

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

Efeito dos coespecíficos e voláteis das plantas *Murraya paniculata* (L.) Jack, *Psidium guajava* L. e *Citrus sinensis* (L.) Osbeck sobre o comportamento de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae)

Newton Cavalcanti de Noronha Junior

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

**Piracicaba
2010**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Newton Cavalcanti de Noronha Junior
Engenheiro Agrônomo

Efeito dos coespecíficos e voláteis das plantas *Murraya paniculata* (L.) Jack, *Psidium guajava* L. e *Citrus sinensis* (L.) Osbeck sobre o comportamento de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae)

Orientador:
Prof. Dr. **JOSÉ MAURÍCIO SIMÕES BENTO**

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

**Piracicaba
2010**

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Newton e Carminha,
E à minha irmã Isis,
Pelo constante apoio, incentivo, amor e confiança.
Pelos exemplos que são, os quais sempre me inspiraram...*

Dedico

*À minha namorada Gisleine,
Por todo amor e companheirismo,
Pelo apoio, compreensão e contribuição neste trabalho.*

Ofereço

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Maurício Bento, pela amizade, incentivo, companheirismo, dedicação, por todas as oportunidades oferecidas, e pelos constantes ensinamentos transmitidos durante a nossa convivência...

Ao Prof. José Roberto Postali Parra, pela oportunidade de desenvolver os trabalhos na estrutura do seu laboratório, incentivo e atenção;

Ao Prof. Paulo Zarbin (UFPR) e sua equipe, pelo companheirismo, momentos de descontração e por disponibilizar a estrutura de seu laboratório e auxílio nas análises químicas;

Aos pesquisadores do Juliano Ayres, Pedro Yamamoto e Marcelo Miranda (FUNDECITRUS), por todo apoio e incentivo.

Aos professores, funcionários e colegas do Curso de Pós-Graduação em Entomologia da ESALQ, pela convivência e aprendizado proporcionado;

A todos os funcionários da biblioteca, pela disposição em ajudar;

Aos Professores Luzia Trinca (UNESP) e Wesley Godoy, pelo auxílio com as análises estatísticas;

Aos colegas e amigos, do laboratório de Comportamento de Insetos, André, Peñaflor, Cris, Welliton, Ana Lia, Rejanas, Bel, Nancy e família, Laura, Ana Cris, Vítor, Mayra, Andréa, Mariana et al., pelo companheirismo, cooperação e momentos de descontração;

Ao amigo e “professor” Edinho Camargo, pelo amparo e lições de vida, transmitidos;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP pelo apoio financeiro e concessão de Bolsa de Estudos;

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT): Semioquímicos na Agricultura;

Ao Fundo de Defesa da Citricultura FUNDECITRUS.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão deste trabalho,

Muito Obrigado!

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO.....	13
Referências	16
2 RESPOSTAS OLFATIVAS DE <i>Diaphorina citri</i> KUWAYAMA (HEMIPTERA: PSYLLIDAE) AOS VOLÁTEIS DA PLANTA <i>Murraya paniculata</i> (L.) JACK (RUTACEAE) E DOS PSILÍDEOS COESPECÍFICOS.....	21
Resumo	21
Abstract.....	21
2.1 Introdução.....	22
2.2 Material e Métodos	23
2.3 Resultados e Discussão.....	31
2.4 Considerações Finais	39
Referências	39
3 ESTUDOS PRELIMINARES DAS RESPOSTAS OLFATIVAS DE <i>Diaphorina citri</i> KUWAYAMA (HEMIPTERA: PSYLLIDAE) AOS VOLÁTEIS DE PLANTAS DE <i>Citrus sinensis</i> (L.) OSBECK (RUTACEAE) INFECTADAS POR <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> .43	
Resumo	43
Abstract.....	43
3.1 Introdução.....	44
3.2 Material e Métodos	45
3.3 Resultados e Discussão.....	48
3.4 Considerações Finais	50
Referências	50
4 EFEITO DOS VOLÁTEIS DE GOIABEIRAS, <i>Psidium guajava</i> L. (MYRTACEAE) NA LOCALIZAÇÃO DE PLANTAS DE LIMÃO-CRAVO, <i>Citrus limonia</i> (L.) OSBECK (RUTACEAE) POR <i>Diaphorina citri</i> KUWAYAMA (HEMIPTERA: PSYLLIDAE).....	53
Resumo	53

