Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Caracterização do aparelho bucal e comportamento alimentar de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) em *Citrus sinensis* (L.) Osbeck

Jean Patrick Bonani

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.

Jean Patrick Bonani
Engenheiro Agrônomo

Caracterização do aparelho bucal e comportamento alimentar de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) em *Citrus sinensis* (L.) Osbeck

Orientador:
Prof. Dr. **JOÃO ROBERTO SPOTTI LOPES**

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

Bonani, Jean Patrick
Caracterização do aparelho bucal e comportamento alimentar de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) em *Citrus sinensis* (L.) Osbeck / Jean Patrick Bonani. - - Piracicaba, 2009.
82 p. : il.

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

1. Comportamento alimentar 2. Frutas cítricas 3. Greening (Doenças de plantas) 4. Hemiptera 5. Insetos vetores 6. Microscopia eletrônica 7. Morfologia animal I. Título

CDD 595.75
B212c

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

DEDICO

Aos meus amados pais, Alécio Bonani e Marli Moreira Bonani, por terem me concedido a oportunidade de viver. Pelo exemplo de vida e união, mas principalmente pela educação que é a maior herança que um filho pode herdar de seus pais! Sem vocês jamais seria ou estaria onde estou! Obrigado por vocês existirem!!

OFEREÇO

Aos meus queridos irmãos, Nádia, Nilson e Wellington!

Aos meus sobrinhos Júlia, Thiago e Lucas!

Aos meus cunhados Bentão, Nilce, Fabiana e Gisele

Aos meus sogros, José Greghi e D. Tata.

Aos meus adorados avós Paulo Moreira & Maria e tia Marilda que onde estiverem sempre estarão olhando por mim!

AGRADEÇO

A Deus, por tudo que estou vivendo, pela oportunidade de acordar a cada dia e dizer eu sou capaz.

"Saiba viver eternamente, buscando estudar e aprender coisas úteis e proveitosas a você e ao próximo.

Quando paramos de aprender e de progredir, começamos a morrer realmente.

Aprenda o mais que puder, em todos os ramos do saber, para iluminar ao máximo o seu espírito.

Aproveite todos os seus minutos, para aprender e para aumentar seus conhecimentos".

Minutos de Sabedoria

À minha querida e adorada esposa Gi.

Obrigado meu amor,

por todo incentivo, pela paciência, pelos conselhos, por ter me acompanhado ao exterior nesta etapa do Doutorado, por sempre estar ao meu lado e principalmente por você fazer parte da minha vida.

Te amo guapa!!!!

"Na vida tudo devemos fazer com amor, pois só o amor constrói obras eternas e penetra profundamente o coração de todos nós!"

Jean Patrick Bonani

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. João Roberto Spotti Lopes pela orientação, ensinamentos, condição harmoniosa de trabalho e pela oportunidade única de ter realizado parte deste doutoramento no exterior, que, de forma brilhante, contribuíram para minha vida profissional e pessoal e, acima de tudo pela amizade.

Ao Dr. Alberto Fereres (ICA/CSIC/Madrid) pela co-orientação, ensinamentos, receptividade e amizade, os quais foram de extrema importância para concretização deste trabalho.

A Dra. Eliza Garzo (ICA/CSIC/Madrid) pela orientação nas análises de dados, pela participação especial nos trabalhos de microscopia eletrônica e principalmente por estado sempre presente em minha estada em Madrid.

Ao Dr. Ernesto Prado, pelas sugestões e todo conhecimento transmitido na área de EPG.

A Dra. Beatriz Appezzato-da-Glória, pela orientação na área de Histologia e Anatomia Vegetal, por ter disponibilizado o laboratório para estudos da bainha estiletar, etapa fundamental para o desenvolvimento de toda experimentação.

A responsável técnica pelo laboratório de anatomia vegetal (Dep. Ciências Biológicas ESALQ/USP) Marli Kasue Misaki Soares pelos ensinamentos e orientação no processo de cortes histológicos

Aos professores do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da ESALQ/USP, pelos ensinamentos ministrados.

Aos professores Celso, João Lopes, Parra, e Sérgio (*in memorian)* pelos ensinamentos passados na docência quando tive o privilégio de ser estagiário auxiliando nas disciplinas de Entomologia Geral e Pragas das Plantas Cultivadas ministradas no curso de Engenharia Agronômica.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) pela concessão de bolsas de estudos no Brasil e Exterior e apoio financeiro para realização deste trabalho.

Ao amigo Pedro Belicuas pela convivência desde a graduação em Lavras até ao primeiro ano de doutorado em Piracicaba.

Aos companheiros de trabalho e amigos do Laboratório de Insetos Vetores: Arthur, Alexandre, Cristiane, Danilo, Daniele, Fernanda, Flávio, Joyce, Juliana, Isolda, Lucas, Marcelo, Maria Tereza, Ricardo, Rodrigo, Rudiney pela convivência ajuda e acima de tudo a convivência harmoniosa ao longo desses quatro anos.

Aos amigos do Laboratório de Insectos Vectores de Patógenos de Plantas (CCMA/CSIC, Madrid): Beatriz, Eliza, Nacho e Saioa pela constante presença, receptividade e ajuda em todos os momentos; Mar, Maria, Poti, Victor, Jorge, David, Mónica e María José (pelos trabalhos em cooperação) pela ajuda e convivência harmoniosa, ainda (ICA/CSIC): Ainoa, Javi, Assusena e Juanjo.

Aos amigos de Pós-graduação em Entomologia, pelo companheirismo e momentos de descontração.

Aos funcionários do setor de Entomologia da ESALQ/USP pela amizade e cooperação

SUMÁRIO

RESUMO..... 09
ABSTRACT..... 10
1 INTRODUÇÃO..... 11
Referências..... 14
2 ASPECTOS MORFOLÓGICOS DO APARATO BUCAL DE *Diaphorina citri* Kuwayama (HEMIPTERA: PSYLLIDAE)..... 16
Resumo..... 16
Abstract..... 16
2.1 Introdução..... 17
2.2 Desenvolvimento..... 18
2.2.1 Material e Métodos..... 18
2.2.2 Resultados..... 20
2.2.3 Discussão..... 22
Referências..... 29
3 CARACTERIZAÇÃO DAS FORMAS DE ONDA "ELECTRICAL PENETRATION GRAPHS" (EPG) de *Diaphorina citri* KUWAYAMA (HEMIPTERA: PSYLLIDAE), VETOR DE *Candidatus* Liberibacter spp. EM CITROS..... 32
Resumo..... 32
Abstract..... 33
3.1 Introdução..... 33
3.2 Desenvolvimento..... 35
3.2.1 Material e Métodos..... 35
3.2.2 Resultados..... 37
3.2.3 Discussão..... 41
Referências..... 52
4 INFLUÊNCIA DA IDADE DA FOLHA CÍTRICA NO COMPORTAMENTO ALIMENTAR DE *Diaphorina citri* Kuwayama (HEMIPTERA: PSYLLIDAE) E NA AQUISIÇÃO DE *Candidatus* Liberibacter asiaticus..... 56
Resumo..... 56
Abstract..... 56

4.1 Introdução..... 57
4.2 Desenvolvimento..... 59
4.2.1 Material e Métodos..... 59
4.2.2 Resultados e Discussão..... 64
4.2.3 Conclusões..... 71
Referências..... 77
EPÍLOGO..... 81

RESUMO

Caracterização do aparelho bucal e comportamento alimentar de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) em *Citrus sinensis* (L.) Osbeck

O psilídeo *Diaphorina citri* é vetor das bactérias *Candidatus* Liberibacter asiaticus e *Ca.* L. americanus, associadas ao Huanglongbing (HLB) dos citros. Apesar da grande importância desta doença no mundo, sabe-se pouco sobre a atividade alimentar deste vetor, o que seria fundamental para entender o processo de transmissão desses patógenos e aprimorar estratégias de manejo da doença. Assim, esta pesquisa teve por objetivos: a) examinar aspectos morfológicos do aparato bucal de *D. citri*; b) caracterizar o seu comportamento alimentar em mudas de laranja doce (*Citrus sinensis*) através da técnica de *Electrical Penetration Graph* (EPG)-sistema DC; e c) avaliar o efeito da idade de folhas cítricas na penetração estiletar deste inseto e na eficiência de aquisição de *Ca*. L. asiaticus. Adultos de *D. citri* apresentam um rostro que se projeta logo após o par de coxas protoráxicas. Verificou-se que na extremidade distal desta estrutura há quatro pares de sensilas em simetria bilateral. O rostro abriga um feixe de quatro estiletes (2 mandíbulas e 2 maxilas) com comprimento médio de 512 µm. Os estiletes maxilares se acoplam formando os canais alimentar e salivar com diâmetros de 0,90 µm e 0,47 µm, respectivamente; esses dois canais se fundem próximo à extremidade distal de uma das maxilas para formar um canal comum, que se estende por, aproximadamente, 4,1 µm. No estudo de EPG, as formas de onda foram descritas quanto à amplitude, frequência, nível de voltagem e origem elétrica, sendo correlacionadas com atividades estiletares baseando-se em análises histológicas da posição da extremidade distal da bainha salivar no tecido vegetal e semelhanças com outras formas de onda descritas para afídeos. Cinco formas de onda foram descritas: (C) penetração intercelular no parênquima; (D) contato com o floema; (E1) salivação no floema; (E2) ingestão no floema; e (G) ingestão no xilema. Com um tempo médio de 206,1 min em 8 h de registro, a ingestão no floema (E2) é a principal atividade observada em *D. citri.* O tempo médio para atingir o floema desde a primeira prova é de 154 min, após 20,3 provas. *D. citri* mostra nítida preferência por folhas novas da porção superior da planta (71,3% dos indivíduos), e pela nervura principal na face abaxial das folhas (87,1%). Cortes histológicos revelam que folhas maduras apresentam lignificação nas paredes de células que compõem a camada de fibras, tecido que antecede o feixe floemático; já as folhas novas não apresentam esse espessamento, favorecendo o caminhamento estiletar rumo ao floema. Adultos de *D. citri* adquirem *Ca*. L. asiaticus com maior eficiência em folhas novas (assintomáticas) do que em folhas maduras (sintomáticas) de plantas infectadas. Aplicando-se a técnica de EPG, verificou-se que as folhas novas favorecem a alimentação floemática de *D. citri*; quase que a totalidade dos indivíduos avaliados sobre folhas novas assintomáticas encontraram o floema e permaneceram por mais tempo neste tecido, o que não foi constatado sobre folhas maduras sintomáticas. Esta pesquisa mostra que o comportamento alimentar de *D. citri* é influenciado pela idade das folhas cítricas, com implicações sobre a eficiência de aquisição da bactéria.

Palavras-chave: Hunglonbing; Doença dos citros; Inseto vetor; *Diaphorina citri*; Comportamento alimentar; Peças bucais; EPG

ABSTRACT

Caracterization of the mouth aparatus and feeding behavior of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) on *Citrus sinensis* (L.) Osbeck

The Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, is the vector of the phloem-limited bacteria *Candidatus* Liberibacter asiaticus and *Ca.* L. americanus, which are associated to the serious disease known as Citrus Huanglongbing (HLB). Despite the importance of this disease worldwide, little is known about the feeding activities of the vector, which is essential to understand transmission mechanisms and establish disease management strategies. Thus, the goals of this research were to examine the morphology of *D. citri* mouth apparatus, to characterize its probing behavior on sweet orange (*Citrus sinensis*) seedlings by using the Electrical Penetration Graph (EPG)-DC technique, and to assess the effect of citrus leaf age on the stylet penetration and efficiency of acquisition of *Ca*. L. asiaticus. *D. citri* shows a cone-shaped rostrum that extends itself to behind the prothoracic pair of thighs. By electron microscopy, we found four pairs of sensilla symmetrically distributed on the distal end of the rostrum. The rostrum houses a stylet bundle comprised of two mandibulae and two maxillae with mean length of 512 µm. The two maxillary stylets are hold together and have internal grooves that form the food and salivary duct, with mean diameters of 0.9 and 0.47 µm, respectively. These two canals merge at a distance of 4.1 µm from the distal tip of the stylets, forming a common duct. In the EPG study, waveforms were described according to characteristics of amplitude, frequency, voltage level and electrical origin, and correlated with stylet activities based on histological analysis of salivary sheath termini in the plant tissue and similarities with EPG waveforms previously described for aphids. Five distinct waveform types were described: (C) intercellular stylet pathway through parenchyma, (D) phloem contact, (E1) salivation in the phloem sieve tubes, (E2) phloem sap ingestion, and (G) in xylem sap ingestion. Phloem sap ingestion (E2) is the main activity observed for *D. citri,* with an average time of 206.1 min in 8 h of recordings. Mean time to reach sieve tubes from the first probe is 154 min, after 20.3 probes. This insect shows a clear preference for young leaves of the upper portion of the plant (71.3% of the individuals), and main vein on the abaxial leaf surface (87.1%). Mature leaves show lignification in cell walls of the fiber layer adjacent to the phloem. In contrast, young leaves do not show cell wall thickening in this fiber layer, favoring stylet pathway towards the phloem. Adults of *D. citri* acquired L. Ca asiaticus with greater efficiency on young (asymptomatic) leaves than in mature (symptomatic) leaves from infected plants. Applying the EPG technique, it was found that young asymptomatic leaves favor phloem feeding by *D. citri*, since most individuals reached phloem sieve tubes and remained longer in this tissue; this was not the case for individuals confined on mature symptomatic leaves. This study shows that feeding behavior of *D. citri* is influenced by citrus leaf age, with implication on efficiency of bacterial acquisition from infected plants.

Keywords: Huanglonbing; Citrus disease; Insect vector; *Diaphorina citri*; Feeding behavior; Mouth apparatus, EPG

1 INTRODUÇÃO

A citricultura é uma das atividades agrícolas de maior relevância no mundo, ocupando uma posição de destaque na economia brasileira, seja pela comercialização de frutos "in natura", ou pela exportação de sucos concentrados. De acordo com a Associação Brasileira dos Exportadores de Citros (2009), o Brasil é responsável por 27% da produção mundial de laranja e 53% do total de suco de laranja consumido no planeta, um dos mais importantes itens de exportação do país. O estado de São Paulo responde por três quartos da produção e da área dedicada à citricultura no país (NEVES, 2003), sendo a principal zona de exportação de suco de laranja concentrado (SLC) do mundo (ESCOBAR et al., 1999).

A cultura dos citros é uma das que apresenta maior número de pragas, dentre estas o psilídeo-dos-citros, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), que se tornou importante a partir de 2004 no Brasil como vetor do agente causal do "Greening" dos citros. Os danos diretos causados pelo psilídeo devido à sucção contínua de seiva não representam ameaça ao pomar. Esta doença, oficialmente denominada Huanglongbing (HLB), foi constatada em pomares cítricos das regiões Centro e Sul do Estado de São Paulo, em julho de 2004, estando associada a bactérias gram negativas e restritas aos vasos do floema das plantas, pertencentes ao gênero *Candidatus* Liberibacter (COLETTA-FILHO et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2005). O psilídeo assume posição de destaque neste patossistema por transmitir tanto a forma asiática de HLB, associada à bactéria *Ca.* L. asiaticus, como também a forma americana, associada à nova espécie *Ca.* L. americanus (YAMAMOTO et al., 2006), estando ambas as espécies presentes em pomares paulistas.

Plantas cítricas infectadas desenvolvem sintomas em folhas e frutos principalmente. Em folhas os sintomas se manifestam de duas formas: sintomas primários, caracterizado pelo amarelecimento ao longo das nervuras e manchas cloróticas irregulares; e secundários, como o aparecimento de folhas pequenas com clorose similar a deficiência de zinco e ferro. Os frutos são reduzidos, assimétricos e de sabor amargo, apresentam queda prematura e os que permanecem nas árvores continuam com a coloração verde (GRAÇA, 1991), popularizando a denominação de "Greening" para esta doença, cujo nome oficial atualmente é Huanglongbing.

Plantas sintomáticas devem ser erradicadas em virtude de não haver cura para esta doença, e pelo risco de servirem como fonte de inóculo para aquisição e disseminação do patógeno pelo psilídeo dentro do pomar (GARNIER et al., 1984; GRAÇA, 1991; FUNDECITRUS, 2009).

Para entender o processo de transmissão de fitopatógenos é de extrema importância conhecer o comportamento alimentar dos insetos vetores, pois a aquisição e inoculação ocorrem durante a alimentação do vetor no tecido vegetal. O vetor não participa da patogênese, atuando apenas como agente de transmissão, disseminação e inoculação do patógeno (COSTA, 1998). Ao contrário de insetos mastigadores que são visualmente observados quanto ao seu hábito alimentar, os hemipteróides alimentam-se de líquidos através da inserção de seus estiletes no tecido foliar. Este comportamento não pode ser observado diretamente, consequentemente, técnicas especializadas são requeridas para o estudo do processo alimentar desses insetos. Um avanço muito importante foi o desenvolvimento da técnica "Electrical Monitoring System" (EMS) (MCLEAN; KINSEY, 1964) e em 1985 "Electrical Penetration Graph" (EPG) convencionado por Tjallingii (1985). A técnica de EPG nada mais é do que a análise detalhada dos caminhos percorridos pelos estiletes dos insetos sugadores nos tecidos da planta, bem como as atividades biológicas envolvidas; baseia-se no princípio de que o inseto e a planta fazem parte de um circuito elétrico primário juntamente com uma fonte de voltagem e uma resistência, assim a variação da voltagem é gravada e registrada em forma tipos e formas (MCLEAN; KINSEY, 1964; TJALLINGII, 1978).

O princípio básico da técnica de EPG é o monitoramento da alteração na resistência entre a planta e o inseto quando este introduz seu aparato bucal no tecido foliar. Em função das atividades estiletares realizadas ocorrem alterações na voltagem do sistema devido a componentes de resistência (R) e de força eletromotriz (emf). Os sinais elétricos gerados (ondas) são amplificados e registrados em um gráfico. Atividades estiletares específicas (puncturas ou provas em células, salivação, ingestão, etc) podem ser relacionadas com formas de onda características (TJALLINGII, 1988).

O método de EPG tem sido aplicado principalmente para o estudo do comportamento alimentar de afídeos, aleirodídeos e cigarrinhas em diversas áreas, tais como mecanismos de transmissão de fitopatógenos (PRADO; TJALLINGII, 1994; MARTIN et al. 1997; COLLAR; FERERES, 1998) resistência de plantas a insetos sugadores (GARZO et al., 2002; ALVAREZ et al., 2006), ação de inseticidas (NISBET et al., 1993; HARREWIJN; KAYSER, 1997) e avaliação

de plantas transgênicas (LIU et al., 2005). Para psilídeos, há apenas um estudo de comportamento alimentar através da técnica de EPG no sistema AC, com o psilídeo da pereira, *Psyla pyricola* Foerster (Hemiptera: Psyllidae) (ULLMAN; MCLEAN, 1988).

D. citri é praga de citros e se conhece mais de 50 espécies hospedeiras desse vetor (BOVE; GARNIER, 2002). Pouco se sabe sobre a preferência desses psilídeos pela parte da planta cítrica, por exemplo. Com relação às folhas sintomáticas que podem atrair o inseto vetor para a planta infectada, não há informações sobre o comportamento alimentar de *D. citri* sob essas folhas, assim como dados de transmissão em diferentes partes da planta. O comportamento alimentar de sugadores está intimamente associado às estruturas que compõem o aparelho bucal desse grupo de insetos e para uma melhor compreensão das atividades envolvidas no processo de alimentação tem sido muito estudado em hemípteras as funções e características morfológicas (estruturas) do aparato bucal desses insetos (HUNTER et al., 1996).

Com a chegada do HLB no ocidente, grandes avanços estão sendo conseguidos através de pesquisas realizadas envolvendo: inseto vetor – patógeno – hospedeiro – ambiente. Conhecer melhor o comportamento alimentar de adultos de *D. citri* e suas implicações neste patossistema é importante para definir e aprimorar táticas de controle mais eficientes que possam ser implementadas no MIP do HLB. Portanto este trabalho de tese teve por objetivos: a) Analisar as principais características morfológicas do rostro e estiletes de adultos de *D. citri* através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e transmissão (MET); b) Caracterizar formas de ondas de EPG-DC associadas à penetração estiletar e atividades alimentares de *D. citri* em citros, para fundamentar o uso da técnica de EPG em estudos de comportamento alimentar deste inseto vetor; e c) Avaliar a preferência de *D. citri* por diferentes partes da planta cítrica, bem como o efeito da idade da folha (nova e assintomática x madura e sintomática) na eficiência de aquisição e comportamento alimentar de *D. citri* em plantas-fonte infectadas com *Ca*. L. asiaticus.

Referências

ALVAREZ, A.E.; TJALLINGII, W.F.; GARZO, E.; VLEESHOUWERS, V.; DICKE M.; VOSMAN, B. Location of resistance factors in the leaves of potato and wild tuber-bearing *Solanum* species to the aphid *Myzus persicae*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 121, p. 145–157, 2006.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS EXPORTADORES DE CITROS. Disponível em: <http://www.abecitrus.com.br>. Acesso em: 15 jan. 2009.

BOVÉ, J.M.; GARNIER, M. Pholem-and xylem-restricted plant pathogenic bacteria. **Plant Science**, Amsterdam, v.164, p. 423-438, 2002.

COLETTA-FILHO, H.D.; TARGON, M.L.P.N.; TAKITA, M.A.; DE NEGRI, J.D.; POMPEU JR, J.; MACHADO, M.A. First report of the causal agent of huanglongbing ('*Candidatus* Liberibacter *asiaticus'*) in Brazil. **Plant Disease**, St. Paul, v. 88, p.1382, 2004.

COLLAR, J.L.; FERERES, A.C. Nonpersistent virus transmission efficiency is determined by aphid probing behavior during intracellular punctures. **Environmental Entomology**, College Park, v. 27, p. 583-591, 1998.

COSTA, C.L. Vetores de vírus de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 6, p. 103-171, 1998.

ESCOBAR, M.R.; GONÇALVES, J.S.; CARDOSO, J.L. Diferenças e similaridades entre os segmentos do complexo citrícola paulista. **Agricultura em São Paulo,** São Paulo, v. 46, n. 1, p. 59-88, 1999.

FUNDECITRUS. Disponível em: <http://www.fundecitrus.com.br>. Acesso em: 10 jan. 2009.

GARNIER, M.; DANIEL, N.; BOVÉ, J.M. The greening organism is a gram negative bacterium. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 9., 1984, Riverside. **Proceedings…** Riverside: IOCV, 1984. p. 115-124.

GARZO, E.; SORIA, C.; GOMEZ-GUILLAMON, M.L.; FERERES, A. Feeding behavior of *Aphis gossypii* resistant accessions of different melon genotypes (*Cucumis melo*). **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 30, p. 129-140, 2002.

GRAÇA, J.V. Citrus greening disease. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 29, p. 109-136, 1991.

HARREWIJN, P.; KAYSER, H. Pymetrozine, a fast-acting and selective inhibitor of aphid feeding. In-situ studies with electronic monitoring of feeding behaviour. **Pesticide Science**, Oxford, v. 49, p. 130-140, 1997.

HUNTER, W.B.; HIEBERT, E.; WEBB, E.S.; POLSTONG, J.E.; TSAI, J.H. Precibarial and cibarial chemosensilla in the whitefly, *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae). **Journal of Insect Morphology and Embriology**, London, v. 25, n. 3, p. 295-304, 1996.

LIU, X.; ZHAI, B.P.; ZHANG, X.X.; ZONG, M.J. Impact of transgenic cotton plants on a non-target pest, *Aphis gossypii* Glover. **Ecological Entomology**, London, v.30, p. 307-315, 2005.

MARTIN, B.; COLLAR, J.L.; TJALLINGII, W.F.; FERERES, A.C. Intracellular salivation and ingestion by aphids may cause inoculation and acquisition of nonpersistently transmitted plant viruses. **Journal of General Virology**, London, v. 78, p. 2701-2705, 1997.

McLEAN, D.L.; KINSEY, M.G. A technique for electronically recording aphid feeding and salivation. **Nature**, London, v. 202, p1358-1359, 1964.

NEVES, E.M. Efeitos alocativos na citricultura: um comparativo entre anos de crise e de euforia. **Laranja,** Cordeirópolis, v. 24, n. 1, p. 1-17, 2003.

NISBET, A.J.; WOODFORD, J.A.F.; STRANG, R.H.C.; CONNOLLY, J.D. Systemic anti feedant effects of azadiracchtin on the Peach-Potato aphid *Mizus percicae*. **Entomologia Experimentalis et Applicata,** Dordrecht, v. 68, n. 1, p. 87-98, 1993.

PRADO, E.; TJALLINGII, W.F. Aphid activities during sieve element punctures. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 72, p. 157-165, 1994.

