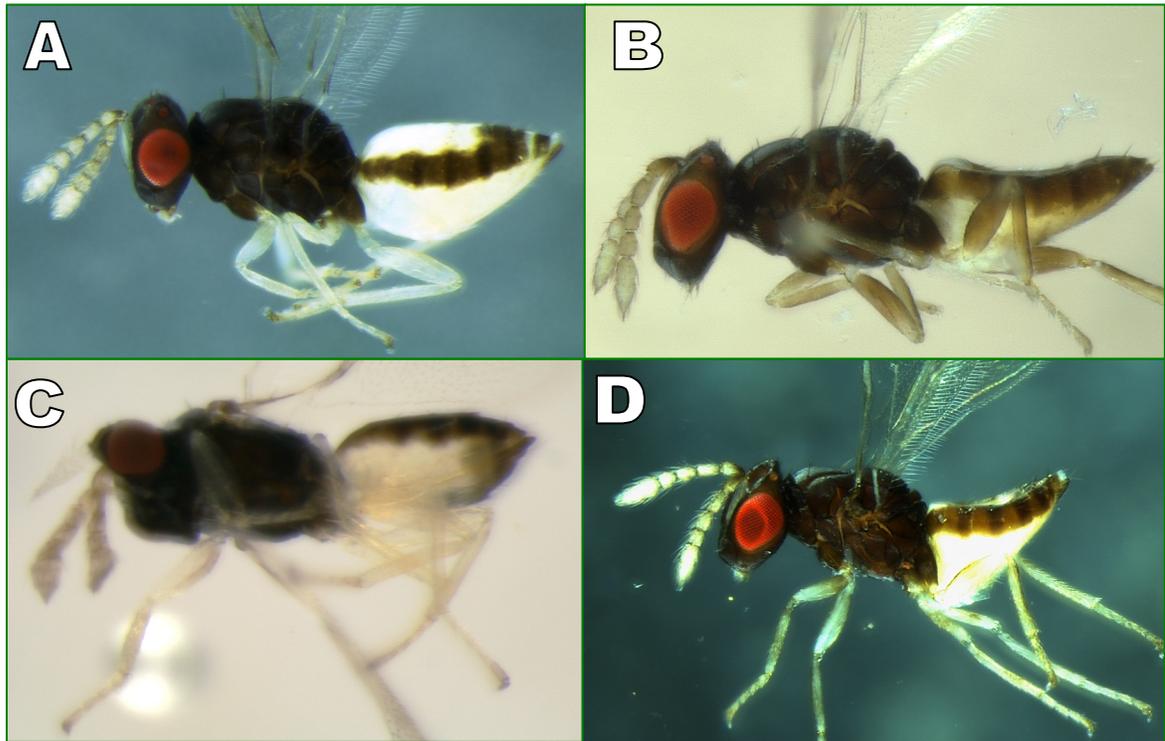


Figura 3 - Variação cromática em populações de *Tamarixia radiata*. **A-** *Tamarixia radiata* típica; **B-** *Tamarixia radiata* com pernas e extremidade ventral do gáster escurecida; **C-** *Tamarixia radiata* com pernas claras e extremidade ventral do gáster escurecida; **D-** *Tamarixia radiata* com pernas escurecidas e extremidade ventral do gáster clara

As populações de *T. radiata* que apresentaram variações cromáticas foram aquelas coletadas em Itirapina, Pederneiras, Piracicaba e São Carlos, estado de São Paulo, Brasil, e Tucumán, região norte da Argentina. Três variações cromáticas foram detectadas em populações amostradas no Brasil e na Argentina, e em indivíduos de uma das populações, todas as pernas são levemente escurecidas, com apenas as extremidades mais claras; numa outra, além das pernas escurecidas, o quarto distal do gaster é levemente escurecido ventralmente. Em uma terceira combinação onde os espécimes apresentaram o quarto distal do gaster levemente escurecido, as pernas eram amareladas como em *T. radiata* típica.

Os espécimes que apresentaram pernas e extremidade do gaster escurecidos são tão diferentes dos espécimes típicos de *T. radiata* (em termos de coloração) que fica até difícil assumir que todos pertençam à mesma espécie. Apesar das diferenças cromáticas, análises morfométricas dos caracteres selecionados (cabeça, escapo, pedicelo, segmentos funiculares, clava, mesossoma, escutelo, dorselo, propódeo, fêmur e tibia posteriores, asa anterior, célula costal, nervuras marginal e estigmal, ovipositor, franjas da asa anterior) não indicaram diferenças nas dimensões e suas proporções de ambas as populações com relação à *T. radiata*. A única diferença encontrada refere-se aos sulcos submedianos do escutelo, que eram ligeiramente convergentes nos exemplares de pernas e extremidade do gaster escuras e paralelos na maioria dos espécimes típicos.

Amostras das populações de Itirapina e Piracicaba (Brasil), Tucumán (Argentina) e Gainesville (EUA) foram submetidas à análise molecular das regiões ITS1 e ITS2 do rDNA (Figura 4). Segundo Avise (2000), estes marcadores podem ser utilizados para delinear grupos de halótipos, proporcionando importantes informações para os estudos filogenéticos e de identificação de biótipos e espécies morfologicamente crípticas, permitindo também estimar a variabilidade genética entre populações. Estudos de frequência de alelos ou de marcadores em populações de parasitóides de ocorrência natural em uma determinada área, são importantes por permitirem a identificação da variação genética destes e a detecção de marcadores indicadores das características biológicas específicas ou de origem geográfica, sendo o reconhecimento destas variações intraespecíficas importantes para o sucesso de um programa de controle biológico aplicado (MacDONALD; LOXDALE, 2004; DE LEON; JONES; MORGAN, 2004).

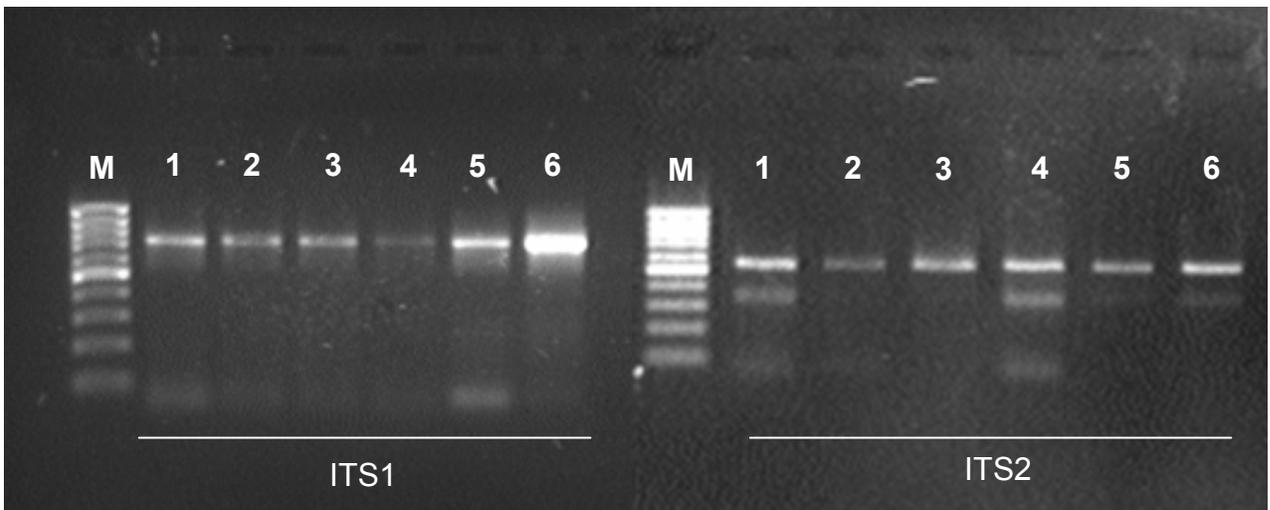


Figura 8 - Reações de amplificação para a detecção das regiões ITS1 e ITS2 do rDNA de cada população do parasitóide *Tamarixia radiata*. **M**- Marcador molecular; **1**- Itirapina (fêmea escura); **2**- Tucumán (fêmea marrom clara); **3**- Tucumán (fêmea escura); **4**- Tucumán (macho marrom claro); **5**- Piracicaba (fêmea de perna amarelo claro); **6**- Gainesville, EUA (fêmea de pernas amarelo claro)

As regiões ITS1 e ITS2 de *T. radiata* das populações de Itirapina, Piracicaba, Tucumán e Gainesville, apresentaram variação na região ITS1 de 719 a 725 pb (Anexo A) e de 548 a 551 para ITS2 (Anexo B). Das populações de *T. radiata* estudadas, ITS2 sempre foi menor do que ITS1.

Pelos resultados obtidos da análise molecular das regiões ITS1 e ITS2 do rDNA, pode-se concluir que a variação cromática presente nas populações de *T. radiata* do Brasil e de Argentina é apenas uma característica fenotípica intra-específica própria de populações que se encontram em um processo de adaptação, pois a similaridade entre as regiões ITS das populações analisadas é bastante alta (Tabela 2). As variações cromáticas encontradas nas populações de *T. radiata* analisadas podem estar diretamente relacionadas com a aptidão destes parasitóides e, como consequência, estas diferenças morfológicas foram moldadas por adaptações ecológicas. Segundo Gibert et al. (2004), durante o desenvolvimento, uma série de fatores climáticos e ambientais influenciam a expressão de numerosas características morfológicas.

Tabela 2 - Descrição das seqüências (pb) e de valores de similaridade entre as regiões ITS1 (porção superior) e ITS2 (porção inferior) das populações: **A**- Fêmea escura (Itirapina); **B**- Fêmea escura (Tucumán); **C**- Fêmea típica (ESALQ); **D**- Fêmea marrom claro (Tucumán); **E**- Macho marrom claro (Tucumán); **F**- Fêmea típica (Gainesville)

Seq.	A	B	C	D	E	F
A	*	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99
B	0,99	*	0,99	0,99	1	0,99
C	0,99	0,99	*	0,99	0,99	0,99
D	0,98	0,99	0,99	*	0,99	0,99
E	0,99	0,99	0,99	0,98	*	0,99
F	0,99	0,99	0,99	0,98	0,99	*

A taxonomia em himenópteros da superfamília Chalcidoidea é exclusivamente baseada na comparação de caracteres morfológicos; assim, podem ser cometidos erros quando as espécies são diferenciadas baseando-se em caracteres morfológicos de origens desconhecidas (ASKEW, 1971). Em estudo desenvolvido por Bernardo, Pedata e Viggiani (2007), confirmou-se a influência da temperatura sobre a variação de caracteres que geralmente eram utilizados em chaves taxonômicas para *Pnigalio soemius* (Walker, 1839) (Hymenoptera: Eulophidae). Estes autores, criaram *P. soemius* em temperaturas de 10, 15, 20, 25 e 30°C, sobre larvas de um de seus hospedeiros naturais, *Cosmopterix pulchrimella* Chambers, 1875 (Lepidoptera: Cosmopterigidae), para investigar a influência da temperatura sobre o tamanho, cor e outros traços morfológicas. Mediante observações dos intervalos de variação presentes nos adultos, os resultados obtidos confirmaram que o tamanho do escutelo e do propódeo, assim como a coloração do gáster, foram afetados pela temperatura de criação durante as fases de crescimento e desenvolvimento.

Variações cromáticas em resposta à temperatura têm sido freqüentemente relatadas para outros insetos (CAPY; DAVID; ROBERTSON, 1988; LAUDONIA; VIGGIANI, 1993; PÉTAVY et al., 2002). Temperaturas mais baixas produzem maior pigmentação em locais específicos do corpo, pois cores mais escuras absorvem mais radiação solar, tanto na faixa do

visível como na do infravermelho, em baixas temperaturas (DAVID et al., 1985; DAVID; CAPY, 1990; KINGSOLVER; WIERNASZ, 1991; SOLENSKY; LARKIN, 2003; GIBERT et al., 2004). Considerando-se um padrão de pigmentação dorsal em espécies que são polimórficas, os indivíduos que pertencem aos morfos mais escuros, geralmente conseguem aquecer-se mais rapidamente e atingir altas temperaturas corporais quando comparados àqueles indivíduos menos pigmentados (DE JONG; GUSSEKLOO; BRAKEFIELD, 1996; FORSMAN, 2000).

3.4 Conclusões

1. Populações de *Tamarixia radiata* (Waterston, 1922) (Hymenoptera: Eulophidae) coletadas em Itirapina, Pederneiras, Piracicaba e São Carlos, estado de São Paulo, Brasil, e em Tucumán, região norte da Argentina apresentam variações cromáticas em relação à espécie típica;
2. As análises morfométricas dos caracteres selecionados não indicam diferenças nas dimensões e proporções das populações de Brasil e Argentina com relação a *T. radiata* típica;
3. As regiões ITS1 e ITS2 do rDNA das populações analisadas apresentam de 98 a 99% de identidade;
4. As variações cromáticas presentes nas populações de *T. radiata* estão relacionadas à plasticidade fenotípica intra-específica própria de populações que respondem às variações do ambiente e que se encontram em processo de adaptação ecológica.

Referências

ASKEW, R.R. **Parasitic insects**. New York: American Elsevier, 1971. 316 p.

AVISE, J.C. **Phylogeography: the history and formation of species**. Cambridge: Harvard University Press, 2000. 447 p.

BERNARDO, U.; PEDATA, P.A.; VIGGIANI, G. Phenotypic plasticity of pigmentation and morphometric traits in *Pnigalio soemius* (Hymenoptera: Eulophidae). **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal, v. 97, p. 101-109, 2007.

BOUČEK, Z. *Tamarixia leucaenae* sp.n. (Hymenoptera: Eulophidae) parasitic on the leucaena psyllid *Heteropsylla cubana* Crawford (Hemiptera) in Trinidad. **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal, v. 78, p. 545-54, 1988.

- BURKS, B.D. The North American parasitic wasps of the genus *Tetrastichus* - a contribution to biological control of insect pests. **Proceedings of the United States National Museum**, Washington, v. 93, p. 505-608, 1944.
- CAPY, P.; DAVID, J.R.; ROBERTSON, A. Thoracic trident pigmentation in natural populations of *Drosophila simulans*: a comparison with *Drosophila melanogaster*. **Heredity**, London, v. 61, p. 263-268, 1988.
- CHIEN, C.C.; CHU, Y. I. Biological control of citrus psyllid, *Diaphorina citri* in Taiwan. Biological Pest Control in Systems of Integrated Pest Management. **Reprinted from Food and Fertilizer Technology Center Book Series**, Taipei, n. 47, p. 93 –104, 1996.
- COSTA LIMA, A.M. **Insetos do Brasil**, Homoptera. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Agronomia, 1942. t. 3, 101 p.
- DAVID, J.R.; CAPY, P.; GAUTIER, J.P. Abdominal pigmentation and growth temperatures in *Drosophila melanogaster*: similarities and differences in the norms of reaction of successive segments. **Journal of Evolutionary Biology**, Basel, v. 3, p. 429-445, 1990.
- DAVID, J.R.; CAPY, P.; PAYANT, V.; TSAKAS, S. Thoracic trident pigmentation in *Drosophila melanogaster*: differentiation of geographical populations. **Genetics, Selection and Evolution**, Paris, v. 17, p. 211-223, 1985.
- DE JONG, P.W., GUSSEKLOO, S.W.S.; BRAKEFIELD, P.M. Differences in thermal balance, body temperature and activity between non-melanic and melanic two-spot ladybird beetles (*Adalia bipunctata*) under controlled conditions. **The Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 199, p. 2655–2666, 1996.
- DE LEON, J.H.; JONES, W.A.; MORGAN, D.J.W. Molecular distinction between populations of *Gonatocerus morrilli*, egg parasitoids of the glassy-winged sharpshooter from Texas and California: Do cryptic species exist?. **Journal of Insects Science**, Madison, v. 4, p. 1-7, 2004.
- ÉTIENNE, J.; QUILICI, S.; MARINAL, D.; FRANCK, A. Biological control of *Diaphorina citri* (Hemiptera : Psyllidae) in Guadeloupe by imported *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae). **Fruits**, Paris, v. 56, p. 307-315, 2001.
- FORSMAN, A. Some like it hot: intra-population variation in behavioral thermoregulation in colour-polymorphic pygmy grasshoppers. **Evolutionary Ecology**, London, v. 14, p. 25-38, 2000.
- FUNDECITRUS. Greening chega às regiões Norte e Sul do Estado. **Revista Fundecitrus**, Araraquara, v. 124, p. 8-11, 2004.
- _____. Descoberta nova bactéria que causa greening. **Revista Fundecitrus**, Araraquara, v. 141, p. 6-8, 2007.

GIBERT, P.; CAPY, P.; IMASHEVA, A.; MORETEAU, B.; MORIN, J.P.; PÉTAVY, G.; DAVID, J.R. Comparative analysis of morphological traits among *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*: genetic variability clines and phenotypic plasticity. **Genetica**, Dordrecht, v. 120, p. 165–179, 2004.

GÓMEZ TORRES, M.L.; NAVA, D.E.; GRAVENA, S.; COSTA, V.A.; PARRA, J.R.P. Primeiro registro de *Tamarixia radiata* (Waterston) (Hymenoptera: Eulophidae) em *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) no Brasil. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 81, p. 112-117, 2006.

GRAHAM, M.W.R.V. A reclassification of the European Tetrastichinae (Hymenoptera: Eulophidae): revision of the remaining genera. **Memoirs of the American Entomological Institute**, Ann Arbor, v. 49, p. 307 – 320, 1991

GRAVENA, S.; BERETTA, M.J.G.; PAIVA, P.E.B.; GALVÃO, R.; YAMAMOTO, P.T. Seasonal abundance and natural enemies of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in citrus orchards of São Paulo State, Brazil. In: IOCV CONFERENCE, 13., 1995, Fuzhu. **Proceedings...** Fujian: International Organization of Citrus Virologists, 1996. p. 414.

HOLLOWAY, G.J.; MARRIOTT, C.G.; CROCKER, H.J. Phenotypic plasticity in hoverflies: the relationship between colour pattern and season in *Episyrphus balteatus* and other Syrphidae. **Ecological Entomology**, London, v. 22, p. 425-432, 1997.

HOY, M.A. Scientific, social, political and ethical issues for classical biological control in the coming millennium. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ENTOMOLOGY, 21., 2000, Foz do Iguaçu. **Abstracts...** Foz do Iguaçu: SEB, 2000. p. 362.

HOY, M.A.; NGUYEN, R. Classical biological control of Asian citrus psylla. **Citrus Industry**, Tampa, v. 81, p. 48-50, 2000.

KINGSOLVER, J.G.; WIERNASZ, D.C. Seasonal polyphenism in wing-melanin pattern and thermoregulatory adaptation in *Pieris* butterflies. **The American Naturalist**, Chicago, v. 137, p. 816-830, 1991.

LaSALLE, J. North American genera of Tetrastichinae (Hymenoptera: Eulophidae). **Journal of Natural History**, London, v.28, p.109-236, 1994.

LAUDONIA, S.; VIGGIANI, G. Effetto della temperatura sulla colorazione degli adulti di *Encarsia partenopea* Masi (Hymenoptera: Aphelinidae). **Bollettino del Laboratorio di Entomologia Agraria Filippo Silvestri**, Portici, v. 50, p. 141-146, 1993.

LIZONDO, M.J.; GASTAMINZA, G.; COSTA, V.A.; AUGIER, L.; GÓMEZ TORRES, M.L.; WILLINK, E.; PARRA, J.R.P. Records of *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae) in Northeastern Argentina. **Revista Industrial y Agrícola de Tucumán**, Tucumán, v. 84, p. 21-22, 2007.

LOMELI-FLORES, J.R.; BUENO-PARTIDA, R. New record of *Tamarixia triozae* (Burks), parasitoid of the tomatoe psyllid *Paratrioza cockerelli* (Sulc) (Homoptera: Psyllidae) in Mexico. **Folia Entomológica Mexicana**, Mexico, v. 41, p. 375-376, 2002.

MacDONALD, C.; LOXDALE, H. D. Molecular markers to study population structure and dynamics in beneficial insects (predators and parasitoids). **International Journal of Pest Management**, London, v. 50, p. 215-224, 2004.

McCLAY, A.S. Distribution of leucaena psyllid and its natural enemies in Mexico: implications for biological control. In: NAPOMOPETH, B. E MACDICKEN, K.G. (Ed.). **Leucaena psyllid: problems and management**. Bangkok: Winrock International Institute for Agricultural Development, 1990. p. 139-143.

MICHAUD, J. P. Natural mortality of Asian citrus psyllid (Homoptera: Psyllidae) in central Florida. **Biological Control**, Orlando, v. 29, p. 260-269, 2004.

NOYES, J.S. **Universal Chalcidoidea database**. 2003. Disponível em: <<http://www.nhm.ac.uk/research-curation/projects/chalcidoids>>. Acesso em: 28 jun. 2007.

PÉTAVY, G.; MORETEAU, B.; GIBERT, P.; DAVID, J.R. Phenotypic plasticity of body size in *Drosophila*: influence of a developmental thermoperiodic regime in two sibling species. **Physiological Entomology**, Oxford, v. 27, p. 124-135, 2002.

PLUKE, R.W.H.; ESCRIBANO, A.; MICHAUD, J.P.; STANSLY, P.A. Potential impact of lady beetles on *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) in Puerto Rico. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 88, p. 123-128, 2003

SOLENSKY, M.J.; LARKIN, E. Temperature-induced variation in larval coloration in *Danaus plexippus* (Lepidoptera: Nymphalidae). **Annals of the Entomological Society of America**, Lanham, v. 96, p. 211-216, 2003.

SUBANDIYAH, S.; NIKOH, N.; TSUYUMU, S.; SOMOWIYARJO, S.; FUKATSU, T. Complex endosymbiotic microbiota of the citrus psyllid *Diaphorina citri* (Homoptera: Psylloidea). **Zoological Science**, Tokyo, v. 17, p. 983-989, 2000.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

TEIXEIRA, D.C.; SAILLARD, C.; EVEILLARD, S.; DANET, J.L.; DA COSTA, P.I.; AYRES, A.J.; BOVÉ, J. *Candidatus Liberibacter americanus*, associated with citrus Huanglongbing (greening disease) in São Paulo State, Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 55, p. 1857-1862, 2005.

WATERSTON, J. On the chalcidoid parasites of psyllids (Hemiptera: Homoptera). **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal, v. 13, p. 41-58, 1922.

YA-JIE, J.; DE-XING, Z.; LI-JUN, H.E. Evolutionary conservation and versatility of a new set of primers for amplifying the ribosomal internal transcribed spacer regions in insects and other invertebrates. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 3, p. 581-585, 2003.

ANEXOS

Anexo A - Alinhamento de seqüências da região ITS1 de *Tamarixia radiata*. **A-** Fêmea escura (Itirapina); **B-** Fêmea escura (Tucumán); **C-** Fêmea típica (ESALQ); **D-** Fêmea marrom claro (Tucumán); **E-** Macho marrom claro (Tucumán); **F-** Fêmea típica (Gainesville)

```

E TACACACGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGATTTAGTGAGGTCCTTCGGAAGTGGTGC GCGCGCAATGTATCTTTACGTTGCCGATTGTGCCGGGAAGATGACC-AAACTTGATCATTTA 119
F TACACACGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGATTTAGTGAGGTCCTTCGGAAGTGGTGC GCGCGCAATGTATCTTTACGTTGCCGATTGTGCCGGGAAGATGACC-AAACTTGATCATTTA 119
D TACACACGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGATTTAGTGAGGTCCTTCGGAAGTGGTGC GCGCGCAATGTATCTTTACGTTGCCGATTGTGCCGGGAAGATGACC-AAACTTGATCATTTA 119
B TACACACGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGATTTAGTGAGGTCCTTCGGAAGTGGTGC GCGCGCAATGTATCTTTACGTTGCCGATTGTGCCGGGAAGATGACC-AAACTTGATCATTTA 119
A TACACACGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGATTTAGTGAGGTCCTTCGGAAGTGGTGC GCGCGCAATGTATCTTTACGTTGCCGATTGTGCCGGGAAGATGACC-AAACTTGATCATTTA 119
C TACACACGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGATTTAGTGAGGTCCTTCGGAAGTGGTGC GCGCGCAATGTATCTTTACGTTGCCGATTGTGCCGGGAAGATGACCCAACTTGATCATTTA 120
*****
E GAGGAAGTAAAAGTCGTAAACAAGGTTTCCGTAGG--TGAACCTGCGGAAGGATCATTAA C G T T T G C A A A A T A C G C A A C G T A T T G T C T C G A A T G G C G A T G A G G A A T A A T C A T C T T T G T C 237
F GAGGAAGTAAAAGTCGTAAACAAGGTTTCCGTAGG--TGAACCTGCGGAAGGATCATTAA C G T T T G C A A A A T A C G C A A C G T A T T G T C T C G A A T G G C G A T G A G G A A T A A T C A T C T T T G T C 237
D GAGGAAGTAAAAGTCGTAAACAAGGTTTCCGTAGG--TGAACCTGCGGAAGGATCATTAA C G T T T G C A A A A T A C G C A A C G T A T T G T C T C G A A T G G C G A T G A G G A A T A A T C A T C T T T G T C 237
B GAGGAAGTAAAAGTCGTAAACAAGGTTTCCGTAGG--TGAACCTGCGGAAGGATCATTAA C G T T T G C A A A A T A C G C A A C G T A T T G T C T C G A A T G G C G A T G A G G A A T A A T C A T C T T T G T C 237
A GAGGAAGTAAAAGTCGTAAACAAGGTTTCCGTAGG--TGAACCTGCGGAAGGATCATTAA C G T T T G C A A A A T A C G C A A C G T A T T G T C T C G A A T G G C G A T G A G G A A T A A T C A T C T T T G T C 237
C GAGGAAGTAAAAGTCGTAAACAAGGTTTCCGTAGG--TGAACCTGCGGAAGGATCATTAA C G T T T G C A A A A T A C G C A A C G T A T T G T C T C G A A T G G C G A T G A G G A A T A A T C A T C T T T G T C 240
*****
E GCCACAACAGACCAACATGATGTTTGAAGCGCTCTCTTTTGAAGCAGCCGAGGGGTTCTTTTGAAGTCTCCTCCGCGCGGATTTCGCTGTGGCAACCTCGATTTGCAAAAAACGAG 357
F GCCACAACAGACCAACATGATGTTTGAAGCGCTCTCTTTTGAAGCAGCCGAGGGGTTCTTTTGAAGTCTCCTCCGCGCGGATTTCGCTGTGGCAACCTCGATTTGCAAAAAACGAG 357
D GCCACAACAGACCAACATGATGTTTGAAGCGCTCTCTTTTGAAGCAGCCGAGGGGTTCTTTTGAAGTCTCCTCCGCGCGGATTTCGCTGTGGCAACCTCGATTTGCAAAAAACGAG 357
B GCCACAACAGACCAACATGATGTTTGAAGCGCTCTCTTTTGAAGCAGCCGAGGGGTTCTTTTGAAGTCTCCTCCGCGCGGATTTCGCTGTGGCAACCTCGATTTGCAAAAAACGAG 357
A GCCACAACAGACCAACATGATGTTTGAAGCGCTCTCTTTTGAAGCAGCCGAGGGGTTCTTTTGAAGTCTCCTCCGCGCGGATTTCGCTGTGGCAACCTCGATTTGCAAAAAACGAG 357
C GCCACAACAGACCAACATGATGTTTGAAGCGCTCTCTTTTGAAGCAGCCGAGGGGTTCTTTTGAAGTCTCCTCCGCGCGGATTTCGCTGTGGCAACCTCGATTTGCAAAAAACGAG 360
*****
E TATCATCAGCCTTTTCGAGCGGATACTCTTAGGTTTTTGAAGAATTTTCGCCCGCTAAGTCGAAAAAATAGAACCGCGCCGATCCGGCAAAACGCGGAGCAAGACTCGTCTCTCGGCCGGC 477
F TATCATCAGCCTTTTCGAGCGGATACTCTTAGGTTTTTGAAGAATTTTCGCCCGCTAAGTCGAAAAAATAGAACCGCGCCGATCCGGCAAAAC-CCGAGCAAGACTCGTCTCTCGGCCGGC 476
D TATCATCAGCCTTTTCGAGCGGATACTCTTAGGTTTTTGAAGAATTTTCGCCCGCTAAGTCGAAAAAATAGAACCGCGCCGATCCGGCAAAACGCGGAGCAAGACTCGTCTCTCGGCCGGC 477
B TATCATCAGCCTTTTCGAGCGGATACTCTTAGGTTTTTGAAGAATTTTCGCCCGCTAAGTCGAAAAAATAGAACCGCGCCGATCCGGCAAAACGCGGAGCAAGACTCGTCTCTCGGCCGGC 477
A TATCATCAGCCTTTTCGAGCGGATACTCTTAGGTTTTTGAAGAATTTTCGCCCGCTAAGTCGAAAAAATAGAACCGCGCCGATCCGGCAAAACGCGGAGCAAGACTCGTCTCTCGGCCGGC 477
C TATCATCAGCCTTTTCGAGCGGATACTCTTAGGTTTTTGAAGAATTTTCGCCCGCTAAGTCGAAAAAATAGAACCGCGCCGATCCGGCAAAACGCGGAGCAAGACTCGTCTCTCGGCCGGC 480
*****
E GGGGCCTCGTGCCTCCGTACCCCTCGTATCGTTGAAGACA-CGCGGAGCGCAAGCTTCGCGTGTTCGACATTAAAGACCTTTTAACTATGGAATT-GTACAAAACGTGTACTTGTAAACGGT 595
F GGGGCCTCGTGCCTCCGTACCCCTCGTATCGTTGAAGACA-CGCGGAGCGCAAGCTTCGCGTGTTCGACATTAAAGACCTTTTAACTATGGAATT-GTACAAAACGTGTACTTGTAAACGGT 594
D GGGGCCTCGTGCCTCCGTACCCCTCGTATCGTTGAAGACA-CGCGGAGCGCAAGCTTCGCGTGTTCGACATTAAAGACCTTTTAACTATGGAATT-GTACAAAACGTGTACTTGTAAACGGT 595
B GGGGCCTCGTGCCTCCGTACCCCTCGTATCGTTGAAGACA-CGCGGAGCGCAAGCTTCGCGTGTTCGACATTAAAGACCTTTTAACTATGGAATT-GTACAAAACGTGTACTTGTAAACGGT 596
A GGGGCCTCGTGCCTCCGTACCCCTCGTATCGTTGAAGACA-CGCGGAGCGCAAGCTTCGCGTGTTCGACATTAAAGACCTTTTAACTATGGAATT-GTACAAAACGTGTACTTGTAAACGGT 595
C GGGGCCTCGTGCCTCCGTACCCCTCGTATCGTTGAAGACAACCGCGGAGCGCAAGCTTCGCGTGTTCGACATTAAAGACCTTTTAACTATGGAATT-GTACAAAACGTGTACTTGTAAACGGT 600
*****
E AAATTCACAAAAATGATTACCCGTAACGGTGGATCACTTGGCTCGTGGGTCGATGAAGAACCGAGCTAATTCGCGCTCTACTTGTGAAGTGCAGGACACATGAACATCGACATTTTGAACG 715
F AAATTCACAAAAATGATTACCCGTAACGGTGGATCACTTGGCTCGTGGGTCGATGAAGAACCGAGCTAATTCGCGCTCTACTTGTGAAGTGCAGGACACATGAACATCGACATTTTGAACG 714
D AAATTCACAAAAATGATTACCCGTAACGGTGGATCACTTGGCTCGTGGGTCGATGAAGAACCGAGCTAATTCGCGCTCTACTTGTGAAGTGCAGGACACATGAACATCGACATTTTGAACG 715
B AAATTCACAAAAATGATTACCCGTAACGGTGGATCACTTGGCTCGTGGGTCGATGAAGAACCGAGCTAATTCGCGCTCTACTTGTGAAGTGCAGGACACATGAACATCGACATTTTGAACG 716
A AAATTCACAAAAATGATTACCCGTAACGGTGGATCACTTGGCTCGTGGGTCGATGAAGAACCGAGCTAATTCGCGCTCTACTTGTGAAGTGCAGGACACATGAACATCGACATTTTGAACG 715
C AAATTCACAAAAATGATTACCCGTAACGGTGGATCACTTGGCTCGTGGGTCGATGAAGAACCGAGCTAATTCGCGCTCTACTTGTGAAGTGCAGGACACATGAACATCGACATTTTGAACG 720
*****
E CACAT 720
F CACAT 719
D CACAT 720
B CACAT 721
A CACAT 720
C CACAT 725
****

```

Anexo B - Alinhamento de seqüências da região ITS2 de *Tamarixia radiata*. **A-** Fêmea escura (Itirapina); **B-** Fêmea escura (Tucumán); **C-** Fêmea típica (ESALQ); **D-** Fêmea marrom claro (Tucumán); **E-** Macho marrom claro (Tucumán); **F-** Fêmea típica (Gainesville)

```

A   TGAACATCGACATTTTGAACGCACATTGCGGTCTCCGGATACAATTCTCGGACCACGCTGGCTGAGGGTCGTTACAAGATAAAAACAGACTGCTCGTCGTCGTCGTCGTCCTCGTCTC 120
B   TGAACATCGACATTTTGAACGCACATTGCGGTCTCCGGATACAATTCCCGGACCACGCTGGCTGAGGGTCGTTACAAGATAAAAACAGACTGCTCGTCGTCGTCGTCGTCCTCGTCTC 120
E   TGAACATCGACATTTTGAACGCACATTGCGGTCTCCGGATACAATTCCCGGACCACGCTGGCTGAGGGTCGTTACAAGATAAAAACAGACTGCTCGTCGTCGTCGTCGTCCTCGTCTC 120
F   TGAACATCGACATTTTGAACGCACATTGCGGTCTCCGGATACAATTCCCGGACCACGCTGGCTGAGGGTCGTTACAAGATAAAAACAGACTGCTCGTCGTCGTCGTCGTCCTCGTCTC 120
C   TGAACATCGACATTTTGAACGCACATTGCGGTCTCCGGATACAATTCCCGGACCACGCTGGCTGAGGGTCGTTACAAGATAAAAACAGACTGCTCGTCGTCGTCGTCGTCCTCGTCTC 120
D   TGAACATCGACATTTTGAACGCACATTGCGGTCTCCGGATACAATTCCCGGACCACGCTGGCTGAGGGTCGTTACAAGATAAAAACAGACTGCTCGTCGTCGTCGTCGTCCTCGTCTC 120
*****
A   CTCTCGGAGACGCGGGCGGGCGTCCGTCGAGCGTATGCCTGAGCGTTCGTCGAACCGTCGACTCGCGTCGATGATTTCCGGTGTGCTCTAAATAAAACACAACGACTCGCTCGATCAA 240
B   CTCTCGGAGACGCGGGCGGGCGTCCGTCGAGCGTATGCCTGAGCGTTCGTCGAACCGTCGACTCGCGTCGATGATTTCCGGTGTGCTCTAAATAAAACACAACGACTCGCTCGATCAA 240
E   CTCTCGGAGACGCGGGCGGGCGTCCGTCGAGCGTATGCCTGAGCGTTCGTCGAACCGTCGACTCGCGTCGATGATTTCCGGTGTGCTCTAAATAAAACACAACGACTCGCTCGATCAA 240
F   CTCTCGGAGACGCGGGCGGGCGTCCGTCGAGCGTATGCCTGAGCGTTCGTCGAACCGTCGACTCGCGTCGATGATTTCCGGTGTGCTCTAAATAAAACACAACGACTCGCTCGATCAA 240
C   CTCTCGGAGACGCGGGCGGGCGTCCGTCGAGCGTATGCCTGAGCGTTCGTCGAACCGTCGACTCGCGTCGATGATTTCCGGTGTGCTCTAAATAAAACACAACGACTCGCTCGATCAA 240
D   CTCTCGGAGACGCGGGCGGGCGTCCGTCGAGCGTATGCCTGAGCGTTCGTCGAACCGTCGACTCGCGTCGATGATTTCCGGTGTGCTCTAAATAAAACACAACGACTCGCTCGATCAA 240
*****
A   TGCGAAAACACGAGCGAGAGTCGATCGTACACGCACACGCACTTTTTTGAAGCGAAGCG-TCTCCGTCCGAGCGTCGTACGTCGAGTCCATGAGC-TCCTT-GAGCGGACCGACGTC 357
B   TGCGAAAACACGAGCGAGAGTCGATCGTACACGCACACGCACTTTTTTGAAGCGAAGCGGTCTCCGTCCGAGCGTCGTACGTCGAGTCCATGAGCCTCCTT-GAGCGGACCGACGTC 359
E   TGCGAAAACACGAGCGAGAGTCGATCGTACACGCACACGCACTTTTTTGAAGCGAAGCG-TCTCCGTCCGAGCGTCGTACGTCGAGTCCATGAGC-TCCTT-GAGCGGACCGACGTC 357
F   TGCGAAAACACGAGCGAGAGTCGATCGTACACGCACACGCACTTTTTTGAAGCGAAGCGGTCTCCGTCCGAGCGTCGTACGTCGAGTCCATGAGCCTCCTT-GAGCGGACCGACGTC 360
C   TGCGAAAACACGAGCGAGAGTCGATCGTACACGCACACGCACTTTTTTGAAGCGAAGCG-TCTCCGTCCGAGCGTCGTACGTCGAGTCCATGAGCCTCCTT-GAGCGGACCGACGTC 358
D   TGCGAAAACACGAGCGAGAGTCGATCGTACACGCACACGCACTTTTTTGAAGCGAAGCG-TCTCCGTCCGAGCGTCGTACGTCGAGTCCATGAGC-TCCTT-GAGCGGACCGACGTC 357
*****
A   TTCTCGGGGCTGGATTTCGCGATCGCGCGTGCCTCTCTCGTTCTCGGCTCTGCACAGCGCTCGTGTATTCGAAATGGCCGCTCGTTCGAGCAGAGTTTTTTTTTATACTTGTATAATT 477
B   TTCTCGGGGCTGGATTTCGCGATCGCGCGTGCCTCTCTCGTTCTCGGCTCTGCACAGCGCTCGTGTATTCGAAATGGCCGCTCGTTCGAGCAGAGTTTTTTTTTATACTTGTATAATT 479
E   TTCTCGGGGCTGGATTTCGCGATCGCGCGTGCCTCTCTCGTTCTCGGCTCTGCACAGCGCTCGTGTATTCGAAATGGCCGCTCGTTCGAGCAGAGTTTTTTTTTATACTTGTATAATT 477
F   TTCTCGGGGCTGGATTTCGCGATCGCGCGTGCCTCTCTCGTTCTCGGCTCTGCACAGCGCTCGTGTATTCGAAATGGCCGCTCGTTCGAGCAGGGTTTTTTTTTATACTTGTATAATT 480
C   TTCTCGGGGCTGGATTTCGCGATCGCGCGTGCCTCTCTCGTTCTCGGCTCTGCACAGCGCTCGTGTATTCGAAATGGCCGCTCGTTCGAGCAGAGTTTTTTTTTATACTTGTATAATT 478
D   TTCTCGGGGCTGGATTTCGCGATCGCGCGTGCCTCTCTCGTTCTCGGCTCTGCACAGCGCTCGTGTATTCGAAATGGCCGCTCGTTCGAGCAGAGTTTTTTTTTATACTTGTATAACT 477
*****
A   TTGATCGACGACCTCAGAGCAGGCGAGACTACCCGCTGAATTTAAGCATATCAGTAAGCGGAGGAAAAGAA 548
B   TTGATCGACGACCTCAGAGCAGGCGAGACTACCCGCTGAATTTAAGCATATCAGTAAGCGGAGGAAAAGAA 550
E   TTGATCGACGACCTCAGAGCAGGCGAGACTACCCGCTGAATTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAA 548
F   TTGATCGACGACCTCAGAGCAGGCGAGACTACCCGCTGAATTTAAGCATATCAGTAAGCGGAGGAAAAGAA 551
C   TTGATCGACGACCTCAGAGCAGGCGAGACTACCCGCTGAATTTAAGCATATTAAGTAAGCGGAGGAAAAGAA 549
D   TTGATCGACGACCTCAGAGCAGGCGAGACTACCCGCTGAATTTAAGCATATTAAGTAAGCGGAGGAAAAGAA 548
*****

```

4 BIOLOGIA E TABELA DE VIDA DE FERTILIDADE DE *Tamarixia radiata* (Waterston, 1922) (Hymenoptera: Eulophidae) SOBRE *Diaphorina citri* Kuwayama, 1907 (Hemiptera: Psyllidae) EM DIFERENTES TEMPERATURAS

Resumo

Tamarixia radiata (Waterston, 1922) (Hymenoptera: Eulophidae) é um endoparasitóide idiobionte específico de *Diaphorina citri* Kuwayama, 1907 (Hemiptera: Psyllidae). Neste estudo, alguns aspectos sobre a biologia, tabela de vida de fertilidade e as condições ideais para o desenvolvimento e reprodução foram determinados em condições de laboratório. Nas temperaturas de 25 e 30°C, o parasitismo em 24 horas foi maior, valores que diferiram significativamente com as porcentagens obtidas nas temperaturas de 15, 20 e 35°C. As maiores porcentagens de emergência do parasitóide ocorreram nas de temperaturas de 25, 30 e 35°C. Fêmeas e machos do parasitóide tiveram igual comportamento com relação à temperatura na faixa de 15 a 35°C. *T. radiata* se desenvolveu na faixa térmica de 15 a 35°C, sendo que 25°C foi a temperatura mais adequada por proporcionar maior viabilidade do período ovo-adulto. A 25°C foram observados os maiores valores da taxa líquida de reprodução (R_0) e de razão finita de aumento (λ), sendo que a R_0 foi maior nesta temperatura, pois, a cada geração a população de *T. radiata* aumentou 126,79 vezes, número superior àquele obtido nas demais temperaturas.