Abstract	53
4.1 Introdução.....	54
4.2 Material e Métodos.....	55
4.3 Resultados e Discussão	61
4.4 Considerações Finais	64
Referências	64

RESUMO

EFEITO DOS COESPECÍFICOS E VOLÁTEIS DAS PLANTAS *Murraya paniculata* (L.) JACK, *Psidium guajava* L. E *Citrus sinensis* (L.) OSBECK SOBRE O COMPORTAMENTO DE *Diaphorina citri* KUWAYAMA (HEMIPTERA: PSYLLIDAE)

Os agroecossistemas consistem em complexas relações tróficas entre plantas, herbívoros, e seus inimigos naturais. Sabe-se que a maioria das plantas é capaz de produzir compostos voláteis, utilizados como sinais químicos por diferentes grupos de insetos. Esses voláteis podem ser produzidos de forma constitutiva em plantas saudáveis, ou seja, sem indução. Por outro lado, a produção de voláteis induzidos se dá a partir do contato de secreções liberadas pelo fitófago com injúrias ocasionadas pela alimentação ou oviposição no tecido vegetal. Para os fitófagos esses voláteis podem sinalizar a presença da planta hospedeira, bem como a presença de coespecíficos e do parceiro sexual. Já para os inimigos naturais, predadores e parasitóides, os voláteis induzidos podem sinalizar a presença do inseto fitófago (presa/ hospedeiro) na planta. Nesse contexto as respostas comportamentais de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), aos voláteis de plantas de murta, *Murraya paniculata* (L.) Jack (Rutaceae), infestadas ou não por coespecíficos, foram estudadas. Também foram investigadas as respostas dos psilídeos aos voláteis de plantas de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (Rutaceae) infectadas por bactérias causadoras do ‘Huanglongbing’ ou HLB, uma das mais sérias doenças dos citros. Nos bioensaios visando compostos repelentes a *D. citri*, foram testados os voláteis de plantas de goiaba, *Psidium guajava* L. (Myrtaceae) e sua interferência na localização de plantas de *Citrus limonia* (L.) Osbeck (Rutaceae) pelos psilídeos. As respostas comportamentais foram mensuradas em olfatômetro ‘Y’ e de ‘quatro vias’. Antes de estabelecer os bioensaios de olfatiometria foram realizados estudos do comportamento sexual de *D. citri*. Os resultados obtidos evidenciaram que o início da atividade sexual de *D. citri* ocorreu entre o segundo e terceiro dia após a emergência, e que os psilídeos foram mais ativos durante a fotofase. Quanto às influências dos voláteis de plantas, machos e fêmeas de *D. citri* responderam diferentemente aos mesmos estímulos olfativos. Assim, os machos foram atraídos apenas aos odores associados às fêmeas. Já as fêmeas, foram atraídas aos odores das plantas, porém, evitando os odores associados aos machos, inclusive de plantas previamente infestadas por estes. Verificou-se também, que os adultos de *D. citri* distinguiram os voláteis de citros com HLB dos voláteis de plantas saudáveis. Sendo assim, ficou nítida a atratividade dos voláteis de plantas infectadas, tanto aos psilídeos machos quanto às fêmeas. Na busca por compostos repelentes, também foi possível demonstrar que os voláteis de *P. guajava* não somente dificultou a localização de plantas de *C. limonia* por *D. citri*, como também repeliram os psilídeos. As descobertas aqui apresentadas poderão auxiliar a elaboração de novas táticas para o manejo comportamental de *D. citri*.

Palavras-chave: *Diaphorina citri*; comportamento sexual; voláteis de plantas; coespecíficos; repelência

ABSTRACT

EFFECT OF CONSPECIFIC AND PLANT VOLATILES OF *Murraya paniculata* (L.) JACK, *Psidium guajava* L. AND *Citrus sinensis* (L.) OSBECK ON THE BEHAVIOR OF *Diaphorina citri* KUWAYAMA (HEMIPTERA: PSYLLIDAE)