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

TJALLINGII, W.F. Electronic recording of penetration behaviour by aphids. **Entomologia experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 24, p. 721-730, 1978.

_____. Electrical nature of recorded signals during stylet penetration by aphids. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 38, p.177-186, 1985.

_____. Electrical recording of stylet penetration activities. In: MINKS, A.K.; HARREWIJN, P. (Ed.). **Aphids:** their biology, natural enemies and control. Amsterdam: Elsevier, 1988. p. 95–108.

ULMAN, D.E.; McLEAN, D.L. The probing behavior of the summer-form pear psylla. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 47, p. 115-125, 1988.

YAMAMOTO, P.T.; FELIPPE, M.R.; GARBIM, L.F.; COELHO, J.H.C.; XIMENES, N.L.; MARTINS, E.C.; LEITE, A.P.R.; SOUSA, M.C.; ABRAHÃO, D.P.; BRAZ, J.D. *Diaphorina citri* Kuwaiama (Hemiptera: Psyllidae): vector of the bacterium *Candidatus* Liberibacter *americanus*. In: HUNGLONGBING INTERNATIONAL WOKSHOP, 2006, Ribeirão Preto. **Proceedings...** Ribeirão Preto: Fundecitrus, 2006. p. 96.

2 ASPECTOS MORFOLÓGICOS DO APARATO BUCAL DE *Diaphorina citri* KUWAYAMA (HEMIPTERA: PSYLLIDAE)

Resumo

Informações sobre a morfologia do aparelho bucal de insetos vetores são essenciais para a compreensão dos mecanismos envolvendo a transmissão de fitopatógenos. Neste estudo, utilizou-se microscopia eletrônica de varredura e de transmissão para elucidar aspectos morfológicos do rostro (*labium*) e dos estiletes maxilares e mandibulares de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), um importante vetor de bactérias (*Candidatus* Liberibacter spp.) associadas à doença Huanglongbing dos citros. *D. citri* apresenta um rostro que se projeta posteriormente além do par de coxas protoráxicas, e que está subdividido em um segmento basal com 26,0 µm de comprimento e 60,0 µm de diâmetro, e outro distal com 63,0 µm de comprimento, que se afunila ao final. Na extremidade distal do rostro é observado um grupo de 4 pares de sensilas em simetria bilateral, com comprimento médio de 5,2 µm e diâmetro de 1,75 µm em sua base. O rostro abriga um par de estiletes mandibulares e um par de estiletes maxilares com comprimento médio de 512 µm. Quando retraídos, esses estiletes formam um "looping" em sua região proximal, e ficam protegidos dentro de uma estrutura chamada crumena. As mandíbulas são estruturas simples, com simetria bilateral; externamente são convexas, com dez ranhuras no ápice; internamente apresentam-se côncavas, abrigando o par de estiletes maxilares, os quais são responsáveis pela formação dos canais alimentar, salivar e comum. Cortes transversais seriados do rostro desde sua extremidade distal até a proximal revelam que as mandíbulas sempre estão projetadas à frente das maxilas. O par de estiletes maxilares não apresenta simetria bilateral como o mandibular. Em sua extremidade distal é observado o canal comum que se estende por, aproximadamente, 4,1 µm, quando então se subdivide nos canais alimentar e salivar, com diâmetros de 0,90 e 0,47 µm, respectivamente. Para a formação desses canais é imprescindível o acoplamento das maxilas que se dá por meio de sulcos presentes lateralmente ao longo desses estiletes. As informações obtidas são básicas para estudos mais detalhados sobre a anatomia das estruturas que compõem o aparato bucal deste inseto vetor.

Palavra-chave: *Diaphorina citri*; Inseto vetor; Microscopia eletrônica; Aparelho bucal; Estiletes

Abstract

Detailed information on morphology of the mouth apparatus of insect vectors is basic to understand mechanisms involved in transmission of pathogens. Here we employed scanning and electron microscopy to elucidate morphological aspects of the rostrum (or labium), as well as mandibular and maxillary stylets of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), an important vector of plant pathogenic bacteria associated with citrus huanglongbing. *D. citri* shows a cone-shaped rostrum that extends itself behind the prothoracic pair of thighs, and is subdivided in basal (60 µm wide) and distal segments with length of 26 and 63 µm, respectively. At the distal end of the rostrum, a group of 4 symmetric pairs of sensilla are observed, which show 5.2 µm in length and 1.75 µm in diameter at the base. The rostrum houses a pair of mandibular and maxillary stylets with mean length of 512 µm; when retracted, their proximal

portions form a loop and are stored in structure known as crumena. The mandibles are simple structures that have bilateral symmetry, and are externally convex with ten grooves in the distal end; internally they are concave and harbor the pair of maxillary stylets. Serial cross sections of the rostrum revealed that the mandibles are always projected ahead of the maxillary stylets. The two maxillary stylets are hold together, and have internal grooves that form the food and salivary duct, with mean diameters of 0.9 and 0.47 µm, respectively. These two canals merge at a distance of 4.1 µm from the distal tip of the stylets, forming a common duct. A tight junction of the maxillary stylets is needed to form these canals. The information reported here is basic for further studies about the anatomy of structures that comprise the mouth apparatus of this vector.

Keyword: *Diaphorina citri*; Insect vector; Electron microscopy; Mouth parts; Stylets

2.1 Introdução

A transmissão de patógenos por insetos está intimamente associada à alimentação e, para hemípteros, são muito estudados os mecanismos que compõem o comportamento alimentar desses insetos, como funções e estruturas do aparato bucal (HUNTER et al., 1996). O psilídeo-dos-citros, *Diaphorina citri* , é considerado uma das principais pragas para a citricultura mundial, pois é o vetor da bactéria causadora do Huanglongbing ou Greening que em julho de 2004 foi constatado em pomares brasileiros (COLETTA-FILHO et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2005). Os estiletes são meios de aquisição e inoculação de fitopatógenos e de maneira geral possuem estruturas similares nas diferentes famílias de Hemiptera. Por outro lado, um estudo detalhado com o uso de microscopia eletrônica é importante para características taxonômicas e melhor compreensão do comportamento alimentar (FORBES, 1969; ULLMAN; MCLEAN, 1986).

Afídeos apresentam os estiletes dispostos em um par de mandíbulas externamente e outro par de maxilas internamente, todos inseridos em um “labium” triseguimentado (rostro e proboscis) protegidos por um “labrum” triangular pequeno (POLLARD, 1973).

Forbes e Mullick (1970), observaram que os estiletes de ninfas de *Adelges piceae* Ratzeburg (Hemiptera: Aphididae) apresentam um diâmetro que varia entre 4,5µm e 3,5 µm desde a base chegando a 2,5 µm na porção distal.

Características morfológicas do aparato bucal de afídeos foram bem relatadas para as seguintes espécies: *A. piceae* (FORBES; MULLICK, 1970), *Aphis gosssypii* Glover (POLLARD, 1958), *Rhopalosiphum maids* Fitch (PARRISH, 1967), *Schizaphis graminum* Rondani (SAXENA; CHADA, 1971), *Myzus persicae* Sulzer (FORBES, 1969; HOOF, 1958 apud POLLARD, 1973), dentre outras. Já para a família Psyllidae os trabalhos estão mais concentrados

no gênero *Psylla*. Existem relatos de estudos anatômicos da cabeça e de estruturas relacionadas a alimentação para o psilídeo da macieira *Psylla mali* Schmidt (Hemiptera: Psyllidae), (GROVE, 1920; WEBER, 1928 apud ULLMAN; MCLEAN, 1986). Forbes (1972) estudou a presença de dendritos nos estiletes mandibulares de *Psylla pyricolla* Foerster (Hemiptera: Psyllidae). Pollard (1970) estudou a movimentação dos estiletes para *P. mali* e Ullman e McLean (1986) estudaram o canal alimentar anterior de *P. pyricola*.

Para o psilídeo-dos-citros, *D. citri,* não se conhece um estudo detalhado do aparato bucal envolvendo microscopia eletrônica de varredura e transmissão. São encontrados na literatura somente estudos a nível de família. Em virtude da importância do inseto como vetor da bactéria e para uma melhor compreensão do comportamento alimentar, o presente capítulo tem como objetivo o estudo morfológico do rostro e estiletes de adultos de *D. citri* através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e transmissão (MET).

2.2 Desenvolvimento

2.2.1 Material e Métodos

Todos os insetos utilizados no estudo foram provenientes de criação mantida sob planta de *Murraya paniculata* (L.) Jack (Rutaceae) em sala climatizada (27±2ºC; 70% UR e fotoperíodo 14:10) no laboratório de insetos vetores de fitopatógenos do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola (ESALQ/USP).

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para a MEV empregou-se a microscopia eletrônica de baixa temperatura (LTSEM). Insetos adultos de *D. citri* foram fixados em álcool (70%), para o estudo utilizamos insetos íntegros e também se extraiu todo o aparato bucal (clípeo, lábio e estilete; Figura 1A).

As amostras foram fixadas mecanicamente sobre o porta espécime de um sistema de *criotransfer* (Oxford CT 1500) e assim mergulhadas em nitrogênio líquido. A unidade de preparação do microscópio foi instalada em um dispositivo de transferência de ar fechado.

Os espécimes congelados foram cauterizados por 2 minutos a -90ºC. Após a sublimação do gelo, as superfícies cauterizadas foram cobertas com ouro e os espécimes então foram

colocados na fase fria da câmara (-135ºC), sendo a observação realizada com o uso de um microscópio eletrônico de varredura DSM960 Zeiss.

Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Os insetos foram fixados em Glutaraldeído 3%, Tampão Cacodilato de sódio 0,1 M, Sacarose 1,8%, $CaCl_2$ 0,001 M. Após 24 horas, o aparelho bucal do inseto, contendo o clípeo, labio e estiletes (Figura 1A).

As amostras foram lavadas e ficaram por 1h em cacodilato de sódio. Em seguida, foram embebidas em ágar 1% para facilitar a orientação do espécime durante inclusão em resina. A Pos-fixação foi feita em 1% tetroxide de osmium por um período de 2h, depois de lavado em água destilada, o bloco contendo o tecido permaneceu por 1h em 0.5% acetato de uranila a 4°C. As amostras foram desidratadas em séries etílicas e incluídas em resina tipo spurr (Figura 1B). Seções finas (1µm) e ultrafinas (70-80 nm) foram obtidas em ultra micrótomo e, montadas em grades de cobre de malha 50 *mesh* e coradas com acetato de uranila aquoso a 2 % (REYNOLDS, 1963). As amostras foram observadas em um microscópio de transmissão STEM LEO EM910 (Oberkochen, Germany) equipado com câmara digital Gatan Bioscan 792 (Pleasanton, CA, USA).

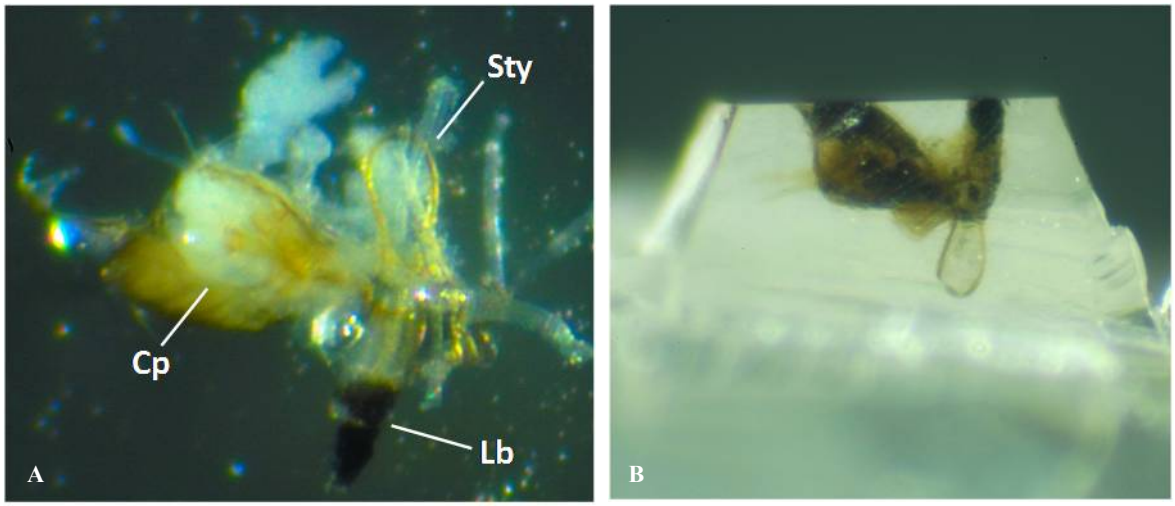


Figura 1 - Estrutura extraída de adultos de *Diaphorina citri*. (A) Clípeo - Cp; Labio - Lb; Estiletes - Sty e (B) material incluído em resina para microscopia de transmissão (MET)

2.2.2 Resultados

Adultos de *D. citri* apresentam um rostro que se projeta logo após as coxas protoráxicas, entre o primeiro e segundo par de pernas com um comprimento de 89,0 µm (Figura 2A e B). Essa estrutura que abriga 2 estiletes mandibulares e 2 maxilares, está subdividida em duas partes, uma basal e outra distal.

O rostro, desde sua base até a extremidade, apresenta um estreitamento dividindo a estrutura em duas porções (Figura 2B). A primeira é a basal (Ba), com comprimento de 26,0 µm e largura de 60,0 µm, e a segunda é a distal (Di), mais comprida e estreita que a primeira, com 63,0 µm de comprimento. Como essa porção final ou distal do rostro apresenta um "afunilamento" foram tomadas três medidas para a largura: a primeira com 40,2 µm, mediana com 25,9 µm e a distal com 14,3 µm ao final (Figura 2B).

Ao final da extremidade distal, observa-se um grupo de 4 pares de sensilas em simetria bilateral, em relação a abertura do rostro (Figura 2B e 2C). Essas sensilas apresentam em média um comprimento de 5,2 µm.

A Figura 2D representa as estruturas básicas que compõem o aparato bucal do psilídeo-dos-citros. Nela observamos o clípeo (Cp), que abriga os músculos dilatadores do cibário (CbDm), o cibário (Cb), seguido pelo lábio ou rostro (Lb). Um fator importante nesse conjunto de estruturas é que quando os estiletes estão retraídos, a porção distal fica abrigada no lábio e a porção proximal faz uma volta '*looping*' e então os estiletes ficam envoltos por uma membrana chamada de crumena (Cr). O clípeo (Cp), juntamente com o conjunto de estiletes (mandibulares e maxilares) foi separado do restante do aparelho bucal do inseto para a determinação do tamanho dos estiletes, desde sua base até o final. Adultos de *D. citri* apresentam um comprimento de 512 µm, em média, desde o clípeo (Cp) até sua extremidade distal (Figura 2E).

As mandíbulas são estruturas simples com poucas variações morfológicas, externamente convexas e internamente côncavas. A extremidade distal da região convexa é composta de dez "ranhuras" em cada uma das mandíbulas (Figura 2F), estruturas que provavelmente auxiliam a penetração estiletar no tecido. Já a região côncava interna, tem a função de abrigar os estiletes maxilares funcionando como uma espécie de "calha".

Os cortes transversais seriados na Figura 3 revelam a conformação interna das estruturas do lábio do psilídeo-dos-citros. Eles são representativos ao longo de seu comprimento, desde a extremidade distal até a proximal (Figuras A-H). Analisando a Figura 3A, que representa a

extremidade distal, observa-se as mandíbulas (Md) se projetando para o exterior por meio da abertura do lábio. Em todos os exemplares analisados, foi verificada essa característica, evidenciando que, quando mortos em álcool, os insetos não retraem os estiletes completamente. Ainda na mesma figura, nota-se a presença das sensilas na região apical do lábio, apresentando um diâmetro médio de 1,75 µm em sua base.

A partir da Figura 3B até a 3H estudou-se em detalhes a conformação estiletar dentro do lábio. Seguindo a sequência de cortes, na Figura 3B, é observada somente as mandíbulas (Md) com os canais neuronais, que sempre estavam projetadas anteriormente às maxilas (Mx), pois, além da função de abrigar os estiletes maxilares, são responsáveis pelo rompimento de tecidos em muitos hemípteros, não só externo a nível de epiderme como também internamente (células e vasos) (POLLARD, 1973). Externamente ao nível de epiderme a Figura 3C mostra a presença de uma das maxilas (Mx) abrigada pelas mandíbulas (Md) e o início do canal comum (CC). Morfologicamente as maxilas não possuem uma simetria bilateral como as mandíbulas, além de serem mais complexas.

Externamente os estiletes maxilares são iguais (convexos), mas em sua área interna, as maxilas apresentam longitudinalmente 4 sulcos ou "calhas", dois deles formam os canais alimentar e salivar e os outros dois formam os canais (groove) onde se encaixa a outra maxila. Na Figura 3D, observa-se a presença das duas maxilas (Mx), sendo que em, uma delas nota-se completamente esses sulcos, em especial os dois centrais representados por (FdC^1) e (SC^1), que constituem o início dos canais alimentar e salivar, respectivamente. Seguindo para a região proximal do lábio na Figura 3E, observa-se o início da junção ou encaixe das maxilas delimitando os canais alimentar (FdC) e salivar (SC). Na figura 3F, os canais estão mais evidentes pela aproximação do segundo estilete; com a "união" dos estiletes maxilares, esses canais tormam-se completamente separados e independentes (Figura 3G).

A Figura 3H representa o corte em uma região mais proximal do lábio, final da área distal (Di) e início da área basal (Ba), como observado anteriormente na Figura 2B. A partir deste corte e no sentido proximal não foram observadas diferenças morfológicas, sendo possível a determinação dos diâmetros dos canais alimentar (FdC) e salivar (SC), que apresentam valores médios de 0,90 µm e 0,47 µm, respectivamente.

As Figuras 4A e 4B representam a microscopia eletrônica de varredura da região dos estiletes maxilares de *D. citri*. Na Figura 4A nota-se a região côncava ou interna de um estilete

maxilar (Mx); quando os estiletes maxilares estão unidos pelos sulcos (Go) presentes mais externamente em cada uma das maxilas, observa-se a formação dos canais: alimentar (FdC), salivar (SC) e comum (CC) (Figura 4B). Analisando esta figura, nota-se que os canais salivar (SC) e alimentar (FdC), permanecem separados ao longo do estilete até a extremidade distal, onde ocorre a junção ou fusão desses canais, formando o canal comum (CC). Pelo canal comum pode passar somente saliva (atividade de salivação que antecede uma ingestão floemática de um afídeo por exemplo), ou ocorrer salivação e ingestão de líquidos (seiva) simultaneamente, ou ainda somente ingestão (PRADO; TJALLINJI, 1994). O canal comum (CC) de *D. citri* apresenta 4,1 µm comprimento.

2.2.3 Discussão

As estruturas morfológicas do aparato bucal de *D. citri* parecem ser homólogas às estruturas presentes em afídeos e cigarrinhas, assim como Ullman e Mclean (1986) também relataram para *P. pyricola.* O psilídeo-dos-citros apresenta um par de estiletes mandibulares localizado externamente, que abriga um par de estiletes maxilares como observado em afídeos (POLLARD, 1973) e outros psilídeos, tais como, *P. mali* (GROVE, 1920; WEBER, 1928 apud ULLMAN; MCLEAN, 1986) e *P. pyricolla* (FORBES, 1972). Para alojar esses dois pares estiletes, *D. citri* apresenta um rostro localizado entre o primeiro e o segundo par de pernas (Figura 2A). Diferentemente de afídeos (Pollard,1973), *D. citri* não abriga fortemente o rostro na região ventral do tórax, projetando-o para trás entre as coxas do primeiro par de pernas quando não estão se alimentando, mas mantêm com o rostro na posição vertical (posição de alimentação). Possivelmente há uma pequena retração do rostro quando está em repouso e, logo que inicia a alimentação, o inseto adquire a posição característica (formando um ângulo de 45° em relação à folha) favorecendo o contato do aparato bucal com o substrato. Devido a esta morfologia típica, *D. citri* apresenta um rostro com 89,0 µm de comprimento, inferior aos de outros sugadores que têm seus rostros de tamanho compatível ao dos estiletes (POLLARD, 1973). Quando não está se alimentando, *D. citri* aloja os estiletes em uma bolsa chamada crumena, (Figura 2D), que é formada por uma invaginação da parede do corpo do inseto sobre a base do lábio (FORBES, 1970). Essa estrutura é característica de insetos com estiletes muito longos e filamentosos, sendo presente em hemípteras das famílias Coccidae, Aleyrodidae, além de Psyllidae (POLLARD, 1970, 1973; MARANHÃO, 1978).

Na extremidade distal do lábio, *D. citri* apresenta quatro pares de sensilas em simetria bilateral, com um comprimento médio de 5,2 µm, totalizando oito sensilas (Figura 2C). Essas estruturas fazem parte do sistema sensorial do inseto no reconhecimento do hospedeiro (TJALLINGII, 1978), porém, para *D. citri* não se sabe se estão relacionadas com função tátil ou quimiorrecepção do inseto. Tjallingii (1978) relatou a presença de 8 pares dessas sensilas em afídeos, com comprimento médio de10 µm. Para outros Psyllidae não foram encontradas informações sobre sensilas presentes na extremidade distal do rostro.

Os estiletes são muito estudados em insetos vetores, principalmente para afídeos, pois estão intimamente ligados à forma de transmissão de vírus (HOOF, 1957, 1958 apud POLLARD, 1973; FORBES, 1969). Desde o clípeo até a sua extremidade distal, o conjunto de estiletes de *D. citri* apresenta um comprimento médio de 512 µm (Figura 2E), tamanho este superior ao comprimento observado em *M. persicae* por Forbes (1969), 502 µm para formas aladas, 492 µm para ápteros. Para a cigarrinha *Nilapavarta lugens* Foster, Goodman e Duchett (1983) encontraram um comprimento de 650 µm. Ullman e McLean (1986) relataram que as características morfológicas do aparelho bucal de psilídeos são intermediárias entre afídeos e cigarrinhas.

Os estiletes mandibulares abrigam os maxilares que, por sua vez, formam os canais alimentar e salivar. As mandíbulas de *D. citri* são estruturas com pouca variação morfológica, internamente, na região côncava. Por outro lado, externamente (região convexa) apresentam 10 ranhuras ou dentes na extremidade distal (Figura 2F). Não foram encontradas essas ranhuras nos estiletes maxilares, assim como relatado por Pollard (1970) para *P. mali*. Ulman e McLean (1986) também observaram a mesma quantidade dessas estruturas no psilídeo da pereira, *P. pyricola*. Mora, Retana e Espinoza (2001) encontraram essas estruturas em abundância para a cigarrinha *Tagosodes orizicolus* Muir (Homoptera: Delphacidae).

Estudando três espécies de cigarrinhas, Tavella e Arzone (1993) descreveram 9-10 “dentes” para *Zyginidia pullula* Boheman (Typhlocybinae); 10-11 em *Empoasca vitis* Goethe (Typhlocybinae) e 20 para *Graphocephala fennabi* Young (Cicadellinae). Em todos os trabalhos, os respectivos autores suspeitam que essas estruturas são especializadas para perfurar tecidos da planta no caminhamento estiletar, também sendo relatadas em afídeos, como *M. persicae,* que apresenta acima de 10 “dentes” (FORBES, 1969).

Os cortes transversais por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) (Figuras 3A-H) representam a conformação estiletar, desde a extremidade distal até a proximal do rostro. Na Figura 3A nota-se que o par de estiletes mandibulares está protraído (detalhe Figura 3B) sendo, essa conformação sempre constatada nos exemplares analisados, podendo representar o que ocorre em uma situação normal de atividade alimentar quando o inseto inicia a penetração estiletar, comportamento frequente em hemípteros (Weber, 1930). Esse movimento estiletar foi muito estudado para *P. mali* (POLLARD, 1970). O início do canal comum surge com a primeira maxila (Figura 3C), formado pela confluência entre os canais alimentar e salivar (FORBES, 1969; TJALLINGII, 1978) com um comprimento de 4,1 µm, observado em MEV nas Figuras 4A e B, trabalhos anteriores com outros hemípteros não mensuram deste canal, como ocorre com os canais alimentar e salivar (FORBES, 1969; FORBES; MULLICK, 1970; POLLARD, 1970; SAXENA; CHADA, 1971). Mittler (1957) observou o término dos canais alimentar e salivar para afídeos originando o canal comum, o que não foi observado para *Homalodisca coagulata* (Say) (Hemiptera: Cicadellidae), onde os canais alimentar e salivar se estendem até a extremidade distal do estilete maxilar (LEOPOLD et al., 2003).