Palavras-chave: Parasitismo; Desenvolvimento; Taxa líquida de reprodução; Razão infinitesimal de aumento

Abstract

Tamarixia radiata (Waterston, 1922) (Hymenoptera: Eulophidae) is an idiobiont endoparasitoid specific to *Diaphorina citri* Kuwayama, 1907 (Hemiptera: Psyllidae). In this study, some aspects of its biology, fertility life table, and ideal conditions for development and reproduction were determined under laboratory conditions. Parasitism in a 24-hour period was highest at 25 and 30°C; values obtained significantly differed from the percentages obtained at 15, 20, and 35°C. The highest parasitoid emergence percentages occurred at 25, 30, and 35°C. Parasitoid females and males behaved similarly in the temperature range from 15 to 35°C. *T. radiata* developed in the temperature range from 15 to 35°C; the most suitable temperature was 25°C, since it gave the highest viability for the egg-adult period. The highest net reproductive rate (R_0) and finite rate of increase values (λ) were observed at 25°C. R_0 was highest at that temperature since the *T. radiata* population increased 126.79 times in each generation; this number was higher than the numbers obtained at other temperatures.

Keywords: Parasitism; Development; Net reproductive rate; Intrinsic rate of increase

4.1 Introdução

O ectoparasitóide idiobionte *Tamarixia radiata* (Waterston, 1922) (Hymenoptera: Eulophidae) tem sido utilizado em programas de controle biológico clássico, reduzindo de forma significativa a população de *Diaphorina citri* Kuwayama, 1907 (Hemiptera: Psyllidae) em diferentes regiões do mundo, e devido à sua eficiência, se destaca como estratégia alternativa a ser adicionada às medidas de manejo complementares dessa praga (AUBERT; QUILICI, 1984; ÉTIENNE et al., 2001; CHIEN; CHU, 1996; HOY; NGUYEN, 2000; SKELLEY; HOY, 2004). O desenvolvimento imaturo e a sobrevivência dos adultos de *T. radiata* são dependentes da faixa térmica e da presença de alimentação (FAUVERGUE; QUILICI, 1991).

D. citri encontra-se associado à cultura de citros com ampla distribuição no Brasil. Além da transmissão do “huanglongbing” ou “greening” desde 2004 (FUNDECITRUS, 2004), este psilídeo causa o enrolamento das folhas e a deformação ou engruvinhamento dos brotos, impedindo o crescimento normal devido à injeção de toxinas durante a sucção de seiva.

O sucesso de um programa de controle biológico depende de fatores que afetem a eficiência em campo dos organismos criados massalmente em condições de laboratório, por varias gerações (BIGLER, 1986). O clima é, provavelmente, o mais importante destes fatores, já que há um complexo de variáveis meteorológicas afetando o desenvolvimento, emergência, sobrevivência, atividade e fecundidade dos parasitóides liberados; dentre os fatores com maior influência situam-se a temperatura e a umidade relativa (KING et al., 1985).

Neste contexto, o estudo da tabela de vida de fertilidade é de grande valia para a compreensão da dinâmica populacional da espécie visada, uma vez que permite uma visão integrada das características biológicas de uma população, sob condições ambientais determinadas (COPPEL; MERTINS, 1977). Segundo Silveira Neto, Nakano e Barbin (1976) cada indivíduo na tabela de vida apresenta sua própria velocidade de desenvolvimento, longevidade e fecundidade, sendo tais fatores expressos em termos médios da população. A taxa de natalidade e de mortalidade em uma população de insetos é determinada por várias condições: qualidade do alimento, temperatura, umidade relativa e fotoperíodo.

O presente trabalho teve por objetivo estudar aspectos da biologia, taxa de reprodução e as condições ideais para desenvolvimento e reprodução de *T. radiata* em condições de laboratório sobre *D. citri*, em diferentes temperaturas. A tabela de vida de fertilidade confeccionada com

estes dados dará as informações sobre a interação do parasitóide com *D. citri*, informações estas que serão fundamentais para a implementação de um programa de controle biológico aplicado dentro do manejo de *D. citri* no Brasil.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Criação de manutenção de *Diaphorina citri*

A criação foi iniciada utilizando-se adultos de *Diaphorina citri* Kuwayama, 1907 (Hemiptera: Psyllidae) provenientes da criação do Laboratório de Biologia dos Insetos, do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, da ESALQ - USP, mantidos a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa (UR): $70 \pm 10\%$ e fotofase de 14 horas ou com psilídeos coletados em pomares de citros do Estado de São Paulo e mantidos nas mesmas condições.

A técnica de criação de *D. citri* foi adaptada das metodologias de Chagas et al. (2002) e Skelley e Hoy (2004). Assim, para a manutenção das populações de *D. citri* foram utilizadas plantas de *Murraya paniculata* (L.) Jack, com 25 a 30 cm de altura, cultivadas em substrato de vermiculita e composto vegetal (1:1) (Figura 1A).

As plantas foram mantidas no interior de bandejas plásticas (34x23x7cm) contendo água e levadas para câmaras climatizadas ($30 \pm 1^\circ\text{C}$, $60 \pm 10\%$ UR e fotofase de 14 h). Após 8 a 15 dias, as plantas que apresentavam brotações novas foram transferidas para gaiolas acrílicas (60x60x50 cm) contendo adultos de *D. citri* para a obtenção de ovos por, no máximo, cinco dias (Figura 1B e C). Após este período, as plantas, contendo as posturas, foram colocadas em gaiolas mantidas em sala de criação climatizada para o desenvolvimento ninfal (Figura 2).

4.2.2 Criação de manutenção de *Tamarixia radiata*

Para a criação de *Tamarixia radiata* (Waterston, 1922) (Hymenoptera: Eulophidae), são utilizadas ninfas de quarto e quinto instares de *D. citri* (CHU; CHIEN, 1991; SKELLEY; HOY, 2004), provenientes da criação do Laboratório de Biologia dos Insetos, mantida a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa (UR): $70 \pm 10\%$ e fotofase de 14 horas. As populações de *T. radiata* foram

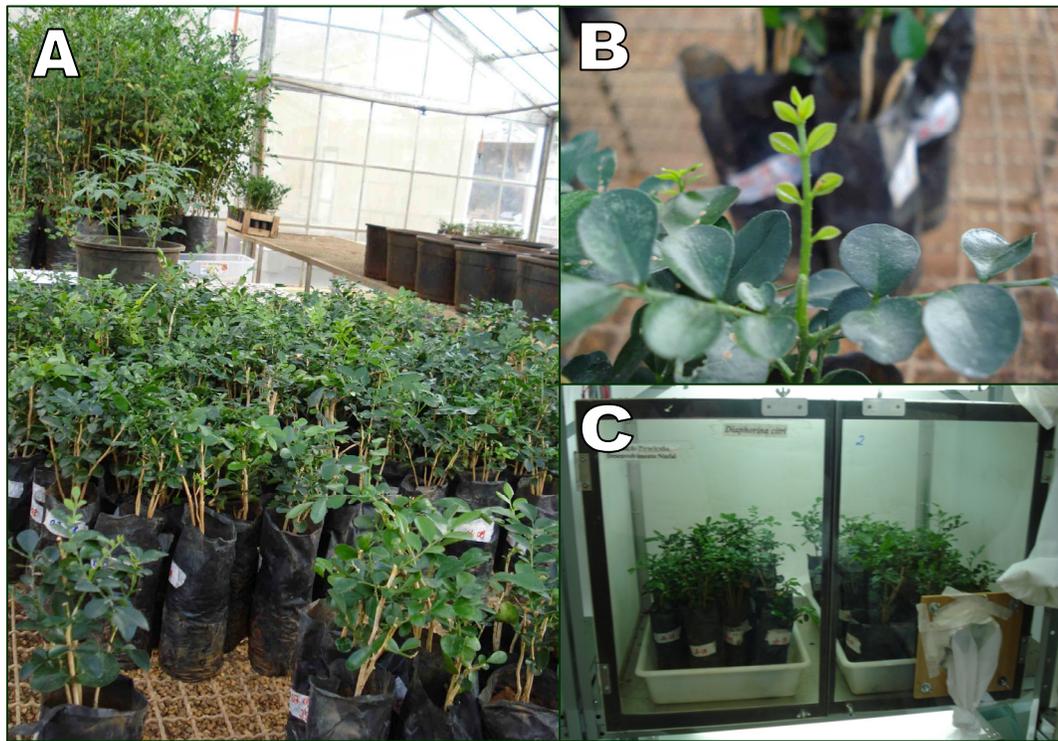


Figura 1 - Técnica de criação de *Diaphorina citri*. **A-** Plantas de *Murraya paniculata* mantidas em casa-de-vegetação; **B-** Brotações de *Murraya paniculata* para serem utilizadas como substrato de postura de *Diaphorina citri*; **C-** Gaiolas para postura de *Diaphorina citri*

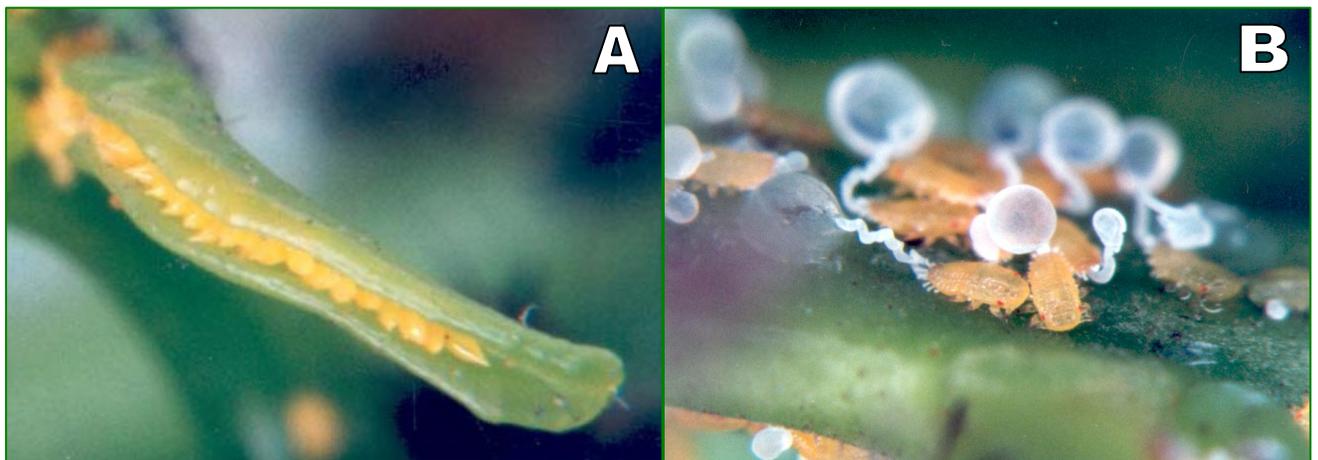


Figura 2 - Ovos e ninfas de *Diaphorina citri*. **A-** Ovos de *Diaphorina citri* em brotações de *Murraya paniculata*; **B-** Ninfas de segundo ínstar de *Diaphorina citri*. Temperatura $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $60 \pm 10\%$ UR e fotofase de 14 horas

mantidas em sala de criação climatizada ($25 \pm 1^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\%$ UR e fotofase de 14 horas) em unidades de criação semelhantes àquelas descritas para *D. citri* (item 4.2.1). As ninfas de quarto e quinto ínstar de *D. citri* (CHU; CHIEN, 1991; SKELLEY; HOY, 2004), que ficam fixadas às plantas, foram expostas ao parasitismo por *T. radiata* por um período de 24 horas. Após este período, as ninfas foram levadas, juntamente com a planta, para novas gaiolas para que o parasitóide completasse o seu desenvolvimento (Figura 3).

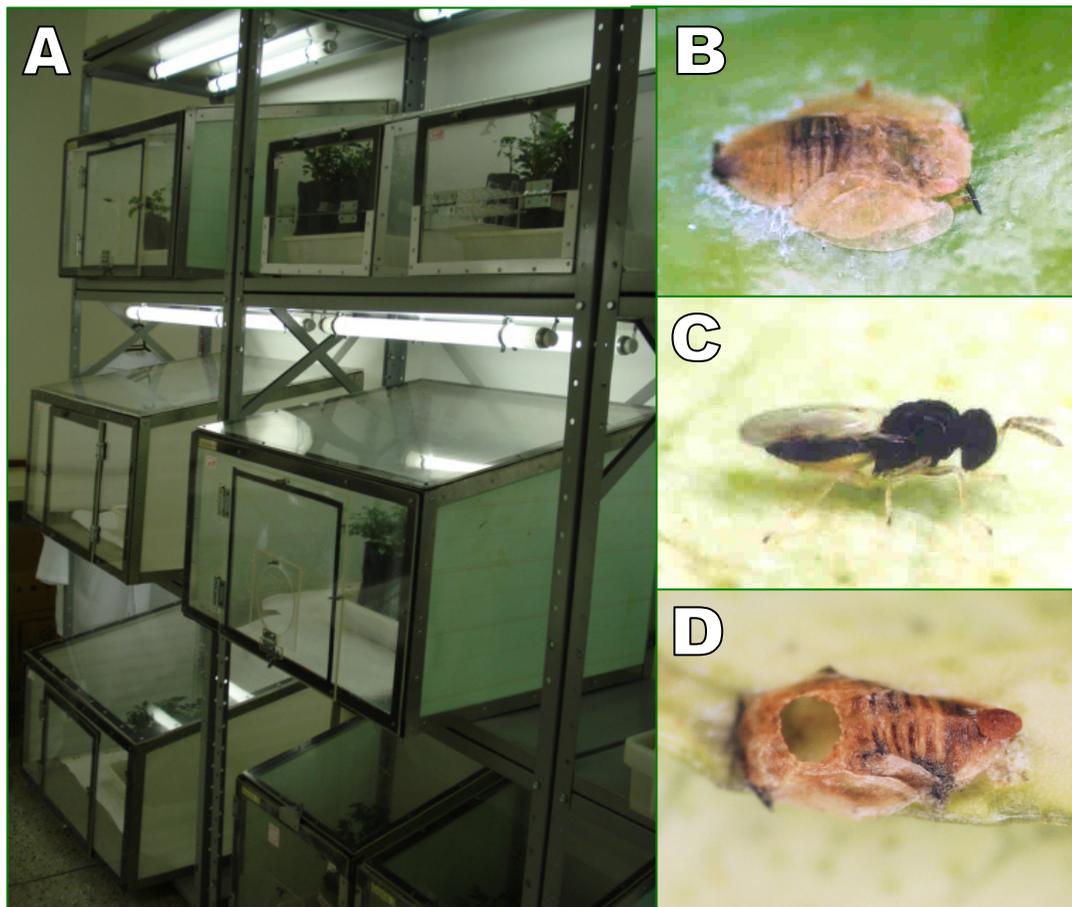


Figura 3 - Criação de *Tamarixia radiata* em condições de laboratório (temperatura $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $60 \pm 10\%$ UR e fotofase de 14 horas). **A**- Sala de criação de *Tamarixia radiata*; **B**- Ninfã de quinto ínstar de *Diaphorina citri* parasitada por *Tamarixia radiata*; **C**- Fêmea de *Tamarixia radiata*; **D**- múmia de *Diaphorina citri*

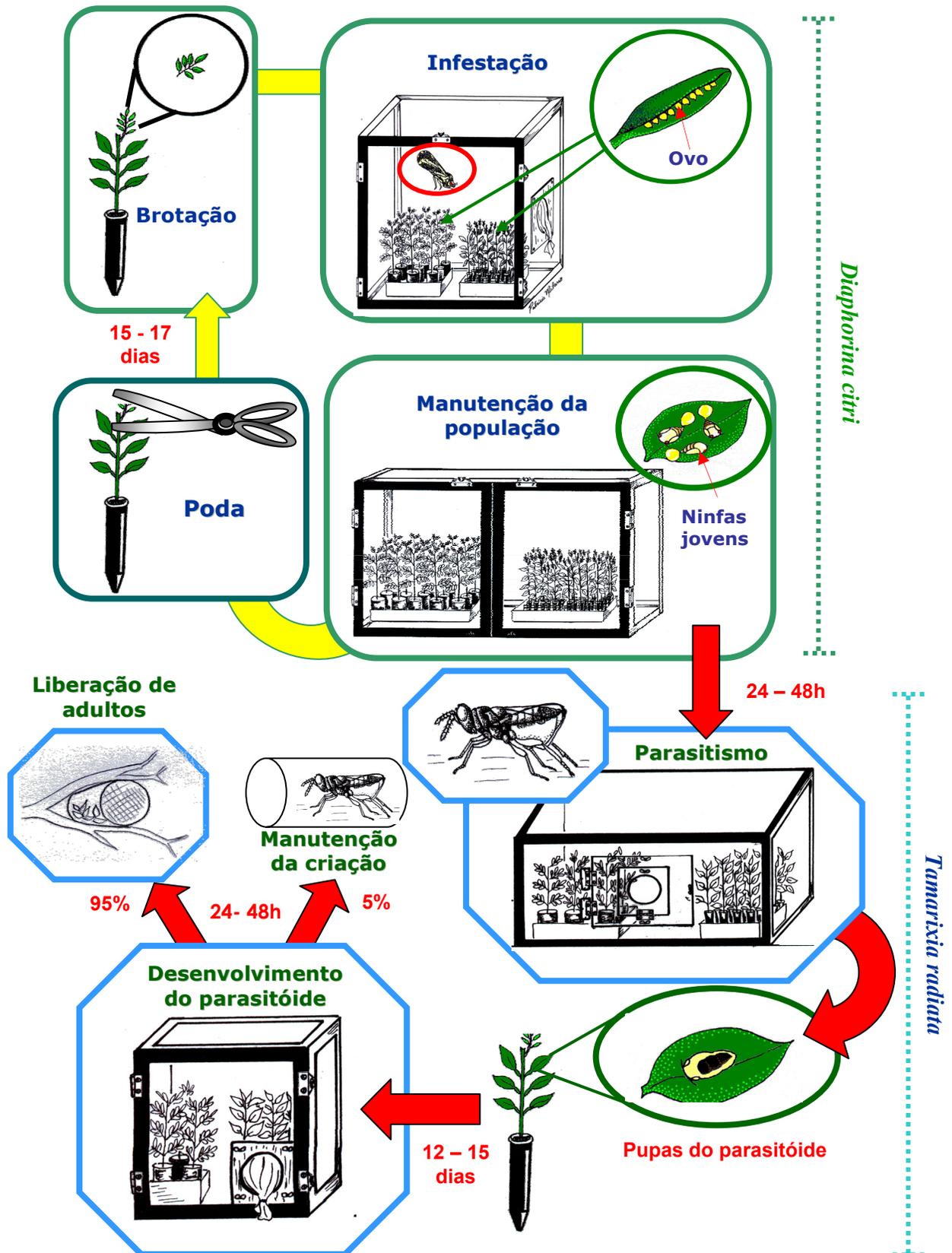


Figura 4 - Esquema de criação de *Diaphorina citri* e *Tamarixia radiata* em condições de laboratório ($25 \pm 1^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\%$ UR e fotofase de 14 horas)

Cerca de 95% das ninfas obtidas são utilizadas para os experimentos com o parasitóide *T. radiata*, e os 5% restantes são destinados à continuidade da criação para as diferentes fases do projeto (Figura 4).

4.2.3 Biologia de *T. radiata* sobre *D. citri* em diferentes temperaturas

Para os estudos dos parâmetros biológicos, fêmeas de *T. radiata* recém emergidas foram alimentadas com uma mistura de mel puro e pólen (CHIEN; CHU; KU, 1994) (Figura 5A) e individualizadas em gaiolas cilíndricas de plástico (15,5 x 5,5 cm) com aberturas recobertas por tecido tipo “voile” (para ventilação). Foram oferecidas 30 ninfas de *D. citri* de quinto ínstar para cada fêmea do parasitóide. O parasitismo foi permitido por 24 horas em câmaras climatizadas (Figura 5B e C), reguladas a 15, 20, 25, 30 e 35 ± 1°C, 70 ± 10% UR e fotofase de 14 horas. Após este período, os parasitóides foram retirados das gaiolas mediante a utilização de um tubo de vidro de 12 x 75 mm e as ninfas de *D. citri* que foram submetidas ao parasitismo, foram levadas para as câmaras climatizadas reguladas com as temperaturas selecionadas. Para cada uma das cinco temperaturas (tratamentos) foram estudadas quatro repetições, sendo que cada repetição foi constituída por uma parcela com cinco tubos; foram avaliados os seguintes parâmetros: duração do desenvolvimento (ovo - adulto), porcentagem de emergência e razão sexual ($rs = \frac{\text{fêmeas}}{\text{fêmeas} + \text{machos}}$). Os parâmetros biológicos avaliados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$), no programa estatístico SAS, Statistical Analyses System (2000).

4.2.4 Tabela de vida de fertilidade de *T. radiata* em diferentes temperaturas

Avaliou-se a fecundidade e longevidade de *T. radiata* nas temperaturas de 15, 20, 25, 30 e 35 ± 1°C. Em gaiolas semelhantes àquelas descritas para os estudos da biologia (item 4.2.3), foram individualizadas, em cada temperatura, fêmeas de *T. radiata* alimentadas com uma mistura de mel puro e pólen (CHIEN; CHU; KU, 1994). Para o parasitismo, foram oferecidas, diariamente, 30 ninfas de quinto ínstar de *D. citri* e após 24 horas, as plantas contendo as ninfas submetidas ao parasitismo, foram levadas para as câmaras climatizadas reguladas com as temperaturas selecionadas.

Cada tratamento (temperaturas) foi representado por dez repetições, sendo os adultos observados diariamente até sua morte. Posteriormente, calculou-se o número médio de ovos por fêmea (mx) em cada data de oviposição (x) considerando o total de fêmeas, o índice de sobrevivência acumulado de fêmeas (lx) durante o período de oviposição e o número de

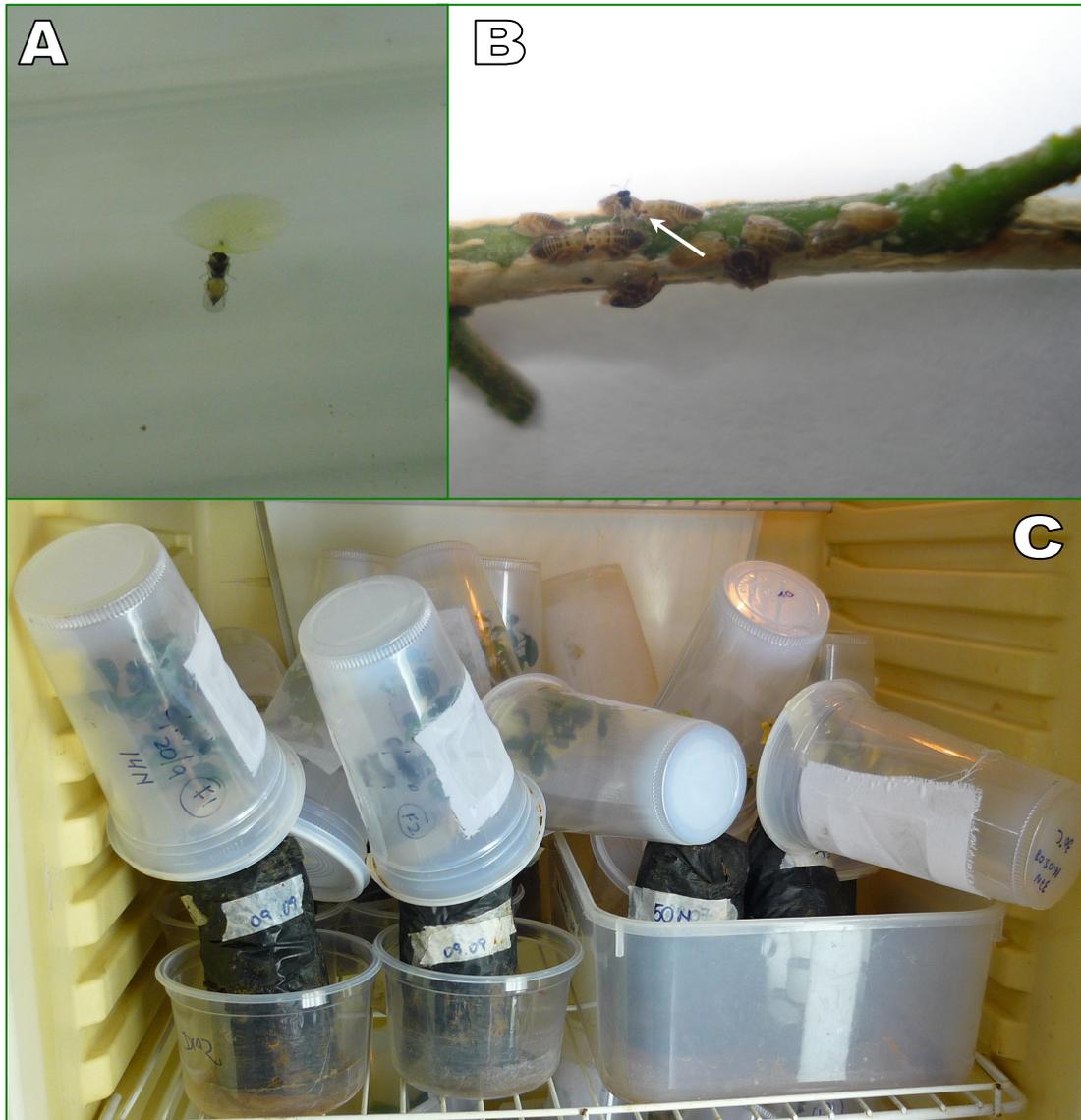


Figura 5 - A- Fêmea de *Tamarixia radiata* alimentada com mistura de mel e pólen; B- A seta indica uma fêmea de *Tamarixia radiata* parasitando ninfas de quinto ínstar de *Diaphorina citri*; C- Gaiolas cilíndricas de plástico (15,5 x 5,5 cm) com perfurações recobertas por tecido tipo “voile” em câmaras climatizadas reguladas a 15, 20, 25, 30 e 35 ± 1°C, 70 ± 10% UR e fotofase de 14 horas

descendentes que atingiram a idade “x” na seguinte ($l_x.m_x$). Estes dados de sobrevivência e fecundidade foram sintetizados em uma tabela de vida e fertilidade seguindo o modelo proposto por Maia, Luiz e Campanhola (2000). Assim, estimou-se o intervalo entre gerações (T) que representa o tempo médio entre a postura de uma geração e a postura da geração seguinte, taxa líquida de reprodução (R_o) que é a estimativa do número médio de fêmeas gerado por fêmea ao longo do período de oviposição e que chegarão na geração seguinte, taxa intrínseca de crescimento (r_m) que é o fator relacionado com a velocidade de crescimento da população e a taxa finita de aumento (λ) que é o fator de multiplicação de crescimento diário da população. Para estimar os parâmetros da tabela de vida foram utilizados os seguintes algoritmos: taxa líquida de reprodução (R_o), form. (1); estimativa da taxa intrínseca de crescimento (r_m'), form. (2); taxa intrínseca de crescimento (r_m), form. (3); intervalo entre gerações (T), form. (4); e taxa finita de aumento (λ), form. (5).

$$R_o = \sum l_x.m_x \quad (1)$$

$$r_m' = \frac{\ln(R_o)}{T} \quad (2)$$

$$r_m = \sum e^{-r_m' \cdot x} \cdot l_x.m_x = 1 \quad (3)$$

$$T = \frac{\ln(R_o)}{r_m} \quad (4)$$

$$\lambda = e^{-r_m} \quad (5)$$

Os parâmetros da tabela de vida de fertilidade e seus respectivos erros padrão foram estimados segundo Meyer, Igersoll e MacDonald (1986) e as médias comparadas pelo teste “t” bilateral ($P \leq 0,06$), utilizando o software “Lifetable.sas” (MAIA; LUIZ; CAMPANHOLA, 2000) no programa estatístico SAS, Statistical Analyses System (2000).

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Biologia de *Tamarixia radiata* sobre *Diaphorina citri* em diferentes temperaturas

Houve efeito significativo da temperatura sobre a porcentagem de parasitismo de *Tamarixia radiata* (Waterston, 1922) (Hymenoptera: Eulophidae). O parasitismo foi maior nas temperaturas de 25 e 30°C, sendo de 84,17 e 72,50%, respectivamente, valores que diferiram significativamente das porcentagens de 22,92; 44,79 e 40,3 obtidas nas temperaturas de 15, 20 e 35°C (Figura 6). As maiores porcentagens de emergência ocorreram nas temperaturas de 25, 30 e 35°C, variando de 88,41 a 78,81%, observando-se diferenças significativas, com redução, apenas nas temperaturas de 15 e 20°C (Figura 7). Com relação à razão sexual, não houve efeito significativo da temperatura sobre este parâmetro biológico (Figura 8). Os valores de parasitismo, emergência e razão sexual observados neste trabalho são semelhantes aos obtidos por Chu e Chien (1991) em condições de laboratório a 25°C, umidade relativa de 100% e fotofase de 14 horas, na China.

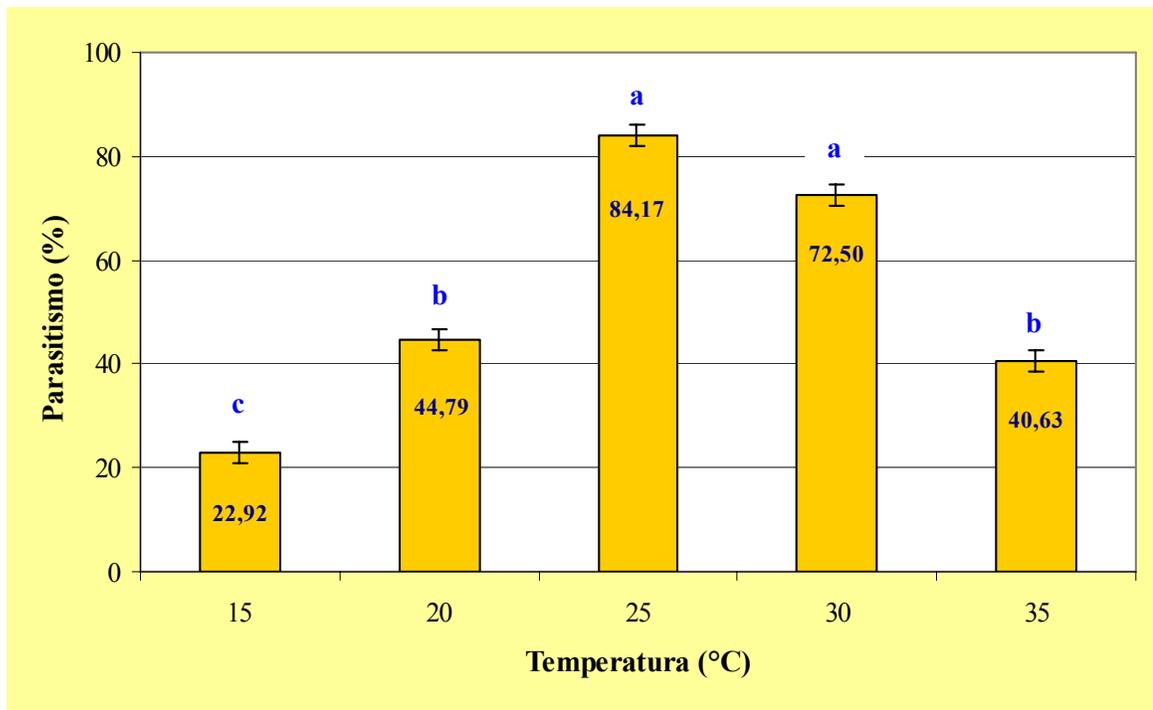


Figura 6 - Porcentagem de parasitismo de *Tamarixia radiata* sobre *Diaphorina citri*, durante 24 horas nas temperaturas de 15, 20, 25, 30 e 35 ± 1°C; UR: 70 ± 10% e fotofase: 14 horas. Médias seguidas de mesma letra, nas barras, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P≤0,05)

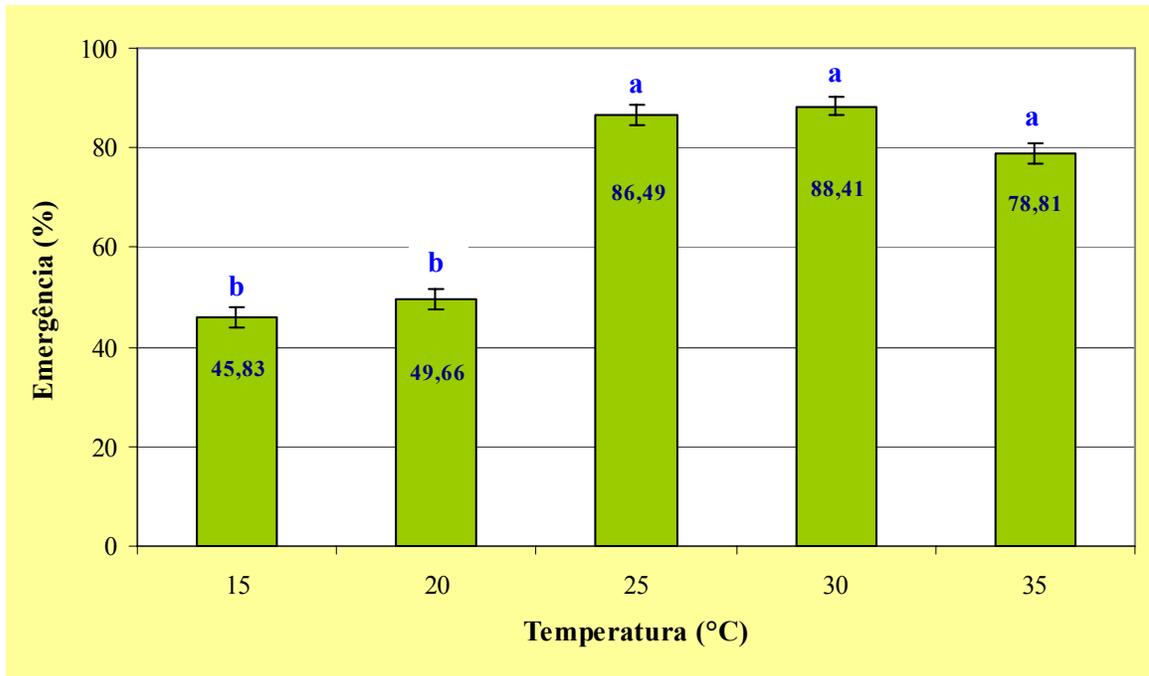


Figura 7 - Porcentagem de emergência de *Tamarixia radiata* criado sobre *Diaphorina citri*, durante 24 horas nas temperaturas de 15, 20, 25, 30 e 35 ± 1°C; UR: 70 ± 10% e fotofase: 14 horas. Médias seguidas de mesma letra, nas barras, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P≤0,05)

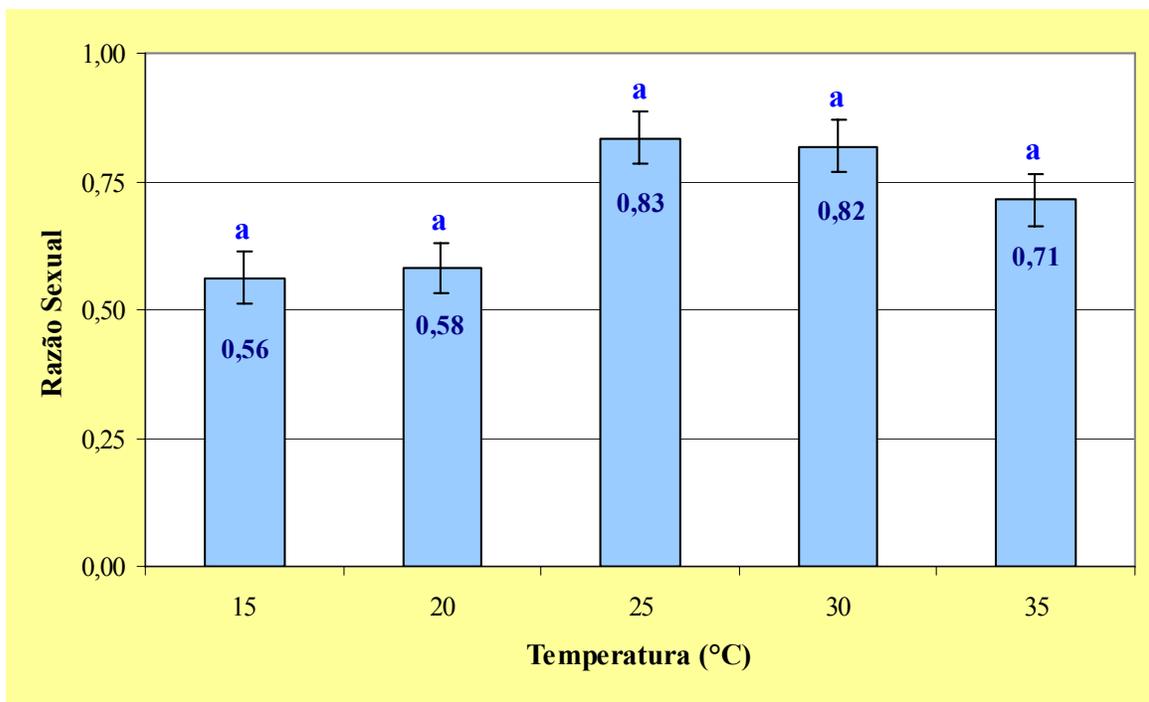


Figura 8 - Razão sexual de *Tamarixia radiata* criado sobre *Diaphorina citri*, durante 24 horas nas temperaturas de 15, 20, 25, 30 e 35 ± 1°C; UR: 70 ± 10% e fotofase: 14 horas. Médias seguidas de mesma letra, nas barras, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P≤0,05)

Devido ao fato de existirem poucos estudos com *T. radiata*, os dados biológicos obtidos no presente trabalho, serão também comparados com outras espécies de eulofídeos. Segundo Wang et al. (1999) as temperaturas favoráveis para o desenvolvimento, sobrevivência e reprodução de eulofídeos encontra-se entre 20 e 30°C; embora o parasitismo ocorra em altas temperaturas, a porcentagem de emergência diminui drasticamente acima dos 32,5°C; por outro lado, e estes parasitóides não conseguiram emergir a 15°C. Estes autores também concluíram que as fêmeas a 25°C parasitaram um maior número de hospedeiros e tiveram os maiores índices de fecundidade em relação aos valores obtidos em outras temperaturas, dados similares aos observados para *T. radiata* na presente pesquisa.

Hondo, Koike e Sugimoto (2006) avaliaram, com base na tolerância térmica, o desenvolvimento, eficiência e reprodução de sete espécies de eulofídeos e, concluíram que todas as espécies analisadas encontravam-se adaptadas às altas temperaturas, diminuindo a capacidade reprodutiva entre 15 e 20°C. Dentro deste contexto, e pelos dados obtidos no presente trabalho com *T. radiata* é importante salientar, a importância de se avaliar a tolerância térmica, antes de se escolher um agente de controle biológico para uma determinada praga, particularmente com relação ao desenvolvimento e reprodução.

A duração média do desenvolvimento biológico (ovo-adulto) de *T. radiata* sobre ninfas de quinto ínstar de *D. citri* (Figura 9), foi afetada pela temperatura, ocorrendo um aumento da velocidade de desenvolvimento com a elevação térmica, nas condições estudadas ($F= 11,97$; $gl= 148$; $P= 0,00106$; ANOVA) (Tabela 1). Vários autores constataram a influência da temperatura sobre a velocidade de desenvolvimento em eulofídeos (MINKENBERG, 1989; BAZZOCCHI et al., 2003; DUALE, 2005). O parasitóide completou o desenvolvimento sobre *D. citri* nas temperaturas de 18, 20, 22, 25, 28, 30 e 32°C. O tempo do desenvolvimento para o período ovo - adulto de machos e fêmeas de *T. radiata* foi inversamente relacionado com as temperaturas estudadas.