The agro-ecosystems consist of complex trophic relationships between plants, herbivores and their natural enemies. It is known that the majority of plants can produce volatile compounds used as chemical signals by different groups of insects. These compounds can be produced constitutively in healthy plants, i.e., without induction. In other hand, the production of induced volatiles occurs from the contact of secretions released by phytophagous with injuries caused by feeding or oviposition in plant tissue. For phytophagous, these volatile compounds may signal the presence of the host plant, as well as the presence of conspecifics and the sexual partner. Although, natural enemies, predators and parasitoids, the induced volatiles can signal the presence of phytophagous insects (prey / host) in the plant. In this context, the behavioral responses of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) to plant volatiles of jasmine, *Murraya paniculata* (L.) Jack (Rutaceae) infested or not by conspecifics, were studied. It was also investigated the responses of psyllids to volatiles of *Citrus sinensis* infected by bacteria that cause the 'huanglongbing' or HLB, one of the most serious diseases of citrus. Given the studies that aim to identify repellent compounds to *D. citri*, it was tested plant volatiles of guava, *Psidium guajava* L. (Myrtaceae) and their impact on plant location of *Citrus limonia* (L.) Osbeck (Rutaceae) by psyllids. Behavioral responses were measured by Y-tube and four-way olfactometers. Before establishing the olfactometry assays, studies of *D. citri* sexual behavior were performed. The obtained results showed that the beginning of *D. citri* sexual activities occurred between the second and third days after emergence, and the psyllids were more active during the photophase. In regard to the effects of plant volatiles, males and females of *D. citri* differently responded to the same olfactory stimuli. Thus, males were attracted only to odors associated with females. Females were attracted to plant odors, although they avoided odors associated with males, including plants previously infested by them. It was also verified that *D. citri* adults distinguished volatiles citrus with HLB from volatiles released by healthy plants. Given that, it was clear that volatiles from infected plants were attractive to both males and females psyllids. In search of repellent compounds, also was possible demonstrated that *P. guajava* volatiles not only hindered the location of plants of *C. limonia* by *D. citri*, but also provided repellent effect to psyllids. The findings presented here may help the development of new tactics for the behavioral management of *D. citri*.

Keywords: *Diaphorina citri*; sexual behavior; plant volatiles; conspecifics; repellence

1 INTRODUÇÃO

O ‘Greening’ ou ‘Huanglongbing’ (HLB) é considerado a doença mais grave dos citros no mundo (DA GRAÇA, 1991; HALBERT; MANJUNATH, 2004; BOVÉ, 2006). O HLB foi relatado pela primeira vez no sudeste da China em 1919 (REINKING, 1919 apud BOVÉ, 2006). No Brasil, o primeiro registro foi em 2004, na região de Araraquara, estado de São Paulo (COLETTA-FILHO et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2005); e nos Estados Unidos em 2005 na Flórida (SUTTON, 2005). Hoje o HLB está presente em mais de 40 países distribuídos pelos continentes Asiático, Africano, Oceania e Americano (BOVÉ, 2006). Após cinco anos da detecção do primeiro foco da doença no Brasil, o HLB encontra-se disseminada por quase todos os municípios produtores de citros de São Paulo (FUNDECITRUS, 2009).

Os agentes causais do HLB formam um complexo de bactérias *Candidatus Liberibacter* spp., gram-negativas, que se desenvolvem nos vasos do floema de seus hospedeiros (GARNIER; DANIEL; BOVÉ, 1984). Atualmente são conhecidas três espécies de bactérias causadoras do HLB: (i) *Candidatus Liberibacter africanus*, (ii) *Ca. L. americanus*; e (iii) *Ca. L. asiaticus*. Destas, *Ca. L. americanus* e *Ca. L. asiaticus* estão presentes no Brasil (COLETTA-FILHO et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2005; YAMAMOTO et al., 2006).

Um dos sintomas mais evidentes do HLB é a presença de ramos com folhas cloróticas, que contrastam com as demais folhas da planta (verdes escuras). Com a evolução da doença, os demais ramos da planta são também afetados, resultando em queda intensa de folhas e seca dos ponteiros. Além disso, as folhas que remanescentes passam a apresentar um mosqueado com manchas irregulares de coloração verde clara ou amarela (FUNDECITRUS, 2007). Nos frutos os principais sintomas são a maturação desuniforme, assimetria bilateral do endocarpo, má formação das sementes, assim como a presença de um feixe de vasos alaranjados próximo à inserção do pedúnculo (BOVÉ, 2006). Os sintomas nos frutos são mais bem observados em corte longitudinal. Por fim o HLB promove a morte da planta, não sendo conhecidas medidas de controle para essa doença (DA GRAÇA, 1991; HALBERT; MANJUNATH, 2004; BOVÉ, 2006).