Para formação dos canais é imprescindível a junção ou união das duas maxilas (FORBES, 1969; FORBES; MULLICK, 1970). Está junção é possível devido às mandíbulas que abrigam as maxilas e principalmente aos sulcos presentes lateralmente ao longo dos estiletes maxilares, formando estruturas semelhantes à ganchos (FORBES, 1969; POLLARD, 1973; TJALLINGII, 1978; TAVELLA; ARZONE, 1993) (Figuras 3D e 4A).

Os canais alimentar e salivar (FdC e SC, respectivamente) estão localizados ao centro da maxila entre os sulcos (Go) e ao longo do estilete, até o momento em que ocorre a fusão para formar o canal comum (Figuras 4A e 4B). Pollard (1973) relatou que o canal alimentar em afídeos é formado igualmente entre os dois estiletes maxilares e o canal salivar é formado predominantemente por um dos estiletes. Essa assimetria entre as maxilas foi observada em *M. persicae* por Forbes (1969), visualizada também para *D. citri* (Figura 3E).

As dimensões médias dos canais alimentar e salivar em afídeos foram determinadas por Auclair (1963, 1964) e Forbes e MacCarth (1969), onde os diâmetros variam de 1-2 µm para o canal alimentar e de 0,2-0,4 µm para o canal salivar. Forbes (1969) e Forbes e Mullick (1970) observaram uma proporção em torno de 2:1 (canal alimentar em relação ao salivar) para *M. persicae* e *A. piceae*. Em *D. citri* foi constatada essa proporção entre os canais alimentar e salivar,

cujos diâmetros medem 0,90 e 0,47 µm, respectivamente. Forbes e Mullick (1970) encontraram para *A. piceae* diâmetros de 1 µm e 0,4 µm (canal alimentar e salivar, respectivamente), que são valores próximos aos de *D. citri*. Já Forbes (1969) relatou para *M. persicae* 1,2 µm e 0,5 µm para os respectivos canais, indicando que o canal salivar deste inseto tem diâmetro superior ao valor médio determinado para afídeos em geral.

Em Auchenorrhyncha as dimensões dos canais alimentar e salivar são ainda maiores; apresentando, respectivamente 2,60 µm e 1,20 µm em *Z. pullula*; 2,0 µm e 1,0 µm em *E. vitis*; 13 µm e 4 µm em *G. fennabi* (TAVELLA; ARZONE,1993), chegando a 6,2 e 20,8 µm para o canal alimentar de ninfas de primeiro instar e adultos de *H. coagulata* respectivamente (LEOPOLD et al., 2003).

Este trabalho revelou informações importantes sobre o aparelho bucal de *D. citri* que contribuirão na melhor compreensão do comportamento alimentar deste inseto e de mecanismos envolvidos na seleção de hospedeiros e na transmissão dos patógenos associados ao huanglongbing dos citros; bem como sobre a função sensorial das sensilas presentes na extremidade distal do rostro, que já foi estudada em outros grupos de hemípteros (FOSTER; GOODMAN; DUCHETT, 1983; BACKUS, 1985; ZACHARUK, 1980; ULMAN; MCLEAN, 1986).

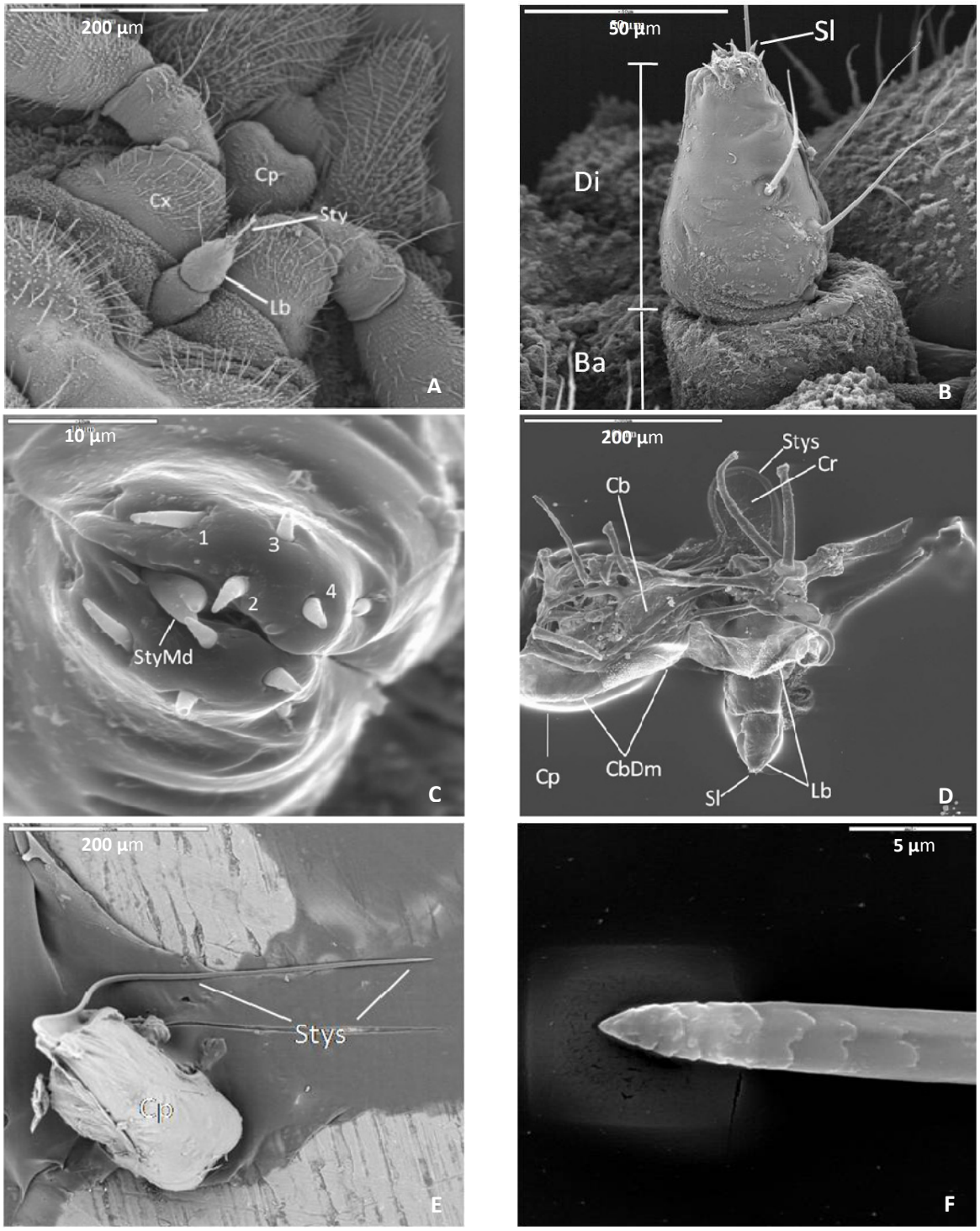


Figura 2 - Microscopia eletrônica de varredura das estruturas do aparato bucal de *Diaphorina citri*. (A) Vista ventral de um adulto; (B) Detalhe do lábio; (C) Detalhe, extremidade distal do lábio; (D) Vista lateral das estruturas do aparato bucal; (E) Vista dos estiletes junto ao clípeo; (F) Detalhe externo de um dos estiletes mandibulares: Cx, coxa; Cp, clípeo; Lb, lábio; Stys, estiletes; Sl, sensilas; Ba, área basal; Di, área distal; StyMd, estiletes mandibulares; 1,2,3,4, sensilas; Cp, clípeo; Cb, cibário; CbDm, músculos dilatadores do cibário; Lb, lábio; Sl, sensilas; Cr, crumena; Cp, clípeo; Stys, estiletes

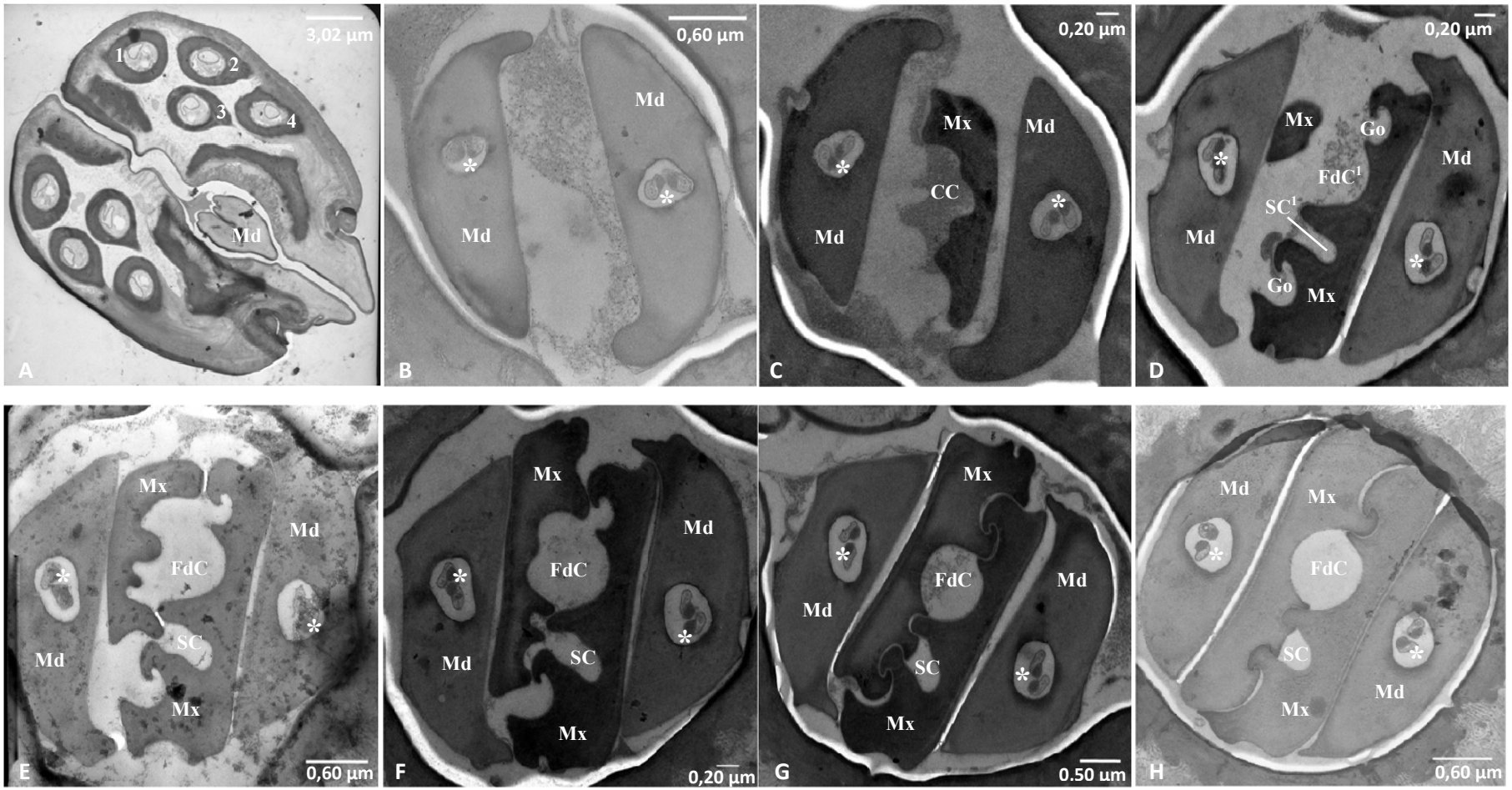


Figura 3 - Cortes transversais sucessivos do lábio de *Diaphorina citri*, extremidade distal para proximal (A-H). A) Abertura da extremidade distal do lábio com estiletes mandibulares ao centro, 4 pares de sensilas; B) Par de estiletes mandibulares e canais neuronais; C) Par de mandíbulas e um dos estiletes maxilares, início do canal alimentar ou canal comum; D) Par de mandíbulas e início da segunda maxila; E) Início da justaposição entre as maxilas formando os canais alimentar e salivar; F) Justaposição das maxilas e formação dos canais alimentar e salivar; G) Completa separação entre os canais alimentar e salivar; H) Detalhe da região proximal dos estiletes: 1, 2, 3, 4, sensilas; Md, mandíbulas; *, canais neuronais; Mx, maxilas; CC, canal comum; FdC^1, início do canal alimentar; SC^1 início do canal salivar; FdC, canal alimentar; SC, canal salivar; Go, sulco.

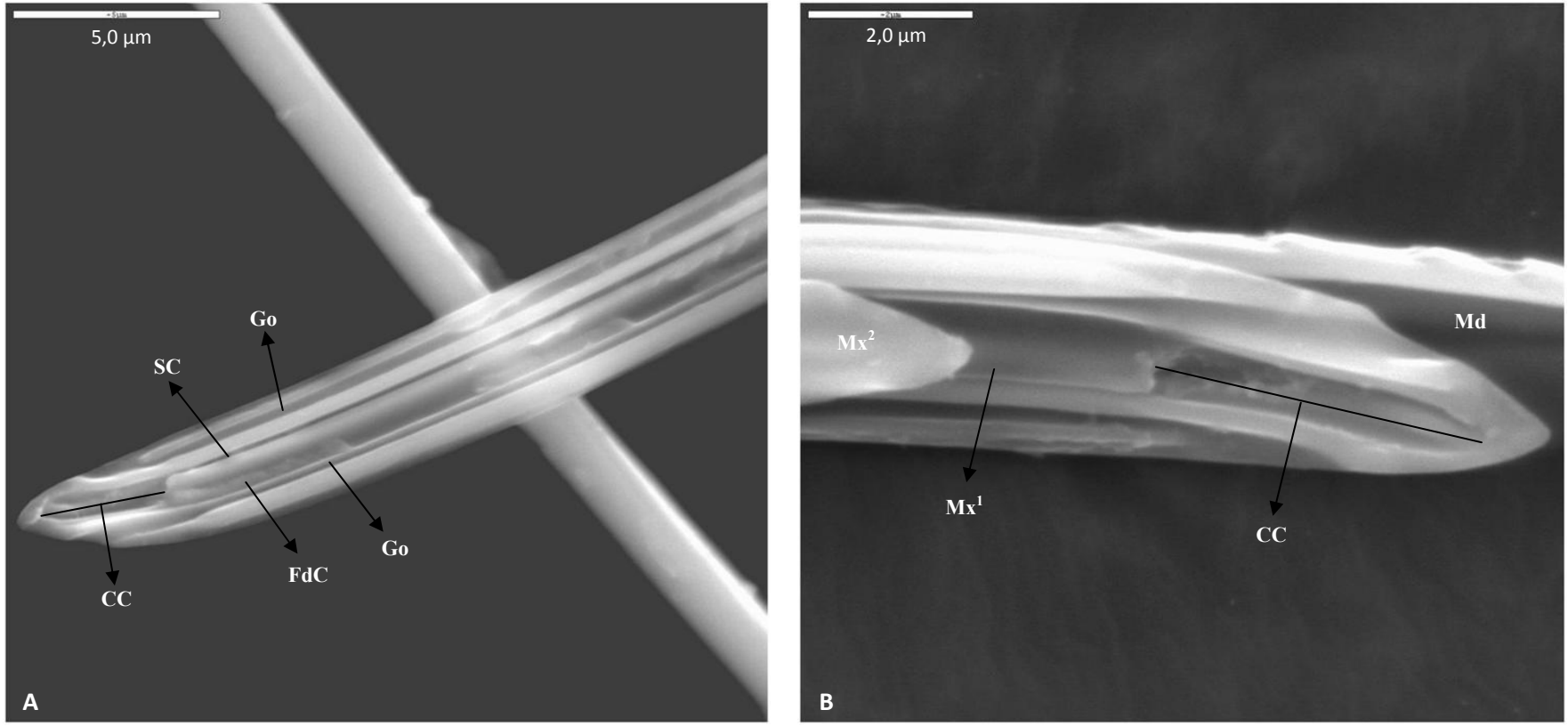


Figura 4 - Microscopia eletrônica de varredura da extremidade distal dos estiletes maxilares de *Diaphrorina citri*, vista da região interna ou côncava dos estiletes. A) Estilete maxilar (Mx) expondo os sulcos (Go); os canais: alimentar (FdC); salivar (SC) e comum (CC); B) Maxila inferior com os canais (Mx^1); maxila superior (Mx^2); detalhe do canal comum (CC)

Referências

AUCLAIR, J.L. Aphid feeding and nutrition. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 8, p. 439-490, 1963.

_____. Recent advances in the feeding and nutrition of aphids. **The Canadian Entomologist**, Ottawa, v. 96, p. 241-149, 1964.

BACKUS, E.A. Anatomical and sensory mechanisms of planthopper and leafhopper feeding behavior. In: NAULT, L.R.; RODRIGUES, J.D. (Ed.). **The leafhoppers and planthoppers**, New York: John Wiley, 1985. p. 163-194.

COLETTA-FILHO, H.D.; TARGON, M.L.P.N.; TAKITA, M.A.; NEGRI, J.D. de; POMPEU JR., J.; MACHADO, M.A. First report of the causal agent of huanglongbing ('*Candidatus* Liberibacter *asiaticus'*) in Brazil. **Plant Disease**, St. Paul, v. 88, p. 1382, 2004.

FORBES, A.R. Stylets of the Green peach aphid. *Myzus persicae*. **The Canadian Entomologist**, Ottawa, v. 101, p. 31-41, 1969.

_____. Innervation of the stylets of the pear psylla, *Psylla pyricola* (Homoptera: Psyllidae), and the greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae). **Journal of the Entomological Society of Bristish Columbia**, Columbia, v. 69, p. 456-488, 1972.

FORBES, A.R.; MAcCARTHY, H.R. Morphology of the Homoptera, with enphasis on virus vector. In: MARAMOROSCH, K. (Ed.). **Viruses, vectors, and vegetation**. New York: Interscience, 1969. p. 211-234.

FORBES, A.R.; MULLICK D.B. The stylets of the balsam woolly aphid, *Adelges piceae* (Homoptera: Adelgidae).**The Canadian Entomologist**, Ottawa, v. 102, p. 1074-1082, 1970.

FOSTER, S.; GOODMAN, L.J.; DUCHETT, J.G. Ultrastructure os sensory recepetiors on the labium of the rice brown planthopper. **Cell and Tissue Research**, Los Angeles, v. 230, p. 353-366, 1983.

HUNTER, W.B.; HIEBERT, E.; WEBB, E.S.; POLSTONG, J.E.; TSAI, J.H. Precibarial and cibarial chemosensilla in the whitefly, *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae). **Journal Insect Morphology and Embriology**, London, v. 25, n. 3, p. 295-304, 1996.

LEOPOLD, R.A.; FREEMANB, T.P.; BUCKNERA, J.S.; NELSONA, D.N. Mouthpart morphology and stylet penetration of host plants by the glassywinged sharpshooter, *Homalodisca coagulata*, (Homoptera: Cicadellidae). **Arthropod Structure & Development**, St. Louis, v. 32 p. 189–199, 2003.

MARANHÃO, Z.C. **Morfologia geral dos insetos**. São Paulo: Livraria Nobel, 1978. 396 p.

MITTLER, T.E. Studies on the feeding and nutrition of *Tuberolachnus salignus* (Gmelin) (Homoptera, Aphididae). The uptake of phloem sap. **The Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 35, p. 334-341, 1958.

MORA, R.; RETANA, A.; ESPINOZA, A.M. External morphology of *Tagosodes orizicolus* (Homoptera: Dephacidae) revealed by scaning electron microscopy. **Annals of the Entomological Society of America**, Beltsville, v. 94, n. 3, p. 438-448, 2001.

PARRISH, W.B. The origin, morphology, and innervations of aphid stylets (Homoptera). **Annals of the Entomological Society of America**, Beltsville, v. 60, p. 273-276, 1967.

POLLARD, D.G. Feeding of the cotton aphid (*Aphis gossypii* Glover). **Empire Cotton Growing Review**, London, v.35, p. 244-253, 1958.

_____. The mechanism of stylet movement in *Psylla mali* Schmidberger (Homoptera: Psyllidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, London, v. 49, p. 295-307, 1970.

_____. Plant penetration by feeding aphids (Hemiptera, Aphidoidea): a review. **Bulletin of Entomological Research,** New York, v. 62, p. 631-714, 1973.

PRADO, E.; TJALLINGII, W.F. Aphid activities during sieve element punctures. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 72, p. 157-165, 1994.

REYNOLDS, E.S. Use of lead citrate at high ph as an electron-opaque stain in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 17, n. 1, p. 208, 1963.

SAXENA, P.N.; CHADA, H.L. The greenbug, *Schizaphis graminum* 2. The salivary gland complex. **Annals of the Entomological Society of America**, Beltsville, v. 64, p. 897-912, 1971.

TAVELLA, L.; ARZONE, A. Comparative morphology of mouth parts of *Zyginidia pullula*, *Empoasca vitis*, and *Graphcephala fennahi* (Homoptera, Auchenorryncha). **Bolletin of Zoology**, Modena, v. 60, p. 33-39, 1993.

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

TJALLINGII, F.W. Mechanoreceptors of the aphid labium. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 24, p. 531-537, 1978.

ULLMAN, D.E.; McLEAN, D.L. Anterior alimentary canal of the Pear Psylla, *Psylla pyricola* Foerster (Homoptera: Psyllidae). **Journal of Morphology**, West Sussex, v. 189, p. 89-98, 1986.

WEBER, H. **Biologie der Hemipteran**. Berlin: Springer, 1930. 543 p.

ZACHARUK, R. Ultrastructure and function of insect chemosensilla. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 25, p. 27-47, 1980.

3 CARACTERIZAÇÃO DAS FORMAS DE ONDA "ELECTRICAL PENETRATION GRAPHS" (EPG) de *Diaphorina citri* KUWAYAMA (HEMIPTERA: PSYLLIDAE), VETOR DE *Candidatus* Liberibacter spp. EM CITROS

Resumo

Há várias décadas o psilídeo *Diaphorina citri* é conhecido como vetor de bactérias do gênero *Candidatus* Liberibacter, associadas ao Huanglongbing (HLB) dos citros. Entretanto, vários aspectos da transmissão dessas bactérias ainda são desconhecidos, como as atividades alimentares do vetor envolvidas na aquisição e inoculação do patógeno em citros. Este trabalho teve por objetivo investigar a penetração estiletar e atividades alimentares de *D. citri* sobre mudas de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. 'Pêra', através da técnica de *Electrical Penetration Graphs* (EPG) - sistema DC. Os tipos de onda EPG foram descritos baseando-se em características de morfologia da onda, amplitude, freqüência, nível de voltagem e origem elétrica. As principais ondas foram correlacionadas com observações histológicas das terminações das bainhas estiletares no tecido vegetal, para determinar as atividades estiletares envolvidas e a localização precisa desses eventos. A atividade estiletar também foi inferida com base na semelhança da onda com outras já descritas para grupos de Sternorrhyncha, particularmente afídeos e moscas-brancas. Analisando-se os registros de 8 h de duração de 20 fêmeas adultas de *D. citri*, cinco formas de onda foram identificadas: (C) penetração intercelular dos estiletes na epiderme e/ou parênquima; (D) primeiro contato com o floema (onda distinta de outras já relatadas para Sternorrhyncha); (E1) salivação no floema; (E2) ingestão no floema e (G) ingestão no xilema. *D. citri* sempre inicia a prova com penetração intercelular na epiderme e parênquima (C), com duração média de 10 min. Após a onda C, os estiletes são freqüentemente retirados da planta e o inseto retorna para não-prova (Np; 86,2% de probabilidade), principalmente nas primeiras 2 h de registro. A probabilidade de contactar o floema após a onda C é de 12,5%. No contato com o floema, observa-se sempre a onda D seguida de E1 (salivação; duração média de 1,55 min). Após E1, há 45% de chance dos insetos iniciarem ingestão de seiva do floema (E2), sendo mais freqüente o retorno às atividades de caminhamento estiletar no parênquima (onda C; 55% de probabilidade). A ingestão no floema é a principal atividade de *D. citri* dentro da planta, com duração total de 206,11 min. em média, em 8 h de registro. Entretanto, este inseto realizou cerca de 20 provas e demorou em média 155 min a partir da 1ª. prova para atingir os vasos do floema. A onda G (ingestão no xilema) foi observada com baixa freqüência (1,3%) após a onda C, com duração média de 23,7 min. Estas informações sobre o comportamento alimentar de *D. citri* são fundamentais para definir atividades estiletares e períodos necessários para aquisição e inoculação de *Candidatus* Liberibacter spp. em citros, e estabelecer táticas de manejo que possam impedir a disseminação de HLB.