4.3.2 Tabela de vida de fertilidade de *T. radiata* em diferentes temperaturas

A tabela de vida de fertilidade de *T. radiata* foi calculada mediante o padrão de oviposição das fêmeas durante o período de avaliação nas diferentes temperaturas. A duração

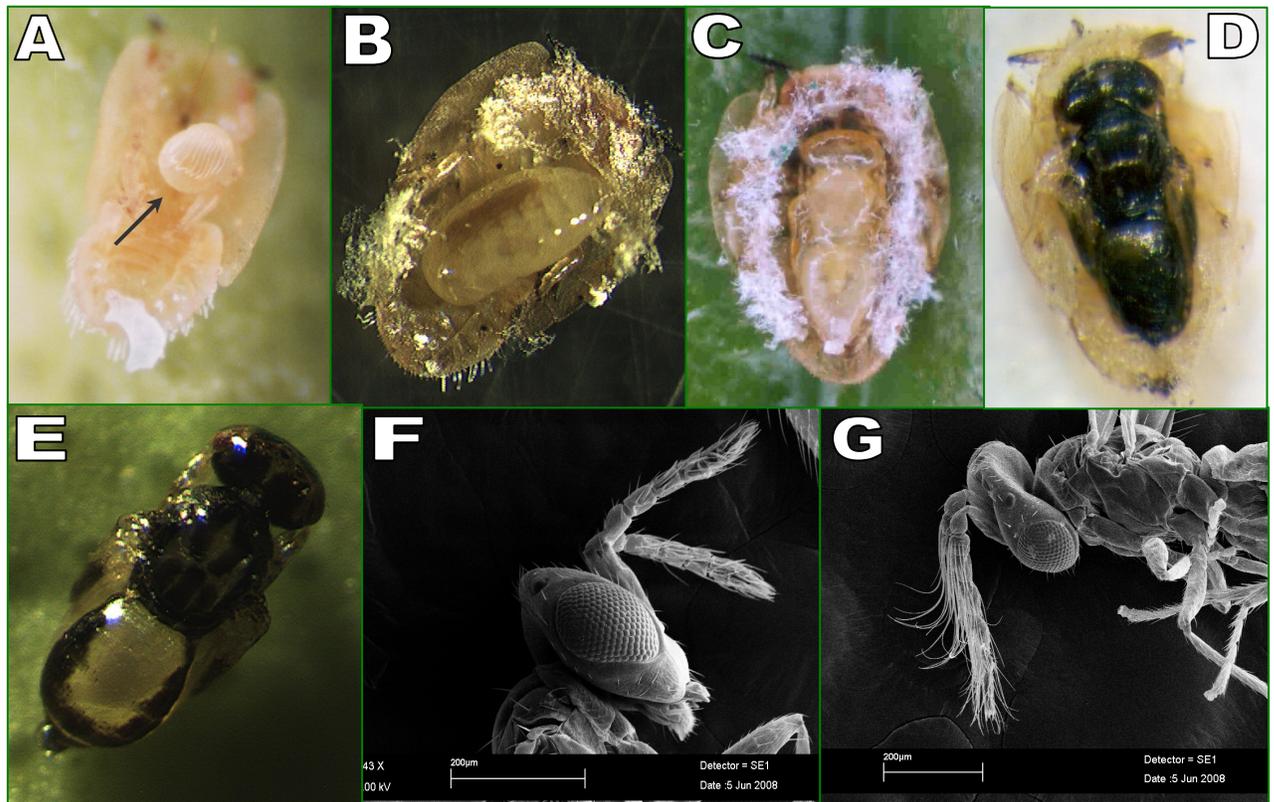


Figura 9 - Desenvolvimento biológico (ovo-adulto) de *Tamarixia radiata*. A- A seta indica um ovo de *Tamarixia radiata*; B- Pré-pupa; C- Pupa; D- Pupa em estágio avançado de desenvolvimento; E- Adulto próximo à emergência; F- Fêmea (143x); G- Macho (101x)

Tabela 1 - Duração (dias) do período de desenvolvimento (ovo - adulto) de *Tamarixia radiata* sobre *Diaphorina citri* em diferentes temperaturas

Temperatura (°C)	15	20	25	30	35
Fêmea	17,33 ± 0,13a ^A	14,27 ± 0,20 ab ^A	11,00 ± 0,17 bc ^A	8,43 ± 0,17 c ^A	7,60 ± 0,09 c ^A
Macho	15,33 ± 0,48a ^B	12,53 ± 0,45a ^B	8,33 ± 0,49 b ^B	6,00 ± 0,76 b ^B	6,63 ± 0,69 b ^B

Médias seguidas da mesma letra minúscula nas linhas e maiúscula nas colunas não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

média de uma geração (T) variou em função das temperaturas utilizadas para o desenvolvimento do parasitóide. A variação foi de 10,43 dias a 35°C a 20,32 a 15°C (Tabela 2). A taxa líquida de

reprodução (R_o), apresentou diferenças estatísticas em função da temperatura, evidenciando-se que a 25°C foi observada a maior fecundidade, sendo 12,83 vezes maior do que aquela obtida a 15°C onde se registrou a menor R_o (Tabela 2).

Todos os valores da razão infinitesimal de aumento (r_m) foram positivos, evidenciando o aumento populacional nas temperaturas avaliadas; assim este parâmetro, variou de 0,1828 a 0,3742, sendo maior a 25°C. Na razão finita de aumento (λ) foi possível observar dois grupos muito semelhantes, o primeiro, incluindo os valores obtidos nas temperaturas de 15, 20 e 35°C e o segundo grupo constituído pelos valores obtidos a 25 e 30°C (Tabela 2). A taxa máxima de aumento variou, como consequência dos resultados anteriores, conforme a temperatura, tendo ocorrido os primeiros picos nas temperaturas de 25, 30 e 35°C, sendo mais atrasados em 15 e 20°C (Figura 10). Estes valores estão diretamente correlacionados à duração do ciclo do inseto, pois o ciclo foi menor em 35°C e se alongou a 15°C (Tabela 2).

Tabela 2 - Duração média (T), taxa líquida de reprodução (R_o), razão infinitesimal de aumento (r_m) e razão finita de aumento (λ) para *Tamarixia radiata*, criada a 15, 20, 25, 30 e 35 ± 2°C; UR: 70 ± 10% e fotofase: 14 horas

Temperatura (°C)	T (dias)	R_o	r_m	λ
15	20,32 ± 0,24a	9,88 ± 1,05 d	0,1826 ± 0,008 d	1,2003 ± 0,010 d
20	18,84 ± 0,12ab	23,62 ± 2,48 c	0,2531 ± 0,013 c	1,288 ± 0,016 c
25	15,53 ± 0,21 bc	126,79 ± 6.25a	0,3742 ± 0,002a	1,4538 ± 0,004a
30	11,78 ± 0,13 c	58,63 ± 3,23 b	0,3378 ± 0,002 b	1,4019 ± 0,012 b
35	10,43 ± 0,35 c	21,27 ± 2,01 c	0,2528 ± 0,009 c	1,2889 ± 0,014 c

Médias seguidas da mesma letra minúscula nas linhas não diferem entre si, pelo teste “t” bilateral de Student ($P \leq 0,06$).

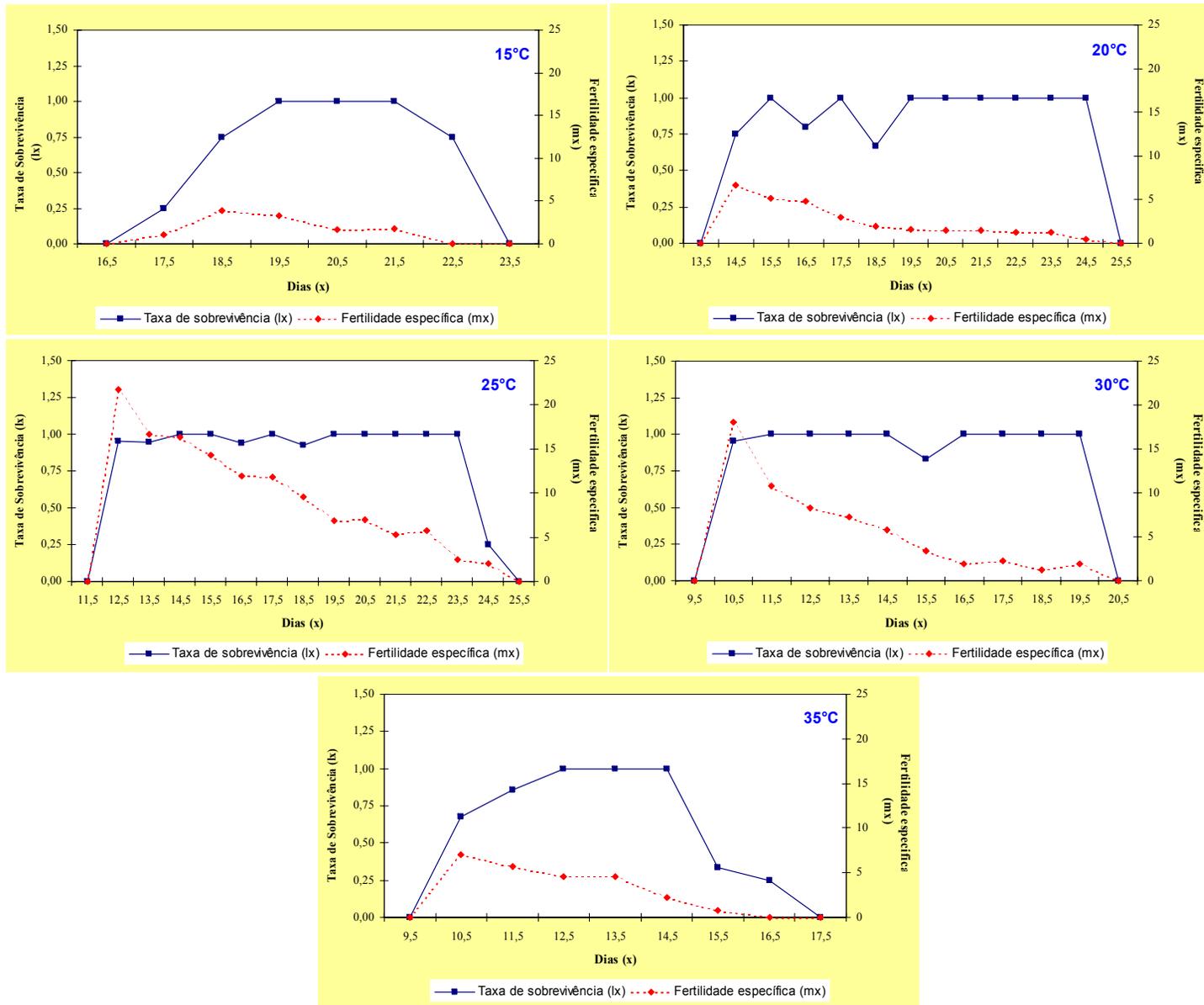


Figura 10 - Razão de sobrevivência (lx) e fertilidade específica (mx) de *Tamarixia radiata* sobre *Diaphorina citri* nas temperaturas de 15, 20, 25, 30 e 35 ± 1°C; UR: 70 ± 10% e fotofase: 14 horas

Os dados obtidos no presente trabalho são próximos àqueles obtidos por Chu e Chen (1991) na China, autores que obtiveram dados de duração média (T) de 17,8 dias, taxa líquida de reprodução (R_0) de 285, razão infinitesimal de aumento (r_m) de 0,31 e razão finita de aumento (λ) 1,37 para *T. radiata* mantido em condições de 25°C, 100% de UR e fotofase de 14 horas.

Em outros trabalhos com eulofídeos, já foi ressaltada a importância da temperatura no desenvolvimento e reprodução (ACOSTA; O'NELL,1999; CASTILLO et al., 2006). Castillo et al. (2006) obtiveram observações similares às apresentadas no presente trabalho, demonstrando que a duração do desenvolvimento de ovo a adulto diminuiu quando a temperatura aumentou de 20 para 33°C e não observaram desenvolvimento destes parasitóides em temperaturas inferiores a 15°C, com maiores fecundidades sendo observadas a 25 e 30°C, com acentuada redução a partir de 33°C.

Acosta e O'Neill (1999) nas temperaturas de 15, 24 e 30°C estudaram a tabela de vida de fertilidade de populações de eulofídeos provenientes de Honduras, Colômbia e México e concluíram, que a descoberta de biótipos adaptados às baixas temperaturas, é importante para a compreensão da biogeografia dos parasitóides, seus hospedeiros e plantas hospedeiras, e a dinâmica das populações em regiões geograficamente diferentes; assim, esta variabilidade poderia servir de base para a seleção das populações adaptadas às condições climáticas comuns às regiões onde seriam utilizadas para o controle do inseto alvo. Dentro deste mesmo contexto, Viggiani, Bernardo e Sasso (2000) concluíram a importância da compreensão dos parâmetros biológicos de eulofídeos sob diferentes regimes de temperatura, pois estes autores comprovaram em condições de campo a ineficiência deste parasitóide quando as condições climáticas não foram as mais apropriadas para a fitofagia da praga.

A tabela de vida de fertilidade é uma, dentre as várias formas, de se conhecer o potencial de crescimento das populações e de avaliar os possíveis impactos dos fatores bióticos e abióticos sobre os insetos. No caso de *T. radiata*, a razão infinitesimal de aumento (r_m), obtida na presente pesquisa, é um bom indicador da temperatura na qual o crescimento da população foi mais favorável, pois este parâmetro refletiu, de forma global, os efeitos da temperatura sobre o desenvolvimento, reprodução e sobrevivência deste parasitóide. A taxa líquida de reprodução (R_0) foi maior a 25°C, pois, a cada geração a população de *T. radiata* irá aumentar 126,79 vezes, número superior àquele obtido nas demais temperaturas (Tabela 2).

4.4 Conclusões

1. As maiores taxas de parasitismo de *Tamarixia radiata* (Waterston, 1922) (Hymenoptera: Eulophidae) sobre *Diaphorina citri* Kuwayama, 1907 (Hemiptera: Psyllidae) ocorrem nas temperaturas de 25 e 30°C;
2. As maiores porcentagens de emergência do parasitóide ocorrem nas de temperaturas de 25, 30 e 35°C;
3. Ambos os sexos de *T. radiata* comportam-se igualmente com relação à temperatura na faixa de 15 a 35°C;
4. *T. radiata* se desenvolve na faixa térmica de 15 a 35°C, sendo 25°C a temperatura mais adequada por proporcionar maior viabilidade do período ovo-adulto;
5. Os maiores valores da taxa líquida de reprodução (R_0) e de razão finita de aumento (λ) de *T. radiata* são obtidos a 25°C.

Referências

- ACOSTA, N.M.; O'NEIL, R.J. Life history characteristics of three populations of *Edovum putleri* Grissell (Hymenoptera: Eulophidae) at three temperatures. **Biological Control**, Orlando, v. 16, p. 81-87, 1999.
- AUBERT, B.; QUILICI, S. Biological control of the African and Asian citrus psyllids (Homoptera: Psylloidea), through eulophid and encyrtid parasites (Hymenoptera: Chalcidoidea) in Reunion Island. In: CONFERENCE OF THE INTERNACIONAL OF CITRUS VIROLOGISTS, 9., 1984, Riverside. **Proceedings...** Riverside: University of California, 1984. p. 100-108.
- BAZZOCCHI, G.G.; LANZONI, A.; BURGIO, G.; FIACCONI, M.R. Effects of temperature and host on the pre-imaginal development of the parasitoid *Diglyphus isaea* (Hymenoptera: Eulophidae). **Biological Control**, Orlando, v. 26, p. 74-82, 2003.
- BIGLER, F. Mass production of *Trichogramma maidis* Pint. et Voeg. and its field application against *Ostrinia nubilalis* Hbn. in Switzerland. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v.101, p. 23-29, 1986.
- CASTILLO, J.; JACAS, J.A.; PEÑA, J.E.; ULMER, B.J.; HALL, D.G. Effect of temperature on life history of *Quadrastichus haitiensis* (Hymenoptera: Eulophidae), an endoparasitoid of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae). **Biological Control**, Orlando, v. 36, p. 189-196, 2006.

CHAGAS, M.C.; PARRA, J.R.P.; MILANO, P.; NASCIMENTO, A.M.; PARRA, A.L.G.C.; YAMAMOTO, P. *Ageniaspis citricola*: Criação e estabelecimento no Brasil, In: PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M.S. (Ed.). **Controle biológico no Brasil**. São Paulo: Manole, 2002. p. 377-391.

CHIEN, C.C.; CHU, Y.I. Biological control of citrus psyllid, *Diaphorina citri* in Taiwan. Biological Pest Control in Systems of Integrated Pest Management. **Reprinted from Food and Fertilizer Technology Center Book Series**, Taipei, n. 47, p. 93-104, 1996.

CHIEN, C.C.; CHU, Y.I.; KU, H.C. Influence of food on longevity, egg production and population increase of the eulophid wasp, *Tamarixia radiata*. **FAO Plant Protection Bulletin**, Taichung, v. 36, p. 97-105, 1994.

CHU, Y.I.; CHIEN, C.C. Utilization of natural enemies to control psyllid vectors transmitting citrus greening. In: KIRITANI, K.; SU, H.J.; CHU, Y.I. (Ed.). **Integrated control of plant virus diseases**. Taipei: Food and Fertilizer Technology Center for the Asian and Pacific Region, 1991. p. 135-145.

COPPEL, H.C.; MERTINS, J.W. **Biological insect pest suppression**. New York: Springer-Verlag, 1977. 314 p.

DUALE, A.H. Effect of Temperature and Relative Humidity on the Biology of the Stem Borer Parasitoid *Pediobius furrus* (Gahan) (Hymenoptera: Eulophidae) for the Management of Stem Borers. **Environmental Entomology**, College Park, v. 34, p. 1-5, 2005.

ÉTIENNE, J.; QUILICI, S.; MARINAL, D.; FRANCK, A. Biological control of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in Guadeloupe by imported *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae). **Fruits**, Paris, v. 56, p. 307-315, 2001.

FAUVERGUE, X.; QUILICI, S. Étude de certains paramètres de la biologie de *Tamarixia radiata* (Waterston, 1922) (Hymenoptera: Eulophidae), ectoparasitoïde primaire de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). Vecteur asiatique du greening des agrumes. **Fruits**, Paris, v. 46, p. 179-185, 1991.

FUNDECITRUS. Greening chega às regiões Norte e Sul do Estado. **Revista Fundecitrus**, Araraquara, v. 124, p. 8-11, 2004.

HONDO, T.; KOIKE, A.; SUGIMOTO, T. Comparison of thermal tolerance of seven native species of parasitoids (Hymenoptera: Eulophidae) as biological control agents against *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae) in Japan. **Applied Entomology and Zoology**, Tokyo, v. 41, p. 73-82, 2006.

HOY, M.A.; NGUYEN, R. Classical biological control of Asian citrus psylla. **Citrus Industry**, Tampa, v. 81, p. 48-50, 2000.

KING, E.G.; BULL, D.L.; BOUSE, L.R.; PHILLIPS, J.R. Introduction: biological control of *Heliothis* spp. in cotton by augmentative releases of *Trichogramma*. **Southwest Entomology**, Oklahoma, v. 8, p. 1-10, 1985.

- MAIA, H.N.M.; LUIZ, A.J.B.; CAMPANHOLA, C. Statistical inference on associated fertility life table parameters using jackknife technique: computational aspects. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.93, n.2, p-511-518, 2000.
- MEYER, J.S.; IGERSELL, C.G.; MACDONALD, L.L. Uncertainty in population growth rates: jackknife vs. bootstrap techniques. **Ecology**, Tempe, v. 67, p.1156-1166, 1986.
- MINKENBERG, O.P.J.M. Temperature effects on the life history of the eulophid wasp *Diglyphus isaea*, an ectoparasitoid of leafminers (*Liriomyza* spp.), on tomatoes. **The Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 115, p. 381-397, 1989.
- SAS INSTITUTE. **Statistical Analysis System**: getting started with the SAS learning. Cary, 2002. 81 p.
- SILVEIRA NETO, S.; NAKANO, O.; BARBIN, D. **Manual de ecologia dos insetos**. São Paulo: Ceres, 1976. 419 p.
- SKELLEY, L.H.; HOY, M.A. A synchronous rearing method for the Asian citrus psyllid and its parasitoids in quarantine. **Biological Control**, Orlando, v.29, p.14-23, 2004.
- VIGGIANI, G.; BERNARDO, U.; SASSO, R. Primi risultati sull'introduzione di *Thripobius semiluteus* Bouček (Hymenoptera: Eulophidae) in Italia per il controllo biologico di *Heliothrips haemorrhoidalis* (Bouché) (Thysanoptera). **Atti Giornate Fitopatologiche**, Perugia, v. 16, p. 521-526, 2000.
- WANG, X.; LIU, S.; GUO, S.; LIN, W. Effects of host stages and temperature on population parameters of *Oomyzus sokolowskii*, a larval-pupal parasitoid of *Plutella xylostella*. **BioControl**, Dordrecht, v. 44, p. 391-402, 1999.

5 CAPACIDADE DE PARASITISMO, EM DIFERENTES TEMPERATURAS, DE *Tamarixia radiata* (Waterston, 1922) (Hymenoptera: Eulophidae) SOBRE *Diaphorina citri* Kuwayama, 1907 (Hemiptera: Psyllidae) E LIBERAÇÃO EM DUAS ÁREAS CITRÍCOLAS

Resumo

Por apresentarem altas taxas de parasitismo e alta capacidade de dispersão, a potencialidade de liberações *Tamarixia radiata* (Waterston, 1922) (Hymenoptera: Eulophidae) como tática de controle de *Diaphorina citri* Kuwayama, 1907 (Hemiptera: Psyllidae) já foi relatada em vários países. Este trabalho teve por objetivo pesquisar a preferência hospedeira, o parasitismo diário e acumulado e a capacidade de parasitismo de *T. radiata*, assim como a liberação deste parasitóide em pomares cítricos comerciais dos municípios de Araras, Cordeirópolis e Limeira, no estado de São Paulo. O parasitismo de *T. radiata* foi de 61,25 e 88,75% sobre ninfas de quarto e quinto ínstars de *D. citri*, respectivamente, valores que diferiram das porcentagens obtidas para as ninfas de primeiro a terceiro ínstars. A capacidade de parasitismo foi menor a 15, 20 e 35°C, sendo possível constatar que a temperatura interferiu na fecundidade do parasitóide. A temperatura mais adequada para o parasitismo de *T. radiata* foi de a de 25°C. Oito dias após a liberação, a porcentagem de parasitismo de *T. radiata* se manteve entre 51,57 e 72,75%, valores que decresceram para 4,17 e 10% quinze dias depois da liberação. Nas áreas escolhidas nos municípios de Cordeirópolis e Limeira, após três liberações, a porcentagem de parasitismo de *T. radiata* variou entre 30 a 60%, constatando-se que o número de ninfas de quarto e quinto ínstars decresceram nas áreas onde foram realizadas tais liberações.

Palavras-chave: Capacidade de parasitismo; Psilídeo; Liberações; Controle biológico clássico; Greening

Abstract

Because of its high parasitism rates and high dispersal capacity, the potential for using *Tamarixia radiata* (Waterston, 1922) (Hymenoptera: Eulophidae) releases as a control tactic against *Diaphorina citri* Kuwayama, 1907 (Hemiptera: Psyllidae) has been reported in several countries. This study aimed to investigate the host preference, daily and accumulated parasitism, and parasitism capacity of *T. radiata*, as well as releases of this parasitoid in commercial citrus orchards in the municipalities of Araras, Cordeirópolis, and Limeira, State of São Paulo, Brazil. *T. radiata* parasitism was 61.25 and 88.75% on fourth- and fifth-instar nymphs of *D. citri*, respectively; these values differed from the percentages obtained for first- to third-instar nymphs. Parasitism capacity was smaller at 15, 20, and 35°C; temperature interfered with the parasitoid's fecundity. The most suitable temperature for *T. radiata* parasitism was 25°C. *T. radiata* parasitism percentage values eight days after release remained between 51.57 and 72.75%, decreasing to 4.17 and 10% fifteen days after release. In the areas selected in the municipalities of Cordeirópolis and Limeira, parasitism percentage values of *T. radiata* after three releases

ranged between 30 and 60%; the number of fourth and fifth-instar *D. citri* nymphs decreased in those areas.

Keywords: Parasitism capacity; Psyllid; Releases; Classical biological control; Greening

5.1 Introdução

Com os estudos iniciais no Brasil, durante os meses de outubro a dezembro de 2004, nos municípios de Piracicaba e Jaboticabal, SP, constatou-se a ocorrência natural de *Tamarixia radiata* (Waterston, 1922) (Hymenoptera: Eulophidae), com porcentagem de emergência de 14,3 a 33,3% e, no período de março a julho de 2005, este parasitóide foi praticamente registrado em todas as áreas citrícolas do estado de São Paulo, apresentando elevadas taxas de parasitismo, variáveis de 27,5 a 80% (GÓMEZ TORRES et al., 2006). Para evitar uma redução drástica na produção brasileira de citros como consequência da disseminação do “huanglongbing” ou “greening”, planeja-se adotar, como uma das táticas de manejo do psílideo vetor, *Diaphorina citri* Kuwayama, 1907 (Hemiptera: Psyllidae), um programa de controle biológico clássico mediante liberações do ectoparasitóide *T. radiata*, à semelhança do que vem ocorrendo em outras regiões do mundo (CHIEN; CHU, 1996; HOY; NGUYEN, 2000; ÉTIENNE et al., 2001; SKELLEY; HOY, 2004).

O clima, tipo de cultura, hospedeiros, predação, uso de agroquímicos e qualidade do inseto influem na eficiência das liberações e dispersão de parasitóides (ANDOW; PROKRYM, 1991). É difícil definir com precisão os fatores intrínsecos e/ou extrínsecos determinantes dos casos de insucesso, mas a seleção inadequada de linhagens, avaliações da “qualidade” do parasitóide criado em laboratório, características do transporte e manipulação, técnicas e intervalo de liberações, densidade liberada (parasitóides: ovos da praga), além das condições climáticas no momento da liberação, dispersão do parasitóide e uso de agroquímicos dentro da cultura, são todos fatores que podem levar ao insucesso de um programa de controle biológico (HASSAN, 1994).

O objetivo deste trabalho foi realizar pesquisas sobre a preferência hospedeira, o parasitismo diário e acumulado e a capacidade de parasitismo de *T. radiata*, assim como a liberação deste parasitóide em pomares cítricos e assim viabilizar a utilização de *T. radiata* como

mais uma estratégia de controle do vetor e da doença nas diferentes regiões citrícolas do estado de São Paulo.

5.2 Material e Métodos

5.2.1 Preferência da idade hospedeira no parasitismo de *Tamarixia radiata*

Neste experimento, trinta ninfas do primeiro ao quinto instares de *Diaphorina citri* Kuwayama, 1907 (Hemiptera: Psyllidae) foram oferecidas com as idades definidas, para 30 fêmeas individualizadas e acasaladas de *Tamarixia radiata* (Waterston, 1922) (Hymenoptera: Eulophidae), com 24 horas de idade e alimentadas com uma mistura de mel puro e pólen (CHIEN; CHU; KU, 1994), colocadas em gaiolas (35x35x45cm). Após 24 horas, as fêmeas foram retiradas das gaiolas e as ninfas foram vistoriadas durante um período de 7 dias para se verificar a porcentagem de parasitismo. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e cada tratamento constou de seis repetições. Foi avaliado o número de ninfas parasitadas por fêmea. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias de parasitismo comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$), no programa estatístico SAS, Statistical Analyses System (2000).

5.2.2 Capacidade de parasitismo de *T. radiata* em diferentes temperaturas

Avaliou-se a capacidade de parasitismo de *T. radiata* sobre ninfas de *D. citri* em câmaras climatizadas reguladas a 15, 20, 25, 30 e $35 \pm 1^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\%$ de umidade relativa e fotofase de 14 horas.

Para cada temperatura, foram individualizadas vinte fêmeas do parasitóide, em tubos de vidro (12 x 75 mm) tampados com filme plástico Magipack® e alimentadas com uma mistura de mel puro e pólen (CHIEN; CHU; KU, 1994). Em gaiolas cilíndricas de plástico (15,5 x 5,5 cm) com perfurações recobertas por tecido tipo “voile”, foram oferecidas diariamente 30 ninfas de *D. citri* de quinto instar (resultado obtido em 5.2.1) para cada fêmea de *T. radiata* (Figura 1A e B). O parasitismo foi permitido por 24 horas nas diferentes temperaturas; após este período, os parasitóides foram retirados das gaiolas e as ninfas de *D. citri*, que foram submetidas ao

parasitismo, foram levadas para as câmaras climatizadas reguladas com as temperaturas selecionadas.

Em delineamento experimental inteiramente casualizado, para cada uma das cinco temperaturas (tratamentos) foram estudadas quatro repetições, sendo que cada repetição foi constituída por uma parcela com cinco tubos. Foram avaliados (Figura 1C) o número de ninfas parasitadas diariamente, a porcentagem acumulada de parasitismo e o número total de ninfas parasitadas por fêmea. Os parâmetros observados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$), no programa estatístico SAS, Statistical Analyses System (2000).

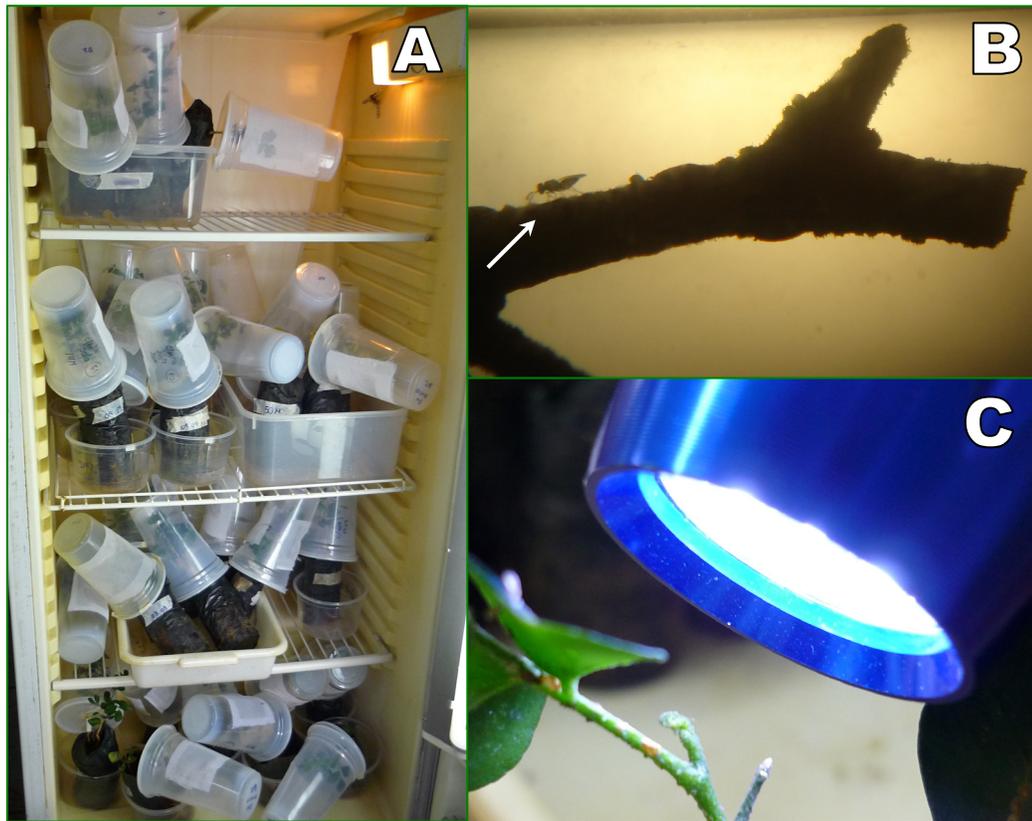


Figura 1 - **A-** Gaiolas cilíndricas de plástico (15,5 x 5,5 cm) utilizadas para a determinação da capacidade de parasitismo de *Tamarixia radiata* em câmaras climatizadas reguladas a 15, 20, 25, 30 e 35 \pm 1°C, umidade relativa de 70 \pm 10% e fotofase de 14 horas; **B-** A seta indica uma fêmea de *Tamarixia radiata* à procura da ninfa hospedeira para o parasitismo; **C-** Forma de avaliação do parasitismo, desenvolvimento e emergência de *Tamarixia radiata* nas diferentes temperaturas, em microscópio estereoscópico

5.2.3 Liberação de *T. radiata* para o controle de *Diaphorina citri* em condições de campo

As liberações do parasitóide foram realizadas em áreas comerciais de citros nos municípios de Araras (22°21'20"S - 47°23'12"W), Cordeirópolis (22°28'50"S - 47°27'27"W) e Limeira (22°33'37"S - 47°24'12"W), no estado de São Paulo. Antes de cada liberação de *T. radiata*, para se determinar o nível de infestação da praga, foram coletados, ao acaso, de 30 a 60 ramos com brotações novas contendo ninfas de *D. citri*. A coleta foi feita de forma cuidadosa, com tesoura de poda, e os ramos coletados foram colocados em sacos de papel devidamente etiquetados e acondicionados em caixas de isopor para serem transportados até o laboratório.

Para liberação, os adultos do parasitóide eram recém emergidos e acondicionados em tubos de vidro (12x75mm). Estes adultos foram levados ao campo 24 horas após a emergência, liberando-se 5 a 10 indivíduos por ponto de liberação (Figura 2).

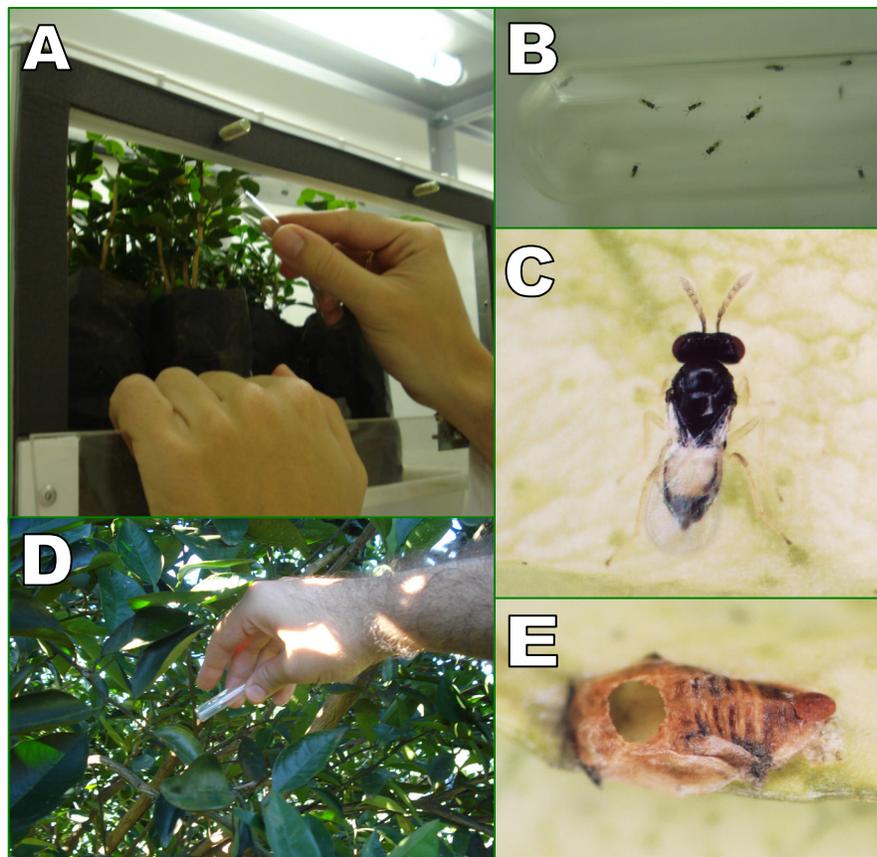


Figura 2 - Metodologia de liberação de *Tamarixia radiata* em pomares cítricos. **A-** Coleta de *Tamarixia radiata* para liberação; **B-** Tubo de vidro de 12x75mm utilizado para o transporte dos parasitóides para liberação; **C-** Fêmea de *Tamarixia radiata*, 24 horas após a emergência; **D-** Liberação do parasitóide em campo; **E-** Múmia de *Diaphorina citri* após a emergência de *Tamarixia radiata*

Nas áreas comerciais, para os experimentos de liberação, foram selecionadas parcelas de 70,2 x 32 m (distantes entre si, de pelo menos, 100 m), correspondendo a 0,23 ha, contendo aproximadamente 86 árvores e como pontos de liberação dentro das parcelas, foram escolhidas 15 árvores (Figura 3).

No município de Araras, foram escolhidas três parcelas; em duas delas, foram realizadas liberações do parasitóide e na outra não houve liberação. Nas áreas selecionadas, oito e quinze dias após a liberação, foi avaliada a porcentagem de parasitismo.

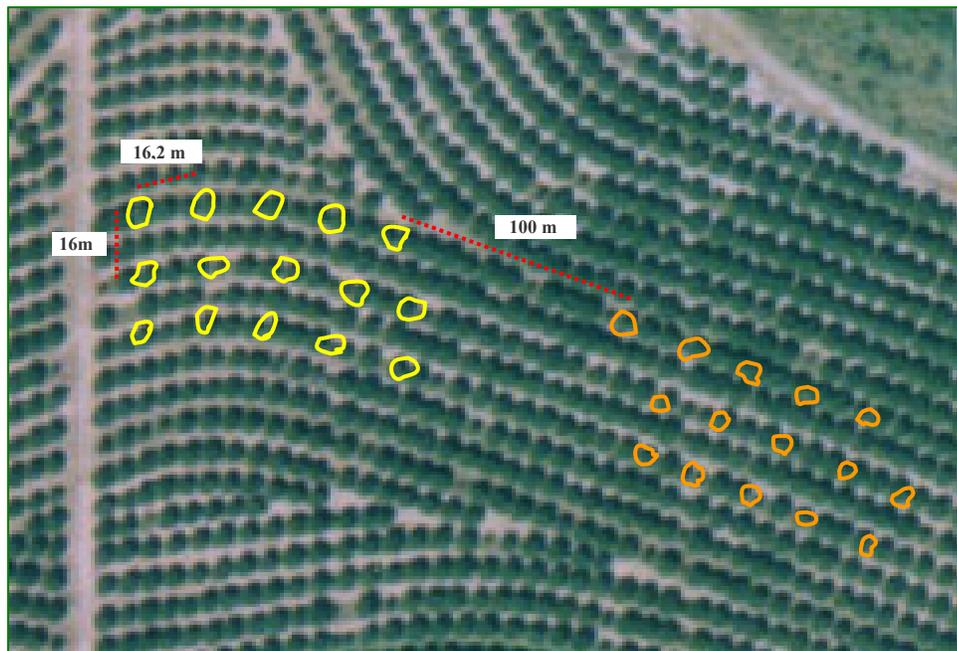


Figura 3 - Vista aérea de um pomar de citros para esquematizar as parcelas de 0,23 ha com as 15 árvores marcadas onde foram feitas as liberações de *Tamarixia radiata* e avaliações de parasitismo

Nas áreas citrícolas dos municípios de Cordeirópolis e Limeira, para as avaliações, em cada uma delas, foram escolhidas duas parcelas; em uma delas, foram realizadas as liberações do parasitóide e na outra não houve liberação (controle). A frequência de liberação nestas áreas dependeu da presença e estágio de desenvolvimento da praga, determinados nas avaliações prévias onde se avaliou o nível de infestação. As avaliações do parasitismo e emergência foram semanais.

5.3 Resultados e Discussão

5.3.1 Preferência hospedeira no parasitismo de *Tamarixia radiata*

Os aspectos etológicos e ecológicos da relação parasitóide-hospedeiro são altamente influenciados pelo estágio de desenvolvimento do hospedeiro. A idade hospedeira constitui-se em fator crucial no sucesso e adequação dos parasitóides (HARVEY, 2000); hospedeiros de idade inadequada reduzem notavelmente a aceitação hospedeira e o parasitismo, além de afetarem o tamanho, taxa de desenvolvimento, sobrevivência e fecundidade das gerações filiais (PAK, 1986; FUESTER; TAYLOR, 1991; FIDGEN et al., 2000).

No presente trabalho, foi possível verificar a estreita relação existente entre o número de ninfas parasitadas com as características biológicas de desenvolvimento do hospedeiro, pois o parasitismo de *Tamarixia radiata* (Waterston, 1922) (Hymenoptera: Eulophidae) foi de 61,25 e 88,75% sobre ninfas de quarto e quinto ínstaes de *Diaphorina citri* Kuwayama, 1907 (Hemiptera: Psyllidae), respectivamente, diferindo significativamente das taxas porcentuais, variáveis de 0,00 a 13,15%, obtidas para as ninfas de primeiro a terceiro ínstaes (F= 20,60; gl= 4; P<0,001; ANOVA) (Figura 4).

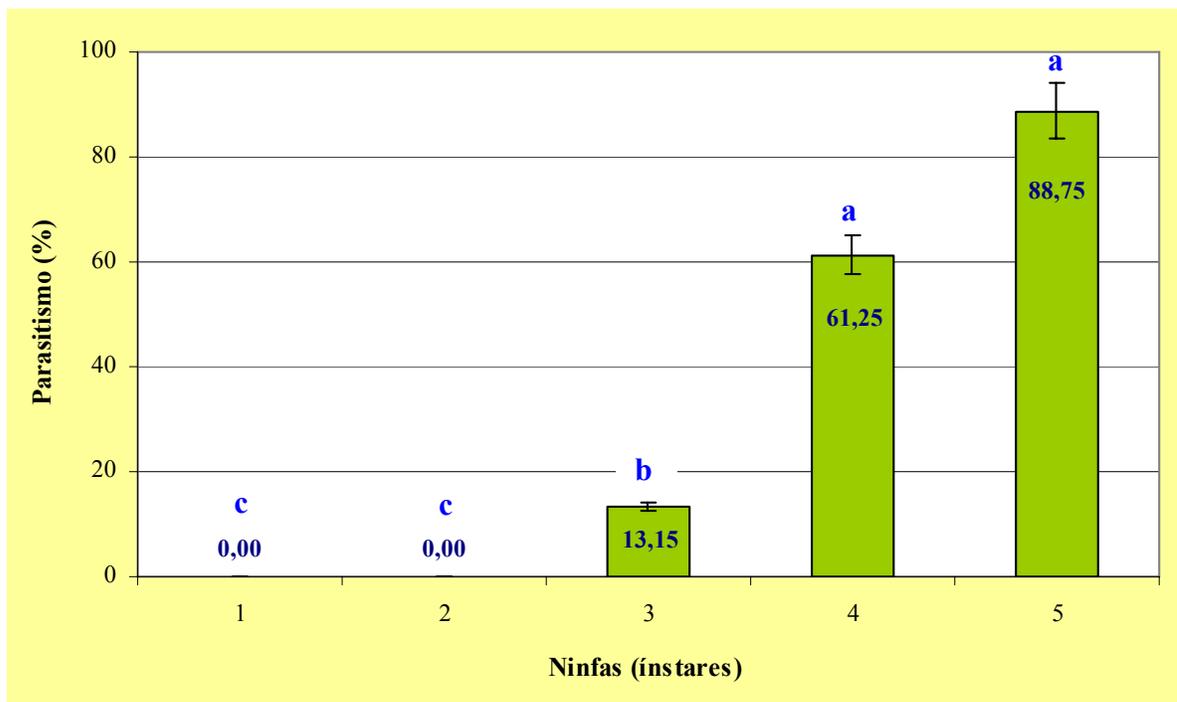


Figura 4 - Influência da idade hospedeiro no parasitismo de *Tamarixia radiata* em ninfas de *Diaphorina citri* durante 24 horas. Temperatura: $25 \pm 1^\circ\text{C}$, UR: $70 \pm 10\%$ e fotofase: 14 horas. Médias seguidas de mesma letra, nas barras, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$)

Segundo Chu e Chien (1991) e Skelley e Hoy (2004) *T. radiata* parasita, de preferência, ninfas de quinto ínstar e se alimenta de ninfas mais jovens (Figura 5), e pela combinação destas duas ações, cada fêmea de *T. radiata* pode destruir até 500 ninfas de *D. citri*. Assim, quando foram oferecidas a este parasitóide ninfas do primeiro a terceiro ínstares, observou-se uma diminuição na porcentagem de parasitismo e emergência de *T. radiata*. Associações como esta também foram observadas por Chu e Chien (1989), que determinaram uma maior sobrevivência, variável entre 71,1 e 85,2%, para a progênie de *T. radiata* criada sobre ninfas de quarto e quinto ínstares.