Apesar da severidade do HLB e dos danos causados por *Ca. Liberibacter* spp. em seus hospedeiros, essas bactérias são extremamente dependentes de insetos vetores para sua disseminação (Mc CLEAN; OBERHOLZER, 1965; SWARTZ; Mc CLEAN; CATLING,

1970; SAIBE; CORTEZ, 1966) apud (DA GRAÇA, 1991). Deste modo, apenas duas espécies de insetos são conhecidas como capazes de transmitir essas bactérias, *Trioza erythrae* Del Guercio (Hemiptera: Triozidae) e *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) (HALBERT; MANJUNATH, 2004).

As bactérias mais comumente associadas ao psilídeo *D. citri* são *Ca. L. asiaticus* (CAPOOR et al., 1967; CHENET al., 1973) apud (HUNG et al., 2004) e *Ca. L. americanus* (TEIXEIRA et al., 2005; YAMAMOTO et al., 2006); e para o psilídeo *T. erythrae* a bactéria *Ca. L. africanus* (Mc CLEAN; OBERHOLZER, 1965 apud HUNG et al. 2004). Contudo, ambas as espécies de psilídeos possuem a capacidade de transmitir, tanto *Ca. L. asiaticus*, quanto *Ca. L. africanus* (LALLEMAND; FOS; BOVÉ, 1986; MASSONIE; GARNIER; BOVÉ, 1969) apud (HALBERT; MANJUNATH, 2004). A maioria dos países afetados pelo HLB possui *D. citri* como vetor de *Ca. L. asiaticus* (HALBERT; MANJUNATH, 2004; BOVÉ, 2006). No Brasil, *D. citri* é conhecido há pelo menos seis décadas (GOMES, 1940; COSTA-LIMA, 1942), sendo considerada até então praga secundária dos citros. Contudo, após o ingresso das bactérias do HLB, e pelo fato de *D. citri* ser considerado um importante vetor, tornou-se uma das principais pragas da citricultura.

O psilídeo *D. citri* é um inseto sugador que mede pouco mais de 0,2 cm de comprimento, de coloração parda acinzentada, que em repouso permanece em um ângulo de 45° formado com a superfície da planta (GOMES, 1940). Antes de chegar à fase adulta, as ninfas de *D. citri* passam por cinco instares, sendo que o ciclo de vida, de ovo a adulto, dura aproximadamente 40 dias conforme a temperatura do ambiente e a planta hospedeira (TSAI; LIU, 2000; NAVA et al., 2007).

Os únicos hospedeiros registrados para *D. citri*, pertencem aos gêneros *Citrus* e *Murraya*, ambos da família Rutaceae (HALBERT; MANJUNATH, 2004). Contudo, não são todas *Murraya* spp. que permitem o completo desenvolvimento de *D. citri*, ocorrendo em alguns casos, somente a postura, sem que haja o desenvolvimento ninfal (AUBERT, 1987; SILVA et al., 1968). Por outro lado, a planta murta, *Murraya paniculata* (L.) Jack é mencionada freqüentemente na literatura como hospedeiro preferencial de *D. citri* (AUBERT, 1987; IKEDA; ASHIHARA, 2008), na qual o inseto pode encontrar condições adequadas para alimentação, reprodução e desenvolvimento (NAVA et al., 2007). Aparentemente, as contínuas brotações de *M. paniculata* contribuem para a manutenção de altas populações de *D.*

citri, especialmente quando não há brotações disponíveis nos pomares comerciais de citros (LIU; TSAI, 2000).

Em geral as folhas jovens das plantas liberam grandes quantidades de compostos voláteis, que por sua vez podem influenciar no comportamento dos insetos. Insetos sugadores, como os psílídeos dependem dessas brotações para suprir suas necessidades nutricionais e de sua prole (KARBAN; BALDWIN, 1997). Portanto, plantas com constantes brotações como *M. paniculata*, provavelmente, possuem alta produção de voláteis, que podem ser atrativos para *D. citri*.

Assim, muitos dos compostos voláteis produzidos por plantas ou insetos, podem interferir nas relações ecológicas, tanto dos organismos que os emitem, quanto daqueles que os recebem (DICKE; LOON Van, 2000; POECKE Van; DICKE, 2004), mediando, complexas interações tróficas e reprodutivas. Neste sentido, a descoberta de semioquímicos capazes de alterar as respostas comportamentais de *D. citri* pode ser de grande utilidade no seu manejo.