Palavras-chave: Psilídeo asiático dos citros; Comportamento alimentar; EPG; Huanglongbing; *Candidatus* Liberibacter

Abstract

For decades the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama has been known as a vector of phloem-limited bacteria associated to citrus huanglongbing (HLB), *Candidatus* Liberibacter spp. However, some aspects of transmission remain poorly understood, such as the feeding activities inside the plant tissue that result in bacterial acquisition and inoculation. This research was carried out to investigate stylet penetration and feeding activities of *D. citri* on seedlings of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. 'Pêra' by using the electrical penetration graph (EPG-DC system) technique. EPG waveforms were described based on amplitude, frequency, voltage level and electrical origin of the observed traces during stylet penetration on plant tissues. The main waveforms were correlated with histological observations of salivary sheath termini in plant tissues, in order to determine stylet activities and their precise position. The behavioral activity was also inferred based on waveform similarities in relation to other Sternorrhynchans, particularly aphids and whiteflies. By analyzing 8-h EPGs of 20 adult females, five waveforms were described: (C) salivary sheath secretion and extracellular stylet pathway through epidermis and parenchyma; (D) first contact with phloem vessels (distinct from other waveforms reported for Sternorrhyncha); (E1) salivation in the phloem; (E2) phloem ingestion; and (G) xylem ingestion. *D. citri* always initiate a probe with intercellular pathway through epidermis and parenchyma (C), with mean duration of 10 min. After waveform C, stylet withdrawal from the plant and return to non-probing status (Np) is the most frequent event (86.2%), especially in the first 2 h of recording. The probability of phloem contact after C is 12.5%. Waveform D is always observed upon phloem contact, followed by E1 (salivation; mean duration of 1.55 min). After E1, there is a 45% probability of phloem ingestion (E2), but return to pathway activity (C) is a more frequent outcome (55%). This insect only reached the phloem vessels after an average of 20 probes and 155 min following the onset of the first probe. Despite the long time to reach the sieve elements, phloem ingestion is the main activity of *D. citri* within the plant, with average total duration of 206.1 min (42.9% of the recording time). Waveform G (xylem ingestion) was observed after C with a very low frequency (1.3%) and mean duration of 23.7 min. These data on probing behavior of *D. citri* are basic to determine stylet activities and time periods required for acquisition and inoculation of *Candidatus* Liberibacter spp. in citrus, as well as to establish effective control tactics for preventing HLB spread.

Keywords: Asian citrus psylla; Probing behavior; EPG; Huanglongbing; *Candidatus* Liberibacter

3.1 Introdução

Greening dos citros, oficialmente denominada Huanglongbing (HLB) foi constatada em pomares cítricos do Brasil em 2004. O psilídeo *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) assume posição de destaque neste patossistema por transmitir tanto a forma asiática de HLB, associada à bactéria *Ca.* L. asiaticus, como também a forma americana, associada à nova espécie *Ca.* L. americanus (YAMAMOTO et al., 2006), estando ambas as espécies presentes em pomares paulistas (COLETTA-FILHO et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2005).

Plantas cítricas infectadas desenvolvem sintomas gerais de deficiência nutricional na folha, ramos e frutos e devem ser erradicadas em virtude de não haver cura para esta doença, e pelo risco de servirem de fonte de inóculo para aquisição e disseminação do patógeno pelo psilídeo dentro do pomar (GARNIER; DANIEL; BOVÉ, 1984; GRAÇA, 1991; FUNDECITRUS, 2009). Para entender o processo de transmissão de fitopatógenos é de extrema importância conhecer o comportamento alimentar dos insetos vetores, pois a aquisição e inoculação ocorrem durante a alimentação do vetor no tecido vegetal (COSTA, 1998). Informações detalhadas sobre a penetração estiletar e atividades e atividades envolvidas são essenciais para entender a aquisição e inoculação de patógenos. Infelizmente, para alguns vetores importantes de bactérias fitopatogênicas, particularmente cigarrinhas e psilídeos pouco é conhecido sobre o comportamento alimentar em seus hospedeiros.

Para estudar em mais detalhes o comportamento alimentar de insetos sugadores, McLean e Kinsey (1964), desenvolveram um método para registrar eventos elétricos relacionados à penetração estiletar e atividades alimentares no interior do tecido vegetal. Originalmente denominada "Electrical Monitoring System" (EMS), esta técnica consiste em montar um circuito elétrico do qual o inseto e planta fazem parte, utilizando um sistema de corrente alternada (AC), e registrando-se oscilações de voltagem (ou ondas) associadas às atividades estiletares dos insetos. Atualmente esta técnica é denominada "Electrical Penetration Graph" (EPG), podendo utilizar também um sistema de corrente contínua (DC), que registra oscilações de voltagem decorrentes tanto de componentes de resistência (R) quanto de força eletromotriz (emf) na interface inseto-planta (TJALLINGII, 1978).

Várias espécies de Sternorrhyncha já tiveram seu comportamento alimentar caracterizado por EPG, principalmente utilizando-se o sistema DC, sendo que para afídeos já foram bem estabelecidas as formas de onda, relacionadas às fases de caminhamento estiletar na epiderme e parênquima vegetal (formas: A, B, C, pd e F), de ingestão nos vasos do xilema (G) e floema (E1-salivação e E2-ingestão) (TJALLINGII, 1978; PRADO; TJALLINGII, 1994). Para aleirodídeos, Janssen, Tjallingii e Van Lenteren (1989) descreveram formas de onda relacionadas à fase de caminhamento (A e C), xilema (G) e ingestão no floema [E(pd)]. Calatayud et al. (1994) observaram ondas de caminhamento (A e C) e de atividade no floema (E) para cochonilhas.

Apesar da grande importância de *D. citri* como vetor de bactérias associadas ao HLB, pouco se sabe a respeito de sua penetração estiletar e atividades alimentares em plantas cítricas

que resultam na transmissão desses patógenos. Este conhecimento é fundamental para estabelecer métodos de controle que possam interferir no processo de alimentação do inseto e com isso evitar a disseminação da doença. Este trabalho teve por objetivo caracterizar formas de ondas de EPG-DC associadas à penetração estiletar e atividades alimentares de *D. citri* em citros, para fundamentar o uso da técnica de EPG em estudos de comportamento alimentar deste inseto vetor. Para tal, formas de ondas de EPG produzidas por adultos desse psilídeo em seedlings de laranja doce foram correlacionados com análises histológicas da posição das terminações de bainhas estiletares deixadas no tecido vegetal, e comparadas com as formas de ondas já descritas para outros Sternorrhyncha.

3.2 Desenvolvimento

3.2.1 Material e Métodos

Insetos e Plantas

A colônia de *D. citri* foi mantida sobre plantas de murta *Murraya paniculata* (L.) Jack (Rutaceae), que é um hospedeiro adequado para criação deste inseto. A criação foi acondicionada em caixas de acrílico (35 x 35 x 53 cm) mantidas em sala climatizada (25±2ºC; 70±% UR e fotofase de 14 h). Para o estudo com EPG, utilizaram-se fêmeas recém-emergidas com até 10 dias de idade que passaram por um período de aclimatação de 2 dias em seedlings de laranja-doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] cv. 'Pêra'. As plantas-teste utilizadas na aquisição dos registros de EPG foram seedlings sadios de laranja doce com 20 – 25 cm de altura, produzidas em sacos plásticos (500ml) contendo solo, esterco e areia (3:1:1), e mantidas em viveiros telados contra o acesso de insetos vetores.

Electrical Penetration Graph (EPG)

O experimento foi conduzido em sala climatizada com as mesmas condições descritas para a criação dos insetos. Os registros de EPG foram obtidos utilizando o sistema DC modelo GIGA-8 (Wageningen University) (TJALLINGII, 1978; 1988), ajustados com "ganância" de 100x. O sinal analógico foi convertido em digital mediante a placa DI-710 (Dataq® Instruments, Akro, OH, USA), acoplado a um computador Pentium4® para aquisição e armazenamento dos

dados, por meio do programa Probe 3.0 (Laboratory of Entomology, Wageningen University, The Netherlands).

Os psilídeos foram anestesiados com CO_2 durante 3 s e imediatamente imobilizados com auxílio de uma bomba de vácuo semelhante à descrita por Van Helden e Tjallingii (2000), sob microscópio esteroscópico. Um fio de ouro (Sigmund Cohn, Mont Vernon, NY, USA) de 20 μm de diâmetro e 3 cm de comprimento, previamente acoplado a um eletrodo de cobre de 3 cm de comprimento x 1 mm de diâmetro, foi fixado sobre o pronoto do inseto com auxilio de uma tintura a base de prata diluída em álcool (Laboratory of Entomology, Wageningen University, The Netherlands). Em seguida, o eletrodo foi acoplado ao amplificador de sinais e o inseto colocado sobre a superfície abaxial da folha da planta cítrica. Outro eletrodo de cobre de 10 cm de comprimento x 2 mm de diâmetro (plant electrod) foi inserido no solo do vaso em que estava a planta. O processo de monitoramento foi realizado dentro de uma gaiola de Faraday (100 x 110 x 90 cm). Para auxílio na interpretação do comportamento alimentar alguns registros foram monitorados através de um sistema de vídeo com uma câmera digital (DCR-HC21, Sony, Toyohashi, Japan) e posteriormente as imagens foram analisadas correlacionando o comportamento do inseto com a forma de onda observada.

Cada psilídeo foi monitorado por 8 horas e os dados de 20 indivíduos foram analisados com o auxílio do programa Probe 3.0. As formas de onda de EPG foram descritas em relação às características da morfologia da onda, análise de espectro de amplitude (máxima e mínima), frequência (Hertz), nível de voltagem (extra ou intracelular) e origem elétrica (resistência – R ou força eletromotriz – emf). Para determinação da origem elétrica, ajustou-se o nível de voltagem para positivo e negativo em diferentes períodos para cada tipo de onda. A amplitude e frequência foram estimadas usando a média de 60 valores observados em distintos pontos para cada padrão (3 observações por inseto).

Histologia do tecido vegetal para análise da posição dos estiletes em diferentes tipos de onda

Em testes preliminares, foi definida as formas de ondas que eram observadas nos registros. Assim, os psilídeos foram monitorados sobre mudas cítricas nas mesmas condições de desenvolvimento que as utilizadas para a aquisição dos dados e, para cada forma de onda de interesse, a alimentação foi interrompida retirando-se o inseto da planta. Uma área de

aproximadamente 0,5 cm^2 do tecido vegetal onde o inseto estava se alimentando foi retirada da planta, sendo em seguida imersa em fucsina ácida (1%) por 3 min, com o objetivo de tingir a saliva produzida pelo inseto durante o início da alimentação, e facilitar assim a visualização do ponto de inserção dos estiletes (MIRANDA et al.; 2009). Posteriormente, o material foi lavado em água destilada, seco em papel-filtro e fixado em solução Karnovsky (KARNOVSKY, 1965). Em seguida foi feita a desidratação à temperatura ambiente em uma série etílica crescente (10% a 100%). Para infiltração e emblocagem, utilizou-se o kit Historesina (Leica, Heidelberg, Germany).

Posteriormente foram realizados cortes seriados em micrótomo com espessura de 12 μm; estes foram corados em solução de azul de toluidina (SAKAI, 1973). Inicialmente, a visualização para encontrar a bainha salivar no tecido foi feita em microscópio ótico (200x); posteriormente os cortes foram montados em resina sintética "Entellan" para a realização de fotomicrografias em fotomicroscópio Leica DM LB.

Após correlações das formas de onda produzidas por *D. citri* na alimentação em folhas cítricas com o estudo da extremidade distal da bainha salivar, calcularam-se valores médios (estatística descritiva) de alguns parâmetros de EPG que representam o comportamento alimentar de adultos deste inseto por um período de 8 horas.

Estudou-se também a sequência típica de eventos que podem ocorrer durante a penetração estiletar, por meio do cálculo da probabilidade de uma determinada forma de onda ser seguida por outra (WAYADANDE; NAULT, 1996; ALMEIDA; BACKUS, 2004; MIRANDA et al.; 2009).

3.2.2 Resultados

Quando alimentados em citros por um período de 8 h, adultos de *D. citri* produziram cinco formas de ondas distintas, que foram descritas baseando-se em sua associação com a posição das terminações da bainha estiletar no tecido vegetal e atividade exercida naquele tecido. Cada forma foi representada por uma letra indicando a atividade alimentar bem como o tecido explorado pelos estiletes. As letras utilizadas para estas ondas já foram empregadas para afídeos por Tjallingii (1978) e Prado e Tjallingii (1994), excetuando-se a forma de onda D. A letra C, indica penetração intercelular no parênquima; D, primeiro contato com o floema; E1, salivação

no floema; E2, ingestão no floema; e G, ingestão no xilema (Figura 1A-J). As principais características referentes às cinco formas de onda estão inseridas na tabela 1. O caminhamento estiletar de *D. citri* nos tecidos da epiderme e parênquima foi sempre intercelular; não foram observadas ondas do tipo 'potential drop' (Pd) durante o caminhamento, sugerindo que este inseto não tem o hábito de fazer picadas de provas em células (Figuras 2B; C; F). As cinco formas de onda estão representadas na figura 1A, o caminhamento dos estiletes pelo parênquima lacunoso forma C é apresentada na Figura 1B, a forma xilemática (G) é observada na Figura 1C, a forma D que antecede a fase floemática é representada na Figura 1D, e a salivação (forma de onda E1) e ingestão floemática (forma E2) estão representadas nas Figuras 1E e 1F respectivamente.

Considerando 20 insetos adultos, a forma de onda Np (não prova) foi observada 30,71 ± 4,0 vezes/indivíduo e duração média de 115,86 ± 13,4 minutos (Tabela 2). A primeira atividade alimentar de *D. citri* é a forma de onda C (caminhamento estiletar, Figura 3); em 8 horas de registro cada indivíduo realizou em média 34,3± 4,0 este comportamento e permaneceu nesta atividade (prova) 157,1± 18,0 minutos (Tabela 2). Uma vez em C a maior probabilidade é que o inseto retorne à forma Np (86,2%) (Figura 3), ou seja, *D. citri* é um inseto com o hábito de efetuar muitas provas. 12,5% é probabilidade do primeiro contato com o floema (forma D) após C. Uma vez produzido essa onda, sempre será observada a salivação no floema (E1) (Figura 3). Consequentemente, as formas D e E1 foram observadas o mesmo número de vezes (3,7 ± 0,9) (Tabela 2).

Uma vez salivando, os insetos apresentam uma maior chance de voltar à forma C (55%) que iniciar a ingestão no floema, E2 (45%) (Figura 3). A atividade de ingestão floemática (E2) é realizada (1,8 ± 0,2 por indivíduo), porém é o comportamento em que os insetos permanecem por mais tempo, (206,1 ± 25,1 minutos) podendo chegar a 389,02 minutos do total de 480 minutos (Tabela2). Ao interromper ou finalizar a ingestão, em todos os casos os insetos retornam à forma de onda C (Figura 3). Somente 4 indivíduos produziram a forma G, com média de 0,45 ± 0,2 vezes por indivíduo; nesta atividade xilemática os insetos permaneceram um total de 46,02 ± 4,8 minutos (Tabela 2) e em todos os casos foi observado o retorno à forma de onda C (Figura 3).

Correlações entre os padrões de EPG e posição da extremidade distal da bainha salivar produzida durante a alimentação

Para a caracterização do comportamento alimentar deste inseto, a análise histológica para encontrar a bainha salivar foi uma etapa fundamental, haja vista que em testes preliminares constatou-se que a excreção de "*honeydew*" não condiz com o momento exato da alimentação. Este inseto, parece reter esse produto para a eliminação posterior. Abdullah (2008), observou que ninfas de *Bactericera cockerelli* (Sulc) (Hemiptera: Psyllidae) excretam gotículas que cristalizam que em contato com o ar.

Ao iniciar a penetração, os estiletes entram através dos espaços intercelulares da epiderme, não sendo observada entrada pelos estômatos e em nenhum momento houve lise celular (Figura 2b e 2C). Uma vez com os estiletes introduzidos na folha, todo o caminhamento percorrido no parênquima lacunoso é intercelular até chegar no floema e ou xilema (Figura 2A e 2F). Para cada forma de onda apontada anteriormente (C; D; E1e E2), encontrou-se a bainha salivar correspondente, exceto G. A forma de onda G, que representa a fase xilemática foi caracterizada por similaridade com a forma de onda G produzida por afídeos, já que sua frequência de ocorrência foi muito baixa. Essa onda apresenta uma amplitude média entre 50-90% e freqüência em Hz "*waves*" 5-7 e "*peaks*" 6-8 (Tabela 1).

Para a forma C, todas as bainhas salivares (n=6) corresponderam ao caminhamento estiletar através do tecido parenquimático lacunoso, ou seja, a extremidade distal da bainha sempre estava neste tecido (Figura 2B e 2C); já para as formas: D; E1 e E2 (5, 5 e 6 bainhas respectivamente), impreterivelmente terminaram nos vasos do floema (Figuras 2A; 2D e 2E) respectivamente. Dentre as bainhas salivares referente à forma E2 uma apresentou ramificação (Figura 2E), muito provavelmente, o inseto não encontrou um local adequado para a alimentação como vasos crivosos por exemplo, ou realizou uma salivação (E1) não seguida de ingestão (E2) e quando novamente encontra o floema inicia uma alimentação contínua produzindo a bainha ramificada.

Características dos parâmetros que ocorrem durante a penetração estiletar considerando vinte insetos em oito horas de registro

Após serem acoplados ao equipamento de EPG, o tempo médio para que os insetos realizem a primeira prova (forma C) é de 3,10 ± 1,21 (Tabela 3). A duração média de uma "C" é

de 10,00 ± 4,2 minutos ao longo de oito horas de registro, podendo alcançar 87,52 minutos (Tabela 2). Na primeira hora, o número de "Cs" é 4,6 vezes maior que o realizado na segunda hora, com 14.05 ± 1,76 e 3,05 ± 0,89 respectivamente (Tabela 3). Para o período em que o inseto não está realizando nenhum tipo de atividade alimentar, período de não-prova (Np), a duração média foi de 4,2 ± 0,5 minutos, não excedendo 10,4 (Tabela 2). Do total de insetos analisados (20), quatro se alimentaram do vaso xilemático (forma G) com uma duração média de 23,7 ± 5,1 min, apresentando como menor tempo desse comportamento 13,2 min, não superando a 36,00 min (Tabela 2).

Após percorrer todo o parênquima lacunoso, o inseto encontra o vaso do floema através de seus estiletes. Todos os indivíduos avaliados atingiram o floema, sendo que E2 (ingestão) foi a atividade que permaneceram por mais tempo, com uma média de 206,1 ± 25,1 minutos (Tabela 2).

Em todos os casos, foi observada uma forma de onda característica após a forma C e que sempre antecede a salivação no floema (E1), denominada como forma D (Figura 1D); é um comportamento que difere do que normalmente ocorre com afídeos e outros Sternorrhyncha. Em afídeos por exemplo, após uma C (caminhamento) observa-se uma queda de potencial representada pela forma E1 (salivação no floema); a forma D apresenta uma amplitude média de 50% a 5V, freqüência em Hertz entre 1,0-3,5 "*peaks*" e nível de voltagem extracelular, a atividade associada à forma de onda D é desconhecida (Tabela 1). Em todos os cortes histológicos (n=5) para a forma de onda D, a extremidade distal da bainha salivar estava no tecido floemático (Figura 2A) e uma vez nesse padrão sempre ocorreu uma salivação (E1) (Figura 3).

A duração média da forma D é de 0,77 ± 0,05 (46,2 segundos), com tempo mínimo de 22,8 e máximo de 78,0 segundos (Tabela 2). O tempo médio desde a primeira prova para que o inseto realize uma salivação (forma E1) foi de 154,89 ± 20,94 min., podendo tardar pouco mais de 5 h (307,23 minutos) ou ocorrer na primeira hora (50,09 min.) (Tabela 3). Ao encontrar o floema o inseto impreterivelmente apresenta a forma de onda D seguida de E1 como comentado anteriormente. Uma vez salivando (E1), o inseto pode iniciar o processo de ingestão (45% de probabilidade) ou voltar a fase de caminhamento (C) (55% de probabilidade) (Figura 3). Então, podemos encontrar uma E1 seguida de C ou uma E1 seguida de E2; no primeiro caso chamamos de E1 "single" (nove insetos apresentaram esse comportamento), que ocorreu com freqüência

média de 1,85 ± 0,7 vezes/inseto e com duração média de 1,24 ± 0,64 min em 8 horas de registro; já a freqüência média de uma E1 seguida de E2 foi de 3,7 ± 0,9 vezes por inseto e a duração média foi de 1,55 ± 0,24 min, variando de 0,39 a 4,8 minutos (Tabela 2).

Antes da primeira salivação (E1), adultos de *D. citri* produzem um número médio de 20,30 ± 2,53 provas (forma C), com duração de 27,40 ± 4,9 min./prova. Contudo, observou-se um tempo mínimo de 8,9 min, podendo chegar a até 89,6 minutos. Após o período floemático (E1 + E2), esse número de provas cai pela metade (10,1± 3,4). As provas menores que 3 minutos de duração antes de (E1+E2) ocorreram em uma frequência média de 23,75 ± 3,53, muito superior à de 7,75 ± 3,05 provas, constatada após essa fase floemática (Tabela 3). Quando o inseto inicia a ingestão (E2), ele pode ficar se alimentando no vaso floemático por um período de até 389,0 minutos ou efetuar uma ingestão curta de 8,9 min. A duração média deste comportamento foi de 150,2 ± 24,3 minutos, sendo a forma de onda em que o inseto permaneceu por mais tempo dentre as cinco formas de onda descritas, evidenciando o comportamento alimentar floemático para essa espécie de psilídeo (Tabela 2). Ao final da terceira hora desde a primeira prova (177,78 ± 22,67 minutos em média), a maior parte dos insetos iniciou a ingestão, podendo ocorrer já na primeira hora, mas com um tempo não inferior a 51,87 minutos (Tabela 3).

3.2.3 Discussão

Até o momento a técnica de EPG tanto no sistema AC quanto no DC permitiu o conhecimento detalhado do comportamento alimentar de pouco mais de 50 espécies de hemípteros, contribuindo com informações importantes para uma melhor compreensão do patosistema inseto-planta-patógeno, o que é fundamental para o manejo integrado de pragas (BACKUS, 1994).

Para a família Psyllidae foi realizado um único trabalho, onde Ulman e McLean (1988) monitoraram as atividades alimentares no sistema AC de ninfas e adultos de *P. pyricola* e idenficaram uma forma de onda S (salivação) e outra I (ingestão), diferindo de *D. citri* que apresentou cinco formas de onda distintas. Esses autores observaram que tanto ninfas quanto adultos apresentam um movimento constante de antenas inclusive após o início da ingestão. Foram realizadas gravações em vídeo desde o início do experimento e observou-se que adultos de *D. citri* também apresentam esse comportamento característico; porém, quando o inseto realiza

uma forma C mais constante (por exemplo, duração média 10 ± 4,15 min, Tabela 2), ou quando estão em ingestão contínua no floema (E2) o movimento de antenas é paralisado.

Outro ponto importante observado por Ulman e McLean (1988), é a preferência pelas nervuras foliares para a alimentação de *P. pyricola*. No caso de *D. citri,* adultos também realizam a alimentação em nervuras de folhas cítricas, mas com preferência para a nervura principal ou central observado em testes preliminares, área que apresenta maior feixe floemático segundo Queiroz-voltan e Blumer (2005); podendo ser um dos motivos pelo qual o inseto tem esse hábito.

Ainda em Ulman e McLean (1988), o tempo desde o início do experimento até a primeira prova explorando a superfície foliar foi de 2,9 minutos para ninfas de *P. pyricola*, resultado praticamente semelhante ao que obtivemos para adultos de *D. citri* (3,10 minutos, Tabela 3); já adultos do psilídeo da pereira apresentaram um tempo superior a 4,4 minutos. Eles observaram também que tanto ninfas como adultos se alimentaram em vários tipos de células, não ingerindo predominantemente seiva do floema, contrariamente foi observado que *D. citri* se alimenta de floema ou de xilema com um tempo médio de 206,1 e 46,0 minutos, respectivamente (Tabela 2), concordando com Hodkinson (1974), que relatou o hábito floemático para a família Psyllidae.

Forma de onda C

Tjallingii (1978; 1985) monitorou atividades alimentares de pulgões através de EPG-DC e relatou que esta forma de onda é complexa, porque pode assemelhar-se a outras ondas com relação ao nível de amplitude da onda ou freqüência de '*peaks*'. Para afídeos, esta forma apresenta as seguintes características: amplitude da onda 30%, uma freqüência não determinada (mistura de picos), o estilete pode estar em todos os tecidos e a atividade é de caminhamento intercelular, podendo ocorrer 'pds' entre a forma de onda (REESE et al, 1994). Em *D. citri,* a forma C também está relacionada com o caminhamento intercelular, porém quedas de potencial (pds) não foram observadas, a morfologia da onda é distinta, amplitude é de 45% com uma frequência de picos variando entre 11,5-19,0 Hz (Tabela 1).