Em condições de campo e laboratório, Duncan e Peña (2002) demonstraram que o estágio de desenvolvimento do hospedeiro afeta significativamente a oviposição sobre outros eulofídeos. Estes autores comprovaram, em condições de campo, porcentagens de parasitismo de 72,7 e 27,3% respectivamente, sobre o terceiro ínstar larval do hospedeiro. Por outro lado, em laboratório as fêmeas ovipositaram, embora ocasionalmente, também em ninfas do segundo ínstar larval e sobre o estágio pré-pupal do hospedeiro; dentro deste contexto, os autores concluíram que os hospedeiros com idade apropriada ofereceram a nutrição e a qualidade necessárias para o subsequente desenvolvimento do parasitóide em condições de campo e laboratório.

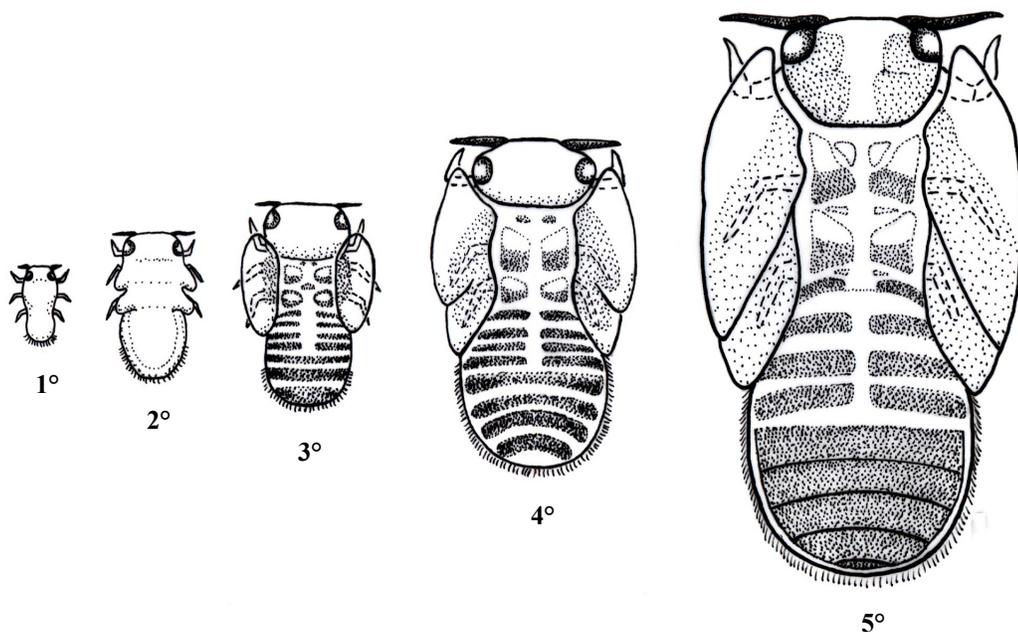


Figura 5 - Seqüência do desenvolvimento ninfal de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). Desenho de Patricia Milano

5.3.2 Capacidade de parasitismo e longevidade de fêmeas de *T. radiata* em diferentes temperaturas

A capacidade de parasitismo total de *T. radiata* ($F= 146,43$; $gl= 19$; $P<0,001$; ANOVA) foi de 20,00; 39,50; 167,42; 76,50 e 35,25 ninfas parasitadas por fêmea nas temperaturas de 15, 20, 25, 30 e 35°C, respectivamente. O parasitismo foi menor a 15, 20 e 35°C, sendo possível assim, observar que a temperatura interferiu na fecundidade do parasitóide (Figura 6). Segundo Chu e Chien (1991), o número de ninfas de *D. citri* parasitadas por *T. radiata* é variável em função do fornecimento de alimento (mel e pólen) e o estágio de desenvolvimento do hospedeiro; assim, quando foram oferecidas, após as fêmeas serem alimentadas, 20 ninfas de quinto ínstar de *D. citri* a 25°C, a fecundidade destes parasitóides variou entre 98 a 156 ovos/fêmeas, valor próximo ao obtido na presente pesquisa, na mesma condição térmica.

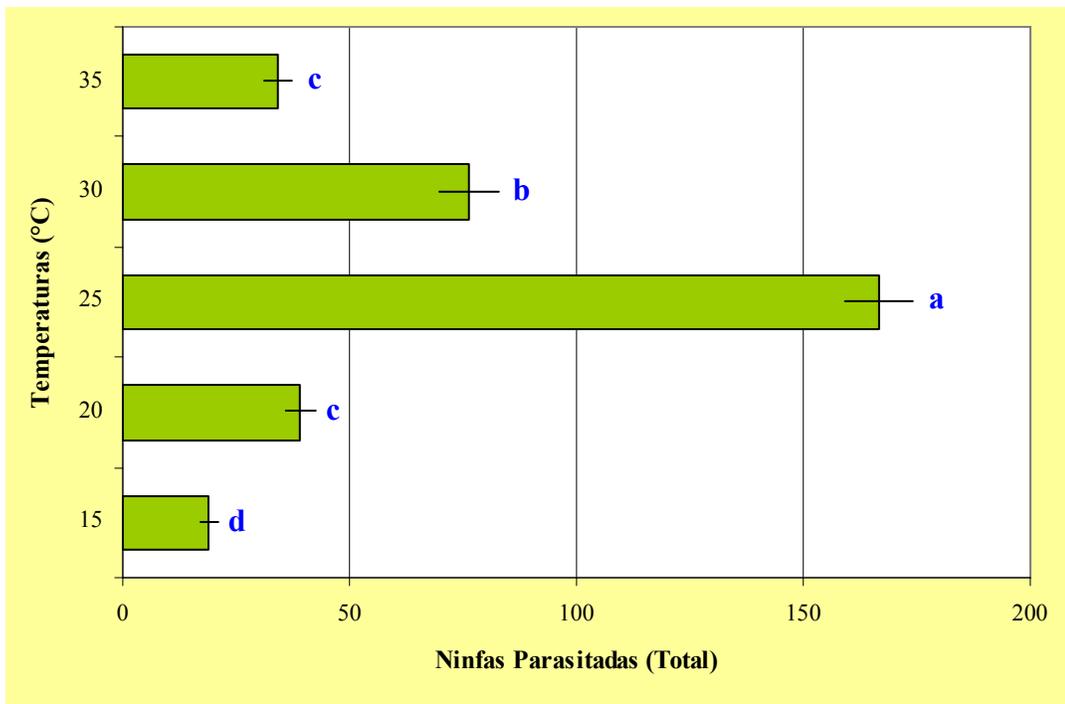


Figura 6 - Capacidade de parasitismo (total) de *Tamarixia radiata* sobre ninfas de quinto ínstar de *Diaphorina citri* em temperaturas de 15, 20, 25, 30 e 35 ± 1°C, UR: 70 ± 10% e fotofase: 14 horas. Médias seguidas de mesma letra, nas barras, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P\leq 0,05$)

Com relação à porcentagem acumulada de parasitismo, verificou-se que as fêmeas colocaram maior número de ovos na temperatura de 25, vindo a seguir a de 30°C (Figura 7);

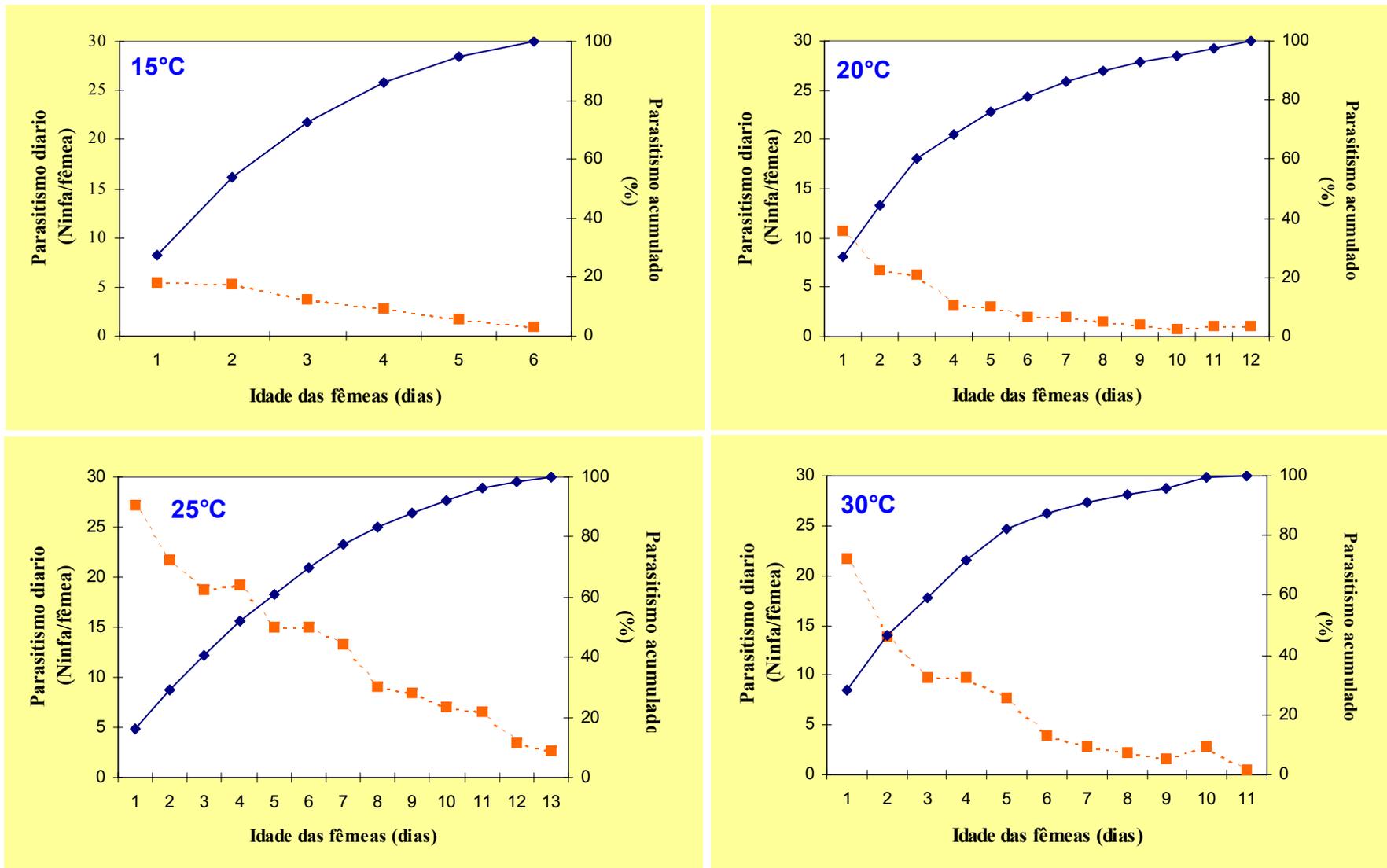


Figura 7 - Parasitismo médio diário e parasitismo acumulado (%) de *Tamarixia radiata* nas temperaturas de 15, 20, 25 e 30 ± 1°C; UR: 70 ± 10% e fotofase: 14 horas

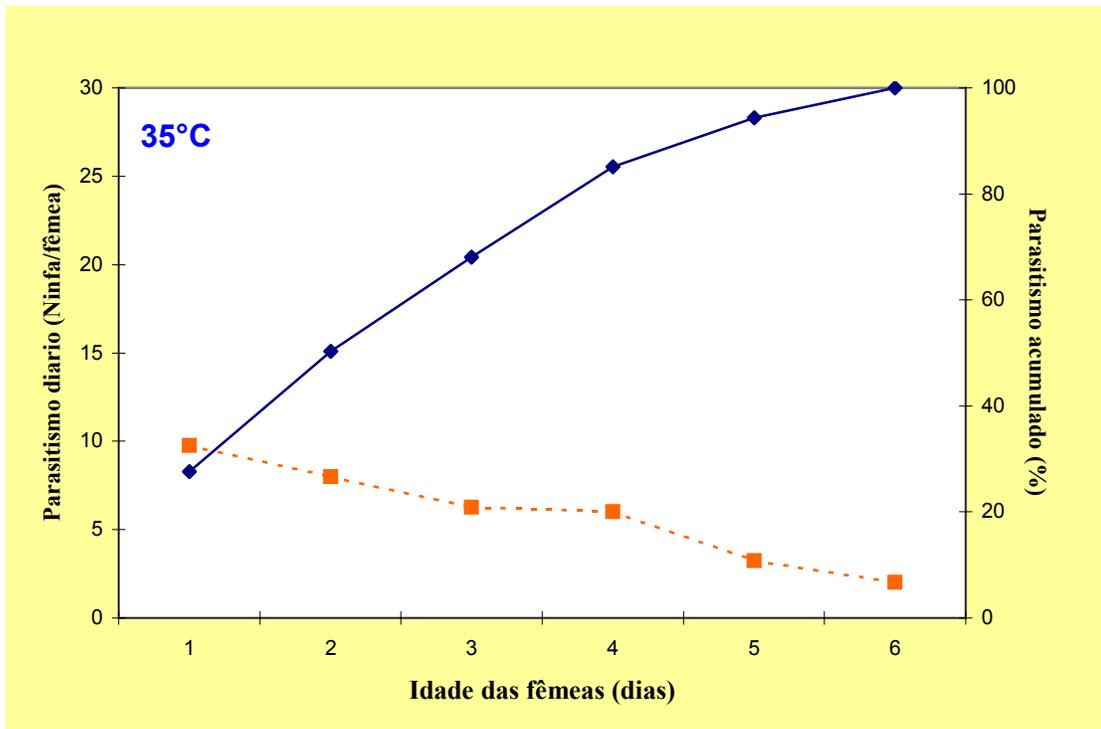


Figura 8 - Parasitismo médio diário e parasitismo acumulado (%) de *Tamarixia radiata* nas temperaturas de $35 \pm 1^\circ\text{C}$; UR: $70 \pm 10\%$ e fotofase: 14 horas

nestes casos, no sétimo dia já tinham parasitado mais do 80% do total de ninfas de *D. citri*. Para as fêmeas que foram expostas às temperaturas de 15, 20 e 35°C o ritmo e a capacidade de parasitismo (Figuras 7 e 8) foram diferentes quando comparados com os resultados obtidos a 25 e 30°C . Em torno do 50% das fêmeas de *T. radiata* morreram no sexto dia quando submetidas às temperaturas extremas de 15 e 35°C , enquanto que aquelas que foram mantidas a 25°C chegaram a viver mais do que 13 dias (Figuras 7 e 8).

Em eulofídeos tem sido observado também, uma relação quadrática entre a fecundidade do parasitóide e a temperatura, devido à notável interação existente deste fator abiótico com o desenvolvimento embrionário e com a longevidade do adulto (PATEL; SCHUSTER, 1991). Estes autores também relataram que em temperaturas baixas, as fêmeas ovipositaram um menor número de ovos quando comparadas com aquelas submetidas a temperaturas na faixa entre 20 e 30°C , onde a oviposição foi maior.

5.3.3 Liberação de *T. radiata* em pomares cítricos

No município de Araras, a porcentagem média de ninfas de quarto e quinto ínstaes de *D. citri* presentes nas áreas selecionadas e liberadas foi de 86,96% (Figura 9), podendo-se afirmar que não houve parasitismo natural no local. Nas duas áreas escolhidas, oito dias após a liberação, a porcentagem de parasitismo de *T. radiata* foi de 51,57 e 72,75% para cada uma das áreas identificadas, neste trabalho, como A e B respectivamente, valores estes que decresceram quinze dias depois da liberação (Figura 10).

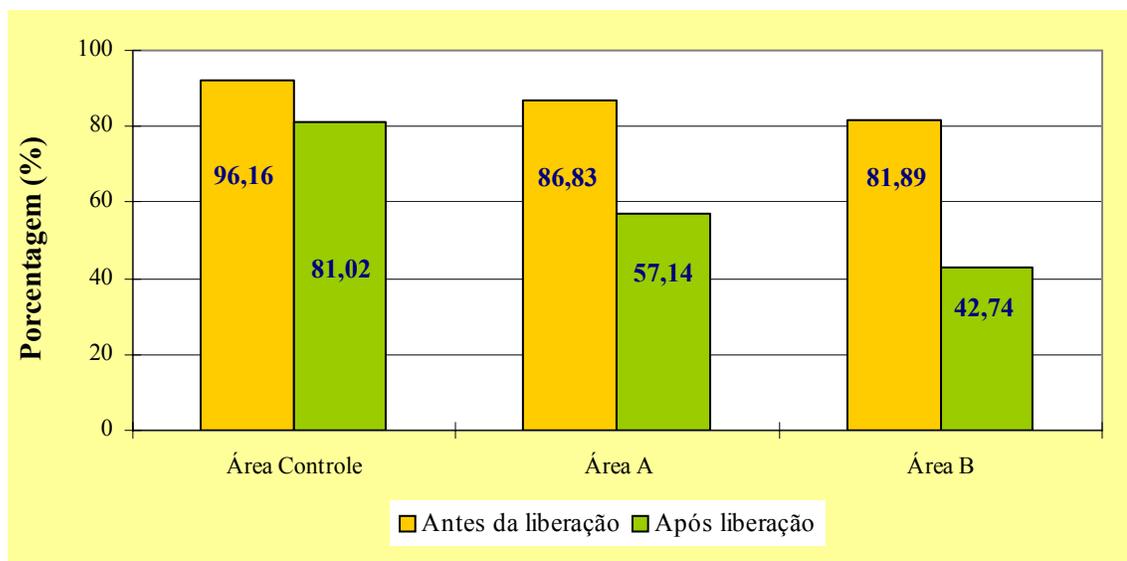


Figura 9 - Porcentagem de ninfas de 4º e 5º ínstaes de *Diaphorina citri* em relação à população total antes e depois da liberação de *Tamarixia radiata* nas áreas selecionadas em de Araras, São Paulo

Segundo Chiu e Chien (1991), após as liberações de *T. radiata* nas regiões central e sul de Taiwan, não foi possível observar correlação entre a porcentagem de parasitismo e a população de ninfas ou adultos de *D. citri*. Entretanto, na presente pesquisa, pôde-se observar que após as liberações, a população de ninfas de quarto e quinto ínstaes diminuiu em 10% aproximadamente (Figura 10). Na área controle (Área C) do presente trabalho não ocorreu parasitismo ao longo das avaliações, mostrando que não existia parasitismo natural na área do experimento.

Nos municípios de Cordeirópolis e Limeira, antes de cada liberação, mediante o levantamento populacional de *D. citri*, determinou-se a porcentagem de ninfas de quarto e quinto ínstaes presentes nas áreas escolhidas (com e sem liberação), obtendo-se porcentagens variáveis

entre 20 e 60% (Figura 11). Com estas avaliações, também foi possível constatar que não existiu parasitismo natural anterior às liberações nos locais escolhidos da Fazenda do Bosque e da Fazenda Panorama dos referidos municípios.

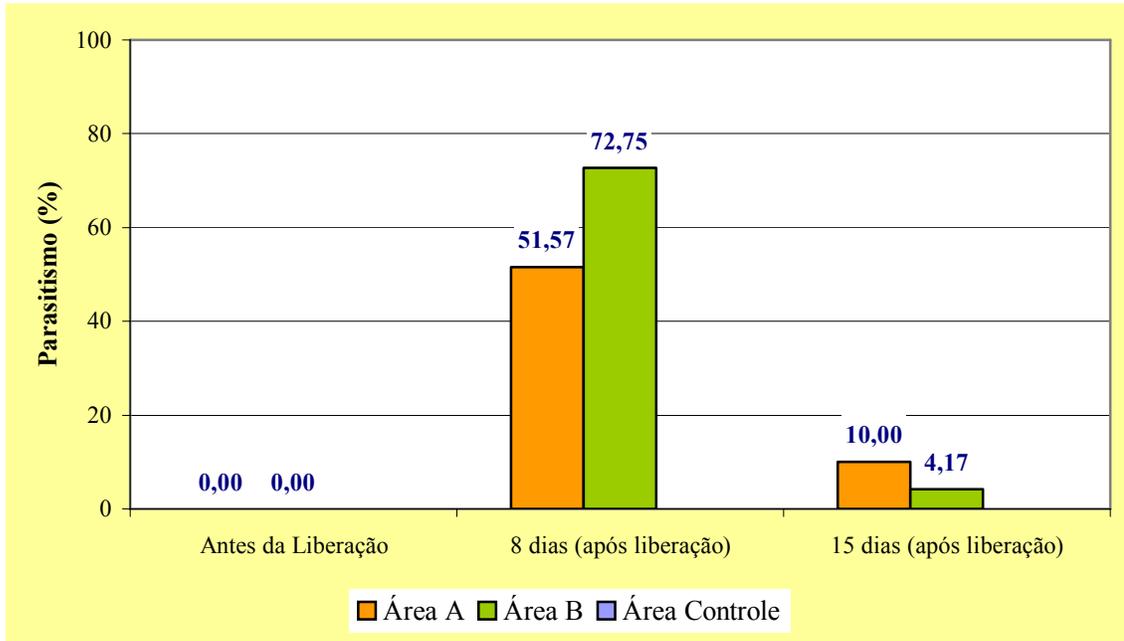


Figura 10 - Porcentagem de parasitismo de *Tamarixia radiata* sobre ninfas de *Diaphorina citri* em de Araras, São Paulo, 8 e 15 dias após a liberação

Na área escolhida na fazenda do Bosque após três liberações, a porcentagem de parasitismo de *T. radiata* foi de 54,57, 64,23 e 62,45% e observou-se que o número de ninfas de quarto e quinto ínstares decresceu na área onde foram feitas tais liberações (Figura 11A) quando comparado com a área controle ou sem liberação (Figura 11B).

Na fazenda Panorama, no município de Limeira, as porcentagens de parasitismo após três liberações variaram entre 30 a 44% (Figura 11C). Como já observado na área comercial do município de Cordeirópolis constatou-se que a porcentagem de ninfas de quarto e quinto ínstares presentes na área controle (sem liberação) foi superior quando comparada com a área onde foram feitas as liberações (Figura 11D).

Estes resultados são semelhantes aos relatados em Taiwan por Chiu e Chien (1989), pois entre os anos de 1983 e 1986, foram realizadas 41 liberações sucessivas do parasitóide em

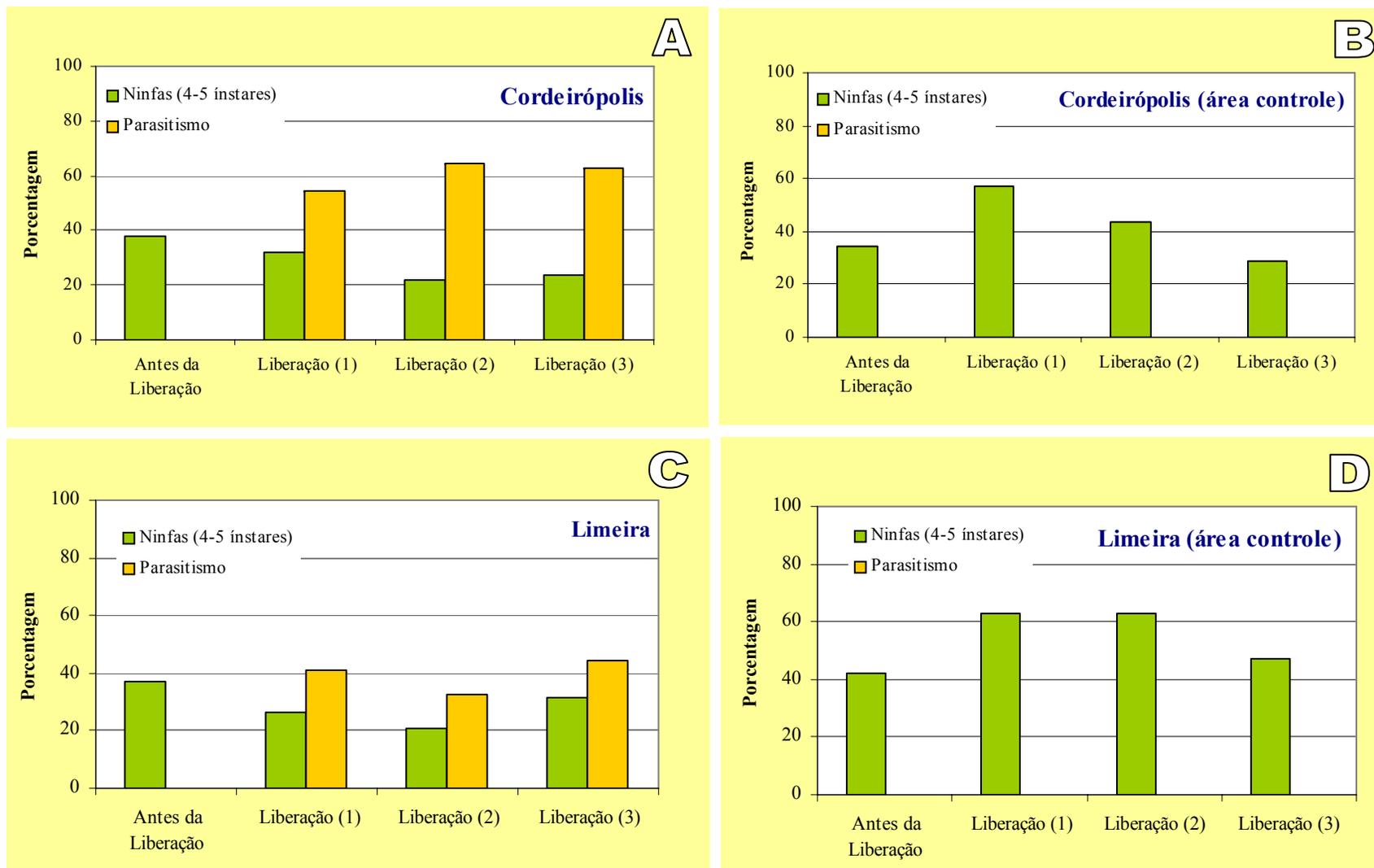


Figura 11 - Porcentagens de parasitismo e de ninfas de 4^o e 5^o ínstaes de *Diaphorina citri* em relação à população total antes e depois da liberação de *Tamarixia radiata* na Fazenda do Bosque em Cordeirópolis, SP (A, B) e na Fazenda Panorama em de Limeira, São Paulo (C, D)

Citrus sp. e 32 em *Murraya paniculata*, e após as primeiras liberações, em 1984, as taxas de parasitismo encontradas variaram entre 30 a 87%, o que segundo estes autores, além de comprovar a potencialidade de *T. radiata* como agente de controle biológico, também demonstrou a capacidade de dispersão e o estabelecimento em áreas distantes. Aparentemente, o mesmo ocorreu nas duas regiões estudadas do estado de São Paulo.

Na Flórida (EUA), *T. radiata*, foi introduzido como parte do programa de controle biológico clássico do psilídeo-dos-citros, e, segundo Michaud (2004), este parasitóide atualmente encontra-se amplamente distribuído em todos os ecossistemas citrícolas da Flórida diminuindo notavelmente a população de *D. citri* e no Texas, segundo este mesmo autor, *T. radiata* se estabeleceu naturalmente em áreas onde não foram realizadas liberações do parasitóide, provavelmente devido à sua grande capacidade de dispersão.

Os dados obtidos após as liberações de *T. radiata* em pomares cítricos no estado de São Paulo, além de comprovar a potencialidade de *T. radiata* como agente de controle biológico, também demonstram a capacidade de estabelecimento deste parasitóide.

5.4 Conclusões

1. Ninfas de quarto e quinto ínstaes de *Diaphorina citri* Kuwayama, 1907 (Hemiptera: Psyllidae) são as mais adequadas para o desenvolvimento de *Tamarixia radiata* (Waterston, 1922) (Hymenoptera: Eulophidae);
2. A temperatura mais adequada para o parasitismo de *T. radiata* é a de 25°C, vindo a seguir a de 30°C;
3. Oito dias após a liberação, a porcentagem de parasitismo de *T. radiata* se manteve entre 51,57 e 72,75%, valores que decresceram para 4,17 e 10% quinze dias depois da liberação.
4. Nas áreas escolhidas nos municípios de Cordeirópolis e Limeira, após três liberações, a porcentagem de parasitismo de *T. radiata* variou entre 30 a 60%, constatando-se que o número de ninfas de quarto e quinto ínstaes decresceram nas áreas onde foram feitas tais liberações.

Referências

- ANDOW, D.A.; PROKRYM, D.R. Releases density, efficiency and disappearance of *Trichogramma nubilale* for control of European corn borer. **Entomophaga**, Paris, v. 36, p. 105-113, 1991.
- CHIEN, C.C.; CHU, Y. I. Biological control of citrus psyllid, *Diaphorina citri* in Taiwan. Biological pest control in systems of integrated pest management. **Reprinted from Food and Fertilizer Technology Center Book Series**, Taipei, n. 47, p. 93 –104, 1996.
- CHIEN, C.C.; CHU, Y.I.; KU, H.C. Influence of food on longevity, egg production and population increase of the eulophid wasp, *Tamarixia radiata*. **FAO Plant Protection Bulletin**, Taichung, v. 36, p. 97-105, 1994.
- CHIU, S.C.; CHIEN, C.C. Control of *Diaphorina citri* in Taiwan with imported *Tetrastrichus radiatus*. **Frutis**, Paris, v. 44, p. 29-31, 1989.
- CHU, Y.I.; CHIEN, C.C. Utilization of natural enemies to control psyllid vectors transmitting citrus greening. In: KIRITANI, K.; SU, H.J.; CHU, Y.I. (Ed.). **Integrated control of plant virus diseases**. Taipei: Food and Fertilizer Technology Center for the Asian and Pacific Region, 1991. p. 135-145.
- DUNCAN, R.E.; PEÑA, J.E. Fecundity, host stage preferences and the effects of temperature on *Pnigalio minio* (Hymenoptera: Eulophidae), a parasitoid of *Phyllocnistis citrella* (Lepidoptera: Gracillariidae). **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Tallahassee, v. 113, p. 20-24, 2000.
- ÉTIENNE, J.; QUILICI, S.; MARINAL, D.; FRANCK, A. Biological control of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in Guadeloupe by imported *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae). **Fruits**, Paris, v. 56, p. 307-315, 2001.
- FIDGEN, J.G.; EVELEIGH, E.S.; QUIRING, D.T. Influence of host size on oviposition behavior and fitness of *Elachertus cacoeciae* attacking a low-density population of spruce budworm *Choristoneura fumiferana* larvae. **Ecological Entomology**, London, v. 25, p. 156-164, 2000.
- FUESTER, R.W.; TAYLOR, P.B. Host instar preferences and development times of two ichneumonid parasites of the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae). **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 84, p. 429-435, 1991.
- GÓMEZ TORRES, M.L.; NAVA, D.E.; GRAVENA, S.; COSTA, V.A.; PARRA, J.R.P. Primeiro registro de *Tamarixia radiata* (Waterston) (Hymenoptera: Eulophidae) em *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) no Brasil. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 81, p. 112-117, 2006.
- HASSAN, S.A. Strategies to select *Trichogramma* species for use in biological control. In: WAJNBERG, E.; HASSAN, S.A. (Ed.). **Biological control with egg parasitoids**. Wallingford: CAB, 1994. p. 55-73.

- HARVEY, J.A. Dynamic effects of parasitism by an endoparasitoid wasp on the development of two hosts species; implications for host quality and parasitoid fitness. **Ecological Entomology**, London, v. 25, p. 267-278, 2000.
- HOY, M.A.; NGUYEN, R. Classical biological control of Asian citrus psylla. **Citrus Industry**, Tampa, v. 81, p. 48-50, 2000.
- MICHAUD, J.P. Natural mortality of Asian citrus psyllid (Homoptera: Psyllidae) in central Florida. **Biological Control**, Orlando, v. 29, p. 260-269, 2004.
- PAK, G.A. Behavioural variations among strains of *Trichogramma* spp. A review of the literature on host-stage selection. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 101, p. 55-64, 1986.
- PATEL, K.J.; SCHUSTER, D.J. Temperature-dependent fecundity, longevity, and host-killing activity of *Diglyphus intermedius* (Hymenoptera: Eulophidae) on third instars of *Liriomyza trifolii* (Burgess) (Diptera: Agromyzidae). **Environmental Entomology**, College Park, v. 20, p. 1195-1199, 1991.
- SAS INSTITUTE. **Statistical Analysis System: getting started with the SAS learning**. Cary, 2002. 81 p.
- SKELLEY, L.H.; HOY, M.A. A synchronous rearing method for the Asian citrus psyllid and its parasitoids in quarantine. **Biological Control**, Orlando, v. 29, p. 14-23, 2004.

6 A ASSOCIAÇÃO *Tamarixia radiata* - *Wolbachia*: OCORRÊNCIA E EFEITOS NO PARASITISMO

Resumo

A associação de insetos a bactérias simbiotes é generalizada nesse grupo de artrópodes, sendo que essas bactérias podem estabelecer diferentes relações com seus hospedeiros, que variam da patogenicidade ao mutualismo. A α -proteobactéria *Wolbachia* é certamente o simbiote secundário mais distribuído entre os insetos. *Wolbachia* interfere na determinação do sexo da progênie, podendo, ainda, influenciar a aptidão biológica de seus hospedeiros. O ectoparasitóide *Tamarixia radiata* (Waterston, 1922) (Hymenoptera: Eulophidae) é um agente de controle eficiente do psilídeo *Diaphorina citri* Kuwayama, 1907 (Hemiptera: Psyllidae), tendo sido relatado no Brasil em 2005. O possível efeito de *Wolbachia* na aptidão biológica de seus hospedeiros e a sua associação com o inseto, aliada à importância de *T. radiata* no combate ao vetor do “huanglongbing” no Brasil, torna necessária a avaliação da associação e o efeito de *Wolbachia* na aptidão reprodutiva desse parasitóide. Das nove populações coletadas no Estado de São Paulo, aquelas de Cafelândia, Ribeirão Bonito e Piracicaba apresentaram infecção múltipla por *Wolbachia* dos supergrupos A e B. O método utilizado para a alimentação de *T. radiata* com antibiótico foi adequado para a obtenção de uma linhagem destes parasitóides com uma redução na densidade do simbiote. Observou-se que houve diferença significativa no parasitismo e emergência da linhagem que apresentou uma redução de *Wolbachia*.

Palavras-chave: Parasitóide; Psilídeo; Greening; Simbiote; Tetraciclina

Abstract

The association between insects and symbiotic bacteria is generalized in this group of arthropods; the bacteria may establish different relationships with their hosts, from pathogenicity to mutualism. *Wolbachia*, an α -proteobacterium, is without a question the most widely distributed secondary symbiont among insects. *Wolbachia* interferes with the sex determination of the progeny, and may also influence the biological aptitude of their hosts. The ectoparasitoid *Tamarixia radiata* (Waterston, 1922) (Hymenoptera: Eulophidae) is an effective control agent against the psyllid *Diaphorina citri* Kuwayama, 1907 (Hemiptera: Psyllidae), and was reported in Brazil in 2005. The potential effect of *Wolbachia* on the biological aptitude of their hosts and their association with the insect, together with the importance of *T. radiata* in fighting the vector of the “huanglongbing” disease in Brazil, make it necessary to evaluate the association and effect of *Wolbachia* on the reproductive aptitude of this parasitoid. Among nine populations collected in the State of São Paulo, those collected in Cafelândia, Ribeirão Bonito, and Piracicaba showed multiple infections by *Wolbachia* from the A and B supergroups. The method employed to feed *T. radiata* with antibiotic was adequate to obtain a parasitoid line with reduced symbiont density. A significant difference in parasitism and emergence was observed in the line with reduced *Wolbachia* numbers.

Keywords: Parasitoid; Psyllid; Greening; Symbiont; Tetracycline

6.1 Introdução

A simbiose é um importante veículo para a evolução e a diversidade ecológica, aumentando o número de habitats aceitáveis para a vida (WERNEGREEN, 2004). Entre os organismos multicelulares, os insetos formam um grupo com grande diversidade de hábitos alimentares que pode ser em parte atribuída aos simbioses a eles associados (BOURTZIS; MILLER, 2003). Os chamados simbioses primários estabelecem associações obrigatórias, sendo indispensáveis ao crescimento e desenvolvimento de seus hospedeiros (WERNEGREEN, 2004); além destes, também podem estar associados a simbioses facultativos ou secundários. Apesar desta associação com simbioses secundários não ser obrigatória, é conhecido que os mesmos influenciam diversos processos fisiológicos do organismo hospedeiro, afetando aspectos bioecológicos, padrões comportamentais, de reprodução e desenvolvimento (WERREN, 1997; LEONARDO; MUIRU, 2003; RUSSELL; MORAN, 2006).

Wolbachia é uma α -proteobactéria Gram negativa que está presente principalmente nos tecidos reprodutivos de seus hospedeiros (WERREN, 1997). Nos insetos, os principais efeitos da infestação por *Wolbachia* são a incompatibilidade citoplasmática (BREEUWER; WERREN, 1990) e a indução de partenogênese telítoca (STOUTHAMER, 1993).

A ampla distribuição deste simbiote despertou o interesse, principalmente nos aspectos envolvidos na interação *Wolbachia* - hospedeiros (BREEUWER; WERREN, 1990; STOUTHAMER; KAZMER, 1994; WERREN, 1997; STOUTHAMER; BREEUWER, HURST, 1999; ROKAS 2000). Também preconiza-se a utilização prática de *Wolbachia* no controle biológico de pragas, visto que a reprodução telítoca poderia aumentar o rendimento de criações massais e permitir a liberação em campo somente de indivíduos eficientes no controle da praga alvo (STOUTHAMER, 1993) ou a sua utilização como vetores para modificação genética em populações de insetos (SINKINS; O'NEILL, 2000).

A potencialidade de liberações de *Tamarixia radiata* (Waterston, 1922) (Hymenoptera: Eulophidae) como tática para racionalizar o controle do “huanglongbing” ou “greening” já foi relatada, pois estes parasitóides constituem-se no principal agente de controle biológico do vetor *Diaphorina citri* Kuwayama, 1907 (Hemiptera: Psyllidae) (CHIEN; CHU, 1996; HOY; NGUYEN, 2000; ÉTIENNE et al., 2001; SKELLEY; HOY, 2004). O presente trabalho envolve estudos que objetivam determinar a presença de *Wolbachia* em populações de *T. radiata*

coletadas em regiões citrícolas do estado de São Paulo, assim como determinar o efeito deste simbionte na aptidão reprodutiva desse parasitóide, permitindo a seleção de linhagens mais adequadas de *T. radiata* para liberação em áreas onde existam problemas com o *D. citri* e a doença por ele transmitida (“huanglongbing” ou “greening”).

6.2 Material e Métodos

6.2.1 Associação *Wolbachia* – *Tamarixia radiata* das populações coletadas no Estado de São Paulo

6.2.1.1 Extração de DNA genômico

O DNA genômico das populações de *Tamarixia radiata* (Waterston, 1922) (Hymenoptera: Eulophidae) coletadas nos municípios de Cafelândia (21°48'09"S - 49°36'36" W), Guarantã (21°53'47"S - 49°35'25"W), Itaju (21°58'50"S - 48°48'15"W), Itirapina (22°15'10"S - 47°49'22"W), Piracicaba (22°43'31"S - 47°38'57"W), Pederneiras (22°21'06"S - 48°46'30"W), Pongai (21°44'10"S - 49°21'22"W), Ribeirão Bonito (22°03'59"S - 48°10'42"W) e São Carlos (22°01'04"S - 47°53'27"W), assim como a população de Gainesville (Flórida, EUA) que foi utilizada como padrão neste estudo, foi extraído de indivíduos preservados em etanol absoluto, utilizando o método de extração salina (ALJANABI; MARTINEZ, 1997). Resumidamente, amostras provenientes de diferentes localidades do Estado de São Paulo foram homogeneizadas em tampão TEN (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,2 mM EDTA, 0,4 M NaCl), 40 µl 20% SDS e 8 µl proteinase-K. As amostras foram incubadas a 55°C por 1 h e 300 µl 5-6 M NaCl foram adicionados. As amostras foram então submetidas à agitação intensa por 30s, seguida de centrifugação (14,000 g x 30 min). O sobrenadante foi coletado e o DNA precipitado após adição de 100% etanol gelado a -20°C por 60 min. Seguindo à precipitação do DNA, as amostras foram centrifugadas (14,000 g x 20 min a 4°C), e o pellet de DNA foi lavado duas vezes em 70% etanol gelado. As amostras foram mantidas à temperatura ambiente para completar a evaporação do etanol, o DNA ressuspenso em água MilliQ autoclavada e armazenadas a -20°C para uso futuro.