Aparentemente, algumas espécies de psílídeos fazem uso dos compostos voláteis das plantas hospedeiras no processo de localização do parceiro sexual (HORTON; GUÉDOT; LANDOLT, 2007; HORTON; LANDOLT, 2007). Além disso, a associação dos voláteis das plantas hospedeiras com os odores de psílídeos coespecíficos parece incrementar o encontro de machos e fêmeas (SOROKER et al., 2004). Para *D. citri* existem indícios de que as fêmeas emitem odores atrativos aos machos (WENNINGER; HALL, 2008), contudo não há informações sobre o papel das plantas hospedeiras favorecendo o encontro sexual, nem estudos da indução de voláteis por coespecíficos.

Os voláteis emitidos pelas plantas infectadas por fitopatógenos também têm se mostrado importantes mediadores das relações entre plantas e insetos vetores, promovendo alterações comportamentais nestes últimos. A emissão desses voláteis, em alguns casos, pode tornar as plantas infectadas mais atrativas aos vetores favorecendo assim a disseminação do patógeno (MAUCK; DE MORAES; MESCHER, 2010). Para psílídeos existem apenas dois trabalhos que exploram essas alterações, ambas promovidas pelo fitopatógeno *Candidatus Phytoplasma Mali* na emissão de voláteis em macieiras *Malus domestica* (Rosaceae). Nessa interação as plantas infectadas foram mais atrativas ao psílídeo vetor *Cacopsylla picta* (Syn. *Cacopsylla costalis* Flor) (Hemiptera: Psyllidae) do que plantas sadias (MAYER; VILCINSKAS; GROSS, 2007, 2008). Com relação ao HLB, sabe-se que plantas de *Citrus*

sinensis (L.) Osbeck (Rutaceae) infectadas, sofrem alterações bioquímicas promovidas pela presença de *Ca. Liberibacter* sp., resultando no acúmulo de metabólitos secundários nas folhas (CEVALLOS-CEVALLO; REYES-DE-CORCUERA, 2008; MANTHEY, 2008). No entanto, ainda são desconhecidos os possíveis efeitos da indução de voláteis em *Citrus* spp. por *Ca. Liberibacter* spp., no comportamento de *D. citri*.

As relações entre um fitopatógeno, planta hospedeira e inseto vetor mediadas por voláteis de plantas são bastante complexas. O conhecimento desse sofisticado mecanismo de comunicação pode resultar na descoberta de novos compostos voláteis, passíveis de uso no manejo comportamental desses insetos, transmissores de fitopatógenos.

Além de compostos atrativos, existem voláteis de plantas com grande potencial repelente aos insetos. Particularmente, no caso do psilídeo *D. citri*, há relatos no Vietnã – país com a citricultura severamente prejudicada pelo HLB – que a presença de plantas de goiaba *Psidium guajava* L. (Myrtaceae) intercaladas com plantas de citros, poderia afastar este inseto dos pomares e consequentemente reduzir a incidência da doença (BEATTIE et al., 2008).

Portanto, o conhecimento das alterações comportamentais em *D. citri*, promovidas por voláteis de plantas e seus coespecíficos, representam uma alternativa de novas estratégias para o manejo desta praga, seja mediante a confecção de iscas atrativas, compostos repelentes ou até mesmo por meio da manipulação dos processos bioquímicos que induzem ou regulam a produção de voláteis nas plantas.

Referências

AUBERT, B. Le psylle asiatique des agrumes (*Diaphorina citri*) Kuwayama au Brésil. **Fruits**, Saint Pierre, v.42, p.225-229, 1987.

BEATTIE, A.; HOLFORD, P.; HAIGH, D.T.; MABBERLEY, D.; BROADBENT, P.; BAYER, R. Retrospectives & insights: huanglongbing, *Diaphorina citri*. In: CITRUS EXPO SEMINAR PROGRAM, 2007, Ft. Myers. Disponível em: <<http://www.imok.ufl.edu/events/expo/>>. Acesso em: 14 jul. 2008.

BOVÉ, J.M. Huanglongbing: a destructive, newly- emerging, century-old disease of citrus. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 88, n. 1, p. 7-37, 2006.