Janssen, Tjallingii e Van Lenteren (1989) estudaram o comportamento alimentar da mosca-branca *Trialeurodes vaporariorum* (Westw.) no sistema DC e observaram que a forma C também representa a atividade de caminhamento estiletar intercelular no mesófilo, podendo ocorrer 'pds' porém mais raramente que afídeos. A freqüência é de 10-16 Hz inicialmente, que decresce com o tempo, está freqüência é bem similar a observada em *D. citri*, porém para o

psilídeo se manteve estável durante as 160 horas de registros (11,5-19,0 Hz; Tabela1), a forma de onda C pode apresentar "subformas" como ocorre em moscas-branca (JANSSEN; TJALLINGII; VAN LENTEREN, 1989), porém neste trabalho não foi estudada em detalhes, já que o principal interesse são as formas de onda floemáticas onde supostamente ocorre a aquisição e inoculação de *C.* L. spp. Jiang et al. (1999) monitoraram durante seis horas o comportamento alimentar de *Bemisia tabaci* (Gennadius) frente a dois biótipos de tomate e observaram uma frequência entre 5-10 Hz e amplitude entre 10-60% para as subformas I e II, ficando abaixo da frequencia mínima observada em *D. citri* (11,5; Tabela1), já a amplitude de 45% foi estável diferindo da variação relatada para este aleirodídeo.

Lei, Van Lenteren e Tjallingii (1999), observaram que quando alimentada em tomate *T. vaporariorum* realizou 57,1 provas (forma C) em um período de 12 horas (4 horas a mais em relação ao presente trabalho), aproximadamente 24 provas a mais que *D. citri* (Tabela 3), já para *B. tabaci* Jiang et al. (1999) constataram uma média de 78,7 e 60,3 provas quando alimentada em dois biótipos de tomate, muito superior a média constatada neste ensaio que não ultrapassou 73 provas (Tabela 3), além de serem grupos diferentes de insetos, este fato pode estar relacionado com a planta hospedeira, já que plantas de citros não possuem tricomas facilitando a busca por um local adequado para a alimentação, o que não ocorre com *B. tabaci* em tomate. Yang e Walker (2003) monitoraram ninfas de *B. argentifolii* e observaram que a forma de onda C também apresenta um nível de voltagem extracelular e todo o caminhamento dos estiletes se da entre as células.

Para a cochonilha *Phenacoccus manihoti,* a frequência para a forma C não ultrapassou 11 Hz (CALATAYUD et al., 1994), também inferior a mínima observada para *D. citri* (11,5 Hz tabela 1). Como parte intrínseca da forma C ocorrem às quedas de potenciais (pds) para insetos do grupo Sternorrhyncha (TJALLINGII, 1978; JANSSEN; TJALLINGII; VAN LENTEREN, 1989; JIANG et al., 1999; CALATAYUD et al., 1994) comportamento não observado para adultos de *D. citri* neste trabalho.

Forma de onda G

Embora se alimentem predominantemente de seiva do floema, *D. citri* assim como afídeos são capazes de ingerirem seiva do xilema. De 20 indivíduos de *D. citri* avaliados, 4 se alimentaram no xilema com um tempo médio de 23,7 minutos de ingestão (Tabela 2). A seiva

xilemática é composta basicamente de água e sais minerais (GOLLAN et al., 1992); portanto, é improvável que supra os insetos nutricionalmente quando comparada com uma alimentação floemática; porém, pode ser uma importante fonte de água evitando a desidratação do inseto. Um estudo de EPG realizado com *Aphis fabae* Scop. (Homoptera: Aphididae) mostrou que a duração de ingestão no xilema aumentou consideravelmente quando os insetos eram submetidos a um período de não alimentação 'jejum' (SPILLER; KOENDERS; TJALLINGII, 1990). No presente trabalho os insetos não foram submetidos ao jejum, então pode ser que os quatro psilídeos que ingeriram seiva xilemática tenham passado por um período de não alimentação enquanto estavam em aclimatação.

A forma de onda G somente foi observada no período de marcação dos registros; por esta razão, não foram realizados cortes histológicos para o estudo da bainha salivar. É uma onda pouco frequente, que apresenta uma probabilidade de ocorrer de 1,3%, inferior à probabilidade de ocorrência de uma forma de onda floemática (12,5%) (Figura 3). Para a cochonilha *P. manihoti* não foi observada claramente a forma G (CALATAYUD et al., 1994). Por similaridade, a forma G é compatível morfologicamente as formas xilemáticas que outros insetos do mesmo grupo Sternorrhyncha possuem, por exemplo, afídeos apresentam uma freqüência entre 4 e 9 Hz, nível de voltagem extracelular (e) e origem do sinal elétrico força eletromotriz (emf) para '*waves*' (w) e resistência (R) para '*peaks*' (VAN HELDEN; TJALLINGII, 2000). Neste trabalho foram constatadas iguais características para o psilídeo dos citros, porém com uma menor variação de frequência, entre 5,0-7,0 e 6,0-8,0 para '*waves*' e '*peaks*' respectivamente (Tabela 1).

Forma de onda D

Esta nomenclatura foi empregada para afídeos por Tjallingii (1978), o autor relatou que este comportamento representava parte da ingestão floemática e era equivalente a "forma de onda I" de ingestão para pulgões, observado por McLean e Kinsey's (1964). Como havia uma ausência de correlação para esta atividade na época e posteriormente o comportamento floemático foi estabelecido salivação e ingestão (E1 e E2 respectivamente), decidiu-se resgatar a nomenclatura já que a forma D deste trabalho também está relacionada com o floema.

Todos os cortes histológicos para esta forma de onda apresentaram a extremidade da bainha salivar no tecido floemático (Figura 2A) e o nível de voltagem é extracelular (e) (Tabela 1), já que não se observa uma queda de potencial (Figura 1D), muito provavelmente esse

comportamento representa o primeiro contato com o vaso floemático, contudo, apesar dos cortes apresentarem a bainha salivar no floema o tipo de atividade é indeterminado (Tabela 1).

Esta forma sempre está entre uma C e uma E1 (Figura 1D), ou seja, antes que o inseto salive no floema ela é observada, com uma amplitude de 50% e frequência entre 1,0-3,5 Hz (Tabela 1). Até então parece ser um padrão específico da espécie *D. citri*, já que Ullman e McLean (1988) não relataram qualquer tipo de atividade semelhante para *P. pyricola*, (pertencente à mesma família). Janssen, Tjallingii e VAN Lenteren, (1989) relataram que a forma floemática E(pd) para a mosca-branca *T. vaporariorum* ocorre sempre após a forma C, não sendo observado outro tipo de onda entre essas formas.

Ninfas de *B. argentifolii* quando encontram o floema ocorre uma transição abrupta do nível de voltagem extra (e) para intracelular (i) originando uma nova forma de onda nomeada como J , esta forma é breve e também não tem uma atividade biológica conhecida, porém apresenta um nível de voltagem intracelular (i) diferentemente da forma D para *D. citri* que é extracelular (e), curiosamente os autores relataram que este comportamento poderia representar o começo da fase floemática ou ainda uma atividade preparatória antes das atividades principais de floema (YANG; WALKER, 2003). Lei et al. (1996) estudaram o comportamento alimentar de ninfas de *T. vaporariorum* e não encontraram comportamento semelhante, o mesmo foi observado para a cochonilha da mandioca *P. manihoti*, a forma floemática (E1) inicia-se com uma queda de potencial após uma C (CALATAYUD et al., 1994). Afídeos apresentam a forma C como a última que antecede o comportamento floemático (TJALLINGII, 1978, 1988; PRADO; TJALLINGII, 1994). Todos esses sternorrhynchos basicamente seguem o modelo do comportamento alimentar dos pulgões e, contrariando essa similaridade, *D. citri* apresenta a forma de onda D entre as formas C e E1 (Figura 1A e 1D).

Formas de onda E1 e E2

A fase floemática é formada por duas formas de onda, E1 (salivação) e E2 (ingestão). Em ambas, as extremidades distais das bainhas salivares são observadas no feixe floemático (Figuras 2 D, E e F). Uma vez atingido o floema (após D), a forma E1 sempre é observada, E1‘single’ quando não é seguida pela ingestão (E2) ou E1 + E2 (salivação seguida de ingestão) concordando com Tjallingii, (1978; 1988) e Prado e Tjallingii (1994), nove adultos de *D. citri* apresentaram E1 ‘single’ não seguida de E2 (Tabela 2). Pulgões apresentam uma freqüência entre 2 e 4 Hz para E1

(VAN HELDEN; TJALLINGII, 2000). *D. citri* apresentou uma freqüência maior, entre 5 e 7,5 Hz; contudo, a oscilação é praticamente a mesma (2,5 Hz) (Tabela 1).

Esses comportamentos floemáticos observados em *D. citri* apresentam uma similaridade com afídeos e outros insetos pertencentes ao mesmo grupo baseado em duas observações: 1) todos os cortes histológicos apresentaram a extremidade distal da bainha salivar no tecido floemático, 2) o nível de voltagem é mantido ao longo do padrão, indicando a posição intracelular (i) dos estiletes (Tabela 1), assim como o potencial de membrana também é mantido (TJALLINGII, 1985). Um dos cortes histológicos que correlacionaram com E2 foi detectada uma bainha ramificada (Figura 2E), podendo evidenciar uma E1 'single', desta forma podemos considerar que o inseto apenas salivou no floema (E1), e em uma segunda tentativa a ingestão foi estabelecida (E1 + E2) momento em que o inseto foi retirado da folha para o estudo histológico.

Calatayud et al. (1994) relataram que de maneira geral as formas de onda E1 e E2 produzidas para a cochonilha *P. manihoti* são homólogas as observadas em afídeos. Da mesma forma, moscas brancas também apresentam igual comportamento (JANSSEN; TJALLINGII; VAN LENTEREN, 1989; LEI; VAN LENTEREN; TJALLINGII, 1999; JIANG et al., 1999). Portanto essas evidências sugerem certa similaridade entre *D. citri* e demais insetos do grupo Sternorrhyncha, principalmente quando ambos estão em atividade floemática.

Este estudo permitirá grandes avanços e melhor compreensão na relação entre vetor-patógeno-hospedeiro, contribuindo com informações importantes sobre o comportamento alimentar deste inseto que até então não eram detalhadas como. Foram estabelecidas as principais atividades estiletares durante a alimentação, evidenciando o comportamento floemático por adultos de *D. citri*. Essas informações serão de referência para estudos de transmissão de *Ca*. L. asiaticus pelo inseto, estudos de resistência de plantas, ação de inseticidas dentre outros, contribuindo de maneira significativa para o manejo integrado do Huanglongbing no mundo.

Tabela 1 – Sumário das principais características e correlações das formas de ondas de EPG-DC descritas para *Diaphorina citri* em *Citrus sinensis*

Ondas de EPG[1]	Características das formas de onda				Correlações	
	Amplitude[2] (%)	Frequência (Hertz)	Nível de voltagem[3]	Origem do sinal elétrico[4]	Local do estilete na planta	Atividade
C	45	11,5 - 19,0	e	R	Parênquima	Secreção da bainha salivar / intercelular
D	50	1,0 - 3,5	e	emf	Floema	Não determinado
E1	-	5,0 - 7,5	i	emf	Floema	Salivação
E2 w	-	3,0 - 8,0	i	emf	Floema	Ingestão
p	10 - 40	3,0 - 9,0	i	R		
G w	-	5,0 - 7,0	e	emf	Xilema	Ingestão
p	50 - 90	6,0 - 8,0	e	R		

[1]p= picos, w= ondas
[2]Amplitude média; 5V=100% amplitude
[3]e: extracelular; i:intracelular
[4]R: resistência;emf: força eletromotriz

Tabela 2 – Frequência de ocorrência e duração de formas de onda (EPG –DC) para *Diaphorina citri* durante um período de oito horas em folhas novas de *Citrus sinensis*. NPP: proporção de indivíduos que produziram um tipo de onda; NPI: número de indivíduos que produzem uma forma de onda específica; DTI: duração total (minutos) da forma de onda por indivíduo; DPI: duração (minutos) de uma forma de onda por indivíduo

	NPP	NPI		DTI		DPI	
		média ± EP (n = 20)	(min – max)	média ± EP (n)	(min – max)	média ± EP (n)	(min – max)
NP	20/20[1]	30,7 ± 4,0	(3 – 71)	115,9 ± 13,4 (20)	(0,38 – 226,9)	4,2 ± 0,5 (20)	(0,13 – 10,4)
C	20/20	34,3 ± 4,0	(3 – 73)	157,1 ± 18,0 (20)	(60,0 – 343,6)	10,0 ± 4,2 (20)	(1,8 – 87,5)
D	20/20	3,7 ± 0,9	(1 – 16)	2,74 ± 0,65 (20)	(0,38 – 12,3)	0.77 ± 0.05 (20)	(22,8 – 78,0)
E1“single”[2]	9/20	1,85 ± 0,7	(0 – 12)	3,3 ± 1,3 (9)	(0,51 – 12,3)	1,24 ± 0.64 (9)	(0,31 – 6,36)
E1[3]	20/20	3,7 ± 0,9	(1 – 16)	4,6 ± 1,0 (20)	(0,40 – 17,9)	1,55 ± 0,24 (20)	(0,39 – 4,8)
E2	20/20	1,8 ± 0,2	(1 – 4)	206,1± 25,1 (20)	(17,8 – 389,0)	150,2 ± 24,3 (20)	(8,9 – 389,0)
G	4/20	0,45 ± 0,2	(0 – 3)	46,0 ± 4,8 (4)	(36,0 – 55,9)	23,7 ± 5,1 (4)	(13,2 – 36,0)

[1]Número de indivíduos que produzem uma forma de onda no total de indivíduos avaliados.
[2]Forma de onda E1 não seguida da forma de onda E2.
[3]Forma de onda E1 seguida da forma de onda E2.

Tabela 3 – Parâmetros de EPG utilizados no estudo do comportamento alimentar de *Diaphorina citri* durante um período de oito horas em folhas novas de *Citrus sinensis*

Número de provas	**Média ± EP / (min-max)**
durante 8 h	34,3 ± 4,0 / (3 – 73)
na 1ª hora	14,05 ± 1,76 / (3 – 28)
na 2ª hora	3,05 ± 0,89 / (0 – 14)
Antes da 1ª E1	20,30 ± 2,53 / (3 – 41)
Após a 1ª E12[1]	10,1 ± 3,4 / (0 – 58)
<3 min antes de E12	23,75 ± 3,53 / (2 – 58)
<3 min após E12[1]	7,75 ± 3,05 / (0 – 50)
Tempo (min) para	**Média ± EP / (min-max)**
1ª prova a partir do início do experimento	3,10 ± 1,21 / (0,24 – 25,03)
1ª E1 desde o início da 1ª prova	154,89 ± 20,94 / (50,09 – 307, 23)
1ª E12ª desde o início da 1ª prova	177,78 ± 22,67 / (51,87 – 352,26)
Prova (padrão C) que antecede E1	27,4 ± 4,9 / (8,9 – 89,6)

[1]Forma de onda E1 seguida por E2

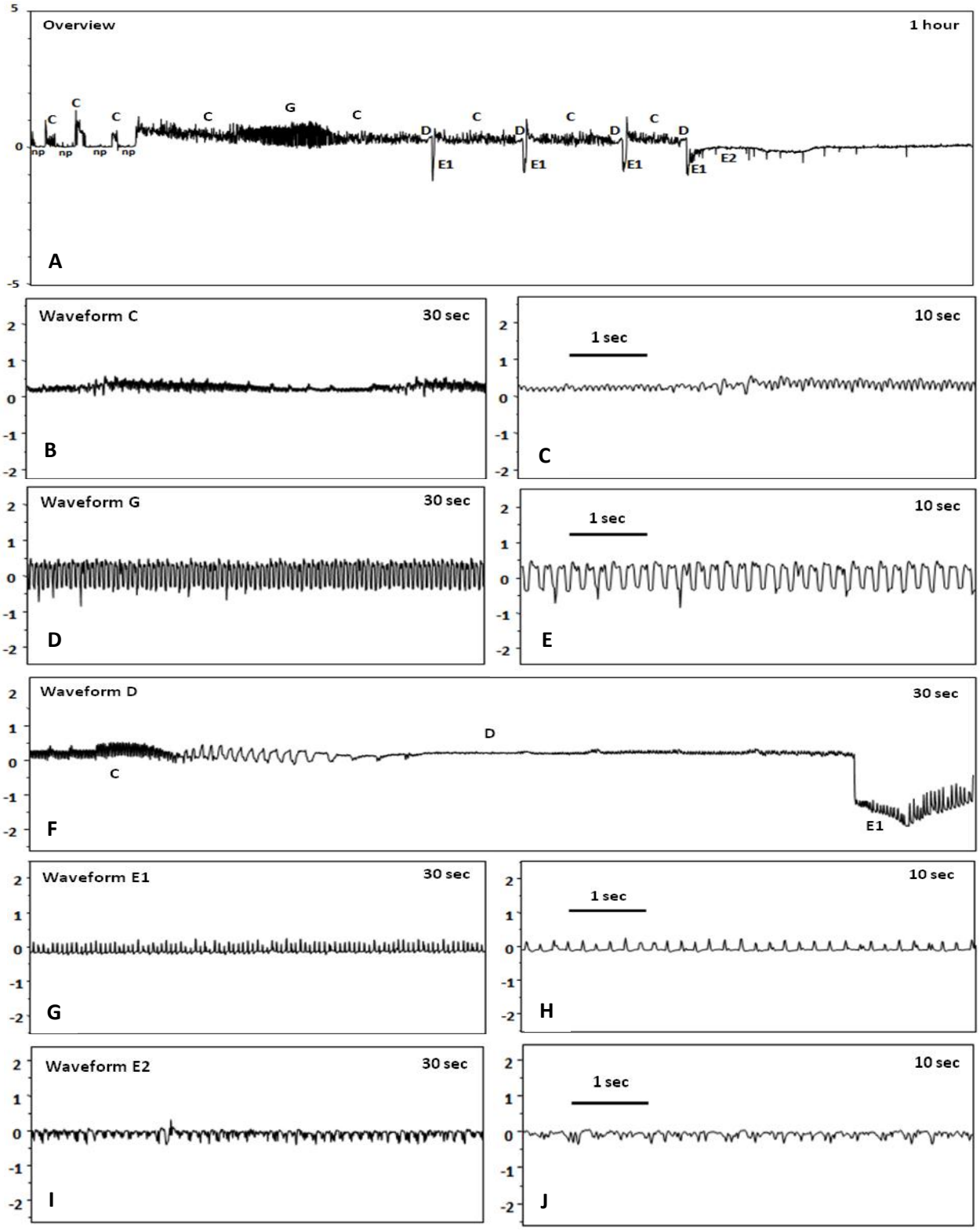


Figura 1 – Formas de onda de EPG produzidas por *Diaphorina citri* sobre folhas de *Citrus sinensis*. (A) Esquema de todas as formas registradas; (C) forma C em 30 seg.; (D) forma C em 10 seg.; (E) forma G em 30 seg.; (F) forma D em 30 seg.; (G) forma E1 em 30 seg.; (H) forma E1 em 10 seg.; (I) forma E2 em 30 seg.; e (J) forma E2 em 10 seg.

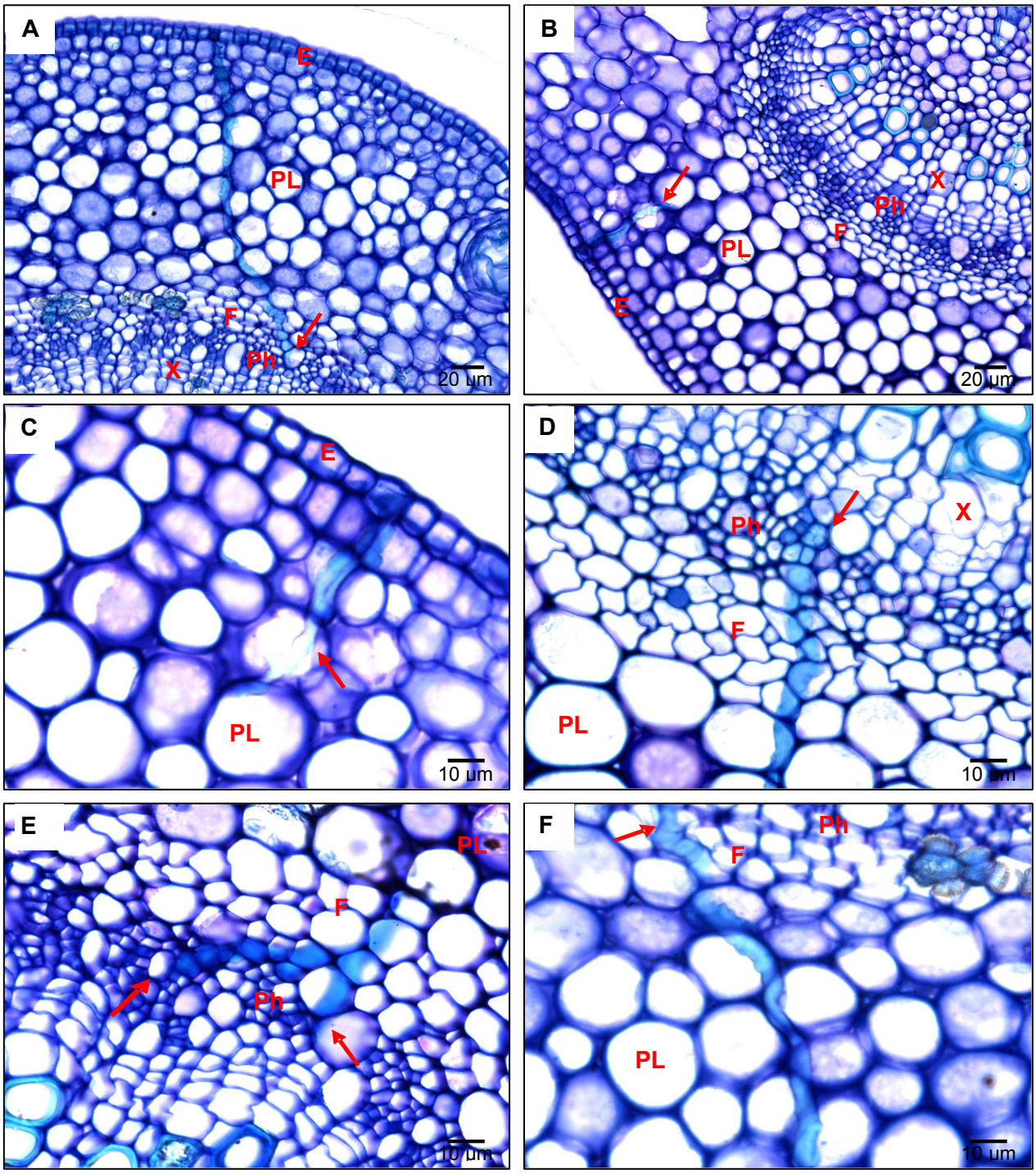


Figura 2 – Cortes transversais de folhas de *Citrus sinensis* contendo bainhas salivares de *Diaphorina citri.* (A) Bainha salivar completa terminando no floema durante a forma E1 (40x). (B e C) Bainhas com extremidades distais no parênquima lacunoso durante a forma C (40 e 100x respectivamente). (D) detalhe da bainha alcançando o floema durante a forma E2 (100x). (E) bainha salivar ramificada no floema durante a forma E2 (100x). (F) bainha salivar com extremidade distal alcançando o floema durante a forma D (100x). E: epiderme; PL: parênquima lacunoso; F: fibras; Ph: floema; X: xilema. Setas indicam o local onde as bainhas salivares terminam.