6.2.1.2 Ocorrência e caracterização de *Wolbachia*

A ocorrência do simbiote *Wolbachia* foi verificada em reações de amplificações com os iniciadores *wsp81F* (5'-TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAA CTAGCTA-3') e *wsp691R* (5'-AAAAATTAAACGCTACTCCAGCTTCTG CAC-3'), em reação programada a 94°C por 5 min (1 ciclo); 94°C por 1 min, 55°C por 1 min, 72°C por 1 min (35 ciclos); seguida de extensão final a 72°C por 5 min (ZHOU; ROUSSET; O'NEILL, 1998). Para as populações em que a presença da bactéria *Wolbachia* foi confirmada, uma segunda reação de amplificação foi realizada para a detecção do supergrupo *Wolbachia* associado às mesmas. Assim, os conjuntos de iniciadores 16SWolbF1 (5'-AGTCCTGGCTAACTCCGTGCCA-3') e 16SWolbRA1 (5'-GGGATTRGCTTAGCCTCGCGAC-3') e 16SWolbF1 e 16SWolbRB1 (5'-TAGCTTAGGCTTGCGCACCT TG-3') foram empregados em reações a 95°C por 3 min; 35 ciclos a 95°C por 30s, 58°C a 1 min, 72°C a 2 min; e extensão final a 72°C por 10 min; para a identificação da ocorrência dos supergrupos A e B de *Wolbachia*, respectivamente (Van BORM et al., 2001).

6.2.2 Avaliação da associação *Wolbachia* - *Tamarixia radiata*

6.2.2.1 Obtenção de uma linhagem de *T. radiata* livre do simbiote *Wolbachia*

Para produzir uma linhagem apossimbionte (sem *Wolbachia*, W⁻) foram selecionadas 10 fêmeas recém emergidas de *T. radiata* provenientes da criação do Laboratório de Biologia dos Insetos, do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, da ESALQ - USP. As fêmeas foram individualizadas em gaiolas cilíndricas de plástico (15,5 x 5,5 cm) com aberturas recobertas por tecido tipo “voile” (para ventilação) e alimentadas durante 72 horas após a emergência com uma mistura de mel puro e pólen (CHIEN; CHU; KU, 1994) e antibiótico (50 µg/mL de tetraciclina). Para cada fêmea, foram oferecidas 30 ninfas de quinto ínstar de *Diaphorina citri* Kuwayama, 1907 (Hemiptera: Psyllidae) e o parasitismo foi permitido por 24 horas em câmara climatizada regulada a 25 ± 1°C, 70 ± 10% UR e fotofase de 14 horas.

Paralelamente ao grupo apossimbionte (sem *Wolbachia*, W⁻), foi também selecionado um segundo grupo, linhagem com *Wolbachia* (W⁺), constituído por 10 fêmeas alimentadas por 72 horas após a emergência com uma mistura de mel puro e pólen (CHIEN; CHU; KU, 1994) e

similar ao primeiro grupo e para o parasitismo, durante 24 horas, foram oferecidas trinta ninfas de quinto ínstar de *D. citri*.

6.2.2.2 Influência do simbiote secundário *Wolbachia* no parasitismo de *T. radiata*

O efeito do simbiote *Wolbachia* no parasitismo por *T. radiata* foi avaliado sobre ninfas de quinto ínstar de *D. citri* (Figura 1). Assim, após a emergência da geração filial (F_1) das fêmeas tratadas com antibióticos (sem *Wolbachia*, W^-) e com *Wolbachia* (W^+) obtidas no item 6.2.2.1, foram individualizadas, em cada grupo, 30 fêmeas recém emergidas do parasitóide e durante três dias, trinta ninfas de *D. citri* foram oferecidas, diariamente, para o parasitismo em sala climatizada regulada a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 14 horas.

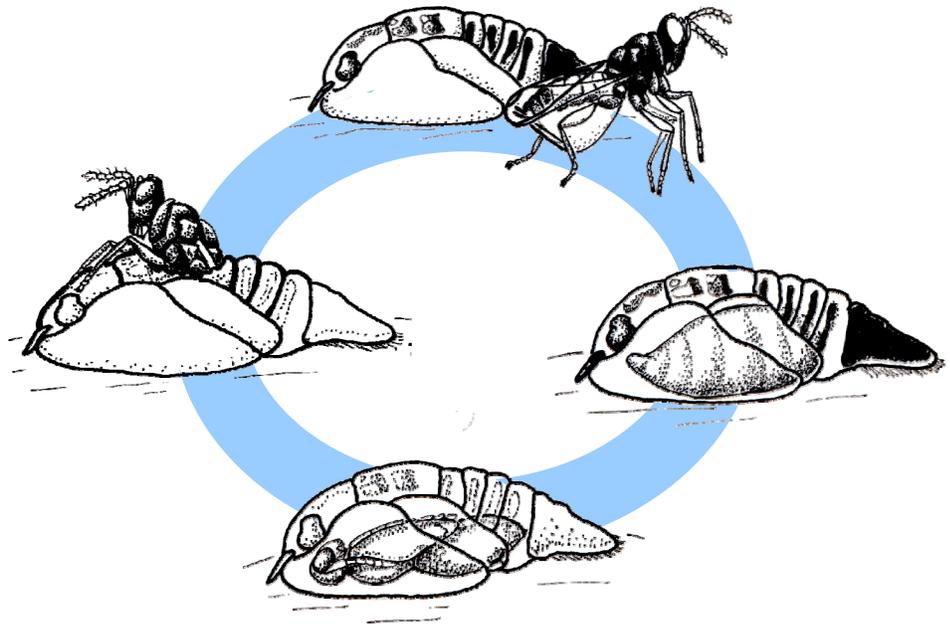


Figura 1 - Esquema do parasitismo, desenvolvimento e emergência de *Tamarixia radiata* sobre ninfas de quinto ínstar de *Diaphorina citri* em condições de laboratório, mantido a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura, $70 \pm 10\%$ UR e fotofase de 14 horas. Desenho de Patrícia Milano

Cada grupo contendo 30 fêmeas constituiu um tratamento representado por cinco repetições. Foi avaliado o número de ninfas parasitadas e a porcentagem de emergência. Os parâmetros observados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$), no programa estatístico SAS, Statistical Analyses System (2000). As fêmeas emergidas (geração filial) das linhagens apossimbionte (W^-) e com *Wolbachia* (W^+), após

os três dias de parasitismo, foram submetidos à extração do DNA, o qual foi submetido à reação de PCR em tempo real para quantificar a densidade de *Wolbachia* nos adultos de *T. radiata* (item 6.2.2.3).

6.2.2.3 Quantificação do simbionte *Wolbachia* associado à geração filial de *T. radiata*

Para quantificar a densidade de *Wolbachia* nos parasitóides, foi utilizado o conjunto de iniciadores FTsZ_F1: 5'-ATYATGGARCATATAAARGATAG-3' e FTsZ_R1: 5'-TCRAGYAATGGATTRGATAT-3', que apresentam o gene *fts* como alvo, o qual codifica uma proteína envolvida na divisão celular deste simbionte. Para as reações foram utilizados 10µL do kit Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen), 1µL de gDNA proveniente de ninfas (20ng/µL), 0,4µL de cada iniciador (20µM) e 8,2µL de H₂O Milli-Q, totalizando volume final de 20µL/reação. As reações foram conduzidas em três etapas: 50°C por 2 min, 95°C por 2 min e 40 ciclos a 95°C por 15s, 60°C por 15s, 72°C por 20s e 76°C por 5s. A determinação da curva de “melting” foi conduzida por um estágio de denaturação final a 76-95°C, 45s no primeiro ciclo, e 5s para os ciclos subseqüentes.

Para a geração da curva padrão de diluição, o fragmento amplificado conjunto de iniciadores FTsZ_F1 e FTsZ_R1 foi purificado e inserido em plasmídeo vetor disponível no sistema pGEM[®]-T Easy Vector System (Promega) e utilizado na transformação de células competentes de alta eficiência NEB 5-alpha (New England BioLabs) para a multiplicação dos plasmídeos, seguindo as recomendações do fabricante. Os transformantes foram selecionados em meio de cultura LB acrescido de 100 µg/ml de ampicilina, tendo 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo (XGAL) como substrato para a ação da enzima β-galactosidase, indicadora de transformação. Colônias positivas foram isoladas, cultivadas em meio LB líquido acrescido de ampicilina (100 µg/ml) e utilizadas para a extração de plasmídeos. Os plasmídeos extraídos foram amplificados com os iniciadores T7 e M13R, os quais identificam áreas do vetor que flanqueiam o inserto. As reações de amplificação foram conduzidas a 94°C por 2 min (1 ciclo); 94°C por 1 min, 50°C por 1 min, 72°C por 2 min (35 ciclos); seguidos de extensão final a 72°C por 5 min. Os produtos de amplificação foram purificados e utilizados para a geração das curvas padrão de diluição.

Para a geração da curva, foram conduzidas reações com uma série de dez diluições contendo de 2.10^9 a 2.10^0 cópias/ μL em triplicata, em condições de reação otimizada para cada simbionte. O número de cópias/ μL foi determinado a partir da equação (1):

$$N = C / (K \times 330 \times 1.6601 \times 10^{-18}) \quad (1)$$

Onde; **N** = número de cópias/ μL ; **C** = concentração da amostra em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; **K** = tamanho do fragmento em pares de base (FENG; ZENG; CHEN, 2008). Para a quantificação do número de cópias de cada fragmento a ser amplificado para cada simbionte em todos os tratamentos, foram conduzidas reações em duplicata, tirando-se a média entre elas.

6.3 Resultados e Discussão

6.3.1 A associação *Wolbachia* - *Tamarixia radiata* no Estado de São Paulo

Das nove populações coletadas no Estado de São Paulo, três apresentaram-se infectadas pelo simbionte secundário *Wolbachia*, assim como a população americana, utilizada como padrão nesse estudo (Figura 2).



Figura 2 - PCR diagnóstico para a detecção da associação de *Wolbachia* em diferentes populações do parasitóide *Tamarixia radiata* no Estado de São Paulo e população padrão dos EUA. **M**- marcadores de peso molecular; **1**- São Carlos; **2**- Pederneiras; **3**- Itajú; **4**- Pongai; **5**- Itirapina; **6**- Guarantã; **7**- Cafelândia; **8**- Ribeirão Bonito; **9**- Gainesville (Flórida, EUA); **10**- Piracicaba

Todas as populações de *Tamarixia radiata* (Waterston, 1922) (Hymenoptera: Eulophidae) apresentaram infecção múltipla por *Wolbachia*, ou seja, as três populações de São Paulo, Cafelândia, Ribeirão Bonito e Piracicaba, e a população oriunda da Flórida (EUA), mostraram-se infectadas pelos supergrupos A e B de *Wolbachia*. A distribuição desuniforme desse simbionte nas diferentes populações do parasitóide *T. radiata* e a ocorrência comum da linhagem “A” associada ao psílideo (SALVADOR; CÔNSOLI, informação pessoal), apontam para a possibilidade de que as populações do parasitóide tenham origem distinta, pois se a introdução de *T. radiata* fosse pontual, deveria ser esperado que todas as populações amostradas, e especialmente aquelas de áreas bem próximas, estivessem associadas ao simbionte em questão. No entanto, verificou-se que populações de áreas próximas, como Pongaí e Guarantã, não apresentaram associação com *Wolbachia*, ao contrário daquela de Cafelândia (Figura 2). Estes resultados também deixam entrever a possibilidade que *T. radiata* tenha adquirido a linhagem “B” do simbionte de algum outro hospedeiro, embora este parasitóide tenha sido somente registrada sobre *Diaphorina citri* Kuwayama, 1907 (Hemiptera: Psyllidae) (NOYES, 2003), tornam-se necessários novos estudos que permitam comprovar ou descartar esta hipótese.

A primeira identificação de *Wolbachia* em psílideos foi relatada em uma população de *D. citri*, com uma elevada taxa de infecção do simbionte de 76,2% (SUBANDIYAH et al., 2000). Baseando-se neste fato poderia ser aventada a hipótese de que as populações de *T. radiata* coletadas no estado de São Paulo possam ter adquirido o simbionte horizontalmente, através de seu hospedeiro. Vavre et al. (1999) inferiram que os parasitóides podem ser mais susceptíveis à transmissão horizontal de *Wolbachia*, visto que podem contrair os simbiontes de seus hospedeiros quando consomem o hospedeiro. A transferência de *Wolbachia* de parasitóides para seus hospedeiros é menos provável, pois hospedeiros parasitados não sobrevivem.

De qualquer forma, a possibilidade de que esses simbiontes possam interferir na aptidão biológica de seu hospedeiro torna essencial o desenvolvimento de futuros trabalhos que permitam identificar o tipo de relação estabelecida entre *T. radiata* - *Wolbachia* - *D. citri*. Isso se faz necessário para que linhagens adequadas do parasitóide possam ser selecionadas para a sua multiplicação em laboratório e posterior liberação a campo.

6.3.2 Influência do simbiote secundário *Wolbachia* no parasitismo de *T. radiata*

A porcentagem de parasitismo ($F= 5,24$; $gl= 29$; $P= 0,0281$; ANOVA) diferiu significativamente em cada um dos tratamentos ao longo dos três dias de observação (Figura 3), estes resultados permitem concluir que a aparente eliminação e/ou redução substancial na densidade do simbiote indica que as fêmeas podem ter encontrado limitações ao longo de seu desenvolvimento imaturo tendo sua capacidade de reprodução afetada, já que não puderam contar com a contribuição adequada de seu simbiote. Com relação à porcentagem de emergência ($F= 5,222$; $gl= 29$; $P= 0,0284$; ANOVA), também houve diferença entre os tratamentos (Figura 3).

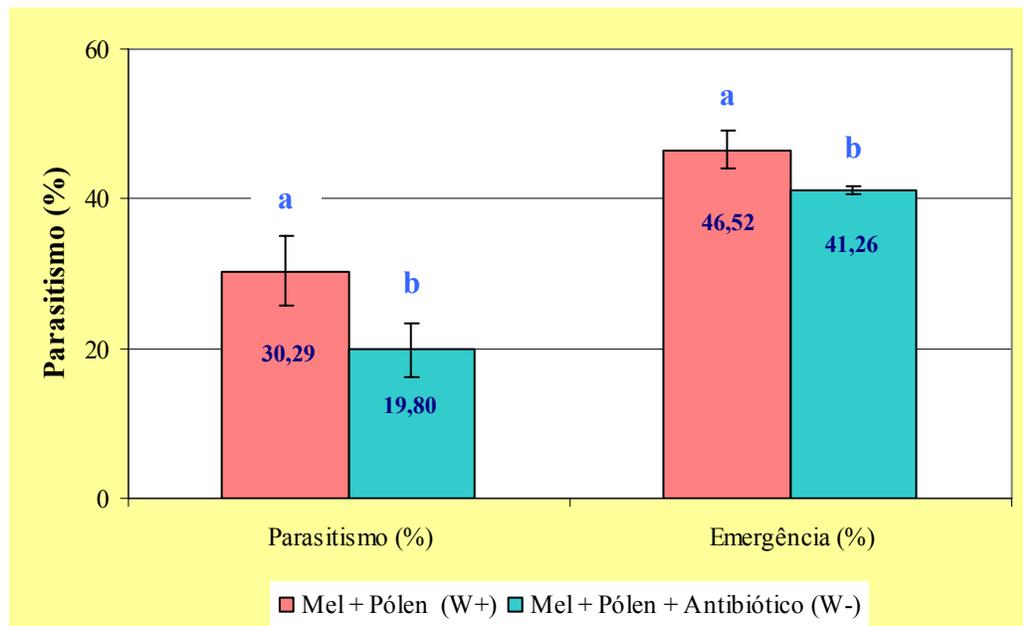


Figura 3 - Porcentagem de parasitismo e emergência de populações de *Tamarixia radiata*, alimentadas com mel + pólen (linhagem com *Wolbachia*, W⁺) e alimentadas com mel + pólen + antibiótico (linhagem sem *Wolbachia*, W⁻). Temperatura: $25 \pm 1^\circ\text{C}$, UR: $70 \pm 10\%$ e fotofase: 14 horas. Médias seguidas da mesma letra minúscula, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$)

Como observado no presente trabalho, Girin e Boulétreau (1995) determinaram que fêmeas infectadas por *Wolbachia* produziam quase duas vezes mais descendentes em relação a fêmeas livres do simbiote; assim, também outros autores têm relatado que quando os insetos estão associados a simbioses, como no caso da *Wolbachia*, estes simbioses facultativos ou secundários, podem influenciar a reprodução, bem como outros aspectos bioecológicos de seus

hospedeiros (WERREN, 1997; JOHANOWICZ; HOY, 1998; LEONARDO; MUIRU, 2003; RUSSELL; MORAN, 2006). Segundo Tsuchida, Koga e Fukatsu (2004), apesar desta associação não ser obrigatória, os simbioses secundários influenciam diversos processos fisiológicos do organismo hospedeiro, afetando padrões comportamentais e de desenvolvimento, assim como sua relação com patógenos, o primeiro e o terceiro níveis tróficos. Entretanto, os efeitos induzidos podem variar de acordo com características genóticas do próprio hospedeiro, assim como da linhagem de *Wolbachia* associada ao inseto (MIN; BENZER, 1997; OLSEN; REYNOLDS; HOFFMANN, 2001; MCGRAW et al., 2001).

6.3.3 Quantificação do simbiote *Wolbachia* associado à geração filial de *T. radiata*

A reação para o simbiote *Wolbachia* com o conjunto de iniciadores FTsz_F1 e FTsz_R1 nas condições otimizadas resultou em curva de “melting” específica. Portanto, através desta metodologia e com os conjuntos de iniciadores FTsz_F1 e FTsz_R1 a quantificação do número cópias genóticas do simbiote foi possível, das linhagens apossimbiote (W^-) e com *Wolbachia* (W^+) de *T. radiata*.

A quantificação do simbiote *Wolbachia* (Figura 4) indicou que houve redução na densidade desta bactéria nas fêmeas da primeira geração, que emergiram das ninfas parasitadas, após o tratamento inicial com a tetraciclina (item 6.2.2.1), demonstrando que o método empregado de alimentação de *T. radiata* com antibiótico (W^-) foi adequado para a redução na densidade do simbiote, mas é importante salientar que a influência do antibiótico no inseto é dependente da densidade de *Wolbachia* que pode variar entre indivíduos o que torna difícil se prever com exatidão a quantidade do simbiote presente em uma determinada população (BALLARD; MELVIN, 2007).

O presente trabalho também evidencia a necessidade de estudos mais abrangentes para se determinar a quantidade de alimento ingerido por estes parasitóides e buscar assim formas mais eficientes de administração de doses seguras do antibiótico que permitam avaliar de forma precisa os efeitos indiretos no metabolismo de *T. radiata*, assim como a complexidade das interações hospedeiro-simbiote-parasitóide. Embora seja possível a obtenção de uma linhagem do parasitóide com uma redução e/ou eliminação da *Wolbachia*, é importante mencionar que *T. radiata* é susceptível à transmissão horizontal deste simbiote secundário através de seu

hospedeiro *D. citri*, pois populações do psíldeo, coletadas no Brasil, apresentam-se associadas ao simbionte secundário *Wolbachia* (SALVADOR; CÔNSOLI, informação pessoal).

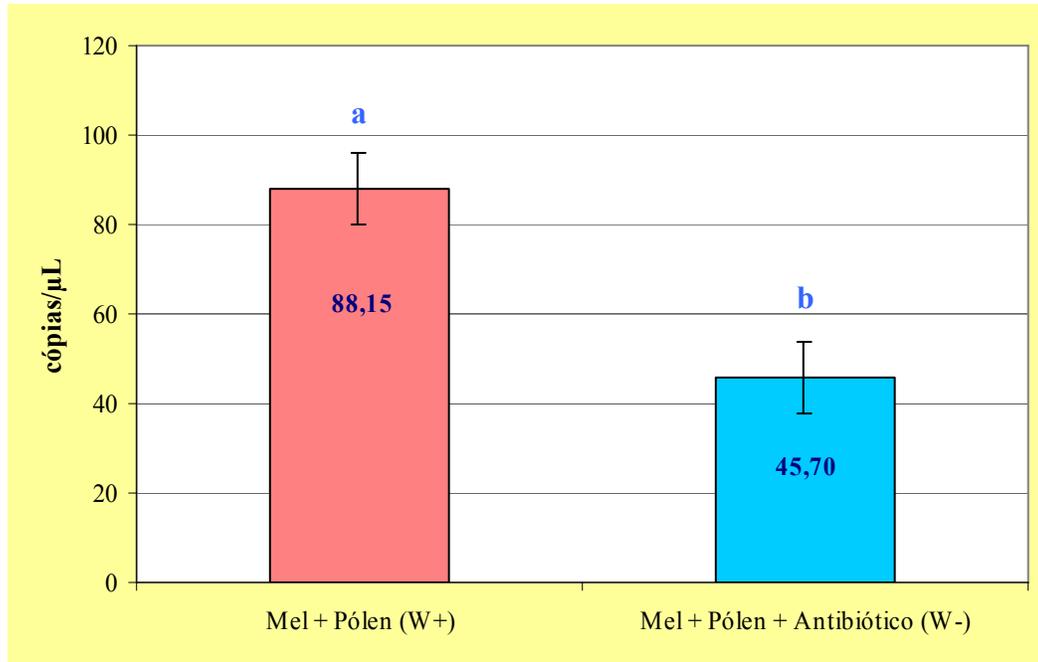


Figura 4 - Quantificação do número de cópias/μL do simbionte *Wolbachia* proveniente das populações de *Tamarixia radiata*, alimentadas com mel + pólen (linhagem com *Wolbachia*, W⁺) e alimentadas com mel + pólen + antibiótico (linhagem sem *Wolbachia*, W⁻). Médias seguidas da mesma letra minúscula, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$)

6.4 Conclusões

1. As populações de *Tamarixia radiata* (Waterston, 1922) (Hymenoptera: Eulophidae) de Cafelândia, Ribeirão Bonito e Piracicaba e a população oriunda da Flórida (EUA), mostraram-se infectadas pelas linhagens A e B de *Wolbachia*;
2. Observou-se que houve diferença significativa entre o parasitismo da linhagem com *Wolbachia* e daquela que apresentou uma diminuição deste simbionte;
3. A densidade de *Wolbachia* em insetos alimentados com antibiótico é reduzida substancialmente;

4. Existe a necessidade de estudos que avaliem os efeitos indiretos do antibiótico no metabolismo de *T. radiata*, assim como a possível transmissão horizontal de *Wolbachia* através de *Diaphorina citri* Kuwayama, 1907 (Hemiptera: Psyllidae).

Referências

- ALJANABI, S.M.; MARTINEZ, I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, p. 4692-4693, 1997
- BALLARD, J.W.O; MELVIN, R.G. Tetracycline treatment influences mitochondrial metabolism and mtDNA density two generations after treatment in *Drosophila*. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 16, p. 799-802, 2007.
- BREEUWER, J.A.J.; WERREN, J.H. Microorganisms associated with chromosome destruction and reproductive isolation between two insect species. **Nature**, Washington, v. 346, p. 558-560, 1990.
- BOURTZIS, K.; MILLER, T.A. **Insect symbiosis**. Cambridge: Cambridge University Press, 2003. 368 p.
- CHIEN, C.C.; CHU, Y. I. Biological control of citrus psyllid, *Diaphorina citri* in Taiwan. Biological pest control in systems of integrated pest management. **Reprinted from Food and Fertilizer Technology Center Book Series**, Taipei, n. 47, p. 93-104, 1996.
- CHIEN, C.C.; CHU, Y.I.; KU, H.C. Influence of food on longevity, egg production and population increase of the eulophid wasp, *Tamarixia radiata*. **FAO Plant Protection Bulletin**, Taichung, v. 36, p. 97-105, 1994.
- ÉTIENNE, J.; QUILICI, S.; MARINAL, D.; FRANCK, A. Biological control of *Diaphorina citri* (Hemiptera : Psyllidae) in Guadeloupe by imported *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae). **Fruits**, Paris, v. 56, p. 307-315, 2001.
- FENG, J.; ZENG, R.; CHEN, J. Accurate and efficient data processing for quantitative real-time PCR using a tripartite plant virus as a model. **BioTechniques**, Natick, v. 44, p. 901-912, 2008.
- GIRIN, C.; BOULÉTREAU, M. Microorganism associated variation in host infestation efficiency in a parasitoid wasp, *Trichogramma bourarachae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Experientia**, Basel, v. 51, p. 398-401, 1995.
- HOY, M.A.; NGUYEN, R. Classical biological control of Asian citrus psylla. **Citrus Industry**, Tampa, v. 81, p. 48-50, 2000.
- JOHANOWICZ, D.L.; HOY, M.A. The manipulation of arthropod reproduction by *Wolbachia* endosymbionts. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 81, p. 310-317, 1998.

LEONARDO, T.E.; MUIRU, G.T. Facultative symbionts are associated with host plant specialization in pea aphid populations. **Proceedings of the Royal Society of London**, London, v. 270B, p. 209-212, 2003.

McGRAW, E.A.; MERRITT, D.J.; DROLLER, J.N.; O'NEILL, S.L. *Wolbachia*-mediated sperm modification is dependent on the host genotype in *Drosophila*. **Proceedings of the Royal Society of London**, London, v. 268B, p. 1471-2954, 2001.

MIN, K.T.; BENZER, S. *Wolbachia*, normally a symbiont of *Drosophila*, can be virulent, causing degeneration and early death. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 94, p. 10786-10791, 1997.

NOYES, J.S. **Universal Chalcidoidea database**. 2003. Disponível em: <<http://www.nhm.ac.uk/research-curation/projects/chalcidoids>>. Acesso em: 28 jun. 2007.

OLSEN, K.; REYNOLDS, K.T.; HOFFMANN, A.A. A field cage test of the effects of the endosymbiont *Wolbachia* on *Drosophila melanogaster*. **Heredity**, London, v. 86, p. 731-737, 2001.

ROKAS, A. *Wolbachia* as a speciation agent. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v. 15, p. 44-45, 2000.

RUSSELL, J.A.; MORAN, N.A. Costs and benefits of symbiont infection in aphids: variation among symbionts and across temperatures. **Proceedings of the Royal Society of London**, London, v. 273B, p. 603-610, 2006.

SAS INSTITUTE. **Statistical Analysis System: getting started with the SAS learning**. Cary, 2002. 81 p.

SINKINS, S.P.; O'NEILL, S.L. *Wolbachia* as a vehicle to modify insect populations. In: HANDLER, A.M.; JAMES, A.A (Ed.) **Insect transgenesis: methods and applications**. Boca Raton: CRC Press, 2000. p. 271-287.

SKELLEY, L.H.; HOY, M.A. A synchronous rearing method for the Asian citrus psyllid and its parasitoids in quarantine. **Biological Control**, Orlando, v. 29, p. 14-23, 2004.

STOUTHAMER, R. The use of sexual versus asexual wasps in biological control. **Entomophaga**, Paris, v. 38, p. 1-6, 1993.

STOUTHAMER, R.; KAZMER, D.J. Cytogenetics of microbe-associated parthenogenesis and its consequences for gene flow in *Trichogramma* wasps. **Heredity**, London, v. 73, p. 317-323, 1994.

STOUTHAMER, R.; BREEUWER, J.A.J.; HURST, G.D.D. *Wolbachia pipiens*: microbial manipulator of arthropod reproduction. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 53, p. 71-102, 1999.

SUBANDIYAH, S.; NIKOH, N.; TSUYUMU, S.; SOMOWIYARJO, S.; FUKATSU, T. Complex endosymbiotic microbiota of the citrus psyllid *Diaphorina citri* (Homoptera: Psylloidea). **Zoological Science**, Tokyo, v. 7, p. 983-989, 2000.

TSUCHIDA, T.; KOGA, R.; FUKATSU, T. Host plant specialization governed by facultative symbiont. **Science**, Washington, v. 303, p. 1989, 2004.

VAN BORM, S.; WENSELEERS, T.; BILLEN, J.; BOOMSMA, J.J. *Wolbachia* in leaf cutter ants: a widespread symbiont that may induce male killing or incompatible matings. **Journal of Evolutionary Biology**, Basel, v. 14, p. 805-814, 2001.

VAVRE, F.; FLEURY, F.; LEPETIT, D.; FOUILLET, P.; BOULETRAU, M. Phylogenetic evidence for horizontal transmission of *Wolbachia* in host-parasitoid associations. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 16, p. 1711-1723, 1999.

WERNEGREEN, J.J. Endosymbiosis: lessons in conflict resolution. **Public Library of Science Biology**, London, v. 2, p.307-311, 2004.

WERREN, J.H. Biology of *Wolbachia*. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 42, p. 587-609, 1997.

ZHOU, W.; ROUSSET, F. O'NEILL, S.L. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using WSP gene sequences. **Proceedings of the Royal Society of London**, London, v. 265B, p. 509-515, 1998.

7 EXIGÊNCIAS TÉRMICAS E HIGROMÉTRICAS DE *Diaphorina citri* Kuwayama, 1907 (Hemiptera: Psyllidae) E *Tamarixia radiata* (Waterston, 1922) (Hymenoptera: Eulophidae) PARA SEU ZONEAMENTO NO ESTADO DE SÃO PAULO

Resumo

Tamarixia radiata (Waterston, 1922) (Hymenoptera: Eulophidae) constituiu-se no principal agente de controle biológico de *Diaphorina citri* Kuwayama, 1907 (Hemiptera: Psyllidae). A duração média do desenvolvimento biológico de *T. radiata* sobre ninfas de quinto ínstar de *D. citri* foi afetada pela temperatura, ocorrendo um aumento da velocidade de desenvolvimento com a elevação térmica. Assim, o tempo do desenvolvimento (ovo - adulto) foi inversamente relacionado com temperaturas, na faixa de 18 a 32°C. O limite térmico inferior de desenvolvimento (Tb) do parasitóide foi de 7,13°C e a constante térmica (K) de 188,7GD. A porcentagem de parasitismo e a emergência de *T. radiata* foram maiores a 70% de umidade relativa. Com a determinação, em condições de laboratório, das exigências térmicas e higrométricas de *T. radiata* e mediante a utilização de um Sistema de Informação Geográfica (SIG), foi possível obter mapas de distribuição do desenvolvimento de *T. radiata* e *D. citri*, no estado de São Paulo. Assim, na região norte, podem ocorrer de 0,52 a 1,28 ciclos/mês para *D. citri* e de 1,95 a 3,26 ciclos/mês para *T. radiata*; na região nordeste o número médio de ciclos/mês pode variar de 0,33 a 1,28 para *D. citri* e de 1,62 a 3,26 para de *T. radiata*; nas regiões sudoeste e sudeste, o número médio de ciclos/mês pode variar de <0,33 a 2,60 para *D. citri* e de <1,62 a 2,93 para de *T. radiata*. Ao longo do ano podem ocorrer na região norte de 10 a 13 ciclos de *D. citri* e de 31 a 35 ciclos de *T. radiata*; na região nordeste, o número de ciclos pode variar de 6 a 10 e de 24 a 31 para a praga e para o parasitóide, respectivamente. Nas regiões sudoeste e sudeste, o número de gerações pode variar de 3 a 10 e de 19 a 31 para *D. citri* e *T. radiata*. Nestas mesmas regiões, e levando-se em consideração as exigências térmicas e higrométricas da praga e do parasitóide, a maior incidência populacional de ambos ocorreu naquelas regiões e épocas do ano com temperaturas mais elevadas e os aumentos populacionais devem coincidir com o aumento das chuvas e com as brotações das plantas cítricas. Verificando estes aspectos da interação *T. radiata* e *D. citri*, os dados obtidos no presente trabalho poderão auxiliar na produção em grande quantidade do parasitóide e na estimativa do número de gerações por o ano do parasitóide e da praga para a implementação de um programa de controle biológico dentro do manejo de *D. citri* em regiões ecologicamente distintas do estado de São Paulo.

Palavras-chave: GIS (Geographic Information System); Huanglongbing; Psilídeo; Parasitóide; Controle biológico

Abstract

Tamarixia radiata (Waterston, 1922) (Hymenoptera: Eulophidae) is the most important biological control agent against *Diaphorina citri* Kuwayama, 1907 (Hemiptera: Psyllidae). The mean duration of the biological development of *T. radiata* on fifth-instar *D. citri* nymphs was affected by temperature, with increased development velocity as temperature increased. Development time (egg - adult) was inversely correlated with temperature in the range from 18 to

32°C. The parasitoid's lower temperature development threshold (Tb) was 7.13°C, with a thermal constant of 188.7 GDD. *T. radiata* parasitism percentage and emergence were higher at 70% relative humidity. By determining the temperature and humidity requirements of *T. radiata* under laboratory conditions and using a Geographic Information System (GIS), distribution maps for *T. radiata* and *D. citri* development in the State of São Paulo could be obtained. In the north region, between 0.52 and 1.28 cycles/month may occur for *D. citri* and between 1.95 and 3.26 cycles/month may occur for *T. radiata*; in the northeast region the mean number of cycles/month may vary from 0.33 to 1.28 for *D. citri* and from 1.62 to 3.26 for *T. radiata*; in the southwest and southeast regions the mean number of cycles/month may vary from <0.33 to 2.60 for *D. citri* and from <1.62 to 2.93 for *T. radiata*. From 10 to 13 *D. citri* cycles and from 31 to 35 *T. radiata* cycles may occur in the north region over the year; in the northeast region, the numbers of cycles may vary from 6 to 10 and from 24 to 31 for the pest and the parasitoid, respectively. In the southwest and southeast regions, the number of generations may vary from 3 to 10 and from 19 to 31 for *D. citri* and *T. radiata*. For the same regions, considering the temperature and humidity requirements of the pest and the parasitoid, the highest population incidence of both occurred in those regions and seasons of the year with the highest temperatures; population increases should occur as rainfall amounts and citrus plant shoots increase. Based on these aspects of the *T. radiata* × *D. citri* interaction, the data obtained in this work can be useful for mass parasitoid production, as well as to estimate the parasitoid's and the pest's numbers of generations per year in order to implement a biological control program within *D. citri* management in ecologically distinct regions of the State of São Paulo.

Keywords: GIS (Geographic Information System); Huanglongbing; Psyllid; Parasitoid; Biological control

7.1 Introdução

A cultura dos citros representa uma das atividades agrícolas mais importantes do Brasil e do estado de São Paulo, com uma receita superior a US\$ 1 bilhão/ano (FNP, 2007). Além de ser uma importante atividade agrícola, envolve segmentos da área industrial, de transportes e comércio em geral, apresentando grande relevância social pelo número de empregos que gera. O Brasil destaca-se no mercado internacional como o maior produtor de citros, com aproximadamente 18 milhões de toneladas anuais, sendo o estado de São Paulo responsável por 80% da produção nacional (FNP, 2007). No entanto, apesar do Brasil ser um grande produtor mundial de citros e possuir um conhecimento tecnológico bem estabelecido para o seu cultivo, vários fatores de ordem comercial e fitossanitária contribuem para a instabilidade da produção, como também podem afetar a competitividade do setor em nível internacional. Desde 2004, foram detectadas, nas áreas citrícolas do estado de São Paulo, as bactérias *Candidatus Liberibacter americanus*, *Candidatus Liberibacter asiaticum*, e um fitoplasma (FUNDECITRUS,

2004; 2007; TEIXEIRA et al., 2005), responsáveis pela principal doença de citros no mundo, o “greening” ou “huanglongbing” (MARTINEZ; WALLACE, 1967).

A transmissão das bactérias associadas ao “huanglongbing” ou “greening” em citros está ligada a duas espécies de psíldeos, sendo uma delas, *Diaphorina citri* Kuwayama, 1907 (Hemiptera: Psyllidae), a única que ocorre com ampla distribuição geográfica no Brasil. As exigências térmicas e os estudos biológicos da praga mostram que *D. citri* no Brasil suporta temperaturas mais elevadas do que a espécie nos EUA. Entretanto, há uma indicação de que acima de 30°C, o inseto tem o seu desenvolvimento prejudicado. Verificou-se também que baixas UR afetam a fase ninfal de *D. citri* (NAVA et al., 2007).

O parasitóide *Tamarixia radiata* (Waterston, 1922) (Hymenoptera: Eulophidae) constitui-se no principal agente de controle biológico de *D. citri*. O sucesso das liberações de *T. radiata* tem sido relatado em vários países, pois este parasitóide apresenta altas taxas de parasitismo, bem como uma alta capacidade de dispersão, estabelecimento e adaptação em campo (CHIEN; CHU, 1996; HOY; NGUYEN, 2000; ÉTIENNE et al., 2001; GÓMEZ TORRES et al., 2006).

Existe um complexo de variáveis meteorológicas que podem afetar o desenvolvimento, emergência, sobrevivência, atividade e fecundidade dos parasitóides liberados; dentre tais fatores a temperatura e a umidade relativa ocupam posição de destaque (KING et al., 1985). Os modelos para prever a ocorrência de insetos são desenvolvidos a partir das exigências térmicas que o inseto requer para completar o desenvolvimento. Na maioria dos estudos de zoneamento, a temperatura é o principal fator envolvido (PARRA, 1985; HAMADA et al., 2007). Sistemas de modelagem têm sido aplicados em programas de manejo de pragas para fornecer orientação sobre a época mais adequada para realizar amostragens e implementar medidas de controle, fornecendo informações básicas para uma melhor compreensão da dinâmica populacional de insetos-pragas e seus inimigos naturais em sistemas agrícolas (PARRA, 1985; DAVIS; BRENES; ALLEE, 1996; HAMADA et al., 2007).

Os Sistemas de Informação Geográfica (SIG) são um conjunto de tecnologias que coletam, tratam, processam dados e disponibilizam informações com referência geográfica, sendo assim uma importante ferramenta para tomada de decisões. A temperatura exerce um efeito significativo na taxa de desenvolvimento, sobrevivência, reprodução e longevidade de *D. citri* e de seu parasitóide *T. radiata* (GÓMEZ TORRES et al., 2006; PARRA; GÓMEZ TORRES;

PAIVA,2007; NAVA et al., 2007). Dentro deste contexto, o objetivo desta pesquisa foi determinar o número de gerações de *D. citri* e de *T. radiata* ao longo do ano, baseando-se em suas exigências térmicas e em graus-dia acumulado, assim como estabelecer a influência da umidade relativa associada à temperatura na adaptação da praga e seu parasitóide nas diferentes regiões citrícolas do estado de São Paulo.

7.2 Material e Métodos

7.2.1 Determinação das exigências térmicas de *Tamarixia radiata*

Para a determinação das exigências térmicas das fases do ciclo total (ovo-adulto) de *Tamarixia radiata* (Waterston, 1922) (Hymenoptera: Eulophidae) nas diferentes temperaturas, foram colocadas ninfas de quarto e quinto ínstars de *Diaphorina citri* Kuwayama, 1907 (Hemiptera: Psyllidae) para o parasitismo (CHU; CHIEN, 1991), durante 24 horas, em gaiolas plásticas de 15,5 x 5,5 cm que continham aberturas recobertas por tecido tipo “voile” para permitir ventilação adequada. Após este período, as ninfas foram levadas juntamente com a planta para câmaras climatizadas reguladas a 18, 20, 22, 25, 28, 30 e 32°C, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 14 horas. Em cada temperatura (7 tratamentos) foram observadas 300 ninfas, divididas em 10 repetições de 30 ninfas por planta. A partir dos dados de duração do período ovo-adulto foi calculado o limiar térmico inferior de desenvolvimento (T_b) e a constante térmica (K) em graus-dia, utilizando-se o método da hipérbole (HADDAD; PARRA; MORAES, 1999). Os parâmetros biológicos avaliados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$), no programa estatístico SAS, Statistical Analyses System (2000).

7.2.2 Efeito da umidade relativa sobre o parasitismo e desenvolvimento de *Tamarixia radiata*

Para determinar o efeito da umidade relativa do ar (UR) sobre o parasitismo e o desenvolvimento (ovo-adulto) de *T. radiata*, foram utilizadas câmaras climatizadas reguladas com UR de 30, 50, 70 e $90 \pm 10\%$, temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase de 14 horas.

Neste experimento, ninfas de quinto ínstar de *D. citri* foram oferecidas para fêmeas individualizadas e acasaladas de *T. radiata*, com 24 horas de idade e alimentadas com uma gotícula de mel puro, colocadas em gaiolas de acrílico (35 x 35 x 45 cm). Um termo-higrômetro digital (Incoterm®, Ref.: 9860.17.1.00) foi utilizado para medir, ao longo do experimento, a umidade relativa no interior das gaiolas, e para a medição em forma simultânea de duas temperaturas (interna/externa). Após 24 horas, as fêmeas foram retiradas das gaiolas e as ninfas foram vistoriadas durante um período de 7 a 12 dias para se verificar a porcentagem de parasitismo, desenvolvimento e emergência. A duração média do desenvolvimento biológico (ovo – adulto) foi submetido à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$), no programa estatístico SAS, Statistical Analyses System (2000).

7.2.3 Utilização de um Sistema de Informação Geográfica (SIG) para determinação do número de gerações de *Diaphorina citri* e *T. radiata* no estado de São Paulo

Como já referido, o SIG é um sistema de gerenciamento de banco de dados computacional para recuperar, armazenar, analisar e visualizar dados espaciais. O número de gerações (ciclos) de *D. citri* e de *T. radiata* com base em suas exigências térmicas e dos graus-dia acumulados foi determinado para o estado de São Paulo ao longo do ano. O calculo dos graus-dia acumulados foi determinado fundamentando-se no método de Arnold (1959) com base nos seguintes parâmetros, form. (1):

$$NC = \frac{(tm - tb)d}{k} \quad (1)$$

Onde; **NC** = número de ciclos; **tm** = temperatura média mensal; **tb** = limite térmico inferior; **k** = graus-dias acumulado necessário para completar um ciclo (ovo-adulto, incluindo pré-oviposição); **d** = número de dias do mês.