CEVALLOS-CEVALLOS, J.M.; CORCUERA, R.J.I. Metabolite changes in HLB Orange leaves by GC-MS and other techniques. In: INTERNATIONAL RESEARCH CONFERENCE ON HUANGLONGBING, 2008, Orlando. **Proceedings...** Orlando: USDA, ARS, 2008. p. 176-177.

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**, Davis, v. 88, p.1382, 2004.

COSTA-LIMA. **Insetos do Brasil**: homópteros. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Agronomia, 1942. t. 3, cap. 23, p. 94-111. (Série Didática, 4).

DA GRAÇA, J.V. Citrus greening disease. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 29, p. 109- 36, 1991.

DICKE, M.; LOON, J.J.A. Van. Multitrophic effects of herbivore-induced plant volatiles in an evolutionary context: review. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 97, p. 237- 249, 2000.

FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA: **Manual de técnico de Greening**. Araraquara, 2007. 12 p.

_____. Levantamento mapeia Greening. **Revista do FUNDECITRUS**, Araraquara, n. 151, p. 8-9, maio/jun. 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, 12., 1984, Riverside. **Proceedings...** Riverside: IOCV, 1984. p. 115-124.

GOMES, J.G. Chave de campo para a determinação das principais pragas dos citros. **Revista da Sociedade Brasileira de Agronomia**, Rio de Janeiro, v.3, n.1, p. 58-108, 1940.

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, p. 330-353, 2004.

HORTON, D.R.; LANDOLT, P.J. Attraction of male pear psylla, *Cacopsylla pyricola*, to female-infested pear shoots. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 123, p.177-183, 2007.

HORTON, D.R.; GUÉDOT, C.; LANDOLT, P.J. Diapause status of females affects attraction of male pear psylla, *Cacopsylla pyricola*, to volatiles from female infested pear shoots. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 123, p. 185-192, 2007.

HUNG, T.H; HUNG, S.C.; CHEN, C.N.; HSU, M.H.; SU, H.J. Detection by PCR of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the bacterium causing citrus huanglongbing in vector psyllids: application to the study of vector–pathogen relationships. **Plant Pathology**, Oxford, v. 53, p. 96–102, 2004.

IKEDA, K.; ASHIHARA, W. Preference of Adult Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) for *Murraya paniculata* and *Citrus unshiu*. **Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology**, Tokyo, v.52, n.1, p.27-30, 2008.

KARBAN, R.; BALDWIN, I.T. **Induce responses to herbivory**. Chicago: University of Chicago Press, 1997. 317 p.

KOHNO, K.; TAKAHASHI, K.; NAKATA, T.; KONISHI, K. Occurrence of the Aisan citrus psylla and its parasitic natural enemies in the Ryukyu archipelago, **Japanese Acta Horticulturae**, Tokyo, v. 575, p. 503- 508, 2002.

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

MANTHEY, J.A. Differences in secondary metabolites in leaves from trees affected with the greening (HLB) disease. In: INTERNATIONAL RESEARCH CONFERENCE ON HUANGLONGBING, 2008, Orlando. **Proceedings...** Orlando: USDA, ARS, 2008. p. 182.

MAUCK, K.E; DE MORAES, C.M; MESCHER, M.C. Deceptive chemical signals by a plant virus attract insect vectors to inferior hosts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 1, n. 1, p. 1- 6, 2010.

MAYER, C.J.; VILSINSKAS, A.; GROSS, J. Chemo-ecologically mediated interactions among “*Candidatus Phytoplasma mali*”, its vector *Cacopsylla picta*, and their host plant *Malus domestica*. **Bulletin of Insectology**, Bologna, v. 60, n. 2, p. 209-210, 2007.

_____. Phytopathogen lures its insect vector by altering host plant odor. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 34, p. 1045-1049, 2008.

NAVA, D.E.; TORRES, M.L.G.; RODRIGUES, M.D.L.; BENTO, J.M.S.; PARRA, J.R.P. Biology of *Diaphorina citri* (Hem., Psyllidae) on different hosts and at different temperatures. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 131, n. 9, p. 709-715, 2007.

POECKE, R.M.P. Van; DICKE, M. Indirect defenses of plant against herbivores: Using *Arabidopsis thaliana* as a model plant. **Plant Biology**, Malden, v. 6, p. 387- 401, 2004.

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

SOROKER, V.; TALEBAEV, S.; HARARI, A.R.; WESLEY, S.D. The role of chemical cues and mate location in the pear psylla *Cacopsylla bidens* (Homoptera: Psyllidae). **Journal of Insect Behavior**, Berlin, v. 17, n. 5, p. 613-626, 2004.