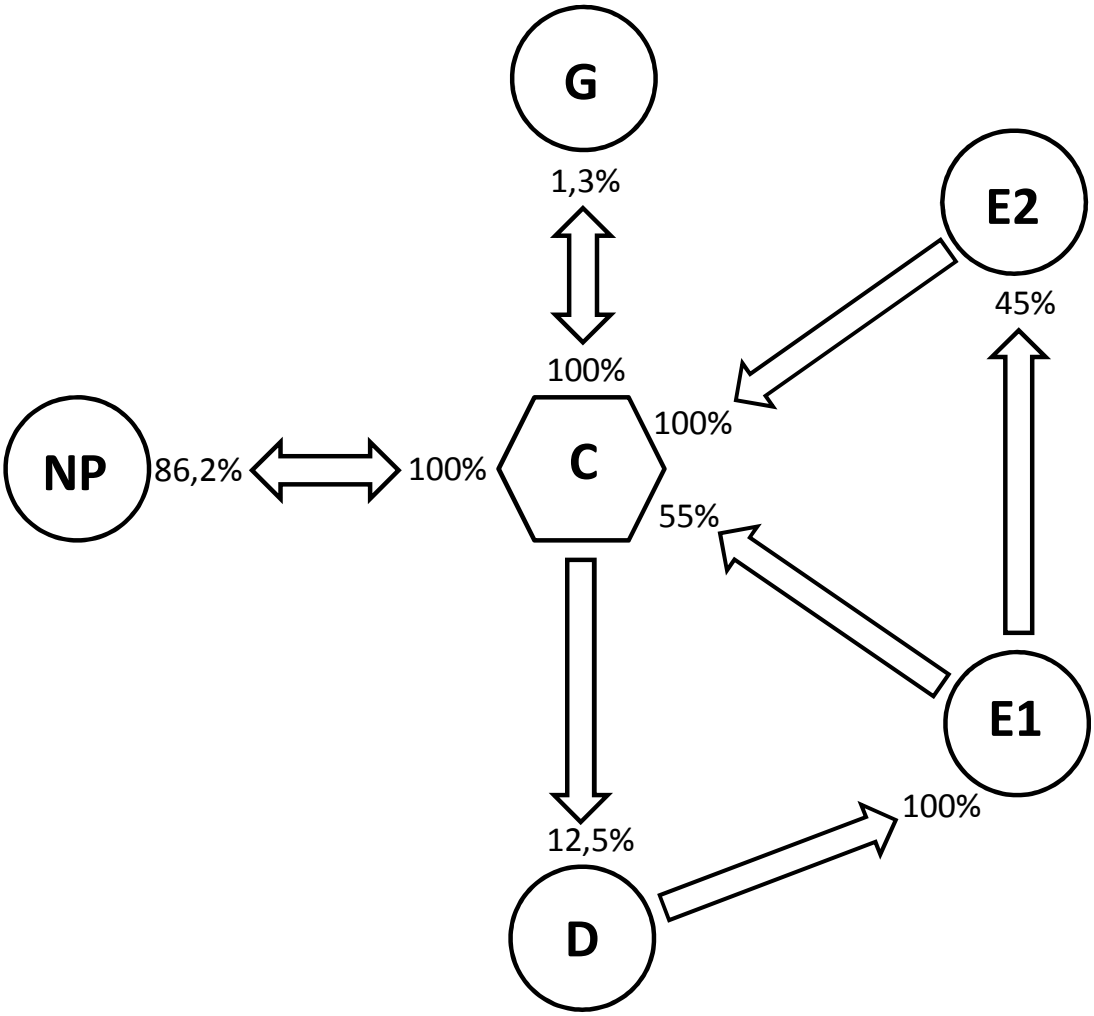


Figura 3 – Sequência de eventos para *Diaphorina citri* sobre folhas de *Citrus sinensis*. Os valores na cabeça de cada seta correspondem a probabilidade de uma forma de onda ser seguida por outra

Referências

ABDULLAH, N.M.M. Life history of the potato psyllid Bactericera cokerelli (Homoptera: Psyllidae) in controlled environment agriculture in Arizona. **African Journal of Agricultural Research**, Nairob, v. 3, n. 1, p. 60-67, 2008

ALMEIDA, R.P.P.; BACKUS, E.A. Stylet penetration behaviors of *Graphocephala atropunctata* (Signoret) (Hemiptera, Cicadellidae): EPG waveform characterization and quantification . **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 97, n. 4, p. 838–851, 2004.

BACKUS, E.A. History, development and applications of the AC electronic insect feeding monitors. In: ELLSBURY, M.M.; BACKUS, E.A.; ULLMAN, D.L. (Ed.). **History, development and applications of the AC electronic insect feeding monitors**. Lanham: Entomological Society of America, 1994. p. 1-15. (Thomas Say Publications in Entomology)

CALATAYUD, P.A.; RAHBÉ, Y.; TJALLINGII, W.F.; TERTULIANO, M.; Le RU, B. Electrical recording feeding behavior of cassava mealybug on host and non-host plants. **Entomologia experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 72, p. 219-232, 1994.

COLETTA-FILHO, H.D.; TARGON, M.L.P.N.; TAKITA, M.A.; NEGRI, J.D. de, POMPEU JR., J.; MACHADO, M.A. First report of the causal agent of huanglongbing ('*Candidatus* Liberibacter asiaticus') in Brazil. **Plant Disease**, St. Paul, v. 88, p. 1382, 2004.

COSTA, C.L. Vetores de vírus de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 6, p. 103-171, 1998.

FUNDECITRUS. Disponível em: <http://www.fundecitrus.com.br>. Acesso em: 10 jan. 2009.

GARNIER, M.; DANIEL, N.; BOVÉ, J.M. The greening organism is a gram negative bacterium. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 9., 1984, Riverside, **Proceedings…** Riverside: IOC, 1984. p. 115-124.

GOLLAN, T.; SHULZE, E.D.; SCHURR, U. Stomatal response to drying soil in relation to changes in the xylem sap composition of *Heiianthus annuus.* II. Stomatal sensitivity to abscisic acid imported from the xylem sap. **Plant cell and Environment**, Logan, v. 15, p. 561-567, 1992.

GRAÇA, J.V. Citrus greening disease. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 29, p. 109-136, 1991.

HODKINSON, I.D. The biology of the Psylloidea (Homoptera): a revew. **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal, v. 64, p. 325-339, 1974.

JANSSEN, J.A.M.; TJALLINGII, W.F.; VAN LENTEREN, J.C. Electrical recording and ultrastructure of stylet penetration by the greenhouse whitefly. **Entomologia experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 52, p. 69-81, 1989.

JIANG, Y.X.; WALKER, G.P. Electrical penetration graphs of the nymphal stage of *Bemisia argentifolii.* **Entomologia experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 109, p. 101-111, 2003.

JIANG, Y.X.; LEI, H.; COLLAR, J.L.; MARTIN, B.; MUÑIZ; FERERES, A. Probing and feeding behavior of two distinct biotypes of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) on tomato plants. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 92, n. 2, p. 357-366, 1999.

KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 27, p. 137-138, 1965.

LEI, H.; VAN LENTEREN, J.C.; TJALLINGII, W.F. Stylet penetration by larvae of the greenhouse whitefly on cucumber. **Entomologia experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 78, p. 77-84, 1996.

MIRANDA, M.P.; FERERES, A.; APPEZZATO-DA-GLORIA, B.; LOPES, J.R.S. Characterization of electrical penetration graphs of *Bucephalogonia xanthophis*, a vector of *Xylella fastidiosa* in *citrus*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 130, p. 35-46, 2009.

McLEAN, D.L.; KINSEY, M.G. A technique for electronically recording aphid feeding and salivation. **Nature**, London, v. 202, p. 1358-1359, 1964.

PRADO, E.; TJALLINGII, W.F. Aphid activities during sieve element punctures. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 72, p. 157-165, 1994.

QUEIROZ-VOLTAN, R.B.; BLUMER, S. Morfologia dos citros. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D. de; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Fundag, 2005. cap. 5, p. 107-123.

REESE, J.C.; MARGOLIES, D.C.; BACKUS, E.A.; NOYES, S.; BRAMELCOX, P.; DIXON, A.G.O. Characterization of aphid host plant resistance and feeding behavior through use of a computerized insect feeding monitor. In: ELLSBURY, M.M.; BACKUS, E.A.; ULLMAN, D.L. (Ed.). **History, development and applications of the AC electronic insect feeding monitors**. Lanham: Entomological Society of America, 1994. p. 70-101. (Thomas Say Publications in Entomology).

SAKAI, W.S. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue. **Stain Technology**, Baltimore, v. 48, p. 247-249, 1973.

SPILLER, N.J.; KOENDERS, L.; TJALLINGII, W.F. Xylem ingestion by aphis a strategy for maintaining water balance. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 55, p. 101–104, 1990.

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

TJALLINGII, W.F. Electronic recording of penetration behaviour by aphids. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 24, p.721-730, 1978.

_____. Electrical nature of recorded signals during stylet penetration by aphids. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 38, p.177-186, 1985.

_____. Electrical recording of stylet penetration activities. In: MINKS, A. K.; HARREWIJN, P. (Ed.). **Aphids:** their biology, natural enemies and control. Amsterdam: Elsevier, 1988. p. 95–108.

_____. Comparison of AC and DC systems for electronic monitoring of stylet penetration activities by Homopterans. In: WALKER, G.P.; BACKUS, E.A. (Ed.). **Principles and applications of electronic monitoring and other techniques in the study of Homopteran feeding behavior.** Lanham: Entomological Society of America, 2000. p. 41-69. (Thomas Say Publications in Entomology).

ULMAN, D.E.; McLEAN, D.L. The probing behavior of the summer-form pear psylla. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 47, p. 115-125, 1988.

VAN HELDEN, M.; TJALLINGII, W.F. Experimental design and analysis in EPG experiments with emphasis on plant resistance research, In: WALKER, G.P.; BACKUS, E.A. (Ed.). **Principles and applications of electronic monitoring and other techniques in the study of Homopteran feeding behavior.** Lanham: Entomological Society of America, 2000. p. 144-171. (Thomas Say Publications in Entomology).

WAYADANDE, A.C.; NAULT, L.R. Leafhoppers on leaves: an analysis of feeding behavior using conditional probabilities. **Journal of Insect Behavior**, New York, v. 9, p. 3-22, 1996.

YAMAMOTO, P.T.; FELIPPE, M.R.; GARBIM, L.F.; COELHO, J.H.C.; XIMENES, N.L.; MARTINS, E.C.; LEITE, A.P.R.; SOUSA, M.C.; ABRAHÃO, D.P.; BRAZ, J.D. *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae): vector of the bacterium *Candidatus* Liberibacter *americanus*. In: HUANGLONGBING INTERNATIONAL WOKSHOP, 2006, Ribeirão Preto. **Proceedings...** Ribeirão Preto: Fundecitrus, 2006. p. 96.

4 INFLUÊNCIA DA IDADE DA FOLHA CÍTRICA NO COMPORTAMENTO ALIMENTAR DE *Diaphorina citri* Kuwayama (HEMIPTERA: PSYLLIDAE) E NA AQUISIÇÃO DE *Candidatus* Liberibacter asiaticus

Resumo

O conhecimento de fatores que influenciam a eficiência de aquisição de *Candidatus* Liberibacter asiaticus por *Diaphorina citri* é importante para determinar condições favoráveis à disseminação da doença Huanglongbing (HLB) em citros e selecionar estratégias adequadas para interferir neste processo, Esta bactéria apresenta uma distribuição irregular nas plantas cítricas, com maior concentração em folhas mais maduras que apresentam os sintomas típicos da doença. Neste estudo avaliou-se a preferência de *D. citri* por diferentes partes da planta cítrica, bem como o efeito da idade da folha (nova e assintomática x madura e sintomática) na eficiência de aquisição e comportamento alimentar de *D. citri* em plantas-fonte infectadas com *Ca.* L. asiaticus. *D. citri* mostra nítida preferência por folhas novas da porção superior da planta (71,3% dos indivíduos), e pela nervura principal na face abaxial das folhas (87,1%). Grupos de insetos sadios foram então confinados separadamente em folhas maduras e folhas novas de plantas-fonte de Ca. L. asiaticus. Após um período de acesso à aquisição (PAA) de 4 dias, os psilídeos de cada tratamento foram mantidos em plantas sadias por 24 dias e, sua infectividade testada por PCR quantitativo. Adultos de *D. citri* adquiriram *Ca.* L. asiaticus em folhas novas (assintomáticas) com maior eficiência do que em folhas maduras (sintomáticas). Para investigar possíveis motivos para as diferenças em eficiência de aquisição, fêmeas adultas de *D. citri* tiveram sua penetração estiletar analisada pela técnica de Electrical Penetration Graph (EPG), em folhas maduras x novas de plantas infectadas, A ingestão de seiva do floema foi mais longa e frequente em folhas novas. Em 5 horas de observação, aproximadamente 50% dos indivíduos em folhas novas iniciaram ingestão contínua em floema (E2), em comparação com apenas 15% em folhas maduras, onde os insetos passaram maior período de tempo com os estiletes no parênquima foliar (fase de caminhamento) ou não se alimentando. Análises histológicas mostraram que as folhas maduras apresentam uma lignificação na parede das células da camada de fibras que antecede os feixes vasculares, enquanto que em folhas novas esta lignificação não é intensa. É possível que a camada de fibras possa dificultar o caminhamento dos estiletes em direção aos vasos de floema nas folhas maduras. A maior duração e frequência de ingestão no floema em folhas novas parecem explicar, ao menos em parte, a maior eficiência de aquisição de *Ca.* L. asiaticus por *D. citri*, quando este é confinado nesta parte da planta.

Palavra-chave: *Diaphorina citri*; *Candidatus* Liberibacter asiaticus; Comportamento alimentar; Transmissão; Huanglongbing (HLB); EPG

Abstract

An understanding of factors influencing acquisition efficiency of *Candidatus* Liberibacter asiaticus by the Asian citrus psylla, *Diaphorina citri*, is basic to determine favorable conditions for Huanglongbing (HLB) spread in citrus, as well as to select strategies to interfere with this

process. This bacterium has an irregular distribution in citrus plants, with greater concentration in mature leaves showing typical symptoms (blotchy mottle). In this study we evaluated the preference of *D. citri* for different parts of a citrus plant, as well as the effect of leaf age (young and asymptomatic x symptomatic mature leaves) in source plants infected with Ca. L. asiaticus on acquisition efficiency and probing behavior of *D. citri*. This insect shows a clear preference for young leaves of the upper portion of the plant (71.3% of the individuals), and main vein on the abaxial leaf surface (87.1%). Groups of healthy lab-reared *D. citri* adults were then confined separately on a young and on a mature (symptomatic) leaf of source plants of *Ca*. L. asiaticus. After an acquisition access period (PAA) of 4 days, psyllids from each treatment were kept on healthy plants for 24 days and then tested for infectivity by quantitative PCR. Adults of *D. citri* acquired *Ca.* L. asiaticus with greater efficiency on young (asymptomatic) leaves than in mature (symptomatic) leaves from infected plants. To investigate possible reasons for the differences in acquisition efficiency, we analyzed the probing behavior of adult females of *D. citri* on mature x young leaves of infected citrus plants by the Electrical Penetration Graph (EPG) technique. Phloem ingestion was longer and observed more often on young leaves. Within 5 h, around 50% individuals on young leaves started sustained phloem ingestion (E2), whereas less than 15% individuals on mature leaves did so. On mature leaves, the insects spent most of the time with the stylets in the parenchyma (pathway phase) or non-probing. Histological analyses indicated that mature leaves show lignification in cell walls of the fiber layer surrounding the vascular bundles. In contrast, young leaves do not show cell wall thickening in this fiber layer. It is possible that the fiber layer affects stylet pathway towards the phloem vessels in mature leaves. The higher frequency and longer duration of phloem ingestion appears to explain at least in part the higher acquisition efficiency of *Ca*. L. asiaticus when *D. citri* is confined on young asymptomatic leaves.

Keyword: *Diaphorina citri*; *Candidatus* Liberibacter asiaticus; Feeding behavior; Transmission; Huanglongbing (HLB); EPG

4.1 Introdução

Diaphorina citri (Hemiptera: Psyllidae) é considerada a praga mais importante da citricultura mundial quando está associada ao agente causal da doença *Candidatus* Liberibacter spp. (HALBERT; MANJUNATH, 2005), apesar de ser praga geralmente encontrada em citros, tem-se o conhecimento de uma ampla gama de hospedeiros, esses mesmos autores relataram em 2004 mais de 50 espécies hospedeiras do inseto vetor; plantas da família Rutaceae são hospedeiros naturais tanto de *D. citri* quanto das espécies de Liberibacter (GARNIER et al., 2000; BOVE; GARNIER, 2002). Os hospedeiros de Psilídeos são exclusivamente dicotiledôneas (EASTOP, 1972). Os estudos desses diferentes hospedeiros para o inseto vetor têm sido bastante explorados, porém temos poucas informações da distribuição de *D. citri* em plantas cítricas. Tsai e Liu (2002) reportaram que o crescimento contínuo de brotos e folhas novas produzidos por

Murraya paniculata (L.) Jack (Rutaceae) é um fator importante para manter altas populações do inseto na planta. Skelley e Hoy (2004) constataram que adultos do inseto ocuparam 95 % dos brotos de *M. paniculata* para reprodução.

Yasuda, Kawamura e Oishi (2005) avaliaram a presença desse psilídeo em plantas adultas de *Murraya exotica* L. e *Citrus depressa* Hayata e não observaram diferença no número de adultos nas diferentes partes da planta de *Citrus*, sendo que em *Murraya*, a maioria das ninfas e adultos foi encontrada em brotos e folhas jovens. Em outro ensaio, empregando plantas (jovens) desta espécie de planta, os autores não encontraram diferenças, na presença de machos em folhas jovens e maduras, porém o número de fêmeas na região apical foi significativamente maior.

O fato desses insetos serem encontrados em regiões apicais e brotações, principalmente ninfas e fêmeas, pode estar relacionado à alta concentração de aminoácidos presentes na seiva floemática deste tipo de tecido. Esta característica proporciona longos períodos de alimentação neste tipo de tecido vegetal, ingerindo grande quantidade de seiva (WU, 1980).

Ca. Liberibacter são bactérias restritas aos vasos do floema e apresentam distribuição sistêmica na planta (BOVE; GARNIER, 2002), sendo essa distribuição irregular na planta (MCLEAN, 1970). Como a alimentação de *D. citri* em plantas cítricas é predominantemente floemática (BONANI, 2009[1]) e a bactéria presente neste tecido, em condições favoráveis, um único inseto pode adquiri-la. No entanto, em uma população, poucos são os indivíduos capazes de efetuar a aquisição e posteriormente inoculação em uma planta sadia (ZHAO, 1981; McLEAN, 1974).

Além da distribuição sistêmica, porém de forma irregular, da bactéria na planta, outro fator que pode interferir na transmissão é a preferência pelo local de alimentação por *D. citri* na planta hospedeira, já que não se conhece um estudo de caso mais detalhado. A preferência pelo tecido na alimentação do psilídeo pode estar ainda relacionada quanto a conformação histológica, como disposição do parênquima e feixe floemático (QUEIROZ-VOLTAN; BLUMER, 2005).

Com o advento da técnica de "*Electrical Penetration Graphs*" (EPG), muitas questões relacionadas ao comportamento alimentar de insetos sugadores foram elucidadas (TJALLINGII, 1978). O comportamento necessário para transmissão de fitopatógenos por afídeos foi estudado

---

[1] Bonani, 2009, p. 46.

por Prado e Tjallingii (1994), Martin et al. (1997) e Collar e Fereres (1998). Também foi empregada para estudar a mudança de comportamento em afídeos quando alimentados em plantas infectadas com vírus (FERERES et al., 1990; ALVAREZ et al., 2006). Jiang et al. (1999) estudaram o comportamento alimentar de *Bemisia tabaci* (Gennadius) em dois biótipos de tomateiro e observaram diferenças comportamentais.

Em virtude de poucas informações relacionadas a preferência de *D. citri* por partes da planta de citros para a alimentação e consequente aquisição do patógeno, o presente capítulo têm por objetivos: avaliar o local de alimentação de *D. citri* em mudas cítricas; analisar os possíveis fatores que possam estar relacionados a este comportamento, através de cortes histológicos do tecido de preferência para a alimentação do inseto; testar a aquisição de *Ca.* L. asiaticus por adultos de *D. citri* quando alimentados em brotações, folhas novas (assintomáticas) e folhas maduras (sintomáticas) e; avaliar o comportamento alimentar deste vetor quando alimentado em folhas novas (assintomáticas) e maduras (sintomáticas) de plantas cítricas infectadas com *Ca.* L. asiaticus, por meio da técnica de Electrical Penetration Graphs (EPG).

4.2 Desenvolvimento

4.2.1 Material e Métodos

Experimento 1: Locais de alimentação de *D. citri* em mudas cítricas

Obtenção de psilídeos e plantas-teste

A colônia de *D. citri* foi mantida sobre plantas de murta *M. paniculata*. A criação foi acondicionada em caixas de acrílico (35 x 35 x 53cm) mantidas em sala climatizada (25±2ºC; 70% UR e fotoperíodo de 14 h). Para o estudo, utilizaram-se insetos recém-emergidos com até 10 dias de idade não sexados. As plantas cítricas empregadas no estudo foram seedlings de laranja-doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] cv. 'Pêra' com 30 cm de altura, produzidas em sacos plásticos (500ml) contendo terra, esterco e areia (3:1:1), e mantidas em viveiros telados, evitando o acesso de insetos vetores.

Seleção do local de alimentação na planta cítrica

O estudo foi realizado em casa de vegetação e para determinar o local de preferência para alimentação de adultos do psilídeo subdividimos as plantas cítricas da seguinte forma: porção superior, tecido mais tenro (região com folhas novas recém expandidas) e porção inferior, tecido mais lenhoso (região com folhas maduras, mais coriáceas). Além dessas regiões, foi avaliada a presença de insetos pousados no caule, epiderme adaxial e abaxial das folhas, nervura principal e nervura secundária e o número de insetos dispersos (Figura 1A). Cada planta foi acondicionada em recipientes plásticos tipo "baleiro" (Figura 1B). Foram realizadas 10 repetições, sendo cada uma constituída por uma planta cítrica nas mesmas condições, sendo que, para cada repetição, foram liberados 20 insetos adultos (machos e fêmeas ao acaso). A liberação dos insetos foi feita às 10 horas da manhã e as avaliações foram realizadas após 1 (11:00 h), 4 (14:00 h), 7 (17:00 h) e 12 (22:00 h), 24 (10:00 h), 27 (13:00), 31 (17:00) e 36 (22:00) h, registrando-se o número de insetos pousados em cada parte da planta. Para análise dos dados foi aplicado o teste de médias Scott-Knott a 5% de significância.

Figura 1 - A: arquitetura da planta com respectivas subdivisões; B: Recipiente plástico tipo "baleiro"

Experimento 2: Histologia do tecido vegetal para análise da posição da bainha salivar de *D. citri* em folhas novas e folhas maduras de citros cv Pêra

Desenvolvimento do ensaio

Plantas e insetos utilizados no experimento foram mantidos nas mesmas condições descritas no experimento 1. Fêmeas adultas foram colocadas individualmente sobre a superfície abaxial de folhas novas recém expandidas e folhas maduras por um período de duas horas. Em seguida, a alimentação foi interrompida, retirando-se o inseto da planta. Na sequência, foi cortada uma área de aproximadamente 0,5 cm^2 do tecido vegetal onde o inseto estava se alimentando e em seguida imerso em fucsina ácida (1%) por 3 minutos. Com isto, foi possível corar a saliva produzida pelo inseto durante o início da alimentação, o que facilitou a visualização do ponto de inserção dos estiletes. Posteriormente o material foi lavado em água destilada, seco em papel-filtro e fixado em solução Karnovsky (KARNOVSKY, 1965). Na etapa seguinte, foi feita a desidratação à temperatura ambiente em uma série etílica crescente (10% a 100%). Para infiltração e emblocagem, foi utilizado o kit Historesina (hidroxietilmetacrilato, Leica, Heidelberg). Posteriormente, foram realizados cortes seriados em micrótomo com espessura de 12 μm, sendo estes corados em solução de azul de toluidina (SAKAI, 1973). Em primeiro momento, a visualização para encontrar a bainha salivar no tecido foi feita em microscópio ótico (200x), após os cortes foram montados em resina sintética "Entellan" para a realização de fotomicrografias em fotomicroscópio (Leica DM LB / DC 300 F). Vinte amostras foram processadas com esse objetivo, obtendo-se ao final conseguimos seis cortes histológicos, onde foi possível observar a bainha salivar, três referentes a insetos que se alimentaram em folhas novas e três que se alimentaram em folhas maduras.

Experimento 3: Aquisição de *C.* L. asiaticus por adultos de *D. citri* quando alimentados em brotações, folhas novas (assintomáticas) e folhas maduras (sintomáticas)

Insetos e plantas utilizados no ensaio de aquisição da bactéria

Os insetos foram mantidos nas mesmas condições descritas no experimento 1. As plantas-fonte utilizadas (cv. pêra) foram obtidas junto ao Fundecitrus, todas PCR (+) para *Ca.* L. asiaticus, apresentando sintomas característicos de HLB. Essas plantas foram cultivadas em sacos plásticos (4 litros) contendo o substrato Rendmax®, apresentando cerca de 40cm de altura.

Desenvolvimento do ensaio

Foram utilizadas 4 plantas-fonte de mesma idade. Previamente essas plantas foram podadas, estimulando a emissão de brotações, preservando as folhas mais velhas que apresentavam sintomas do HLB. Como tratamentos, foram utilizadas plantas com brotos, folhas novas recém expandidas e folhas velhas que apresentavam sintomas, sendo utilizados 4 tratamento por repetição.