Para o cálculo da temperatura média das diferentes regiões do estado foi utilizado o modelo proposto por Rodriguez-Lado, Sparovek e Vidal-Torrado (2007), baseado na análise da temperatura média mensal de 256 estações meteorológicas por meio de uma regressão linear múltipla. O processamento dos dados e geração dos mapas com o número de ciclos mensais (período ovo-adulto, incluindo pré-oviposição) para a praga e para parasitóide foi realizado com

o Sistema de Informações Geográficas (SIG) TNT Mips 7.2 e com o Modelo de Elevação Digital (DEM-SRTM) desenvolvido pela Embrapa (Miranda, 2005). A base do DEM-SRTM contém os dados numéricos de relevo e da topografia do Brasil, originários da missão de mapeamento do relevo terrestre SRTM (Shuttle Radar Topography Mission), desenvolvido pela NASA (National Aeronautics and Space Administration) e NGA (National Geospatial-Intelligence Agency) dos EUA no ano 2000. Este modelo dispõe de uma medida altimétrica precisa, obtida mediante uma resolução espacial de 90 metros por 90 metros de território; porém, para reduzir o tempo de processamento dos dados, no presente trabalho, optou-se por gerar os mapas numa resolução espacial de 1000 metros. Para facilitar a compreensão dos mapas gerados, o estado de São Paulo foi dividido em intervalos de isotermas, de $< 17^{\circ}\text{C}$; 17°C a 19°C ; 19°C a 21°C ; 21°C a 23°C ; 23°C a 25°C ; 25°C a 27°C e $> 27^{\circ}\text{C}$.

7.2.4 Análise da influência da umidade relativa e temperatura na adaptação de *D. citri* e *T. radiata* nas regiões citrícolas do estado de São Paulo

Por meio de climogramas analisou-se a influência conjunta da temperatura e da umidade relativa do ar (termohigrogramas), numa tentativa de avaliar o desenvolvimento e adaptação de *D. citri* e *T. radiata* nos municípios das regiões citrícolas Norte, Nordeste, Sudeste e Sudoeste do estado de São Paulo (Tabela 1).

Para a elaboração dos climogramas foram utilizados os dados de temperatura média mensal obtidos por Rodriguez-Lado, Sparovek e Vidal-Torrado (2007) (item 7.2.3) e para o cálculo da umidade relativa média do ar das diferentes regiões do estado, seguindo a metodologia destes mesmos autores, foi analisada a umidade relativa média mensal de 256 estações meteorológicas por meio de uma regressão linear múltipla. Para a construção do climograma foram colocados nas abcissas os dados mensais de temperatura e nas ordenadas os dados mensais de umidade relativa do ar e a seguir, foram unidos os 12 pontos formando um polígono fechado para cada região. O termohigrograma da região de Araraquara foi utilizado como padrão de comparação por ser esta região a que apresenta maior problema como o “huanglongbing” ou “greening” no estado de São Paulo.

Para comparação dos diferentes municípios em relação a Araraquara, foi considerada como faixa de temperatura e umidade relativa do ar (UR) favoráveis à praga (*D. citri*) e ao

inimigo natural (*T. radiata*), respectivamente, 18 a 30°C e 70 a 85% (NAVA et al., 2007) e 25 a 30°C e 70 ± 10% (GÓMEZ TORRES; PARRA, 2007; 2008). Assim, dentro dos polígonos (climogramas) a coincidência destes valores com os da região de Araraquara foi considerada zona favorável aos insetos em estudo.

Tabela 1 - Regiões citrícolas do estado de São Paulo com os municípios selecionados para o zoneamento de *Diaphorina citri* e *Tamarixia radiata*

Norte	Nordeste	Sudoeste	Sudeste
Barretos	Araraquara	Avaré	Bragança Paulista
Catanduva	Franca	Bauru	Campinas
Fernandópolis	Jaboticabal	Botucatu	Itapetininga
General Salgado	Ribeirão Preto	Itapeva	Limeira
Jales	São João da Boa Vista	Jaú	Mogi Mirim
São José do Rio Preto		Lins	Piracicaba
Votuporanga		Ourinhos	Sorocaba

7.3 Resultados e Discussão

7.3.1 Determinação das exigências térmicas de *Tamarixia radiata*

O parasitóide *Tamarixia radiata* (Waterston, 1922) (Hymenoptera: Eulophidae) completou o desenvolvimento sobre *Diaphorina citri* Kuwayama, 1907 (Hemiptera: Psyllidae) em todas as temperaturas estudadas (18, 20, 22, 25, 28, 30 e 32°C). O tempo do desenvolvimento para o período ovo - adulto do parasitóide foi inversamente relacionado com as temperaturas estudadas, obtendo-se durações de 17.31±0,13, 14.20±0,12, 12.46±0,13, 10.33±0,13, 10.09±0,11, 7.55±0,19, 7.59±0,21 dias, respectivamente para cada uma das temperaturas avaliadas (Figura 1), resultados que se assemelham àqueles obtidos por Bazzocchi et al. (2003) e Minkenbergl (1989) para outro eulofídeo, *Diglyphus isaea* (Walker, 1838) parasitando *Liriomyza trifolii* (Burgess, 1880) e *Liriomyza huidobrensis* (Kaltenbach, 1858) (Diptera: Agromyzidae).

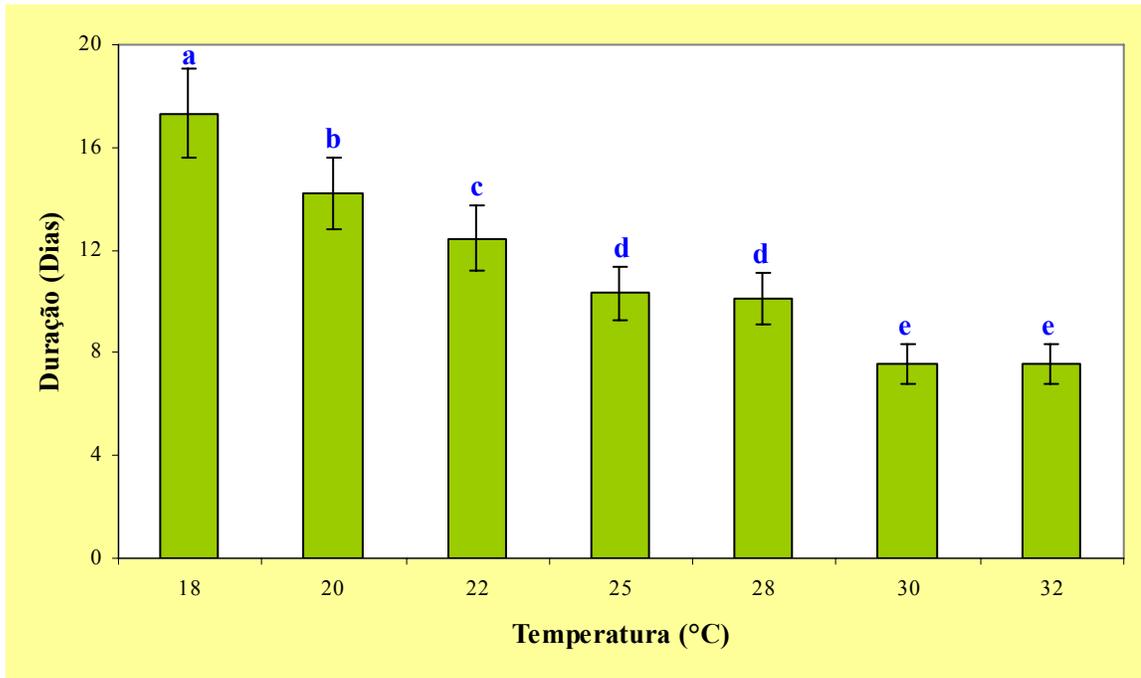


Figura 1 - Média \pm EP da duração (dias) do ciclo (ovo - adulto) de *Tamarixia radiata* sobre ninfas de *Diaphorina citri*, em diferentes temperaturas. UR: $70 \pm 10\%$ e fotofase de 14 horas. Médias seguidas da mesma letra, nas barras, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$)

Com os dados de duração e de desenvolvimento (1/dia) nas temperaturas de 18, 20, 22, 25, 28, 30 e 32°C, para o período ovo - adulto de *T. radiata*, determinou-se o limite térmico inferior de desenvolvimento (T_b) (Figura 2) e a constante térmica (K), sendo obtidos valores de 7,13°C e 188,7GD respectivamente, com um coeficiente de determinação (R^2) de 94,7%, dado que proporciona um alto índice de confiabilidade aos resultados alcançados. Os dados, obtidos neste trabalho, diferem do valor de limite térmico inferior de desenvolvimento (11°C) e de constante térmica (165GD) apresentados por Chien e Chu (1996) para populações deste mesmo parasitóide provenientes de áreas de *Citrus sinensis* e de *Murraya paniculata*, mas são próximos ao limite térmico inferior de 9,2 a 9,5°C apresentadas por Bazzocchi et al. (2003) para fêmeas e machos para outra espécie de eulofídeo (*D. Isaea*).

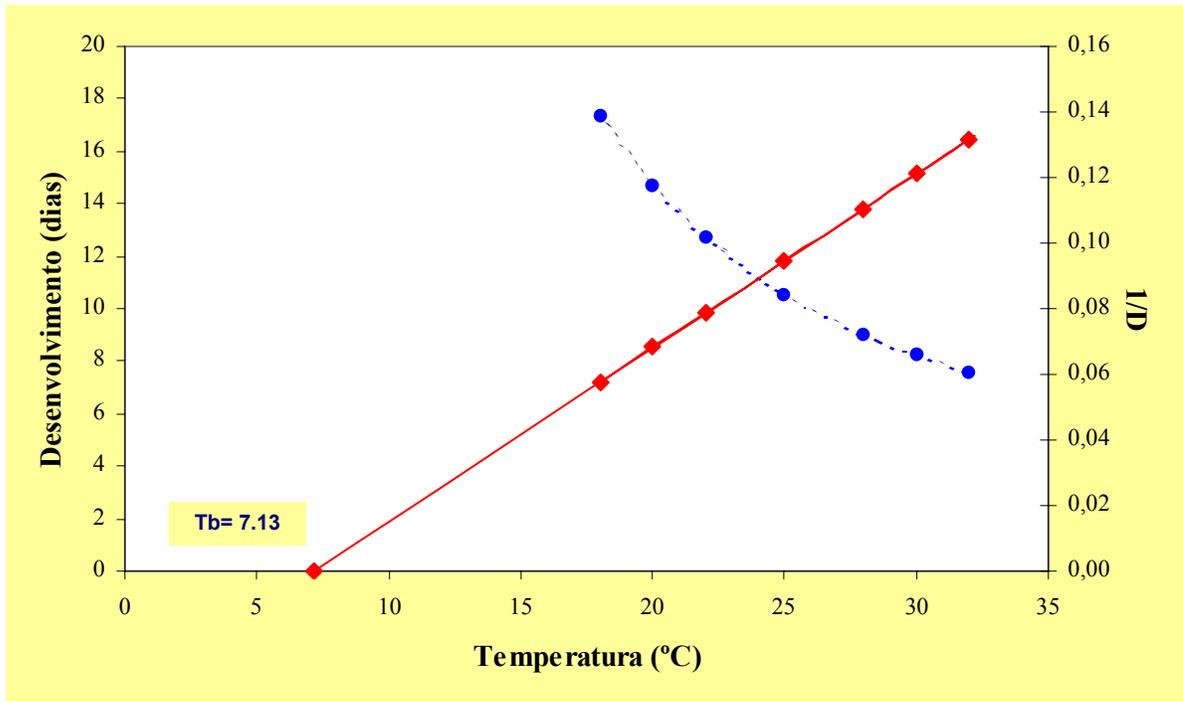


Figura 2 - Curva de velocidade de desenvolvimento de *Tamarixia radiata* sobre ninfas de *Diaphorina citri*, em diferentes temperaturas. UR: $70 \pm 10\%$ e fotofase de 14 horas

7.3.2 Efeito da umidade relativa sobre o desenvolvimento e parasitismo de *T. radiata*

A relação existente entre um parasitóide e seu hospedeiro é bastante complexa, tornando assim fundamental a compreensão das respostas dos agentes de controle biológico frente aos diversos fatores bióticos e abióticos que podem interferir no seu desenvolvimento, sobrevivência e aptidão (BLUMBERG, 1997; GEDEN, 1997; FERREIRA DE ALMEIDA; PIRES DO PRADO; GEDEN, 2002). A porcentagem de parasitismo de *T. radiata* sobre *D. citri* ($F= 5,37$; $gl= 3$; $P> 0,001$; ANOVA) foi maior em 70% de UR, variando significativamente quando comparado com os outros tratamentos, embora sem diferir da umidade relativa de 90%, observando-se assim que o parâmetro avaliado diminuiu nas umidades de 30 e 50% (Figura 3). Duale (2005) obteve resultados similares para outra espécie de Eulofidae, *Pediobius furvus* (Gahan, 1928), com parasitismos elevados na faixa entre 60 a 80% UR.

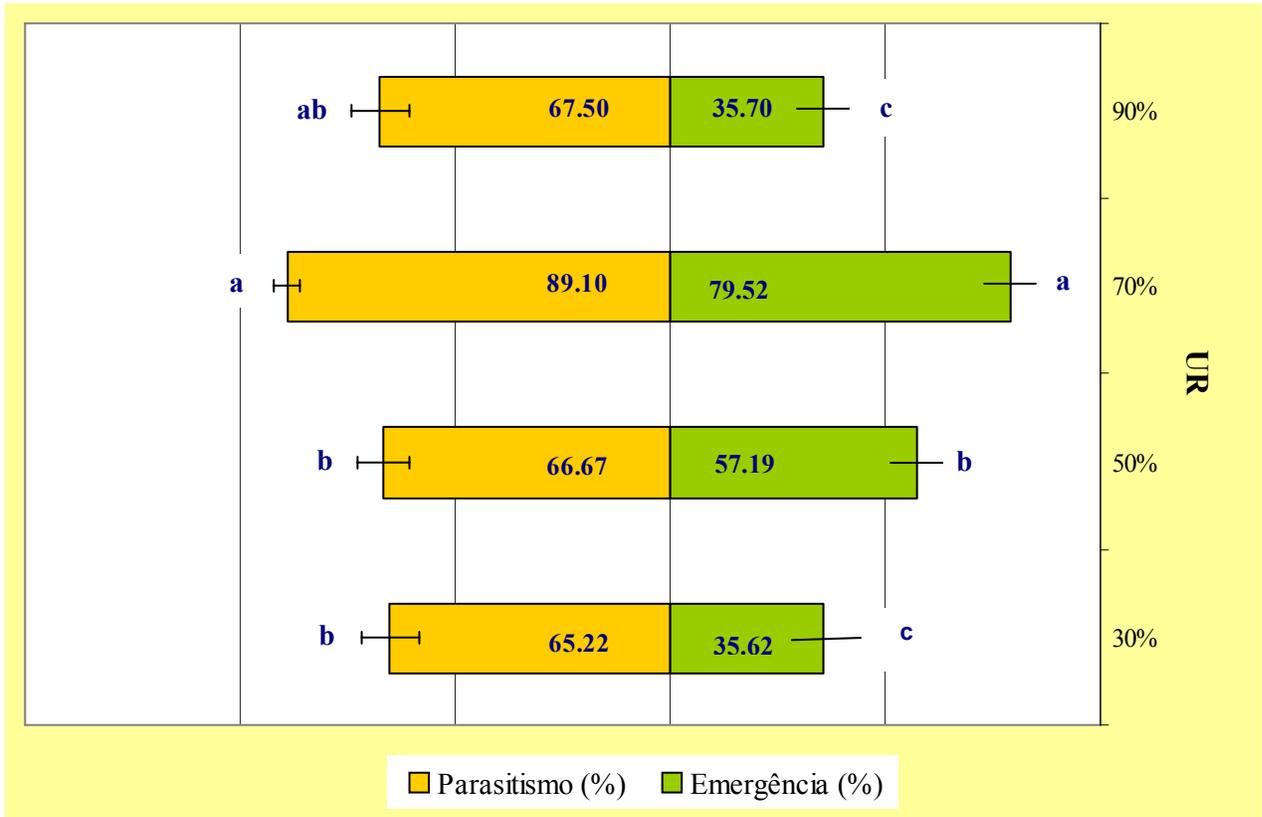


Figura 3 - Porcentagem de parasitismo e emergência de *Tamarixia radiata* sobre *Diaphorina citri* em quatro umidades relativas (30, 50, 70 e 90 ± 10%) em laboratório. Temperatura: 25 ± 1°C e fotofase: 14 horas. Médias seguidas da mesma letra, nas barras, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$)

Pelos resultados observados, a umidade relativa do ar não influenciou a duração do desenvolvimento (período ovo - adulto) de *T. radiata*, que permaneceu entre 10 a 14 dias, valores similares aos obtidos no experimento de temperaturas deste trabalho (item 4.3.3), embora, a porcentagem de emergência ($F= 8,20$; $gl= 3$; $P> 0,001$; ANOVA) tenha sido mais afetada pelas umidades relativas extremas de 30 e 90% com 35% de emergência, sendo que a maior taxa de emergência ocorreu a 70% de UR vindo a seguir a UR de 50% (Figura 3). Desta forma, os critérios que devem ser selecionados para se obter uma produção em grande quantidade de *T. radiata* devem estar associados às exigências térmicas e higrométricas determinadas na presente pesquisa, ou seja, temperaturas de 25 a 30°C e umidade relativa (UR) de 70 ± 10%.

7.3.3 Utilização de um Sistema de Informação Geográfica (SIG) para determinação do número de gerações de *Diaphorina citri* e de *T. radiata* no estado de São Paulo

Com o mapa de isotermas obtido e com os parâmetros biológicos obtidos nas diferentes temperaturas e umidades relativas para *D. citri* e *T. radiata*, foi possível determinar, para os diferentes municípios das regiões citrícolas do estado de São Paulo, o número estimado de gerações que ocorrem mensal e anualmente para a praga e para o inimigo natural.

A media mensal de gerações na região norte (Barretos, Catanduva, Fernandópolis, General Salgado, Jales, São José do Rio Preto e Votuporanga), no verão (dezembro, janeiro, fevereiro e março) deve variar entre 0,90 a 1,28 ciclos/mês para *D. citri* e de 2,60 a 3,26 ciclos/mês para *T. radiata* (Figuras 15, 4, 5 e 6; Tabela 2). No outono (março, abril, maio e junho) o número médio de ciclos/mês pode variar entre 0,52 a 1,28 e de 1,95 a 3,26 para a praga e o parasitóide, respectivamente (Figuras 6, 7, 8 e 9; Tabela 2). No inverno (junho, julho, agosto e setembro) este número deve ser variável entre 0,52 a 1,09 ciclos/mês para *D. citri* e de 1,95 a 2,93 ciclos/mês para *T. radiata* (Figuras 9, 10, 11 e 12; Tabela 2). Na primavera (setembro, outubro, novembro e dezembro) o número médio de ciclos/mês poderá oscilar entre 0,90 a 1,28 e de 2,60 a 3,26 para a praga e para o parasitóide, respectivamente (Figuras 12, 13, 14 e 15; Tabela 2).

Por outro lado, na região nordeste do estado (Araraquara, Franca, Jaboticabal, Ribeirão Preto e São João da Boa Vista), no verão o número médio de ciclos/mês pode variar entre 0,71 a 1,28 para *D. citri* e de 2,60 a 3,26 para *T. radiata* (Figuras 15, 4, 5 e 6; Tabela 2). No outono, este número deverá ser variável entre 0,33 a 1,09 e de 1,62 a 2,60 ciclos/mês para a praga e para o parasitóide, respectivamente (Figuras 6, 7, 8 e 9; Tabela 2). No inverno, os cálculos indicam uma variação entre 0,33 a 0,90 ciclos/mês para *D. citri* e de 1,62 a 2,60 ciclos/mês para *T. radiata* (Figuras 9, 10, 11 e 12; Tabela 2) e na primavera, o número médio de ciclos/mês pode variar entre 0,71 a 1,09 e de 2,28 a 2,93 para *D. citri* e *T. radiata*, respectivamente (Figuras 12, 13, 14 e 15; Tabela 2).

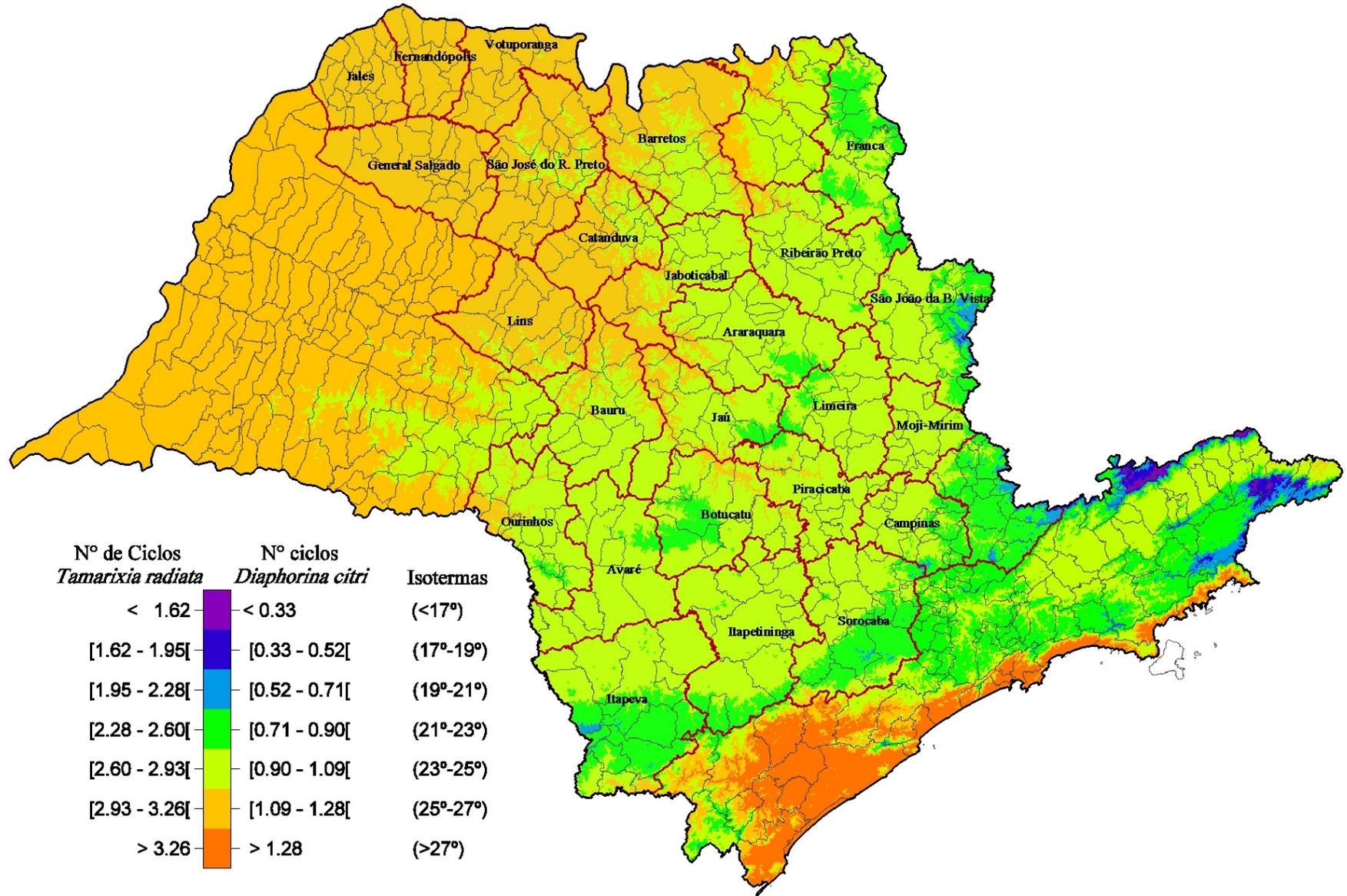


Figura 4 - Número de gerações (período ovo – adulto, incluindo pré-oviposição) de *Tamarixia radiata* e *Diaphorina citri* no mês de janeiro nos intervalos de isotermas, de <17°C; 17°C a 19°C; 19°C a 21°C; 21°C a 23°C; 23°C a 25°C; 25°C a 27°C e >27°C no Estado de São Paulo

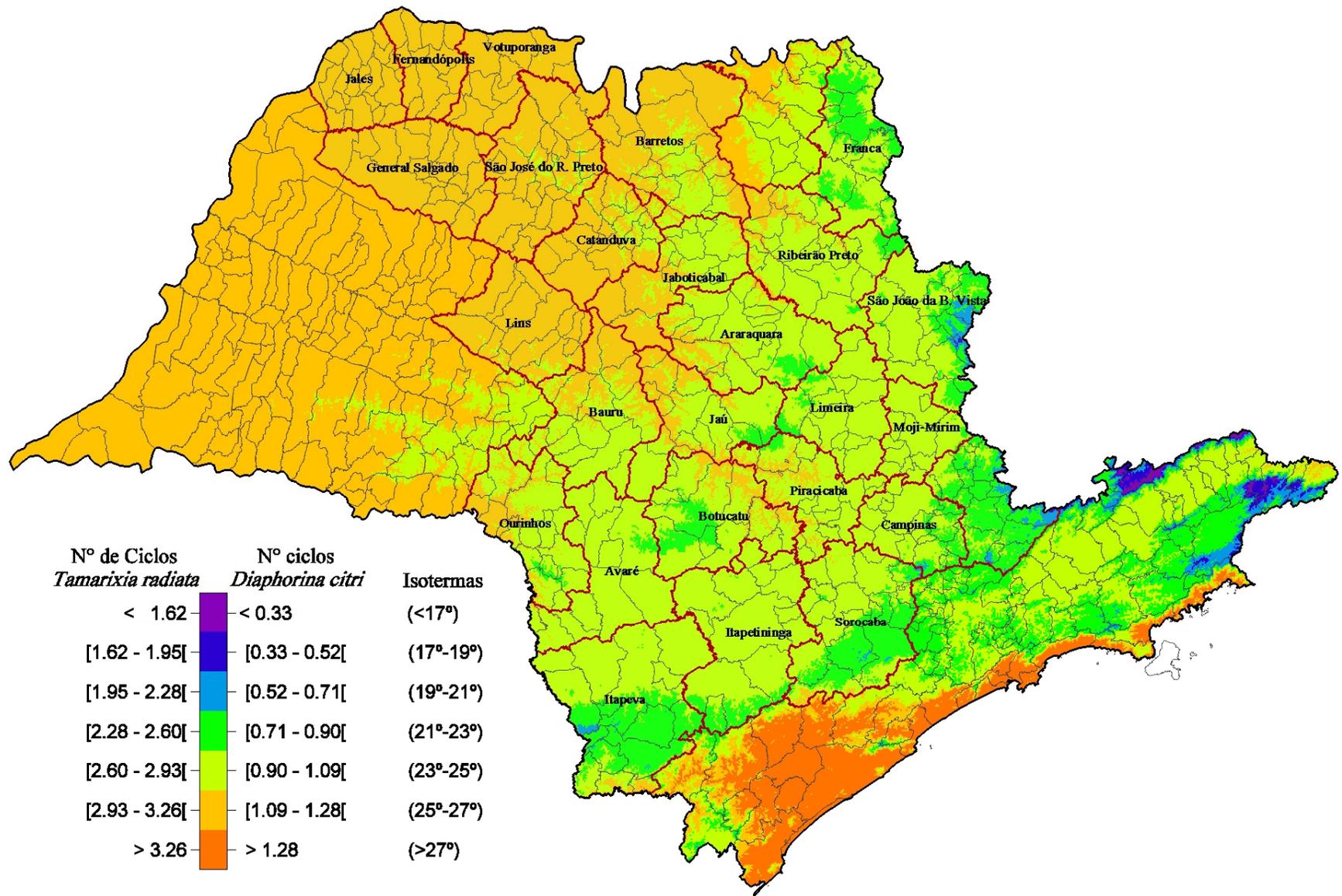


Figura 5 - Número de gerações (período ovo - adulto, incluindo pré-oviposição) de *Tamarixia radiata* e *Diaphorina citri* no mês de fevereiro nos intervalos de isotermas, de <17°C; 17°C a 19°C; 19°C a 21°C; 21°C a 23°C; 23°C a 25°C; 25°C a 27°C e >27°C no Estado de São Paulo

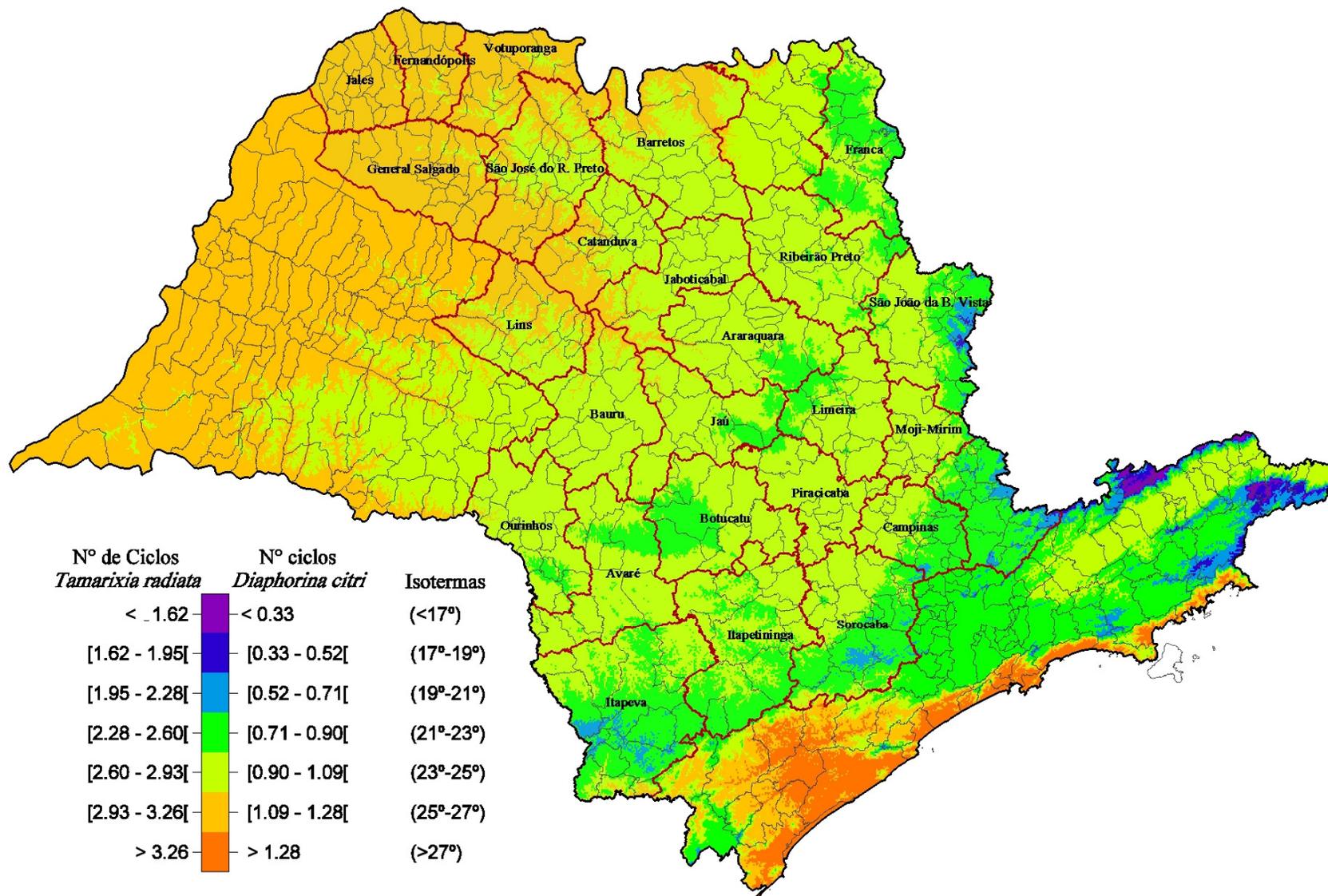


Figura 6 - Número de gerações (período ovo - adulto, incluindo pré-oviposição) de *Tamarixia radiata* e *Diaphorina citri* no mês de março nos intervalos de isotermas, de <17°C; 17°C a 19°C; 19°C a 21°C; 21°C a 23°C; 23°C a 25°C; 25°C a 27°C e >27°C no Estado de São Paulo

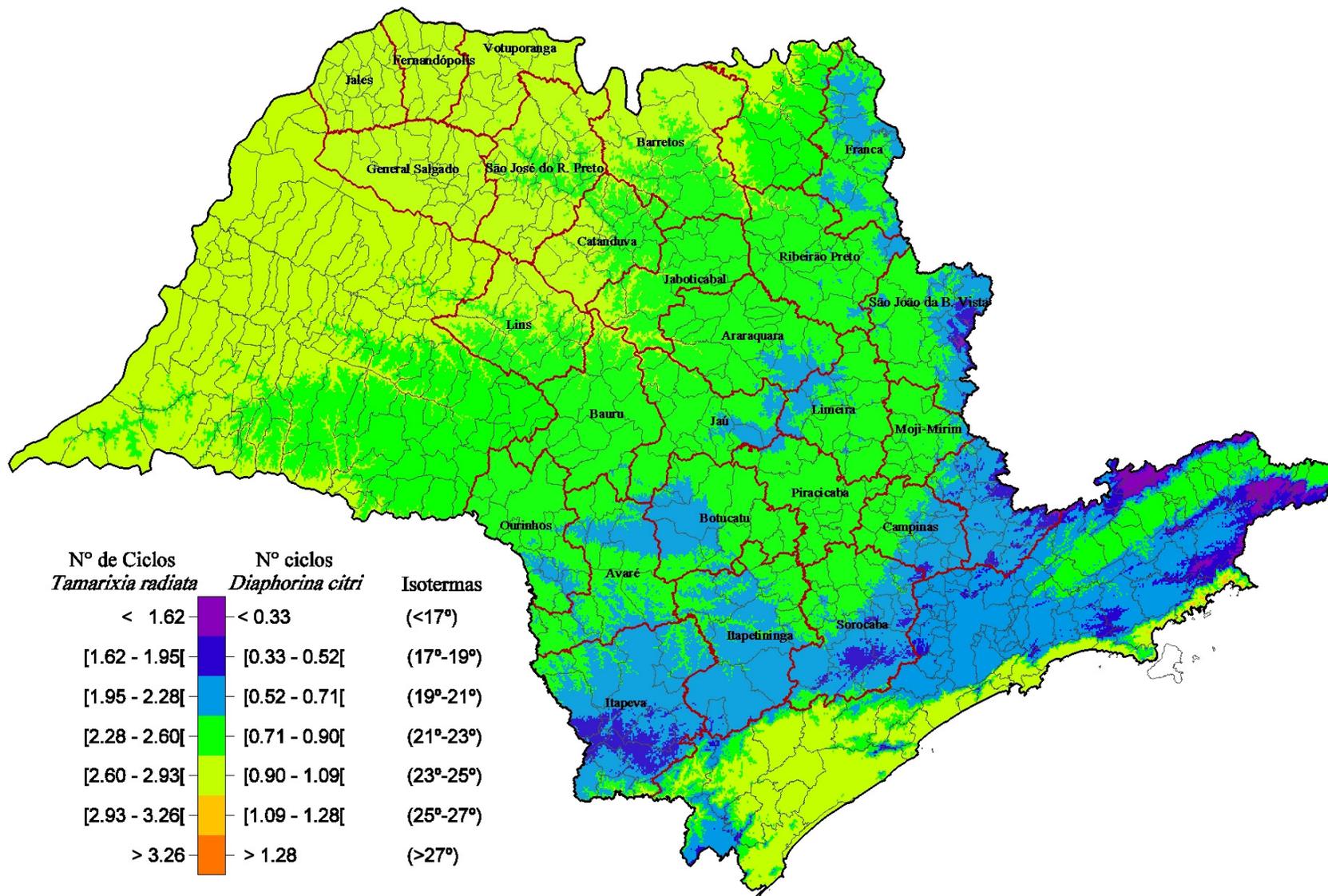


Figura 7 - Número de gerações (período ovo - adulto, incluindo pré-oviposição) de *Tamarixia radiata* e *Diaphorina citri* no mês de abril nos intervalos de isotermas, de <17°C; 17°C a 19°C; 19°C a 21°C; 21°C a 23°C; 23°C a 25°C; 25°C a 27°C e >27°C no Estado de São Paulo

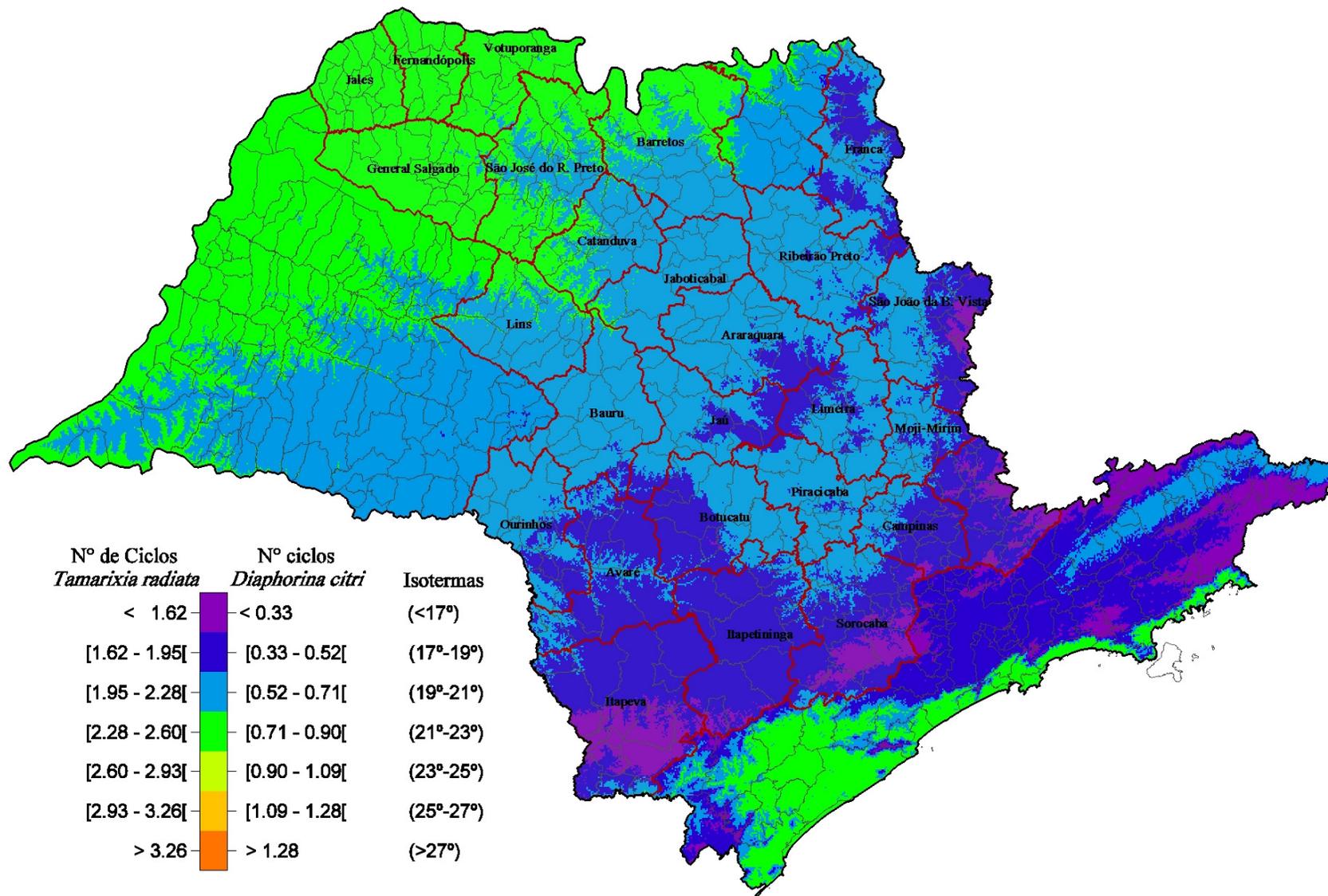


Figura 8 - Número de gerações (período ovo - adulto, incluindo pré-oviposição) de *Tamarixia radiata* e *Diaphorina citri* no mês de maio nos intervalos de isotermas, de <17°C; 17°C a 19°C; 19°C a 21°C; 21°C a 23°C; 23°C a 25°C; 25°C a 27°C e >27°C no Estado de São Paulo