SUTTON, B.D. Detection and identification of citrus huanglongbing (Greening) in Florida, USA. In: INTERNATIONAL CITRUS CANCER AND HUANGLONGBING RESEARCH

WORKSHOP, 2., 2005, Orlando. **Proceedings...** Orlando: University of Florida, 2005. Abstract H-11.

TEIXEIRA, D.C.; DANET, J.L.; EVEILLARD, S.; MARTINS, E.C.; JESUS JR., W.C.; YAMAMOTO, P.T.; LOPES, S.A.; BASSANEZI, R.B.; AYRES, A.J.; SAILLARD, C.; BOVE, J.M. Citrus huanglongbing in São Paulo State, Brazil: PCR detection of the 'Candidatus' Liberibacter species associated with the disease. **Molecular and Cellular Probes**, Oxford, v. 19, p. 173- 179, 2005.

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

WENNINGER, E.; STELINSKI, L.L.; HALL, D. Behavioral evidence for a female-produced sex attractant in *Diaphorina citri*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 128, p. 450- 459, 2008.

YAMAMOTO PT, FELIPPE MR, GARBIM LF, COELHO JHC, XIMENES NL; MARTINS, EC; LEITE, APR; SOUSA, MC; ABRAHÃO, DP; BRAZ, JD. *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae): vector of the bacterium *Candidatus* Liberibacter americanus. In: HUANGLONGBING-GREENING INTERNATIONAL WORKSHOP, 2006, Ribeirão Preto. Ribeirão Preto: Fundectrus, 2006. p. 96.

2 RESPOSTAS OLFATIVAS DE *Diaphorina citri* KUWAYAMA (HEMIPTERA: PSYLLIDAE) AOS VOLÁTEIS DA PLANTA *Murraya paniculata* (L.) JACK (RUTACEAE) E DOS COESPECÍFICOS

Resumo

Nos últimos anos a citricultura mundial vem sofrendo grandes prejuízos ocasionados pela doença ‘Huanglongbing’ ou HLB, promovida por bactérias *Candidatus Liberibacter* spp., que tem como inseto vetor o psíldeo *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). Além dos citros, a planta de murta *Murraya paniculata* (L.) Jack. (Rutaceae) é mencionada como hospedeira preferencial de todas as fases de *D. citri*. Desse modo investigou-se a hipótese dos voláteis liberados por essa planta influenciarem a atração e o encontro sexual em *D. citri*. Assim, o efeito dos voláteis de plantas induzidas ou não de *M. paniculata* sobre os adultos de *D. citri* e desses aos seus coespecíficos foi explorado em laboratório, utilizando-se um olfatômetro ‘Y’ com fluxo de ar controlado (400 mL.min⁻¹). Os tratamentos foram os voláteis de: (i) Plantas sadias; (ii) plantas sadias + 20 fêmeas; (iii) plantas sadias + 20 machos; (iv) plantas induzidas durante 24 horas por 20 fêmeas; (v) plantas induzidas durante 24 horas por 20 machos; (vi) 20 fêmeas; (vii) 20 machos; e (viii) ar limpo (controle). Cada tratamento foi confrontado com o controle e posteriormente, aqueles que diferiram estatisticamente confrontados entre si. Machos e fêmeas foram testados individualmente para cada tratamento com 20 repetições. Os bioensaios foram realizados em fotofase a 25 °C e UR 70%. Os resultados foram analisados pelo teste de qui-quadrado ($P \leq 0,05$). Machos e fêmeas de *D. citri* responderam de forma distinta. As fêmeas foram atraídas pelos tratamentos contendo voláteis de plantas de murta *M. paniculata* (i, ii, e iv) exceto quando associadas aos machos (iii e v). Já os machos foram atraídos somente por voláteis provindos de fêmeas (ii e vi). Estes resultados sugerem que os voláteis da planta de murta *M. paniculata* ou mesmo um possível atraente sexual possam estar envolvidos na atratividade distinta entre machos e fêmeas de *D. citri*.