Após o período de aclimatação de 48 horas em plantas cítricas sadias os insetos foram confinados sob brotos, folhas novas e folhas velhas sintomáticas em grupos de 30 indivíduos acondicionados em gaiolas plásticas transparentes e retangulares (4 x 7 x 3cm), contendo aberturas com tecido tipo "*voil*", mantendo, um período de acesso a aquisição (PAA)de 72 h. Em seguida, os psilídeos foram mantidos sob "seedlings" sadios de laranja-doce (*C. sinensis* cv. caipira) por um período de 24 dias (latência). Então, os insetos foram subdivididos em três por amostra e analisados quanto a infectividade através de PCR quantitativo (qPCR). Como controle negativo, um grupo de 30 psilídeos da mesma criação estoque, não foram submetidos ao PAA em planta-fonte, também foram avaliados por qPCR, a fim de confirmar a sanidade dos mesmos. As brotações, folhas novas e folhas velhas que os insetos passaram nas plantas-fonte também foram analisadas por qPCR.

Experimento 4: Electrical Penetration Graph (EPG)

Desenvolvimento do ensaio

O experimento foi conduzido em sala climatizada com as mesmas condições descritas para o experimento 1. Os registros de EPG foram obtidos utilizando o sistema DC modelo GIGA-8 (Wageningen University) (Tjallingii, 1978; 1988), ajustados com "ganância" de 100x. O sinal analógico foi convertido em digital mediante a placa DI-710 (Dataq® Instruments), acoplado a um computador Pentium4® para aquisição e armazenamento dos dados, por meio do programa Probe 3.0 (Laboratory of Entomology, Wageningen University). O processo de monitoramento foi realizado dentro de uma gaiola de Faraday, onde as quatro plantas-fonte foram distribuídas ao acaso.

Os insetos foram acoplados ao sistema de EPG utilizando a metodologia descrita por Bonani (2009[1]) e colocados individualmente em folhas novas (recém expandidas) não apresentando sintomas do HLB e folhas velhas (maduras) sintomáticas, foi monitorado 4 insetos simultaneamente, dois em folhas novas e dois em folhas maduras, a cada registro era alterada a posição de arrumação das plantas na gaiola bem como folhas novas e velhas para a alimentação dos insetos. Em testes preliminares não foram observadas diferenças no comportamento alimentar de insetos sob brotos e folhas novas, o que motivou a realização do ensaio somente com insetos sob folhas novas e folhas maduras. Foram analisados 15 registros para insetos sob folhas novas e 15 para insetos sob folhas maduras de 5 horas de duração para cada indivíduo avaliado. Posteriormente realizou-se a marcação dos registros com o programa Probe 3.0 baseando-se nas formas de onda descritas por Bonani (2009[2]), definidas como: (C), penetração intercelular no parênquima; (D), primeiro contato com o floema; (E1), salivação no floema; (E2), ingestão no floema; e (G), ingestão no xilema. Após a marcação dos registros calculou-se os parâmetros de EPG determinados por Van Helden e Tjallingii (2000) a fim de se observar possíveis diferenças no processo de penetração estiletar de *D. citri* em folhas novas e maduras de plantas cítricas infectadas com o HLB asiático. Os parâmetros foram divididos em: número de vezes que um padrão ocorre em um registro; duração média e total do padrão por registro e tempo

---

[1] Bonani, 2009, p. 35.

[2] Bonani, 2009, p. 37.

necessário para que ocorra determinado parâmetro. Os dados foram submetidos a uma análise de variância e posteriormente ao teste de comparação de médias de Mann-Whitney.

4.2.2 Resultados e Discussão

Adultos de *D. citri* quando expostos a plantas cítricas jovens apresentaram um comportamento característico com relação à preferência para pouso e consequente alimentação. Em média, 71,3 % dos indivíduos foram encontrados pousados na porção superior das plantas enquanto que 5,1 % estavam na porção inferior e 1,4 % no caule da muda (Figura 4A). A porção superior é constituída de um tecido tenro (mais jovem) com folhas recém expandidas, ao contrário da inferior que possui folhas maduras e coriáceas e o caule provavelmente por ser mais lignificado foi a região menos preferida pelos psilídeos. Curiosamente, a porcentagem de insetos dispersos foi mais que o dobro (22,2 %) do que a soma daqueles que se encontravam pousados na porção inferior e caule (Figura 4A). Xu, Xia e Ke (1994) relataram que adultos e ninfas de *D. citri* são encontrados em ramos mais jovens, na penúltima folha que compõe o ramo da planta cítrica, o que não ocorreu neste trabalho, onde a distribuição foi uniforme na porção mais jovem. Em *M. paniculata,* Tsai e Liu (2002) reportam que brotações e folhas novas são estruturas importantes para manter altas populações do inseto. Yasuda, Kawamura e Oishi (2005) também observaram que a maior parte de adultos e ninfas do mesmo psilídeo foi encontrada em brotos e folhas jovens de plantas adultas de *M. paniculata*, já no hospedeiro *C. depressa* contrastando com esses resultados, foram encontrados adultos em todas as partes da planta não havendo diferenças. Em outro experimento, empregando plantas jovens de murta, os mesmos autores encontraram 84% de fêmeas na porção apical enquanto que para machos não foram observadas diferenças significativas. De maneira geral, hemípteros preferem regiões mais jovens do hospedeiro para realizar a alimentação, porém psilídeos, quando confinados em plantas mais velhas e com ausência deste tipo de tecido eles se alimentam de ramos e folhas maduras (AUBERT, 1987).

Marucci et al. (2004) também constataram esse comportamento para duas espécies de cigarrinhas vetores em citros. Apesar desses insetos apresentarem um comportamento xilemático, esses vasos possuem uma maior concentração de aminoácidos na seiva em ramos que compõem essa porção da planta, e provavelmente, os psilídeos também apresentam esse comportamento devido aos tecidos serem mais vigorosos e os vasos floemáticos mais ricos nesses compostos.

Esse comportamento floemático foi mencionado por Hodkinson (1974) e confirmado por Bonani (2009[1]) através da técnica de EPG.

A maior parte dos psilídeos foi encontrada na porção superior da planta. Neste mesmo ensaio foi avaliada a preferência pela região da folha (Figura 4B), onde observou-se que 87,1 % dos insetos foram encontrados na epiderme abaxial dessas folhas novas. Desses, 50,0 % estavam pousados na nervura central posicionados em fila (Figura 4B) e o restante nas nervuras secundárias. Dos 12,9 % observados na epiderme adaxial a maior parte também foi encontrada na nervura principal (9,7 %) e 3,2 % nas nervuras secundárias (Figura 4B). Tsai, Hwang e Wang (1984) avaliaram a distribuição de adultos de *D. citri* em *M. paniculata* e verificaram uma maior incidência desses insetos ocupando as nervuras centrais das folhas (43 %) seguido de 31% nos pecíolos, 24 % na borda foliar e menos que 2 % no caule, no presente trabalho também foi encontrado um número maior de adultos pousados na nervura central, porém Tsai, Hwang e Wang (1984) não mencionaram se os insetos estavam na epiderme abaxial ou adaxial, outro fator foi o número elevado de adultos nos pecíolos, neste trabalho o caule foi representado por (caule + pecíolos) não ultrapassando 1,4 % de adultos presentes nestas regiões (Figura 4A). No presente experimento quando pousados em folhas todos os insetos ocupavam as nervuras, diferindo dos resultados obtidos por Tsai, Hwang e Wang (1984).

Wu (1980) relatou que o comportamento de adultos de *D. citri* estarem pousados nas epidermes adaxial ou abaxial de folhas está relacionado às condições climáticas; no inverno esses insetos se deslocam para a epiderme adaxial enquanto que no verão são encontrados na epiderme abaxial evitando à incidência direta de luz solar e para se protegerem contra chuvas.

Em virtude de poucas informações que relatam essa preferência pela epiderme e nervura central de folhas cítricas realizamos um experimento para avaliar o aspecto histológico dessas folhas que muito provavelmente aspectos histológicos têm grande influência nesse comportamento.

A conformação histológica básica em folhas de *C. sinensis* focada nos objetivos do presente trabalho, baseou-se nos seguintes pontos: na Figura 3A, observa-se uma folha em corte transversal de 12 µm de espessura na região da nervura central. A porção superior é chamada de

---

[1] Bonani, 2009, p. 46.

superfície adaxial e a inferior de superfície abaxial, a diferença na nervura central entre essas regiões é bem evidente, pois a área da nervura localizada na epiderme adaxial é menos robusta que a observada na abaxial. A diferença nos tecidos também é nítida, pois quando *D. citri* se alimenta na epiderme adaxial, o primeiro tecido que os estiletes encontram após a epiderme é o parênquima paliçádico. Esse tecido é constituído por células de formato regular e são justapostas, com pouco espaço intercelular (QUEIROZ-VOLTAN; BLUMER, 2005). Quando o inseto se alimenta pela superfície abaxial (região de preferência), após passarem pela epiderme, os estiletes encontram o parênquima lacunoso que apresenta células de formato irregular. Nessa conformação os espaços entre as células são evidentes e certamente facilitam o caminhamento estiletar do inseto, tendo em vista que *D. citri* apresenta caminhamento estiletar intercelular (BONANI, 2009[1]).

Outro fator que favorece a alimentação na epiderme abaxial pode estar relacionado com a conformação do tecido floemático. O floema, localizado nesta região, possui um calibre superior ao que está na epiderme adaxial (QUEIROZ-VOLTAN; BLUMER, 2005), ou seja, a disponibilidade do feixe floemático é maior do que aquela que está na epiderme superior.

Analisando as Figuras (3B – 3E) observa-se uma provável hipótese que explique a preferência dos insetos pela porção superior de plantas cítricas (folhas novas). A Figura 3B representa cortes histológicos de uma folha madura; Nela pode-se observar parte da bainha salivar de *D. citri* deixada pelos estiletes no momento da alimentação. Neste corte, o final da bainha está na camada de fibras que antecede os vasos floemáticos (a extremidade distal que representa o término da bainha está apresentada na Figura 3C). Essa camada apresenta como uma de suas funções a proteção do feixe floemático. Nessas folhas maduras, a camada de fibras possui a parede celular mais lignificada quando comparadas à mesma estrutura em folhas novas (Figura 3D e 3E). Bronze (1981) realizou um estudo anatômico comparativo entre folhas jovens e folhas maduras de *C. sinensis* e observou que em folhas novas essas fibras pericíclicas (ao redor do floema) possuem paredes espessas, porém pecto-celulósicas. Em folhas maduras, ocorre lignificação dessas paredes conferindo rigidez às mesmas. Essas características podem ser

---

[1] Bonani, 2009, p. 39.

observadas nas Figuras (3B, C, D e E) do presente trabalho. Em folhas novas esses fatores favorecem o caminhamento estiletar e consequente chegada ao floema.

Como a alimentação de adultos de *D. citri* pode ser influenciada pela região e/ou tecido de plantas cítricas, certamente implicaria de alguma forma no processo de transmissão de *Ca*. L. asiaticus quando alimentados em folhas novas assintomáticas e folhas maduras com os sintomas do HLB. Heredia et al. (2006) realizaram um estudo anatômico comparativo em folhas sintomáticas (mosqueado) e assintomáticas de plantas infectadas com bactéria e observaram diferenças no parênquima e floema. Folhas com sintomas apresentaram grande acúmulo de grânulos (provavelmente amido) nas células do parênquima e um visível aumento do número de camadas celulares no floema, enquanto que em folhas sem sintomas os grânulos, quando presentes, ocorreram em poucas células e a região do floema se apresentou menos espessa. Hong-Ji (2008) observou, em cortes histológicos de folhas sintomáticas de duas variedades cítricas (Ponkan e Tankan) infectadas pelo HLB, revelaram uma degeneração severa dos tecidos em ambas as variedades: hiperplasia do parênquima, degeneração de células floemáticas e xilemáticas e consequente necrose dos elementos vasculares. Houve um espessamento do floema, assim como observado por Heredia et al. (2006), sendo constatado, também o rompimento da epiderme superior causado por hiperplasia e necrose, inclusive suberização de células epidérmicas expostas.

Aliados aos fatores verificados supõe-se que folhas com sintomas e sem sintomas da doença venham a interferir no processo de alimentação dos insetos e consequente aquisição da bactéria.

Em um primeiro experimento, foi avaliada a taxa de infectividade de adultos deste psilídeo quando alimentados em folhas maduras (sintomáticas) e folhas novas (assintomáticas) constatando-se que em todas as repetições (os insetos foram confinados em folhas com sintomas) a aquisição da bactéria foi de 0 %, por outro lado, quando alimentados em folhas novas sem os sintomas do HLB, a eficiência de aquisição foi de 60,00 %; 71,40 %; 66,70% e somente em uma das repetições a aquisição foi zero ou nula (Tabela 1). Quando submetidos a folhas novas, a eficiência de aquisição da bactéria foi alta (Tabela 1, 60,0 – 71,4 %). Na Tailândia, Hong-Ji (2008) verificou que a eficiência de aquisição de *D. citri* adultos após passar mais de um dia em planta cítrica infectada foi abaixo de 5%, por outro lado, Xu et al. (1988) observaram uma

eficiência de aquisição de 80 % para *D. citri* alimentados em plantas cítricas infectadas com HLB asiático (variedade Tankan).

No experimento 2 (Tabela 1), em todos os tratamentos (Brotos, Folhas novas assintomáticas e Folhas maduras sintomáticas) foi observada a aquisição do patógeno por *D. citri*, a taxa de infectividade em insetos oriundos de aquisição em folhas novas assintomáticas foi entre (12,5 e 100,0 %), seguido de aquisição em brotações (0-50,0 %) e folhas com sintomas do HLB (0,0-33,3 %). A eficiência de aquisição de *Ca*. L. asiaticus por *D. citri* é afetada em virtude da alimentação nos diferentes tecidos de planta cítrica. Gottwald et al. (2008) questionaram, apesar da distribuição sistêmica da bactéria na planta cítrica, as porções que não apresentam sintomas do HLB, com menor título bacteriano presente, poderiam ser fonte de inóculo quando *D. citri* se alimenta nesse tecidos? Ainda concluíram que a taxa de infectividade de *Ca*. L. asiaticus para *D. citri* que se alimenta em tecidos não sintomáticos mas PCR-positivo continua sendo um ponto de discussão.

Coletta Filho[1] comparou a concentração da bactéria (CT) entre brotos, folhas coriáceas e folhas novas de plantas cítricas infectadas com o HLB asiático e constatou que a concentração bacteriana em folhas maduras sintomáticas é maior que as observadas em brotações e folhas novas (informação pessoal). Essas informações enriquecem ainda mais os resultados aqui mencionados. Apesar de folhas sintomáticas apresentarem um CT superior da bactéria, insetos sob folhas novas podem realizar uma alimentação mais eficiente refletindo no processo de aquisição da bactéria, gerando uma relação inversamente proporcional (↑ CT ↓ aquisição).

Empregando a técnica de EPG para avaliar o comportamento alimentar de *D. citri* quando submetidos em folhas novas assintomáticas e folhas maduras com o sintoma do HLB asiático de plantas cítricas infectadas, observou-se a maior parte das diferenças em parâmetros floemáticos. Gabrys, Tjallingii e Van Beek (1997) avaliaram a preferência alimentar de *Brevicoryne brasicae* (L.) por folhas jovens, maduras, velhas e talos de repolho e diferentemente dos resultados apresentados nesse trabalho, os autores constataram diferenças significativas em parâmetros que antecedem o floema, como número de provas, por exemplo, que foi maior para insetos sob talos que em folhas.

---

[1] COLETTA FILHO, H.D. Centro de Citricultura

Os parâmetros de EPG (Tabela 2), relativos ao número de vezes que o inseto realiza uma forma de onda durante um registro revelam que adultos do psilídeo, quando se alimentam em folhas novas (sem sintomas), encontram o floema quatro vezes a mais (5,46 vezes) que adultos sob folhas maduras sintomáticas (1,53 vezes) em 5 horas de registros (considerar este tempo de registro para todos os parâmetros). Esta diferença é observada pela forma de onda D que antecede a E1 em 100% dos casos como relatado anteriormente por Bonani (2009[1]). Além de diferenças no número de vezes que insetos atingem esta forma de onda, também foi constatado que de 15 insetos avaliados, 14 encontraram o floema quando em folhas novas e apenas 6 tiveram este comportamento sob folhas maduras. Esses dois fatores podem interferir significativamente na aquisição da bactéria, pois a eficiência de aquisição está relacionada diretamente com um comportamento alimentar adequado pelo inseto vetor, o que corrobora com McLean (1974) e Zhao (1981). Através de análises de EPG consegue-se observar em detalhes possíveis fatores inerentes ao hospedeiro que interferem no comportamento alimentar de sugadores, como diferenças de tecido por exemplo, seja relacionado à epiderme, mesofilo ou tecidos vasculares (TJALLINGII, 1990, 1995)

A ingestão no floema (E2) após a salivação (E1) ocorreu duas vezes a mais para insetos em folhas novas que em folhas maduras (1,20 e 0,60 respectivamente, Tabela 2) e dos seis que haviam produzidos E1 em folhas maduras 50% realizaram a ingestão (E2). Com relação as provas que ocorrem antes e após a 1ª E2, o número de vezes em folhas novas foi significativamente maior em ambos os casos (Tabela 2). Analisando a Figura 4, de maneira geral observa-se que em folhas maduras (Figura 4B) a forma C (provas) é praticamente estável ao longo do tempo, com pequena diminuição após a E2. Consequentemente esse comportamento gera certa estabilidade no número de provas, ou seja, insetos em plantas maduras passam a maior parte do tempo em C que em plantas novas (134,32 e 96,78 minutos respectivamente, Tabela 2). Sabe-se que a forma de onda D sempre antecede a salivação (E1) e os cortes histológicos referentes a esta atividade, a extremidade distal da bainha salivar do psilídeo sempre estava no tecido floemático (BONANI, 2009[2]), a duração média uma D foi de 45,57 e 67,56 segundos para

---

[1] Bonani, 2009, p. 40.

[2] Bonani, 2009, p. 39.

insetos alimentados em folhas novas e maduras respectivamente. Essa diferença de 20 segundos observada em insetos sob folhas maduras pode estar relacionada a uma possível dificuldade de rompimento do vaso floemático para a alimentação, devido provavelmente ao espessamento e degeneração de células desse tecido constatado por Heredia et al. (2006) e Hong-ji (2008) e ainda a lignificação da camada de fibras que antecede o floema (BRONZE, 1981).

Os parâmetros floemáticos que antecedem a ingestão (E2) foram marcados por diferenças significativas. A ingestão (E2) que está intimamente relacionada com a aquisição do patógeno pelo inseto também foi observada uma grande diferença na duração. Insetos que se alimentaram em folhas novas assintomáticas permaneceram em média 63,86 minutos ingerindo seiva floemática, enquanto que psilídeos alimentados em folhas sintomáticas apresentaram este comportamento por 15,85 minutos apenas (Tabela 2). Na mesma tabela, nota-se diferença significativa para o parâmetro E2 > 10 minutos, que ocorre em maior quantidade para insetos sob folhas novas que em folhas maduras. A forma E2 para *D. citri* em sua maioria é superior a 10 minutos, portanto esta diferença é reflexo do número de vezes que a forma E2 é produzida. O tempo desde a primeira prova (forma C) até a primeira E1 e primeira E2 foi maior em ambos os parâmetros para *D. citri* que se alimentaram em folhas maduras sintomáticas. Esses parâmetros tem uma relação muito forte com o fato desses insetos terem permanecido por longo tempo na fase de caminhamento estiletar (forma C).

Na Figura 4 observou-se diferenças de comportamento analisando a porcentagem de insetos nas diferentes formas de onda (EPG) a cada 30 minutos. Com 5 horas de registros nota-se que 50% dos insetos estavam em comportamento floemático sob folhas novas (Figura 4A) e apenas 15% dos indivíduos realizavam esta atividade em folhas maduras para o mesmo período (Figura 4B).

Observa-se claramente uma alternância entre as formas Np e C para insetos em folhas velhas chegando a 75 % dos indivíduos ao final de cinco horas (Figura 4B). Foi constatado que os insetos apresentaram certa dificuldade em encontrar o floema e estabelecer uma alimentação contínua sob folhas maduras e com sintomas do HLB .

4.2.3 Conclusões

1 – Adultos de *D. citri* tem preferência por folhas novas da porção superior de mudas cítricas, mais especificamente pela nervura principal da face abaxial dessas folhas.

2 – Folhas novas e maduras de citros possuem diferenças histológicas que parecem explicar pelo menos em parte a maior frequência de adultos de *D. citri* que atingem os vasos do floema e ingerem seiva em folhas novas de plantas-fonte da bactéria.

3 – A taxa de infectividade de *C*. L. asiaticus por adultos de *D. citri* foi superior quando se alimentam em folhas novas e assintomáticas de planta cítrica infectada.

4 – Folhas novas assintomáticas de plantas infectadas pelo HLB asiático favorecem o comportamento alimentar adequado para aquisição da bactéria por adultos de *D. citri*.

Tabela 1 – Detecção de *Candidatus* Liberibacter asiaticus em adultos de *Diaphorina citri* em função da alimentação em brotos, folhas assintomáticas e folhas sintomáticas em plantas de *Citrus sinensis* infectadas com a bactéria

Experimentos	Plantas-fonte	Tratamentos (folhas)	Nº de insetos avaliados	Taxa de infectividade (%) *
1	1	Nova assintomática	15	60,00
		Madura sintomática	12	0
	2	Nova assintomática	21	71,40
		Madura sintomática	15	0
	3	Nova assintomática	9	66,70
		Madura sintomática	9	0
	4	Nova assintomática	18	0
		Madura sintomática	18	0
Controle negativo[1]			30	0
2	1	Broto	30	0
		Nova assintomática	24	12,50
		Madura sintomática	6	0
	2	Broto	30	10,00
		Nova assintomática	30	30,00
		Madura sintomática	9	33,33
	3	Broto	24	50,00
		Nova assintomática	27	89,00
		Madura sintomática	21	14,30
	4	Broto	30	40,00
		Nova assintomática	27	100,00
		Madura sintomática	30	20,00
Controle negativo[1]			30	0

*3 psilídeos / amostra.

[1]Insetos obtidos da mesma colônia de criação, porém não submetidos à planta-fonte.

Tabela 2 – Parâmetros de EPG (média ± erro padrão) usados no estudo do comportamento alimentar de *Diaphorina citri* sobre folhas assintomáticas e sintomáticas de plantas cítricas infectadas com *Candidatus* Liberibacter asiaticus, durante o período de 5 horas

Parâmetros de EPG	n[1]	Folhas Assintomáticas	n[1]	Folhas Sintomáticas	P
		Número de vezes que ocorre			
C	15	18,27 ± 2,22 a[2]	15	21,13 ± 4,70 a	0,7713
C < 3 minutos	15	7,86 ± 2,35 a	15	11,53 ± 4,60 a	0,5712
Np	15	13,00 ± 2,30 a	15	19,01 ± 4,77 a	0,3082
C na 1ª hora	15	8,33 ± 2,27 a	15	6,86 ± 1,74 a	0,4746
C na 2ª hora	11	1,86 ± 0,46 a	12	5,60 ± 2,33 a	0,1919
G	7	0,53 ± 0,16 a	7	1,06 ± 0,52 a	0,7472
D	14	5,46 ± 0,72 a	6	1,53 ± 0,55 b	0,0006
E1 "*single*"	14	4,27 ± 0,55 a	4	1,00 ± 0,48 b	0,0004
E1	14	5,46 ± 0,72 a	6	1,53 ± 0,55 b	0,0008
E2	12	1,20 ± 0,26 a	3	0,60 ± 0,33 b	0,0159
Provas antes da 1ª E2	12	9,20 ± 2,50 a	3	4,06 ± 1,87 b	0,0141
Provas após a 1ª E2	10	2,90 ± 0,92 a	3	0,53 ± 0,32 b	0,0116
E2 > 10 min	11	0,80 ± 0,92 a	2	0,20 ± 0,14 b	0,0049
		Duração (min.)			
C	15	96,78 ± 29,40 a	15	134,62 ± 15,60 b	0,0279
Np	15	79,85 ± 10,85 a	15	116,17 ± 15,93 a	0,1249
G	7	15,64 ± 7,81 a	7	15,32 ± 8,09 a	0,9283
média de D*	14	47,57 ± 2,16 a	6	67,56 ± 2,65 b	0,0369
E1	14	13,23 ± 3,85 a	6	4,95 ± 1,85 b	0,0295
E2	12	63,86 ± 16,77 a	3	15,85 ± 11,44 b	0,0022
		Tempo[3]			
para 1ª prova desde o início do registro	15	3,77 ± 0,10 a	15	2,20 ± 0,69 a	0,1249
mínimo de C antes da 1ª E1	14	23,12 ± 3,08 a	6	16,74 ± 6,32 a	0,1130
desde a 1ª prova até a 1ª E1	14	95,07 ± 11,49 a	6	167,98 ± 24,63 b	0,0078
desde a 1ª prova até a 1ª E2	12	118,58 ± 21,61 a	3	185,36 ± 29,33 b	0,0046

[1] Número de insetos
[2] Médias seguidas da mesma letra, na mesma linha, não diferem significativamente (P < 0,05) usando o teste de Mann-Whitney.
*Valores em segundos.