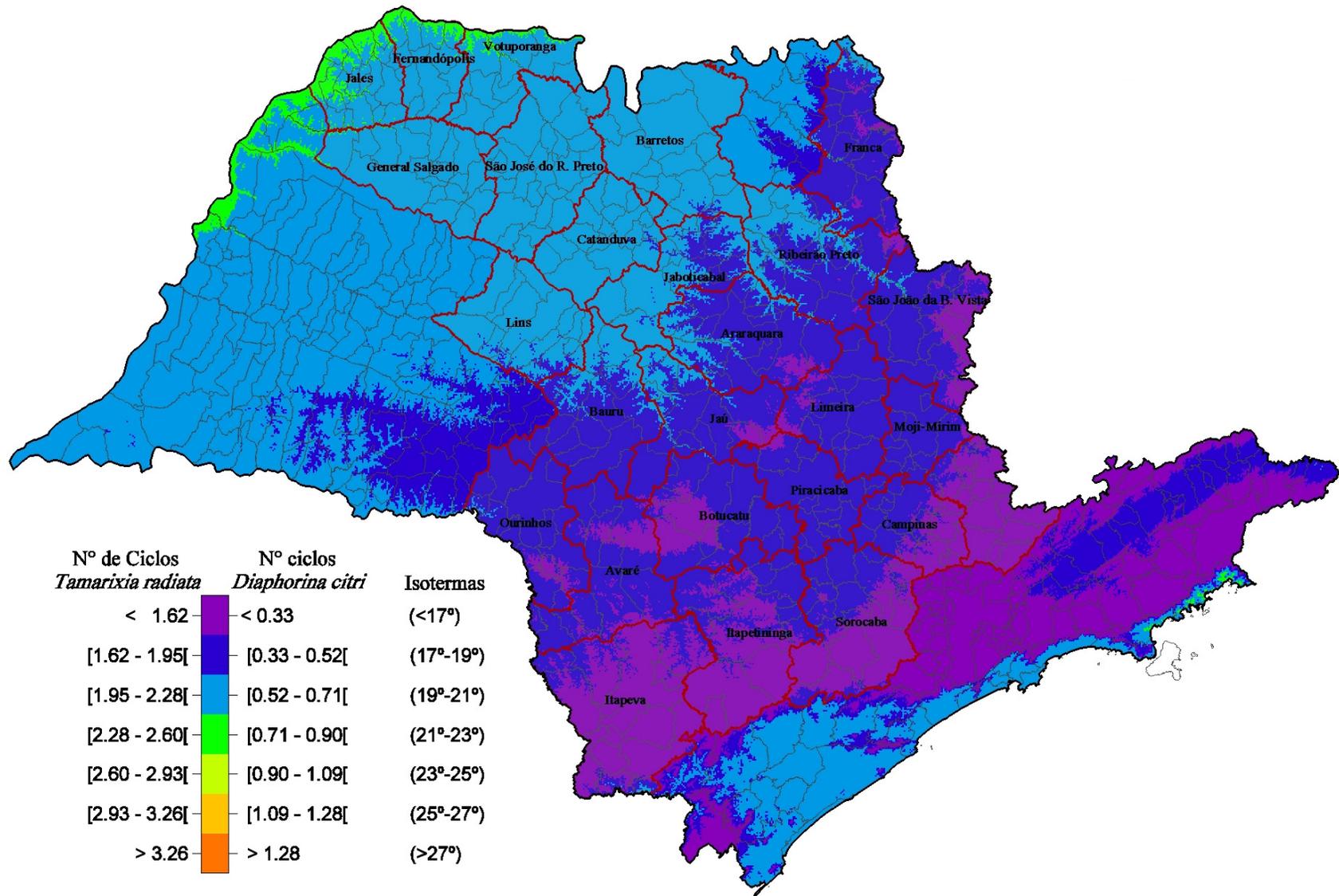


Figura 9 - Número de gerações (período ovo - adulto, incluindo pré-oviposição) de *Tamarixia radiata* e *Diaphorina citri* no mês de junho nos intervalos de isotermas, de <17°C; 17°C a 19°C; 19°C a 21°C; 21°C a 23°C; 23°C a 25°C; 25°C a 27°C e >27°C no Estado de São Paulo

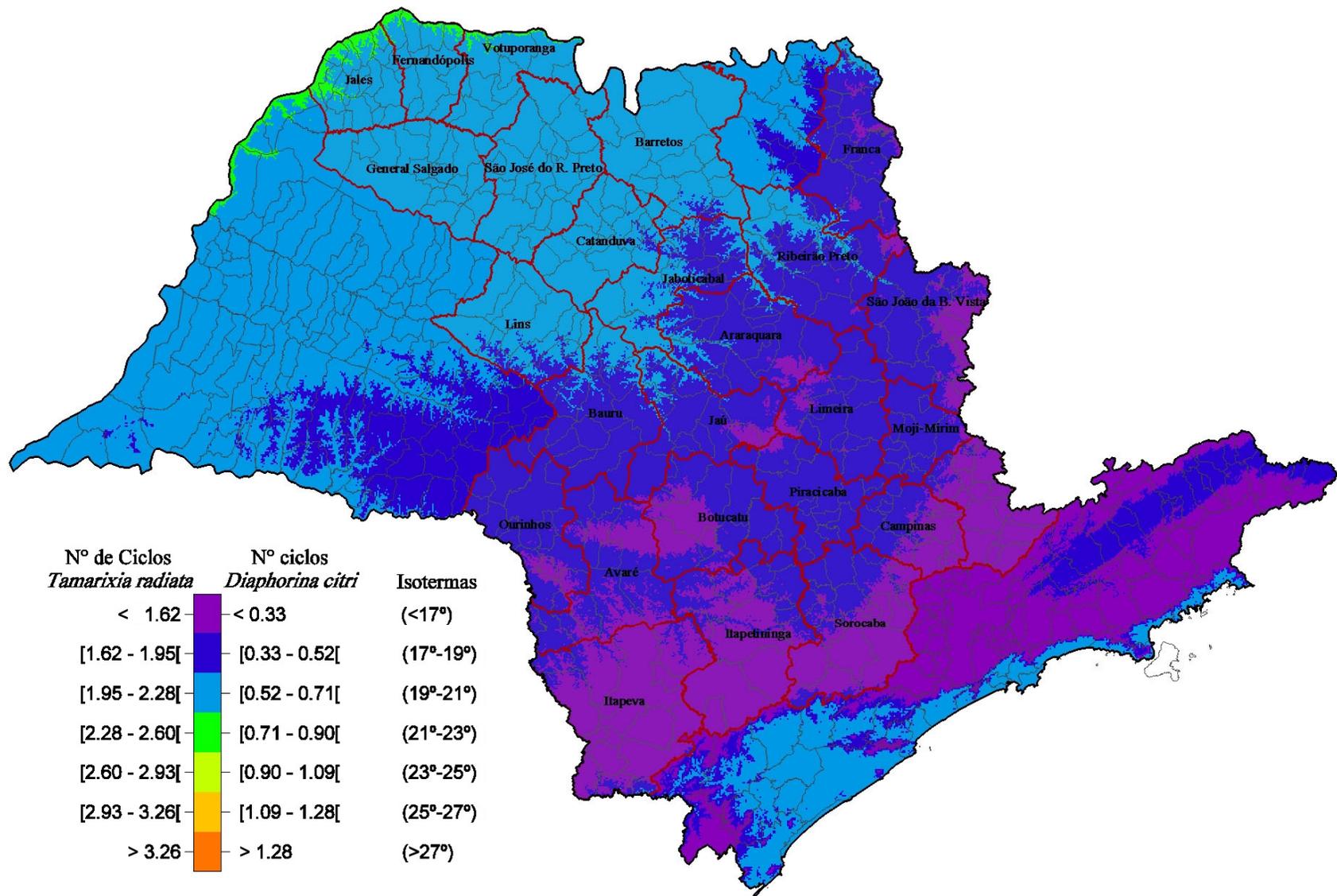


Figura 10 - Número de gerações (período ovo - adulto, incluindo pré-oviposição) de *Tamarixia radiata* e *Diaphorina citri* no mês de julho nos intervalos de isotermas, de <17°C; 17°C a 19°C; 19°C a 21°C; 21°C a 23°C; 23°C a 25°C; 25°C a 27°C e >27°C no Estado de São Paulo

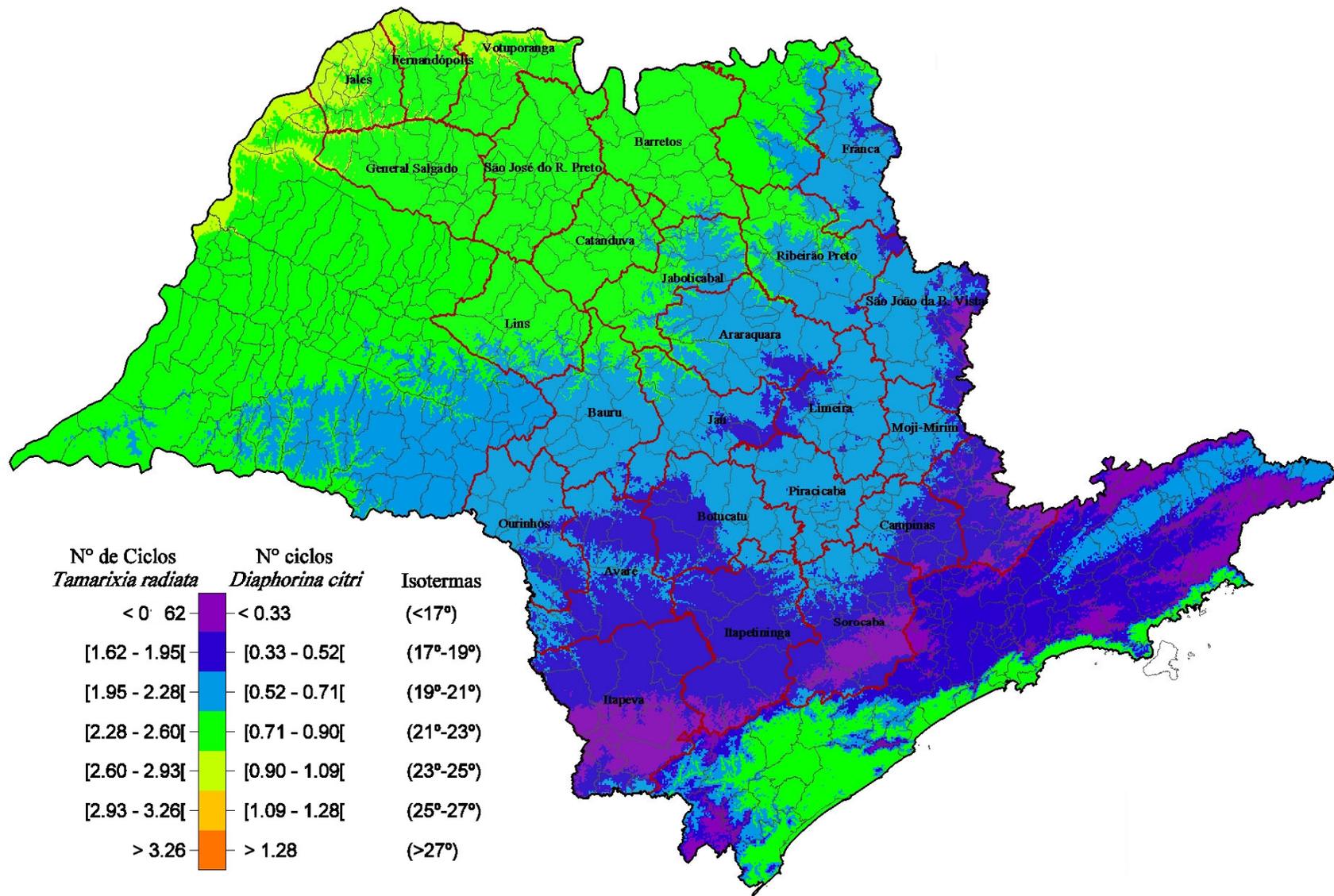


Figura 11 - Número de gerações (período ovo - adulto, incluindo pré-oviposição) de *Tamarixia radiata* e *Diaphorina citri* no mês de agosto nos intervalos de isotermas, de <17°C; 17°C a 19°C; 19°C a 21°C; 21°C a 23°C; 23°C a 25°C; 25°C a 27°C e >27°C no Estado de São Paulo

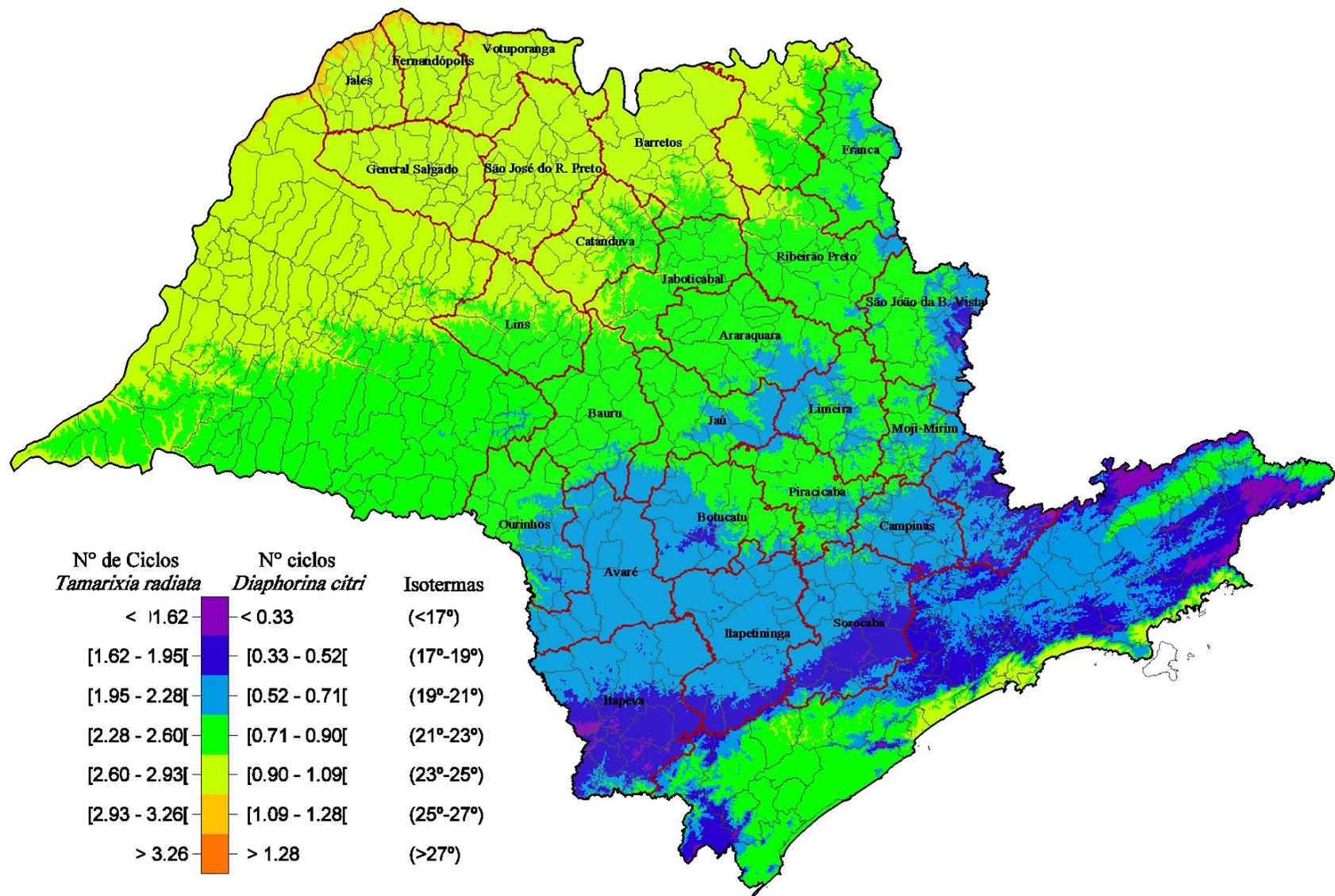


Figura 12 - Número de gerações (período ovo - adulto, incluindo pré-oviposição) de *Tamarixia radiata* e *Diaphorina citri* no mês de setembro nos intervalos de isotermas, de <17°C; 17°C a 19°C; 19°C a 21°C; 21°C a 23°C; 23°C a 25°C; 25°C a 27°C e >27°C no Estado de São Paulo

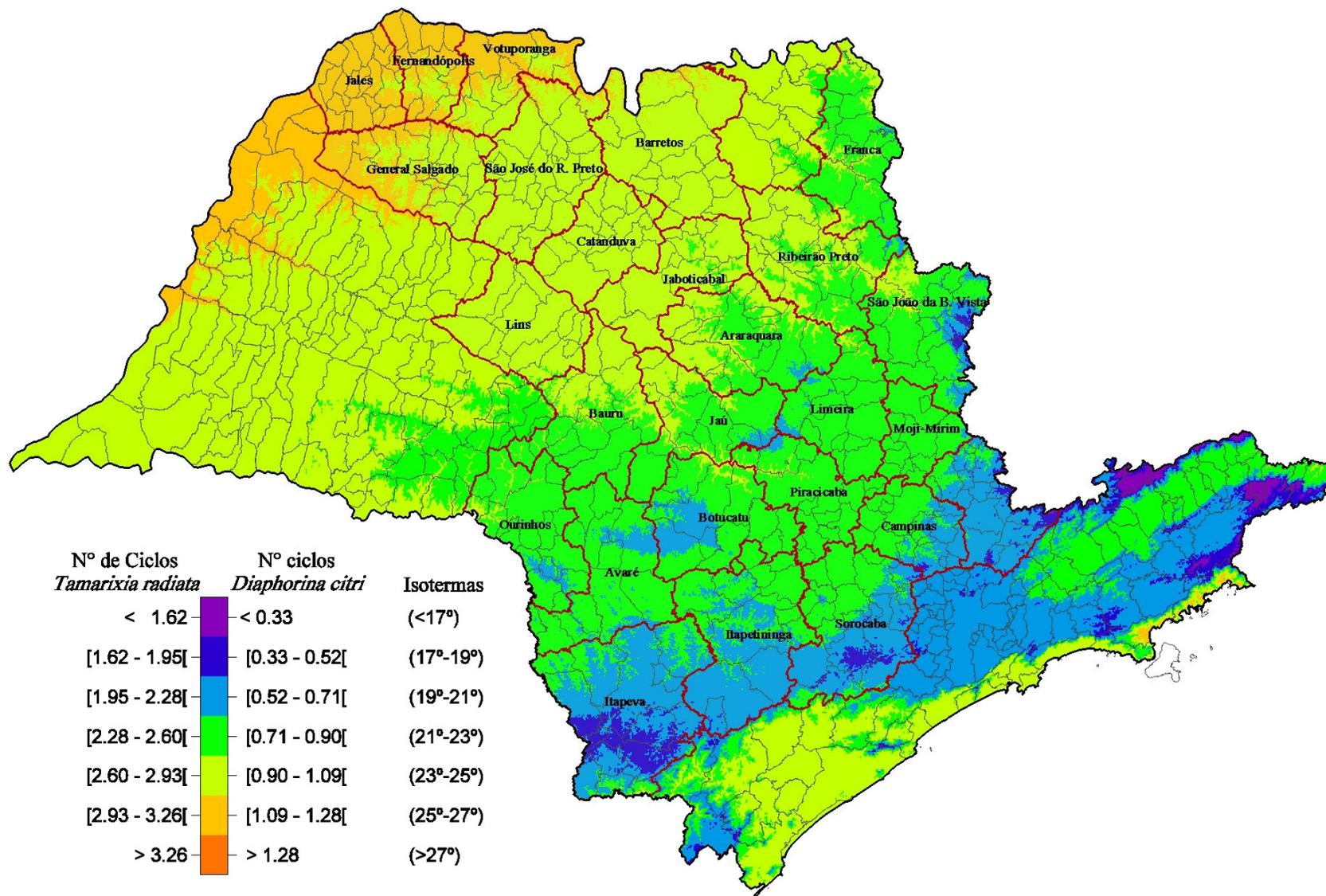


Figura 13 - Número de gerações (período ovo - adulto, incluindo pré-oviposição) de *Tamarixia radiata* e *Diaphorina citri* no mês de outubro nos intervalos de isotermas, de <17°C; 17°C a 19°C; 19°C a 21°C; 21°C a 23°C; 23°C a 25°C; 25°C a 27°C e >27°C no Estado de São Paulo

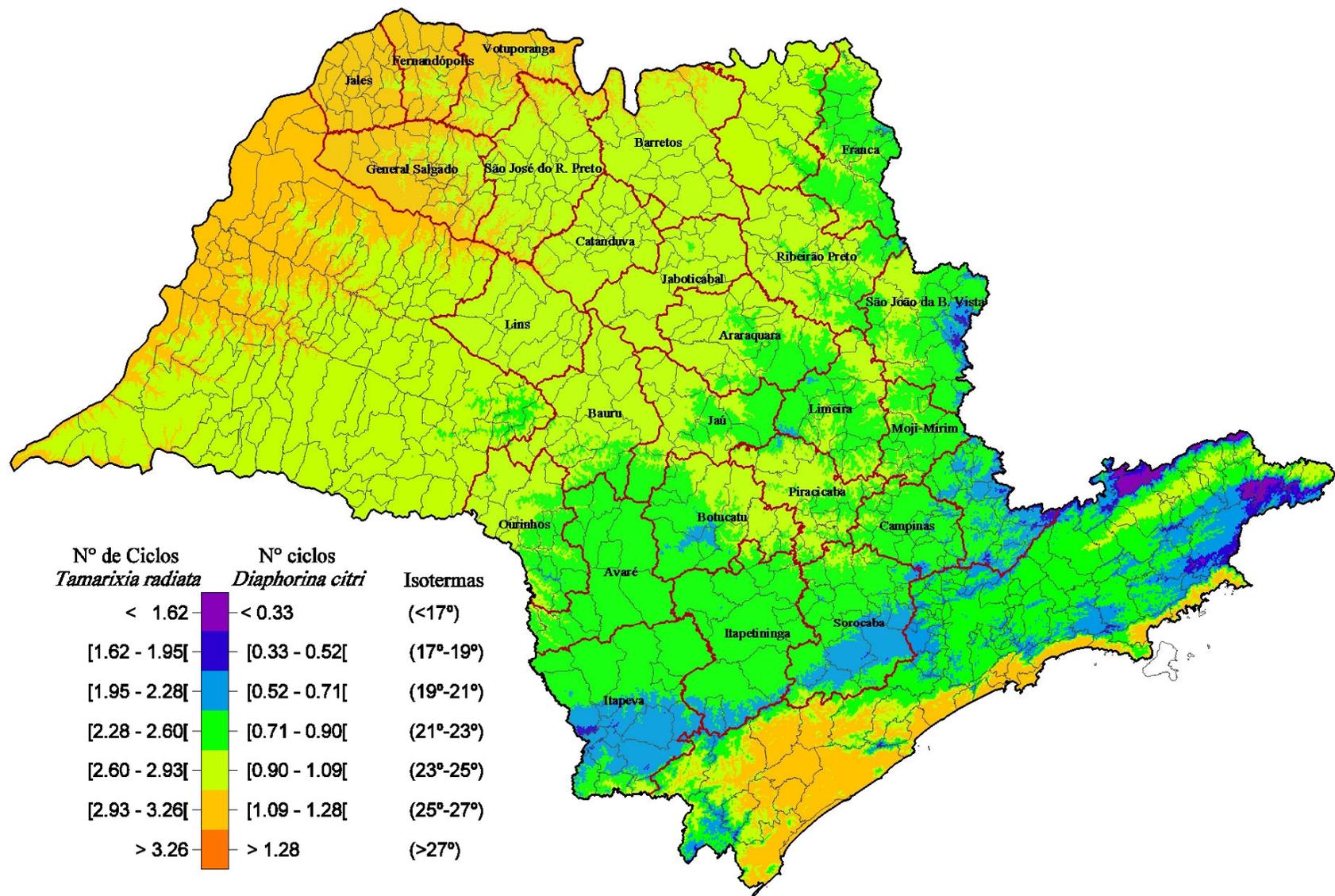


Figura 14 - Número de gerações (período ovo - adulto, incluindo pré-oviposição) de *Tamarixia radiata* e *Diaphorina citri* no mês de novembro nos intervalos de isotermas, de <17°C; 17°C a 19°C; 19°C a 21°C; 21°C a 23°C; 23°C a 25°C; 25°C a 27°C e >27°C no Estado de São Paulo

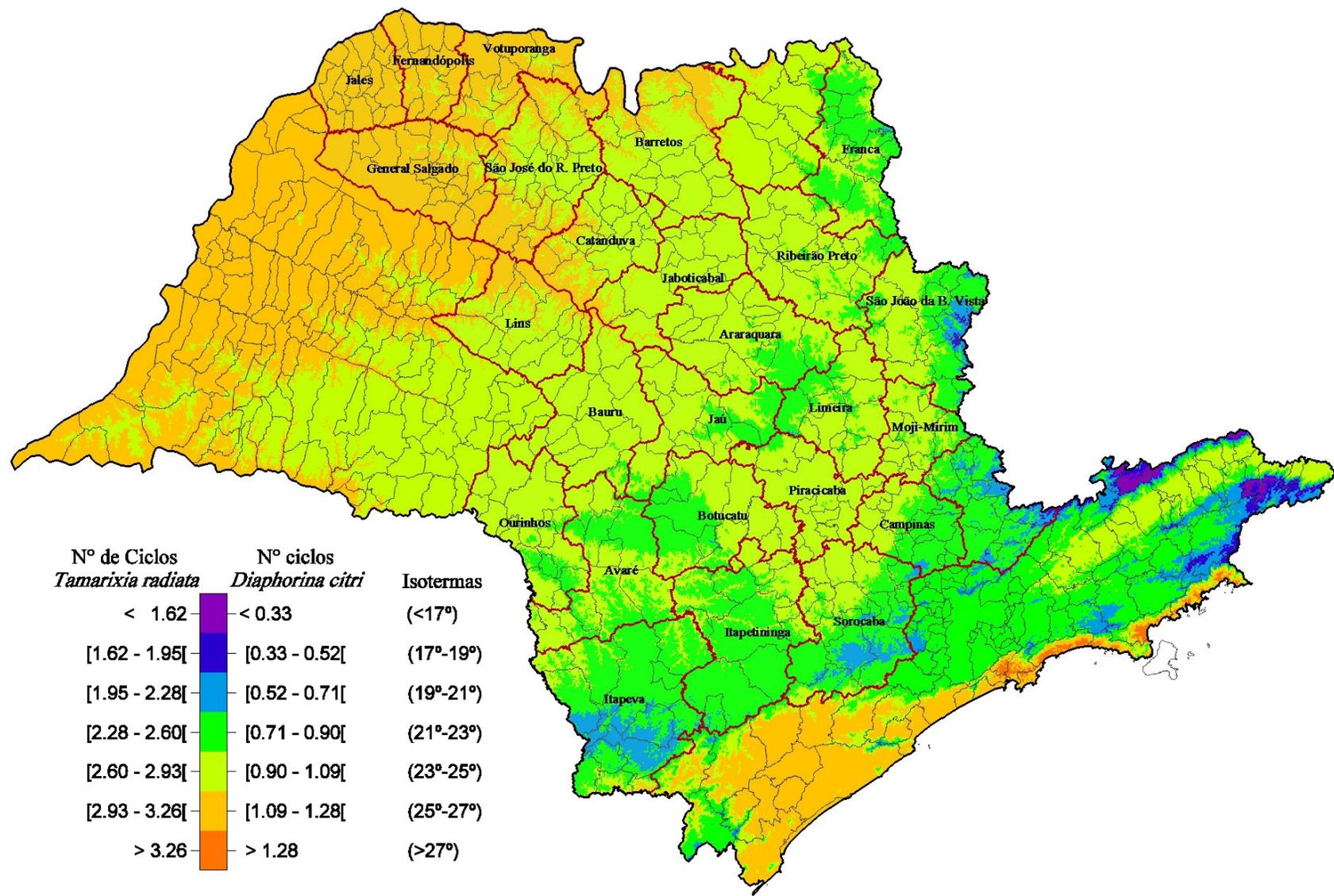


Figura 15 - Número de gerações (período ovo - adulto, incluindo pré-oviposição) de *Tamarixia radiata* e *Diaphorina citri* no mês de dezembro nos intervalos de isotermas, de <17°C; 17°C a 19°C; 19°C a 21°C; 21°C a 23°C; 23°C a 25°C; 25°C a 27°C e >27°C no Estado de São Paulo

Na região sudoeste (Avaré, Bauru, Botucatu, Itapeva, Jaú, Lins e Ourinhos), no verão o número médio de ciclos/mês pode oscilar entre 0,71 a 1,90 para *D. citri* e entre 2,28 a 2,93 para *T. radiata* (Figuras 15, 4, 5 e 6; Tabela 2). No outono, este número é variável entre <0,33 a 1,09 e de <1,62 a 2,93 ciclos/mês para a praga e o parasitóide, respectivamente (Figuras 6, 7, 8 e 9; Tabela 2). No inverno, tal variação é de <0,33 a 0,90 ciclos/mês para *D. citri* e de <1,62 a 2,60 ciclos/mês para *T. radiata* (Figuras 9, 10, 11 e 12; Tabela 2), sendo que na primavera, o número médio de ciclos/mês pode variar entre 0,33 a 1,90 e de 1,62 a 2,60 para *D. citri* e *T. radiata*, respectivamente (Figuras 12, 13, 14 e 15; Tabela 2).

Na região sudeste (Bragança Paulista, Campinas, Itapetininga, Limeira, Mogi Mirim, Piracicaba e Sorocaba) a media mensal de gerações, no verão pode oscilar entre 0,71 a 1,28 ciclos/mês para *D. citri* e de 2,28 a 3,26 ciclos/mês para *T. radiata* (Figuras 15, 4, 5 e 6; Tabela 2). No outono, o número médio de ciclos/mês pode ser variável entre <0,33 a 1,09 e de <1,62 a 2,60 para a praga e o parasitóide, respectivamente (Figuras 6, 7, 8 e 9; Tabela 2). No inverno, este número deve variar de <0,33 a 0,71 ciclos/mês de *D. citri* e de <1,62 a 2,28 ciclos/mês para *T. radiata* (Figuras 9, 10, 11 e 12; Tabela 2). Na primavera, o número médio de ciclos/mês deve variar entre 0,52 a 1,09 e de 1,95 a 2,93 para a praga e o parasitóide, respectivamente (Figuras 12, 13, 14 e 15; Tabela 2).

Pelos resultados obtidos mediante o processamento dos dados e a geração dos mapas do número de gerações (período ovo – adulto, incluindo pré-oviposição) com o Sistema de Informações Geográficas (SIG) e com o Modelo de Elevação Digital (DEM-SRTM), nas áreas citrícolas do estado de São Paulo ao longo do ano (Figura 16; Tabela 2), pode ocorrer na região norte de 10 a 13 ciclos de *D. citri* e de 31 a 35 ciclos de *T. radiata*; na região nordeste, o número de ciclos pode variar de 6 a 10 e de 24 a 31 para a praga e para o parasitóide, respectivamente. Por outro lado, nas regiões sudoeste e sudeste, o número de gerações pode variar de 3 a 10 e de 19 a 31 para *D. citri* e *T. radiata*. Estes resultados apresentados referem-se a estimativas que deverão ser validadas em campo. Durante os meses de menor densidade populacional (no outono e inverno), além da menor temperatura, outros fatores como a pluviosidade devem contribuir diretamente (umidade relativa) e indiretamente (menor quantidade de brotações) para a diminuição populacional, especialmente de *D. citri*.

A presença de inimigos naturais, em qualquer agroecossistema, é fundamental para a regulação populacional da espécie hospedeira; no presente trabalho, pôde-se observar que o número de gerações de *T. radiata* é superior ao número de gerações do hospedeiro *D. citri*. Portanto, a população deste parasitóide depende da densidade populacional de seu hospedeiro, como todos os organismos estrategistas K. As estratégias r e K referem-se à alocação de recursos para a reprodução de organismos em geral (PIANKA, 1970), sendo que os organismos com estratégia r alocam mais e os com estratégia K alocam menos recursos. Este tipo de classificação leva à discussão sobre a existência ou ausência das diferenças entre as espécies em relação às suas estratégias reprodutivas, como consequência dos processos de seleção induzidos pelo ambiente, Dobzanski (1950) foi o primeiro em sugerir que a seleção natural opera de forma diferente dependendo das condições que prevalecem no ambiente. Para Price (1973) e Force (1972), a teoria das estratégias r e K é muito importante nos parasitóides, pelo fato de que com o passar do tempo ocorrem incrementos na população das espécies de parasitóides dependentes da capacidade de reprodução e da duração do ciclo de seus respectivos hospedeiros.

A abordagem metodológica utilizada neste trabalho e a base de dados desenvolvida poderão ser utilizadas para direcionar estudos de flutuação populacional da praga nas diferentes regiões citrícolas do estado, assim como poderão ser empregadas nos estudos para avaliar o potencial de utilização de *T. radiata* para o controle biológico de *D. citri*. Desta forma, com a possibilidade de integrar numa única base de dados, as informações espaciais provenientes de dados cartográficos e os dados biológicos da *D. citri* e de *T. radiata*, será possível, utilizar tal base como uma nova ferramenta para dar suporte para detecção, monitoramento e controle de *D. citri*. Um resumo dos resultados obtidos é apresentado na Tabela 2, sendo que tais resultados deverão ser validados em condições de campo para ajustes anteriores à sua utilização pelo agricultor.

Tabela 2 - Número provável de gerações de *Diaphorina citri* e de *Tamarixia radiata* em quatro regiões citrícolas do estado de São Paulo, com base na temperatura e umidade relativa e no Sistema de Informação Geográfica (SIG) durante as quatro estações do ano

Regiões		Norte		Nordeste		Sudoeste		Sudeste	
Estações/meses		Intervalos de variação (IV)							
		<i>D. citri</i>	<i>T. radiata</i>	<i>D. citri</i>	<i>T. radiata</i>	<i>D. citri</i>	<i>T. radiata</i>	<i>D. citri</i>	<i>T. radiata</i>
Verão	Dezembro	1,09 - 1,28	2,93 - 3,26	0,90 - 1,09	2,60 - 2,93	0,71 - 1,90	2,28 - 2,93	0,71 - 1,09	2,28 - 2,93
	Janeiro	1,09 - 1,28	2,93 - 3,26	0,90 - 1,09	2,60 - 2,93	0,90 - 1,90	2,60 - 2,93	0,90 - 1,09	2,60 - 2,93
	Fevereiro	1,09 - 1,28	2,93 - 3,26	0,90 - 1,28	2,60 - 3,26	0,90 - 1,90	2,60 - 2,93	0,90 - 1,28	2,60 - 3,26
	Março	0,90 - 1,28	2,60 - 3,26	0,71 - 1,09	2,28 - 2,93	0,71 - 1,09	2,28 - 2,93	0,71 - 1,09	2,28 - 2,93
Outono	Março	0,90 - 1,28	2,60 - 3,26	0,71 - 1,09	2,28 - 2,93	0,71 - 1,09	2,28 - 2,93	0,71 - 1,09	2,28 - 2,93
	Abril	0,71 - 1,09	2,28 - 2,93	0,52 - 0,90	1,95 - 2,60	0,33 - 0,90	1,62 - 2,60	0,52 - 0,90	1,95 - 2,60
	Maiο	0,52 - 0,90	1,95 - 2,60	0,33 - 0,71	1,62 - 2,28	<0,33 - 0,52	<1,62 - 1,95	0,33 - 0,71	1,62 - 2,28
	Junio	0,52 - 0,71	1,95 - 2,28	0,33 - 0,71	1,62 - 2,28	<0,33 - 0,52	<1,62 - 1,95	<0,33 - 0,52	<1,62 - 1,95
Inverno	Junio	0,52 - 0,71	1,95 - 2,28	0,33 - 0,71	1,62 - 2,28	<0,33 - 0,52	<1,62 - 1,95	<0,33 - 0,52	<1,62 - 1,95
	Julho	0,52 - 0,71	1,95 - 2,28	0,33 - 0,71	1,62 - 2,28	<0,33 - 0,52	<1,62 - 1,95	<0,33 - 0,52	<1,62 - 1,95
	Agosto	0,71 - 0,90	2,28 - 2,60	0,52 - 0,71	1,95 - 2,28	<0,33 - 0,71	<1,62 - 2,28	0,33 - 0,71	1,62 - 2,28
	Setembro	0,90 - 1,09	2,60 - 2,93	0,71 - 0,90	2,28 - 2,60	0,33 - 0,90	1,62 - 2,60	0,52 - 0,71	1,95 - 2,28
Primaveira	Setembro	0,90 - 1,09	2,60 - 2,93	0,71 - 0,90	2,28 - 2,60	0,33 - 0,90	1,62 - 2,60	0,52 - 0,71	1,95 - 2,28
	Outubro	0,90 - 1,28	2,60 - 3,26	0,71 - 1,09	2,28 - 2,93	0,52 - 0,90	1,95 - 2,60	0,52 - 0,90	1,95 - 2,60
	Novembro	0,90 - 1,28	2,60 - 3,26	0,71 - 1,09	2,28 - 2,93	0,71 - 1,90	2,28 - 2,93	0,71 - 1,09	2,28 - 2,93
	Dezembro	1,09 - 1,28	2,93 - 3,26	0,90 - 1,09	2,60 - 2,93	0,71 - 1,90	2,28 - 2,93	0,71 - 1,09	2,28 - 2,93
Anual	10,78 - 13,05	31,28 - 35,23	6,22 - 10,78	23,40 - 31,28	3,95 - 10,78	19,45 - 31,28	3,95 - 10,78	19,45 - 31,28	

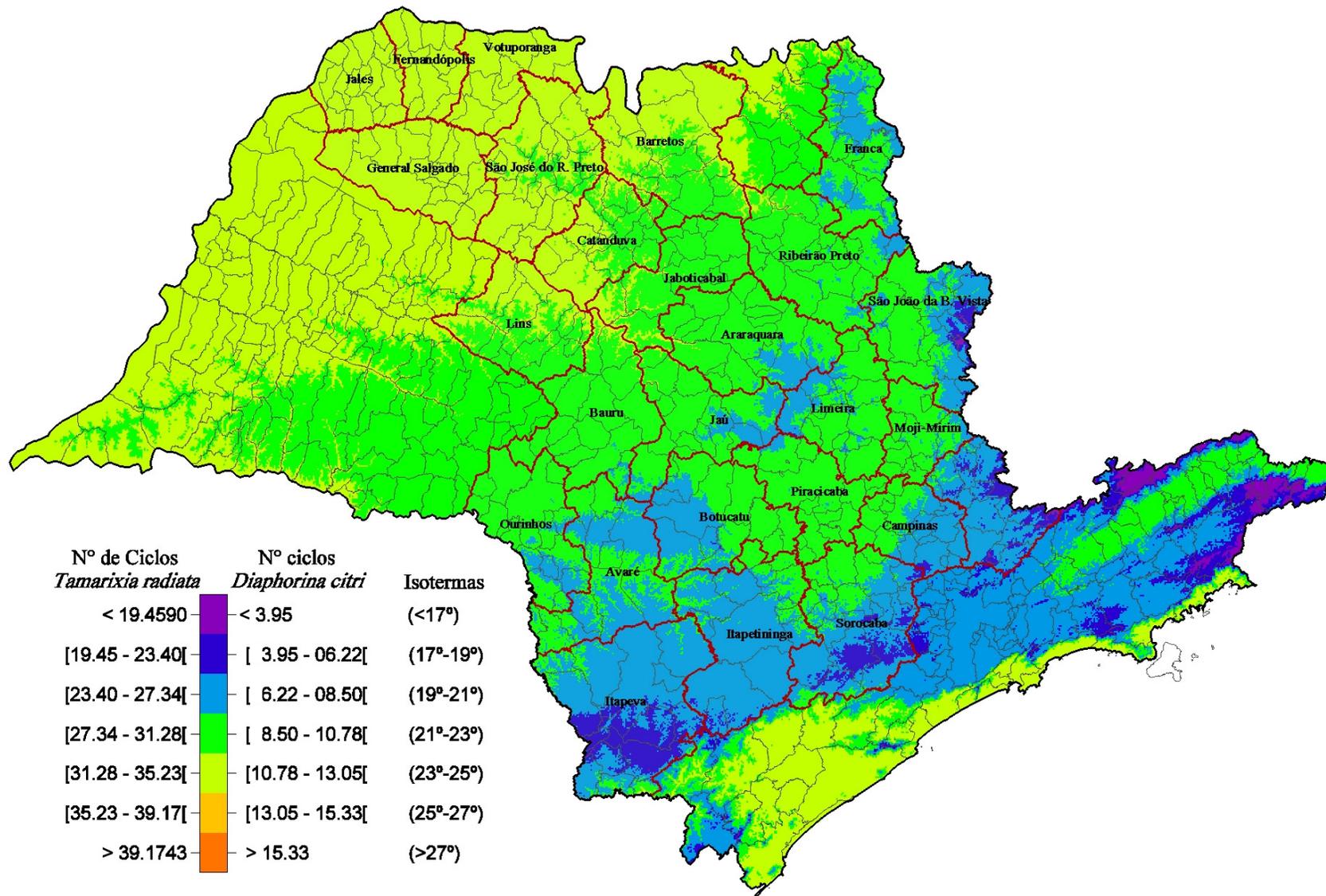


Figura 16 - Mapa de isotermas anual para o estado de São Paulo, mostrando o número de gerações anuais (período ovo - adulto, incluindo pré-oviposição) de *Tamarixia radiata* e *Diaphorina citri*, nos intervalos de <17°C; 17°C a 19°C; 19°C a 21°C; 21°C a 23°C; 23°C a 25°C; 25°C a 27°C e >27°C

7.3.4 Influência da umidade e temperatura na adaptação de *D. citri* e *T. radiata* nas regiões citrícolas do estado de São Paulo

Conforme relato de Nava et al. (2007), *D. citri* desenvolve-se melhor nas temperaturas entre 18 e 30°C e nas umidades relativas (UR) entre 70 e 85%. Por outro lado, para *T. radiata* conforme obtido na presente pesquisa, temperaturas entre 25 e 30°C e umidade relativa de 70% são as condições mais favoráveis para o parasitismo da espécie.

Nas áreas citrícolas de Barretos, Catanduva, Fernandópolis, General Salgado, Jales, São José do Rio Preto e Votuporanga, correspondentes à região norte do estado, durante o verão (dezembro a março) apresentam-se as melhores condições para o desenvolvimento e adaptação de *T. radiata* e para *D. citri* as condições mais favoráveis devem ocorrer entre dezembro e junho, meses que correspondem ao verão e outono no estado de São Paulo (Figuras 17 e 18), quando comparadas a Araraquara.