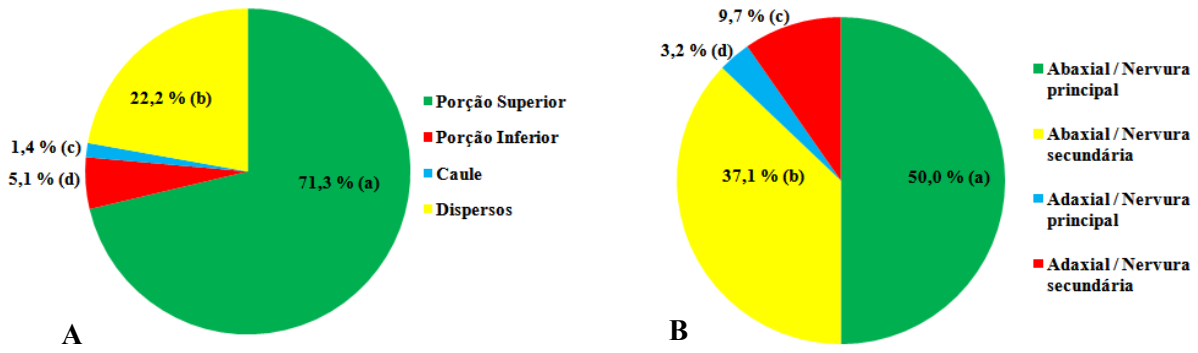


Figura 2 – Distribuição de adultos de *Diaphorina citri* em mudas de *Citrus sinensis*, em ensaio de livre escolha. A) Regiões da planta; B) Superfície foliar e Nervuras. Porcentagens seguidas da mesma letra no mesmo gráfico, não diferem entre si pelo teste de Scott-Nott a 5% de significância.

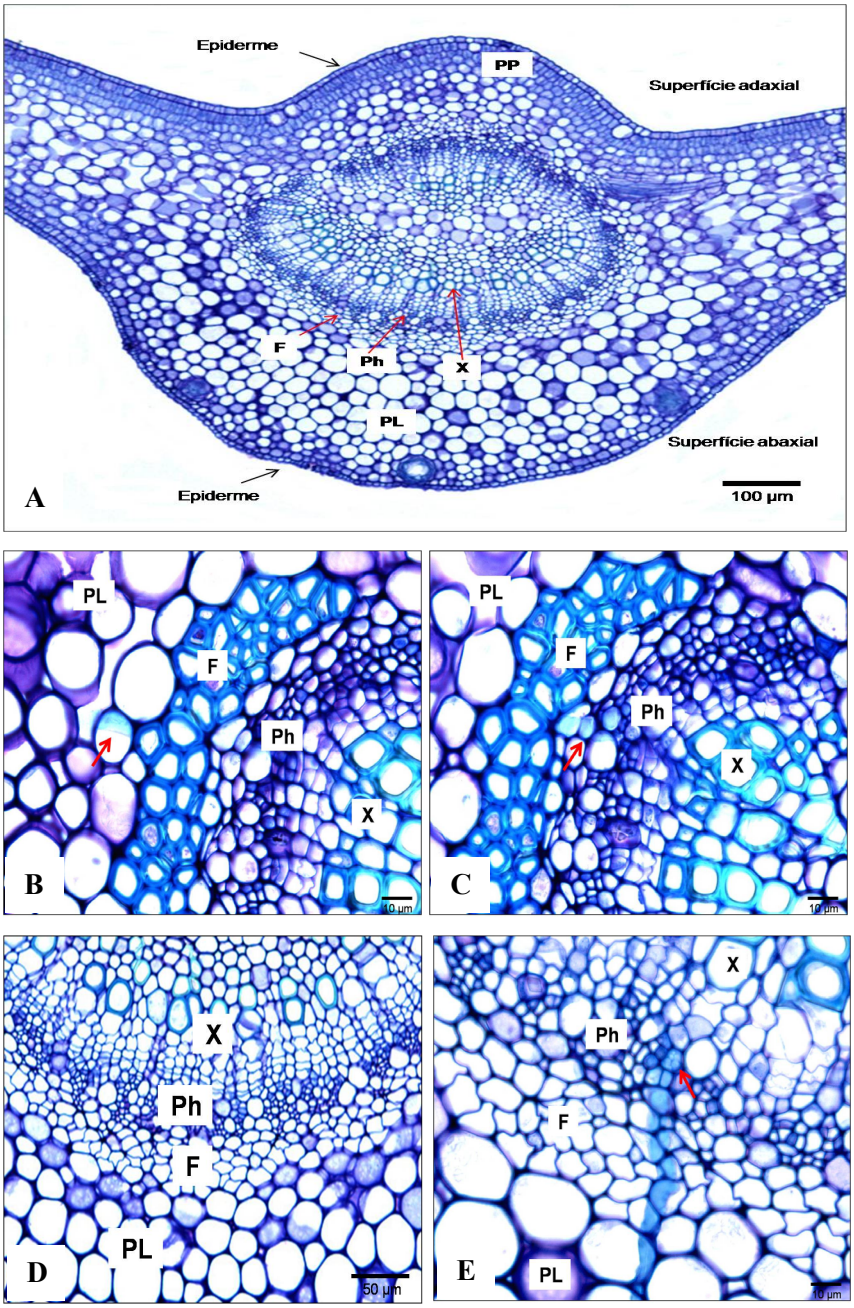
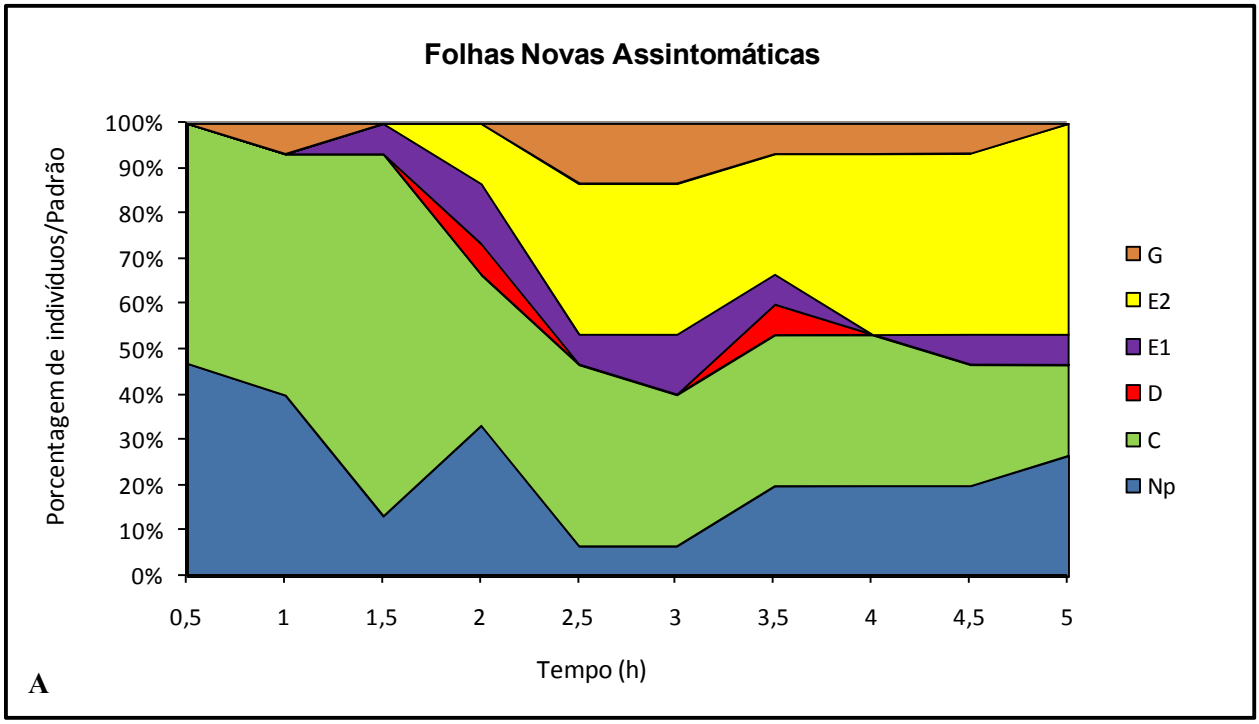


Figura 3 – Cortes transversais de folhas de *Citrus sinensis* (A) Tomada geral de um corte transversal evidenciando epiderme adaxial e abaxial e nervura central da folha (10x); (B) Tecido de uma folha madura e encontro da bainha salivar produzida por *D. citri* com a camada de fibra (100x); (C) Detalhe da bainha salivar chegando ao feixe floemático após ultrapassar a camada de fibras em uma folha madura (100x); (D) Tecido de uma folha nova (20x); (E) Detalhe da bainha salivar chegando ao feixe floemático após ultrapassar a camada de fibras em uma folha madura (100x). PP: parênquima paliçádico; PL: parênquima lacunoso; F: fibras; Ph: floema; X: xilema. Setas indicam as bainhas salivares terminam.



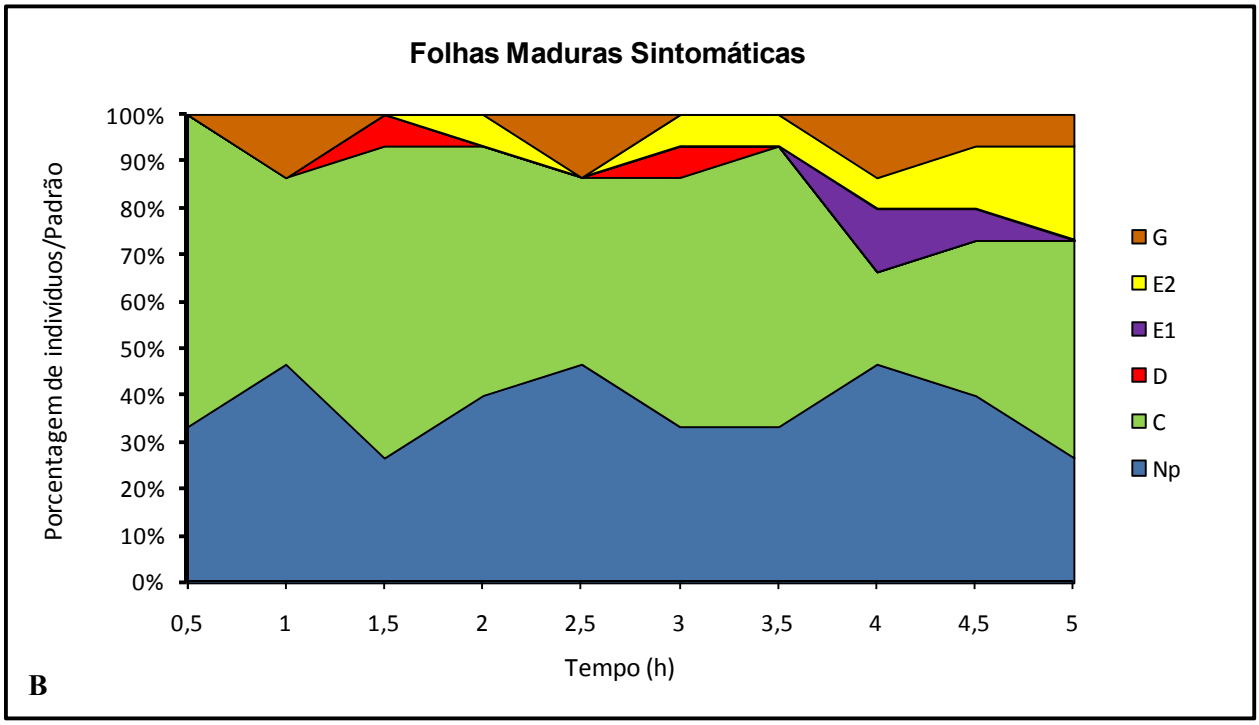


Figura 4 – Porcentagem de indivíduos adultos de *Diaphorina citri* em diferentes formas de onda (EPG), em intervalos de 30 minutos sobre folhas "novas" assintomáticas e folhas "maduras" sintomáticas de plantas infectadas com *Candidatus* Liberibacter asiaticus

Referências

ALVAREZ, A.E.; TJALLINGII, W.F.; GARZO, E.; VLEESHOUWERS, V.; DICKE M.; VOSMAN, B. Location of resistance factors in the leaves of potato and wild tuber-bearing *Solanum* species to the aphid *Myzus persicae*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 121, p. 145–157, 2006.

AUBERT, B. *Trioza erytreae* Del Guercio and *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psylloidea), the two vectors of citrus greening disease: Biological aspects and possible control strategies. **Fruits**, Montpellier, v. 42, p. 149-162, 1987.

BOVÉ, J.M.; GARNIER, M. Pholem-and xylem-restricted plant pathogenic bacteria. **Plant Science**, Amsterdam, v. 164, p. 423-438, 2002.

BRONZI, L.M. **Estudo da anatomia foliar de dois cultivares de Citrus sinensis (L.) Osbeck (Rutaceae): cv. Folha murcha e cv. Pera**. 1981. 95 p. Dissertação (Mestrado em Biologia) – Departamento de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1981.

COLLAR, J.L.; FERERES, A.C. Nonpersistent virus transmission efficiency is determined by aphid probing behavior during intracellular punctures. **Environmental Entomology**, College Park, v. 27, p. 583-591, 1998.

EASTOP, V.F. Deductions from the present day host plants of aphids and related insects. **Royal Entomological Society**, London, v. 6, p. 157-178, 1972.

FERERES, A.; POEHLING, H.M.; BORGEMEISTER, C. Probing and feeding behavior of Sitobion avenae (F.) (Hom., Aphididae) on three wheat cultivars infected with barley yellow dwarf virus. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 109, p. 29-36, 1990.

GABRYS, B.; TJALLINGII, W.F.; VAN BEEK, T.A. Analysis of EPG recorded probing by cabbage aphid on host plant parts with different glucosinolate contents. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 23, n. 7, p. 1661-1673, 1997.

GARNIER, M.S; JAGOUEIX-EVEILLARD, P.R.; CRONJE, G.F.; LE ROUX, H.F; BOVÉ, J.M. Genomic characterization of a Liberibacter present in an ornamental rutaceous tree, *Calodendrum capense*, in the Western Cape province of South Africa. Proposal of '*Candidatus* Liberibacter africanus subsp. capensis.' **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 50, p. 2119-2125, 2000.

GOTTWALD, T.; PARNELL, S.; TAYLOR, E.; POOLE, K.; HODJE, J.; FORD, A.; THERRIEN, L.; MAYO, S.; IREI, M. Within-tree distribution of *Candidatus* Liberibacter asiaticus In: INTERNATIONAL RESEARCH CONFERENCE ON HUANGLONGBING, 2008, Orlando. **Proceedings…** Orlando: USDA, 2008. p. 270-273.

HALBERT, S.E.; MANJUNATH, K.L. Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: a literature review and assessment of risk in Florida. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 87, n. 3, p. 3330-353, 2004.

HEREDIA, M.; GARCIA, A.L.; TORRES, S.C.Z.; LOPES, S.A. Análise microscópica de folhas de plantas de laranja doce afetadas pelo hunglongbing. In: HUNGLONGBING INTERNATIONAL WOKSHOP, 2006, Ribeirão Preto. **Proceedings**... Ribeirão Preto: Fundecitrus, 2006. p. 89.

HODKINSON, I.D. The biology of the Psylloidea (Homoptera): a revew. **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal, v. 64, p. 325-339, 1974.

HONG-JI, S. Research and health management of citrus huanglongbing in Taiwan. In: INTERNATIONAL RESEARCH CONFERENCE ON HUANGLONGBING, 2008, Orlando. **Proceedings…** Orlando: USDA, 2008. p. 58-93.

JIANG. Y.X.; LEI, H.; COLLAR, J.L.; MARTIN, B.; MUÑIZ; FERERES, A. Probing and feeding behavior of two distinct biotypes of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) on tomato plants. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 92, n. 2, p. 357-366, 1999.

KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 27, p. 137-138, 1965.

MARTIN, B.; COLLAR, J.L.; TJALLINGII, W.F.; FERERES, A.C. Intracellular salivation and ingestion by aphids may cause inoculation and acquisition of nonpersistently transmitted plant viruses. **Journal of General Virology**, London, v. 78, p. 2701-2705, 1997.

MARUCCI, R.C.; LOPES, J.R.S.; VENDRAMIM, J.D.; CORRENTE, J.E. Feeding site preference of *Dilobopterus costalimai* Young and *Oncometopia facialis* (Signoret) (Hemiptera: Cicadellidae) on citrus plants. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 33, p. 759-768, 2004.

McLEAN, A.P.D. Greening disease of sweet orange: its transmission in propagative parts and distribuition in partially diseased trees. **Phytophalactica**, Pretoria, v. 2, p. 263-268, 1970.

_____. The efficiency of citrus psylla, *Trioza erytreae* (del G.) as a vector of greening disease of citrus **Phytophalactica**, Pretoria, v. 6, p. 45-54, 1974.
PRADO, E.; TJALLINGII, W.F. Aphid activities during sieve element punctures. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 72, p. 157-165, 1994.

QUEIROZ-VOLTAN, R.B.; BLUMER, S. Morfologia dos citros. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D. de; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Fundag, 2005. cap. 5, p. 107-123.

SAKAI, W.S. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue. **Stain Technology**, Baltimore, v. 48, p. 247-249, 1973.

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

TJALLINGII, W.F. Electronic recording of penetration bahaviour by aphids. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 24, p. 721-730, 1978.

_____. Electrical recording of stylet penetration activities. In: MINKS, A.K.; HARREWIJN, P. (Ed.). **Aphids:** their biology, natural enemies and control. Amsterdam: Elsevier, 1988. p. 95–108.

_____. Stylet penetration parameters from aphids in relation to host-plant resistance. **Symposium Biologica Hungarica**, Tihany, v. 39, p. 411-419, 1990.

_____. Aphid-plant interactions, what goes on in the depth of the tissues? **Experimental and Applied Entomology**, Amsterdam, v. 6, p. 163-169, 1995.

TSAI, J.H.; LIU, Y.H. Biology of *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) on four host plants. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 93, p. 1721-1725, 2000.

TSAI, J.H.; WANG, J.J.; LIU, Y.H. Seasonal abundance of the asian citrus pasyllid, *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) in southern Florida. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 85, n. 3, p. 446-451, 2002.

TSAI, Y.P.; HWANG, M.T.; WANG, H.C. *Diaphorina citri* on *Murraya paniculata*. **Plant Protection Bulletin**, Taiwan, v. 26, p. 285-287, 1984.

VAN HELDEN, M.; TJALLINGII, W.F. Experimental design and analysis in EPG experiments with emphasis on plant resistance research, In: WALKER, G.P.; BACKUS, E.A. (Ed.). **Principles and applications of electronic monitoring and other techniques in the study of homopteran feeding behavior.** Lanham: American Society of Entomology, 2000. p. 144-171. (Thomas Say Publications in Entomology).

WU, D. Relationship between the habits of citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama, and the occurrence of citrus huanglongbing. **China Citrus**, Pequin, v. 2, p. 33-34, 1980.

XU, C.; XIA, Y.; KE, C. Study on the biology and control of citrus psylla. **Acta Phytophylacica Sinica**, Beijing, v. 21, p. 53-56, 1994.

XU, C.; XIA, Y.; LI, K; KE, C. Further study of the transmition of citrus huanglongbing by a psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 10., 1988, Riverside. **Proceedings…** Riverside: IOC, 1988. p. 178-181.

YASUDA, K.; KAWAMURA, F.; OISHI, T. Location and preference of adult asian psyllid, *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) on Chinese box orange jasmine, *Murraya exotica* L. and flat limon, *Citrus depressa*. **Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology**, Tokyo, v. 49, p. 146-149, 2005.

ZHAO, X.Y. Citrus yellow shoot disease (huanglongbing) – a review. In: INTERNATIONAL SOCIETY OF CITRICULTURE, 1., 1981, Tokyo. **Proceedings…** Tokyo: ICC, 1981. p. 466-469.

EPÍLOGO

Huanglongbing (HLB), considerada a doença mais destrutiva dos citros, que representa uma grande ameaça para a citricultura mundial, está invadindo novas áreas de cultivo a cada dia. Pesquisas intensas têm sido realizadas por todo mundo, principalmente a partir de 2004/2005, quando esta enfermidade atingiu o continente americano, que é o maior produtor mundial do fruto. Muitas são as linhas de pesquisa em andamento e todas vêm contribuindo significativamente para um melhor entendimento do complexo vetor-patógeno-hospedeiro-ambiente. Uma vez detectada na planta a bactéria *Candidatus* Liberibacter, a árvore deve ser erradicada imediatamente, já que não existe cura para o HLB e a mesma pode servir como fonte de inóculo para disseminação secundária da doença; ou seja, o psilídeo *Diaphorina citri* pode se alimentar na árvore infectada e eventualmente adquirir a bactéria e transmiti-la para outras plantas sadias no pomar.

Uma das medidas para conter o avanço da doença é o combate do inseto vetor através de inseticidas. Porém, quando se trata de insetos vetores de fitopatógenos não existe um nível de controle, pois um único inseto pode ser capaz de disseminar a doença, considerando-se ainda que uma fêmea é capaz de efetuar uma postura de mais de 500 ovos ao longo de sua vida, o risco de disseminação é elevado mesmo quando a população de psilídeos é baixa. Para conseguir avanços no manejo de doenças disseminadas por vetores é de extrema importância conhecer o comportamento alimentar desses insetos, já que a aquisição e inoculação do patógeno ocorrem durante a alimentação do vetor no tecido vegetal. Portanto, as informações obtidas neste trabalho sobre o comportamento alimentar de *D. citri* permitirão uma maior compreensão do processo de transmissão de bactérias associadas ao complexo HLB, oferecendo uma perspectiva mais promissora para o combate a doença.

No capítulo 2 desta tese foram descritas as principais características morfológicas do aparelho bucal de *D. citri*, principalmente a conformação dos estiletes e suas dimensões, informações importantes que auxiliam na compreensão da alimentação deste inseto no hospedeiro. No capítulo 3, a alimentação floemática de *D. citri* foi evidenciada e o comportamento alimentar foi detalhadamente observado em folhas novas recém expandidas de plantas cítricas, local preferido para sua alimentação.

Apesar da bactéria estar em maior concentração em folhas maduras e sintomáticas de uma planta infectada, os resultados do capítulo 4 mostram que sua aquisição pelo vetor é mais eficiente em folhas novas sem os sintomas da doença. Isto origina a seguinte questão: será que uma planta com sintomas do HLB é realmente a principal fonte de inóculo?

Folhas cítricas maduras, mesmo não apresentando sintomas, possuem diferenciação nos tecidos em relação a folhas novas. Por exemplo, cortes histológicos mostraram que a camada de fibras pericíclicas que envolvem o floema são mais espessas e lignificadas quando comparadas com as encontrada em folhas novas. Essa observação pode auxiliar na compreensão do comportamento alimentar de *D. citri* em folhas maduras, que se caracterizou por menor ingestão floemática. É possível que o psilídeo tenha dificuldades de transpor essa camada de fibras com seus estiletes, já que o caminhamento estiletar é intercelular; com essa lignificação os espaços intercelulares são reduzidos consequentemente a alimentação floemática se torna mais difícil, o que explica pelo menos em parte a menor taxa de aquisição bacteriana pelo vetor em folhas maduras.

Em seu conjunto, esta pesquisa mostra que o processo de transmissão de *Candidatus* Liberibacter asiaticus é influenciado pelo comportamento alimentar de *D. citri* e por características do tecido foliar, portanto, seria de grande importância desenvolver e aprimorar métodos de controle que interfiram na alimentação do psilídeo *D. citri*, impondo dificuldades no caminhamento estiletar até o floema. Por exemplo, através de estudos de resistência de plantas, buscando-se inserir algum fator de resistência que interfira no comportamento alimentar do inseto, ou melhorando-se a ação e tecnologia de aplicação de inseticidas, dentre outras medidas,de modo a contribuir para o manejo do HLB.

Jean Patrick Bonani

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