Em Araraquara, Franca, Jaboticabal, Ribeirão Preto e São João de Boa Vista, áreas correspondentes à região nordeste do estado (Figura 19), durante os meses de novembro a março (primavera - verão) ocorrem as condições de temperatura e umidade relativas mais favoráveis para o desenvolvimento, reprodução e sobrevivência de *T. radiata*; por outro lado, no caso de *D. citri* estas condições são registradas entre novembro a junho (verão - outono).

Na região sudoeste (Figuras 20 e 21), para *D. citri*, em Avaré ao longo do ano apresentam-se as condições favoráveis para seu desenvolvimento e adaptação, enquanto nas áreas de Bauru, Botucatu, Itapeva, Jaú, Lins e Ourinhos estes parâmetros favoráveis ocorrem entre novembro a junho (primavera - outono). Para *T. radiata*, nestas mesmas áreas, às épocas do ano mais adequadas ocorrerão no verão (dezembro - março).

Para o parasitóide *T. radiata*, as médias mensais de temperatura e umidade relativa mais favoráveis na região sudeste ocorrem durante o verão (dezembro - março), e para *D. citri* nas áreas de Bragança Paulista, Itapetininga e Sorocaba, estas condições serão favoráveis ao longo do ano. Nas áreas de Campinas, Limeira, Mogi Mirim, e Piracicaba os maiores índices populacionais desta praga deverão ocorrer entre novembro a junho (primavera - verão - outono) (Figuras 22 e 23).

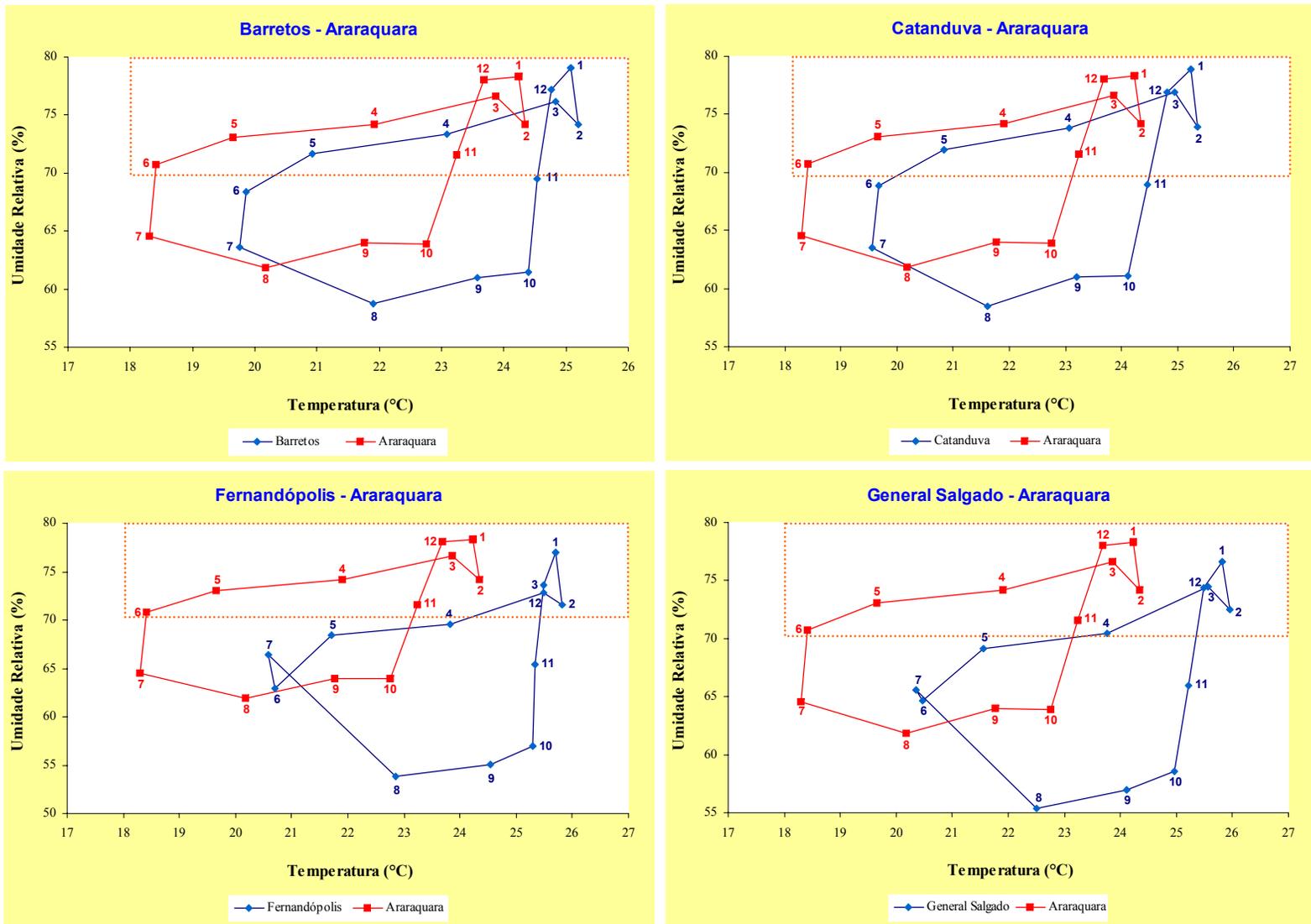


Figura 17 - Termohigrogramas das áreas citrícolas de Barretos, Catanduva, Fernandópolis e General Salgado, correspondentes à região norte do estado de São Paulo, comparadas com Araraquara, visando o zoneamento ecológico de *Tamarixia radiata* e *Diaphorina citri*. Os retângulos pontilhados correspondem às condições de temperatura e umidade relativa favoráveis à praga e o parasitóide

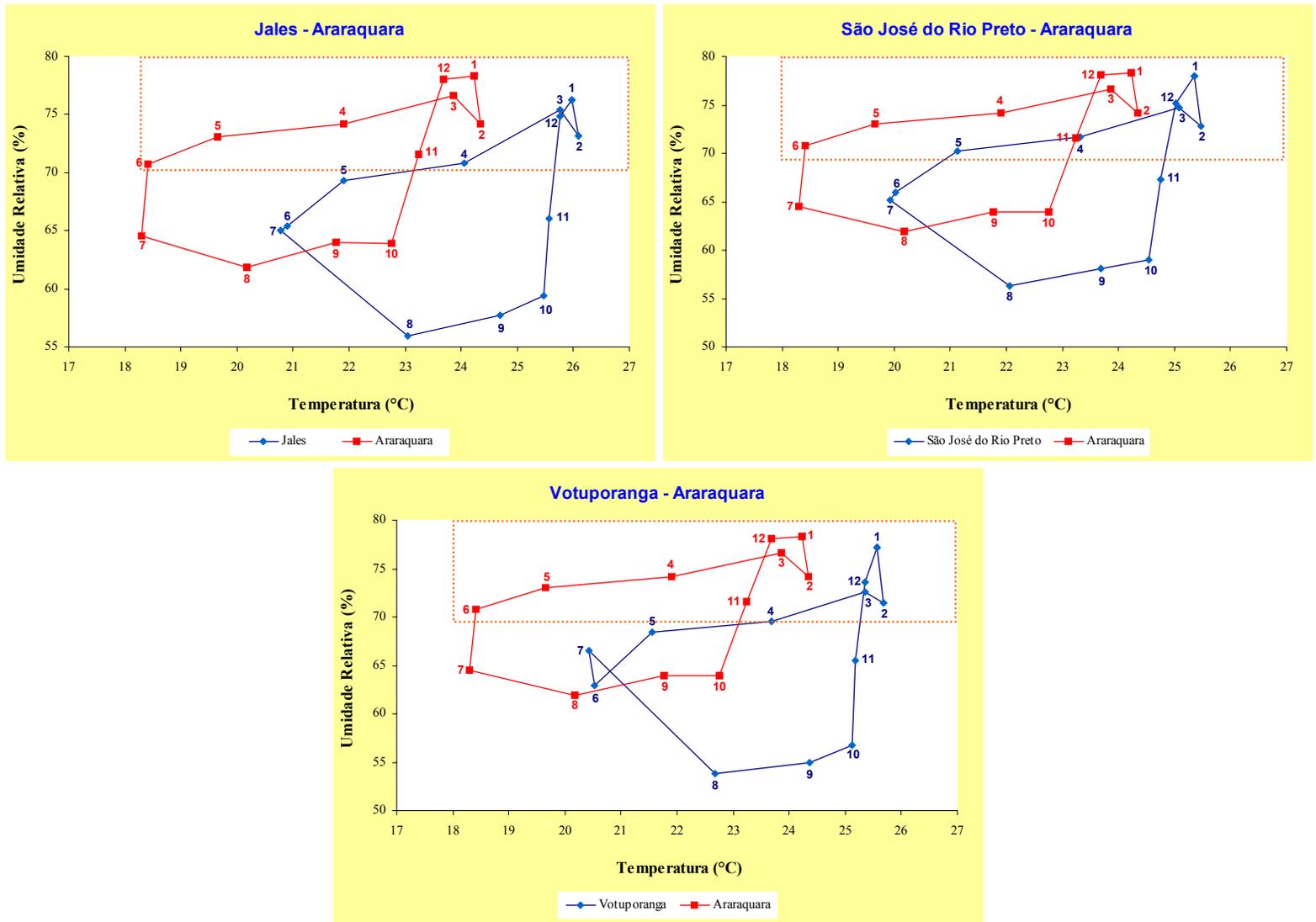


Figura 18 - Termohigrogramas das áreas citrícolas de Jales, São José do Rio Preto, e Votuporanga, correspondentes à região norte do estado de São Paulo, comparadas com Araraquara, visando o zoneamento ecológico de *Tamarixia radiata* e *Diaphorina citri*. Os retângulos pontilhados correspondem às condições de temperatura e umidade relativa favoráveis à praga e o parasitóide

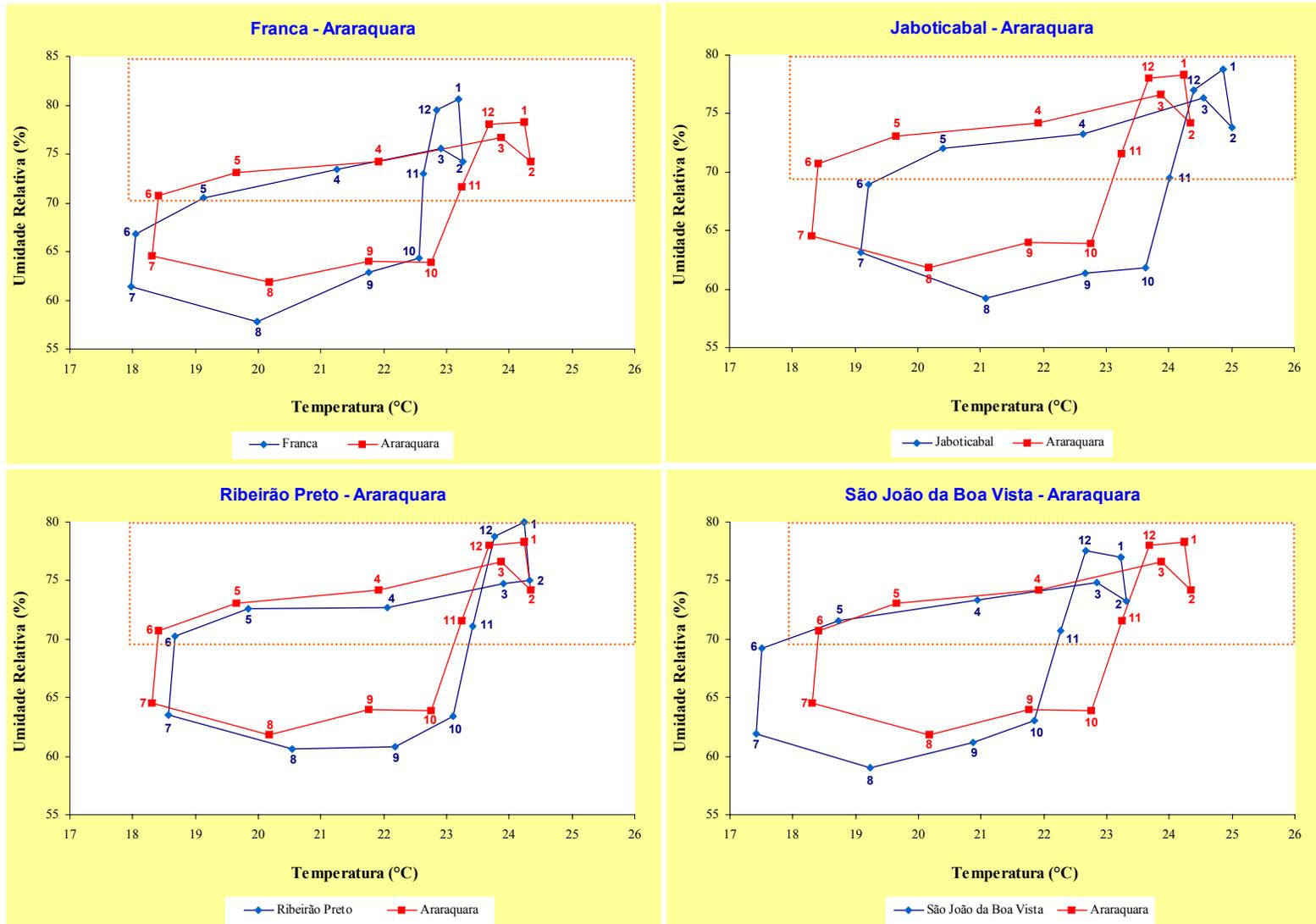


Figura 19 - Termohigrogramas das áreas citrícolas de Franca, Jaboticabal, Ribeirão Preto e São João de Boa Vista, correspondentes à região nordeste do estado de São Paulo, comparadas com Araraquara, visando o zoneamento ecológico de *Tamarixia radiata* e *Diaphorina citri*. Os retângulos pontilhados correspondem às condições de temperatura e umidade relativa favoráveis à praga e o parasitóide

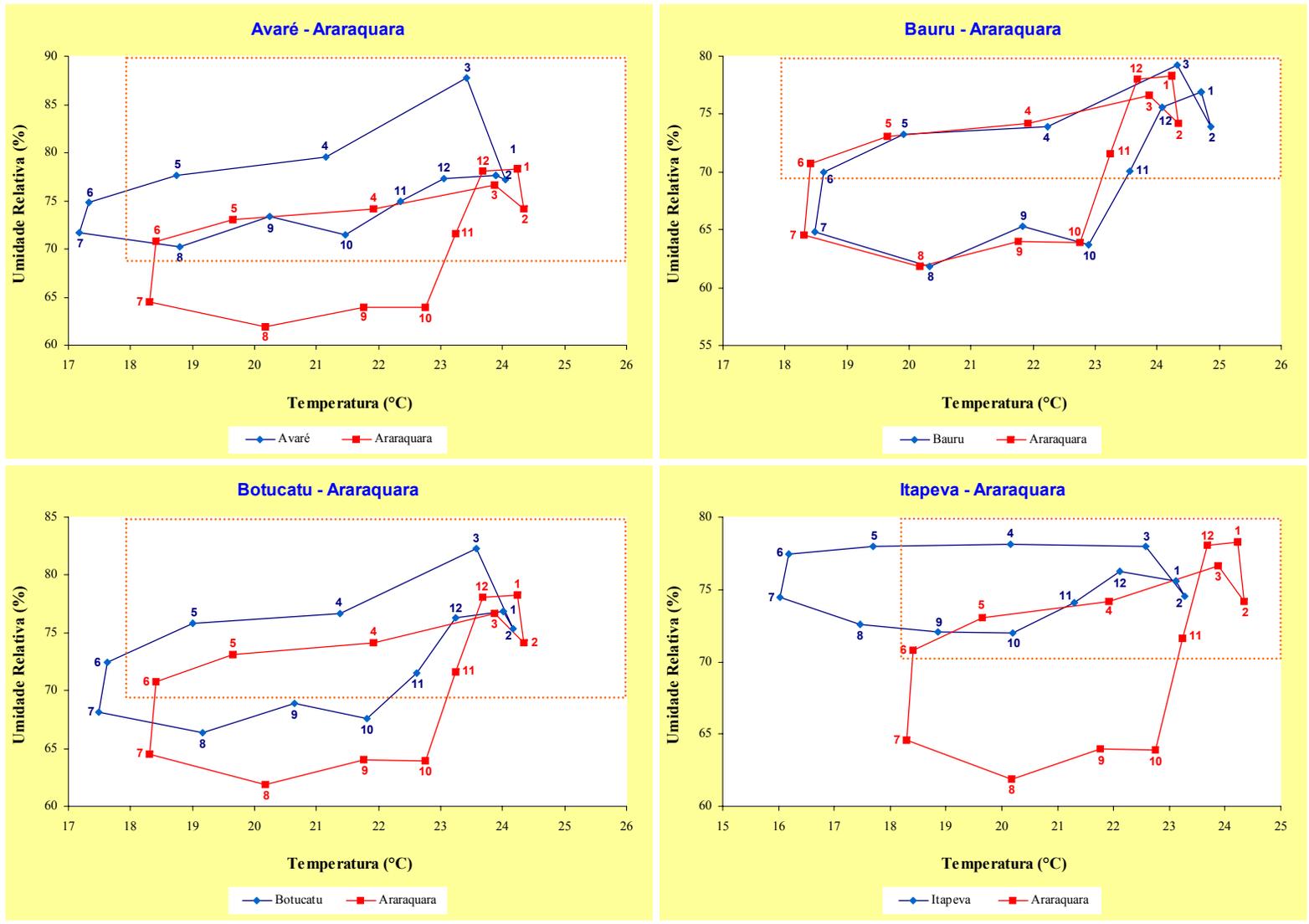


Figura 20 - Termohigrogramas das áreas citrícolas de Avaré, Bauru, Botucatu e Itapeva, correspondentes à região sudoeste do estado de São Paulo, comparadas com Araraquara, visando o zoneamento ecológico de *Tamarixia radiata* e *Diaphorina citri*. Os retângulos pontilhados correspondem às condições de temperatura e umidade relativa favoráveis à praga e o parasitóide

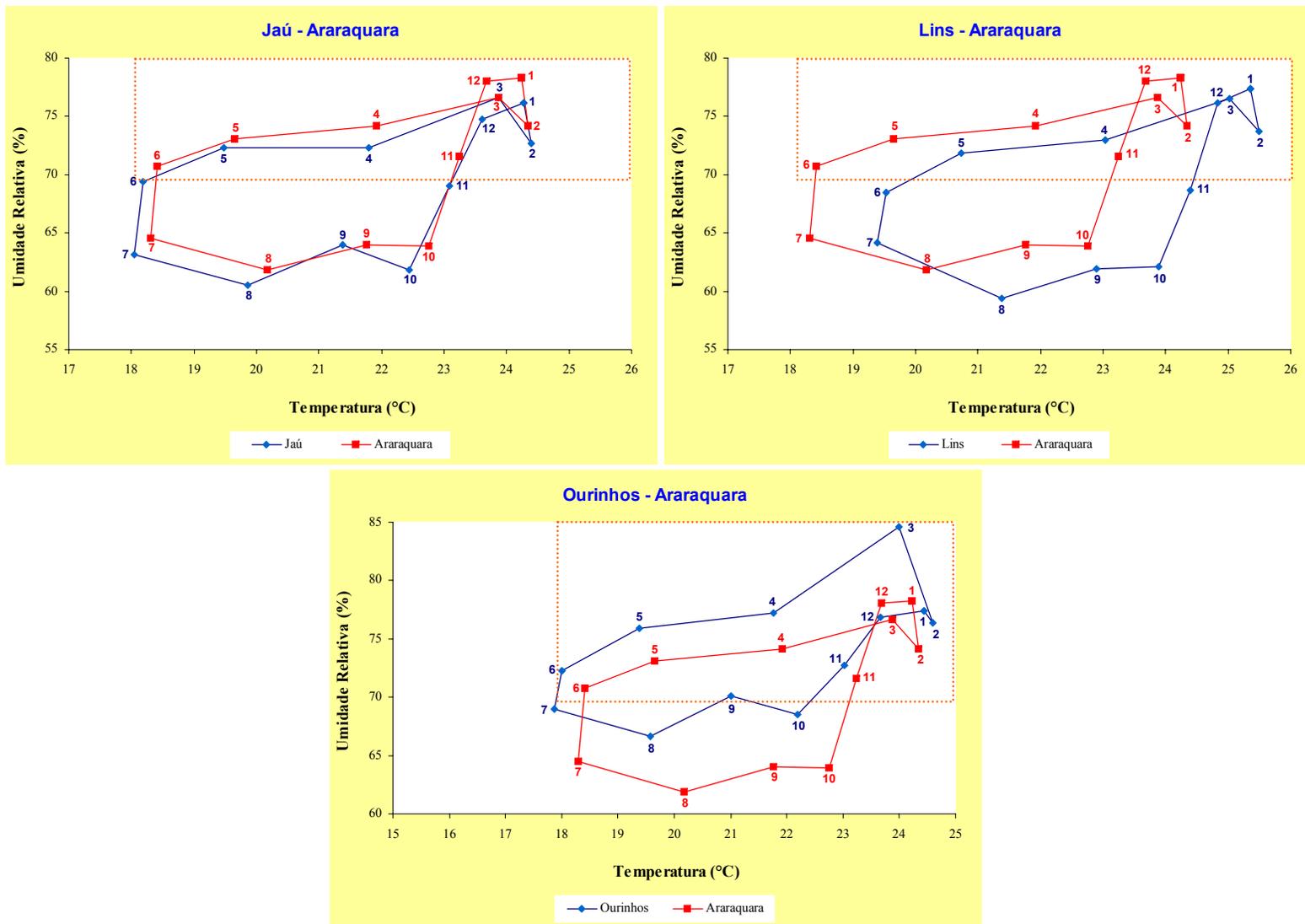


Figura 21 - Termohigrogramas das áreas citrícolas de Jaú, Lins e Ourinhos, correspondentes à região sudoeste do estado de São Paulo, comparadas com Araraquara, visando o zoneamento ecológico de *Tamarixia radiata* e *Diaphorina citri*. Os retângulos pontilhados correspondem às condições de temperatura e umidade relativa favoráveis à praga e o parasitóide

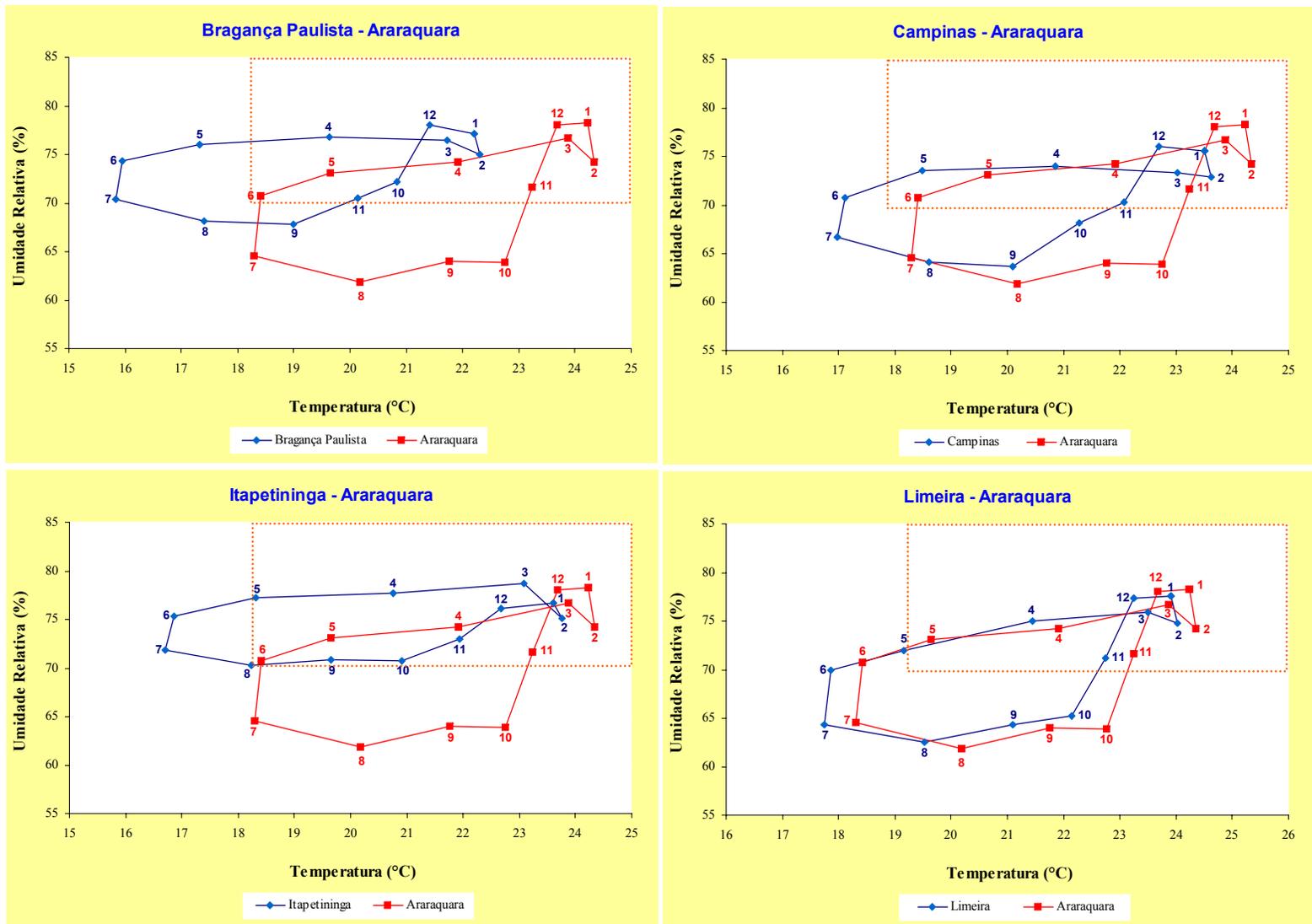


Figura 22 - Termohigrogramas das áreas citricolas de Bragança Paulista, Campinas, Itapetininga e Limeira, correspondentes à região sudeste do estado de São Paulo, comparadas com Araraquara, visando o zoneamento ecológico de *Tamarixia radiata* e *Diaphorina citri*. Os retângulos pontilhados correspondem às condições de temperatura e umidade relativa favoráveis à praga e o parasitóide

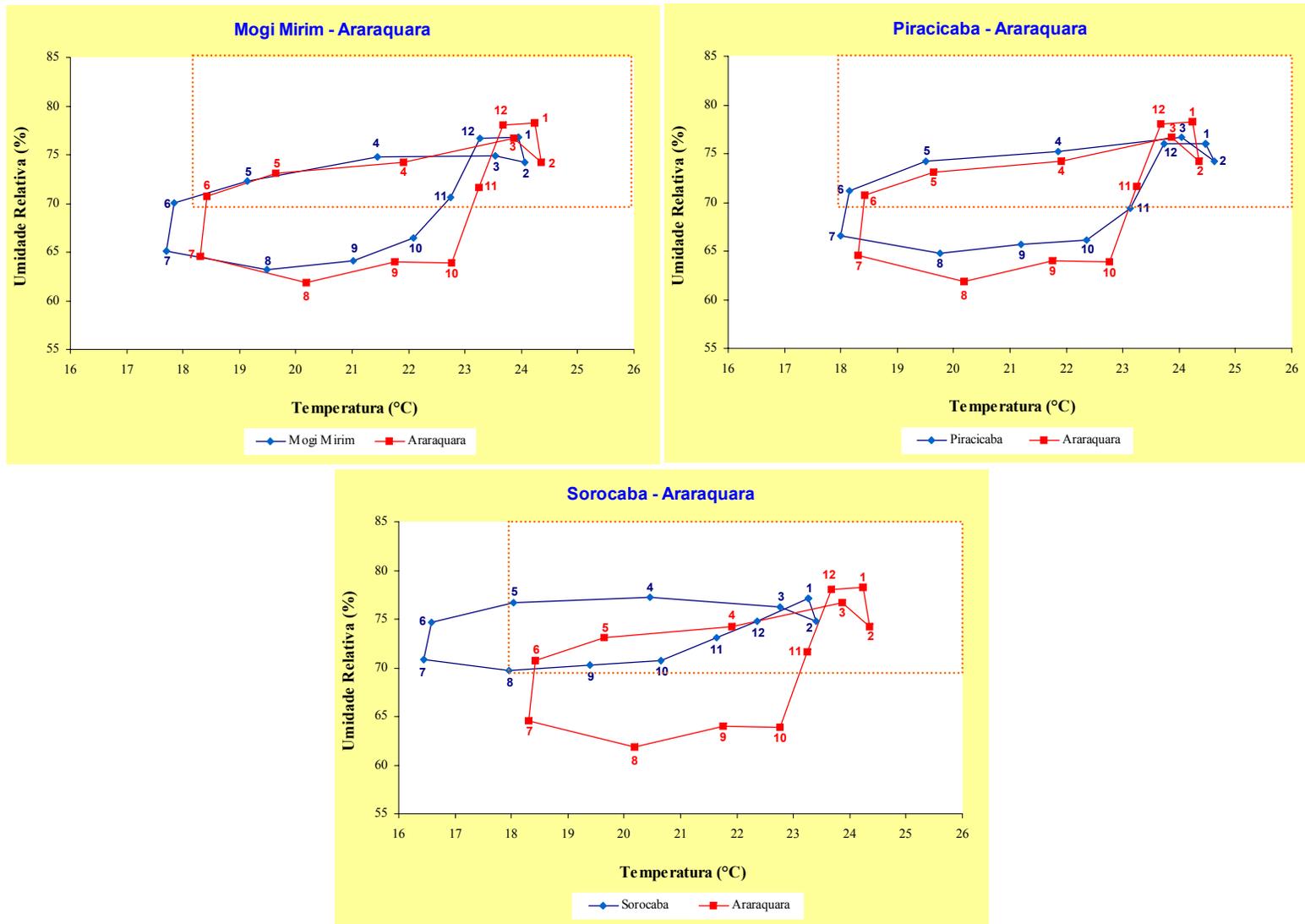


Figura 23 - Termohigrogramas das áreas citrícolas de Mogi Mirim, Piracicaba e Sorocaba, correspondentes à região sudeste do estado de São Paulo, comparadas com Araraquara, visando o zoneamento ecológico de *Tamarixia radiata* e *Diaphorina citri*. Os retângulos pontilhados correspondem às condições de temperatura e umidade relativa favoráveis à praga e o parasitóide

Nestas comparações, com relação às condições termohigrométricas mais favoráveis para o desenvolvimento de *D. citri*, observa-se que tem municípios bastante coincidentes com Araraquara como é o caso de Franca, Jaboticabal, Ribeirão Preto, Bauru, Jaú, Campinas, Limeira, Mogi Mirim e Piracicaba (Figuras 19, 20, 21, 22, 23). Em outros casos, como nos municípios de São João de Boa Vista, Itapeva, Bragança Paulista e Sorocaba (Figuras 19, 20, 22, 23), embora as médias mensais de temperatura possam ser menos favoráveis para *T. radiata*, as condições de umidade relativa destes municípios poderão ser muito favoráveis para o desenvolvimento, adaptação e estabelecimento deste parasitóide.

Baseando-se nos termohigrogramas das diferentes regiões citrícolas do estado de São Paulo, e levando-se em consideração as exigências térmicas e higrométricas tanto de *D. citri* como de seu parasitóide *T. radiata*, pôde-se observar que nas diferentes áreas, os níveis populacionais poderão ser bastantes variáveis, sendo que a maior incidência do psíldeo e conseqüentemente do seu parasitóide, ocorrerão naquelas regiões e épocas do ano com temperaturas mais elevadas e os aumentos populacionais coincidiriam com o início das chuvas e, conseqüentemente, com as brotações das plantas cítricas. Por outro lado, presença de plantas hospedeiras de *D. citri*, como a murta, poderão interferir nos níveis populacionais da praga e do parasitóide.

7.4 Conclusões

1. O tempo do desenvolvimento para o período ovo - adulto de *Tamarixia radiata* (Waterston, 1922) (Hymenoptera: Eulophidae) é inversamente relacionado com temperaturas na faixa de 18 a 32°C;
2. O limite térmico inferior de desenvolvimento (Tb) de *T. radiata* é de 7,13°C e a constante térmica (K) é de 188,7GD;
3. O parasitismo e a porcentagem de emergência de *T. radiata* sobre *Diaphorina citri* Kuwayama, 1907 (Hemiptera: Psyllidae) são maiores a 70% de umidade relativa;
4. Com base no sistema de informações geográficas (SIG), para o estado de São Paulo, a média mensal de gerações, na região norte, pode variar de 0,52 a 1,28 ciclos/mês para *D. citri* e de 1,95 a 3,26 ciclos/mês para *T. radiata*; na região nordeste o número médio de ciclos/mês pode

variar de 0,33 a 1,28 para *D. citri* e de 1,62 a 3,26 para de *T. radiata*; nas regiões sudoeste e sudeste, o número médio de ciclos/mês pode variar de <0,33 a 2,60 para *D. citri* e de <1,62 a 2,93 para de *T. radiata*.

5. Ao longo do ano, podem ocorrer na região norte de 10 a 13 ciclos de *D. citri* e de 31 a 35 ciclos de *T. radiata*; na região nordeste, o número de ciclos pode variar de 6 a 10 e de 24 a 31 para a praga e para o parasitóide, respectivamente. Para as regiões sudoeste e sudeste, o número de gerações pode variar de 3 a 10 e de 19 a 31 para *D. citri* e *T. radiata*, respectivamente;
6. Nas diferentes regiões citrícolas do estado de São Paulo, e levando-se em consideração as exigências térmicas e higrométricas tanto de *D. citri* como de seu parasitóide *T. radiata*, a maior incidência da praga e, conseqüentemente do parasitóide, ocorrem naquelas regiões e épocas do ano com temperaturas mais elevadas e os aumentos populacionais devem coincidir com o aumento das chuvas e com as brotações das plantas cítricas.

Referências

- ARNOLD, C.Y. The determination and significance of the base temperature in a linear heat unit system. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 74, p. 430-445, 1959.
- BAZZOCCHI, G.G.; LANZONI, A.; BURGIO, G.; FIACCONI, M.R. Effects of temperature and host on the pre-imaginal development of the parasitoid *Diglyphus isaea* (Hymenoptera: Eulophidae). **Biological Control**, Orlando, v. 26, p. 74-82, 2003.
- BLUMBERG, D. Parasitoid encapsulation as a defense mechanism in the Coccoidea (Homoptera) and its importance in biological control. **Biological Control**, Orlando, v. 8, p. 225-236, 1997.
- CHIEN, C.C.; CHU, Y. I. Biological control of citrus psyllid, *Diaphorina citri* in Taiwan. Biological pest control in systems of integrated pest management. **Reprinted from Food and Fertilizer Technology Center Book Series**, Taipei, n. 47, p. 93 –104, 1996.
- CHU, Y.I.; CHIEN, C.C. Utilization of natural enemies to control psyllid vectors transmitting citrus greening. In: KIRITANI, K.; SU, H.J.; CHU, Y.I. (Ed.). **Integrated control of plant virus diseases**. Taipei: Food and Fertilizer Technology Center for the Asian and Pacific Region, 1991. p. 135-145.

DAVIS, P.M.; BRENES, N.; ALLEE, L.L. Temperature dependent models to predict regional differences in corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) phenology. **Environmental Entomology**, College Park, v. 25, p. 767-775, 1996.

DUALE, A.H. Effect of Temperature and relative humidity on the biology of the stem borer parasitoid *Pediobius furrvus* (Gahan) (Hymenoptera: Eulophidae) for the management of stem borers. **Environmental Entomology**, College Park, v. 34, p. 1-5, 2005.

DOBZANSKY, T. H. Evolution in the tropics. **American Scientist**, New Haven, v. 38, p. 209-221, 1950.

ÉTIENNE, J.; QUILICI, S.; MARINAL, D.; FRANCK, A. Biological control of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in Guadeloupe by imported *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae). **Fruits**, Paris, v. 56, p. 307-315, 2001.

FERREIRA DE ALMEIDA, M.A.; PIRES DO PRADO, A.; GEDEN, C.J. Influence of temperature on development time and longevity of *Tachinaephagus zealandicus* (Hym., Encyrtidae), and effects of nutrition and emergence order on longevity. **Environmental Entomology**, College Park, v. 31, p. 375-380, 2002.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. **AGRIANUAL 2007**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2007. 516 p.

FORCE, D.C. R and K strategists in endemic host-parasitoid communities. **Bulletin of the Entomological Society of America**, Washington, v. 18, p. 135-137, 1972.

FUNDECITRUS. Greening chega às regiões Norte e Sul do Estado. **Revista Fundecitrus**, Araraquara, v. 124, p. 8-11, 2004.

_____. Descoberta nova bactéria que causa greening. **Revista Fundecitrus**, Araraquara, v. 141, p. 6-8, 2007.

GEDEN, C.J. Development models for fifth fly parasitoids *Spalangia gemina*, *Spalangia cameroni*, and *Muscidifurax rapter* (Hymenoptera: Pteromalidae) at constant and variable temperatures. **Biological Control**, Orlando, v. 9, p. 185-192, 1997.

GÓMEZ TORRES, M.L.; PARRA, J.R.P. Biology and determination of temperature requirements in *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae). In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ENTOMOLOGY, 23., 2008, Durban. **Proceedings...** Durban: Entomological Society of Southern Africa, 2008. p. 197.

_____. Bioecological studies with *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae) for *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) control. In: X EUROPEAN WORKSHOP ON INSECT PARASITOIDS, 10., 2007, Erice. **Proceedings...** Erice (Sicily): University of Palermo and University of Napoli "Federico II", 2007. v. 1, p. 122.

GÓMEZ TORRES, M.L.; NAVA, D.E.; GRAVENA, S.; COSTA, V.A.; PARRA, J.R.P. Primeiro registro de *Tamarixia radiata* (Waterston) (Hymenoptera: Eulophidae) em *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) no Brasil. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 81, p. 112-117, 2006.

HADDAD, M.L.; PARRA, J.R.P.; MORAES, R.C.B. **Métodos para estimar os limites térmicos inferior e superior de desenvolvimento de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1999. 29 p.

HAMADA, E.; MORANDI, M.A.B.; TAMBASCO, F.J.; PEREIRA, D.A.; EVANGELISTA, S. **Estimativa de áreas favoráveis à ocorrência da *Diaphorina citri* (vetor do greening asiático) no Estado de São Paulo**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2007. Disponível em: <<http://www.cenargen.embrapa.br/publica/trabalhos/cot058.pdf>>. Acesso em: 10 jun. 2008.

HARRISON, W.W.; KING, E.G.; OUTZ, J.D. Development of *Trichogramma pretiosum* at five different temperature regimens. **Environmental Entomology**, College Park, v. 14, p. 118-121, 1985.

HOY, M.A.; NGUYEN, R. Classical biological control of Asian citrus psylla. **Citrus Industry**, Tampa, v. 81, p. 48-50, 2000.

KING, E.G.; BULL, D.L.; BOUSE, L.R.; PHILLIPS, J.R. Introduction: biological control of *Heliothis* spp. in cotton by augmentative releases of *Trichogramma*. **Southwest Entomology**, Oklahoma, 8:1-10, 1985.

MIRANDA, E.E. **Brasil em relevo**. Campinas: Embrapa Monitoramento por Satélite, 2005. Disponível em: <<http://www.relevobr.cnpm.embrapa.br>>. Acesso em: 01 abr. 2005.

MARTINEZ, A.L.; WALLACE, J.M. Citrus leaf mottle-yellows disease in the Philippines and transmission of the causal virus by a psyllid, *Diaphorina citri*. **Plant Disease Reporter**, Washington, v. 58, p. 692-695, 1967.

MINKENBERG, O.P.J.M. Temperature effects on the life history of the eulophid wasp *Diglyphus isaea*, an ectoparasitoid of leafminers (*Liriomyza* spp.), on tomatoes. **The Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 115, p. 381-397, 1989. NAVA, D.E.; GÓMEZ TORRES, M.L.; RODRIGUES, M.D.A.; BENTO, J.M.S.; PARRA, J.R.P. Biology of *Diaphorina citri* (Hem., Psyllidae) on different hosts and at different temperatures. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 131, p. 709-715, 2007.

PARRA, J.R.P. Biologia comparada de *Perileucoptera coffeella* (Guérin-Méneville, 1842) (Lepidoptera: Lyonetiidae) visando seu zoneamento ecológico no Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Entomologia**, Curitiba, v. 29, p. 45-76, 1985.

PARRA, J.R.P.; GÓMEZ TORRES, M.L.; PAIVA, P.E.B. Eficiência do parasitóide *Tamarixia radiata* para o controle biológico do psilídeo *Diaphorina citri* em São Paulo. **Citricultura Atual**, Cordeirópolis, v. 61, p. 18-19, 2007.

PIANKA, E.R. On r- and K-selection. **The American Naturalist**, Chicago, v. 104, p. 592-597, 1970.

PRICE, P.W. Parasitoid strategies and community organization. **Environmental Entomology**, College Park, v. 2, p. 623-625, 1973.

RODRIGUEZ-LADO, L., SPAROVEK, G., VIDAL-TORRADO, P. Modelling air temperature for the state of São Paulo, Brazil. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 64, p. 460-467, 2007.

SAS INSTITUTE. **Statistical Analysis System**: getting started with the SAS learning. Cary, 2002. 81 p.

TEIXEIRA, D.C.; SAILLARD, C.; EVEILLARD, S.; DANET, J.L.; DA COSTA, P.I.; AYRES, A.J.; BOVÉ, J. *Candidatus Liberibacter americanus*, associated with citrus huanglongbing (greening disease) in São Paulo State, Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 55, p. 1857-1862, 2005.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)