Palavras-chave: Respostas olfativas; voláteis de plantas; atração; *Diaphorina citri*; *Murraya paniculata*

Abstract

In the last years worldwide citriculture have been suffering severe economic losses due to the disease ‘Huanglongbing’ or HLB, caused by the bacteria *Candidatus Liberibacter* spp., which are transmitted by the psyllid *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). Besides citrus, jasmine plant *Murraya paniculata* (L.) Jack (Rutaceae) is mentioned to be a preferential host of all *D. citri* stages. For this reason, it was investigated the hypothesis that volatiles released by this plant could play a role in attraction and in the sexual partner encounter of *D. citri*. Thus, the effects of volatiles released from *M. paniculata* induced and non-induced plants as well as from conspecifics to the adults of *D. citri* were assessed in the laboratory using a Y-tube olfactometer arms and under controlled air flow (400 mL.min⁻¹). The treatments consisted of volatiles released by: (i) Healthy plants; (ii) healthy plants + 20

females; (iii) healthy plants + 20 males; (iv) induced plants during 24 hours with 20 females; (v) induced plants during 24 hours with 20 males; (vi) 20 females; (vii) 20 males; and (viii) clean air (control). Each treatment was compared with the control, and subsequently, the ones that statistically differed from the control were compared between them. Males and females were tested individually to each treatment, comprising 20 replicates. The bioassays were performed during photophase at 25°C and relative humidity 70%. The results were analyzed through chi-square test ($P \leq 0,05$). Males and females responded distinctly. The females were attracted to the treatments containing volatiles of jasmine plant *M. paniculata* (i, ii, e iv) except when they were associated with males (iii e v). In other hand, males were attracted just to volatiles from females (ii e vi). These results suggest that volatiles from jasmine plant *M. paniculata*, or even a possible sexual attractant, can be involved in the differential attractiveness between males and females of *D. citri*.

Keywords: Olfactory responses; plant volatiles; attraction; *Diaphorina citri*; *Murraya paniculata*

2.1 Introdução

O interesse por estudos com voláteis de plantas e seu efeito sobre o comportamento dos insetos tem aumentado nas últimas décadas. A maioria destes trabalhos envolve as defesas induzidas nas plantas por insetos fitófagos e sua resposta sobre os inimigos naturais (DE MORAES et al., 1998; DICKE; LOON, 2000).

Nos insetos sugadores, os poucos estudos conduzidos com aqueles do grupo dos psilídeos (Psyllidae), demonstraram que a indução de plantas hospedeiras foi semelhante aos obtidos para os fitófagos quanto à atração de inimigos naturais (SCUTAREANU et al., 1997; DRUKKER; BRUIN; SABELIS, 2000; MEHNEJAD; COPLAND, 2006).

Contudo, alguns outros poucos trabalhos sugerem que as plantas hospedeiras induzidas pelos psilídeos poderiam produzir voláteis que favoreceriam o encontro sexual desses insetos (REDDY; GUERRERO, 2004; SOROKER et al., 2004). Além disso, Wenninger et al. (2008) demonstraram que as fêmeas de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) atraem os machos para o acasalamento, o que indicaria a possibilidade de um complexo mecanismo envolvendo o comportamento sexual nesta espécie.

Assim, este capítulo visou investigar o efeito dos voláteis da planta hospedeira murta *Murraya paniculata* (L.) Jack., induzidas ou não, sobre os adultos do psilídeo *D. citri*, e desses aos seus coespecíficos.

2.2 Material e métodos

Obtenção dos insetos e plantas

Os exemplares de *D. citri* foram obtidos inicialmente a partir de uma criação previamente estabelecida no Laboratório de Biologia de Insetos da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ) e outra do Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus), ambas provenientes de pomares comerciais do interior do Estado de São Paulo – Itapetininga e Botucatu no caso da ESALQ e Santa Fé do Sul para o Fundecitrus. A partir daí uma nova criação foi estabelecida em sala com $25\pm 1^\circ\text{C}$, $70\pm 10\%$ UR e fotofase de 14 horas, seguindo a metodologia modificada de Skelley e Hoy (2004).

Para os biensaos envolvendo a atividade sexual de *D. citri*, plantas de murta, *M. paniculata* foram mantidas em casa-de-vegetação, onde receberam podas, adubação, tratamento fitossanitário, transplante, etc. Após um período entre 8 a 15 dias, as plantas com brotações foram separadas e transferidas para gaiolas de acrílico (60 x 60 x 50 cm) (Figuras 2.1A e B). Os adultos recém emergidos foram separados por sexo e agrupados em gaiolas feitas com garrafas de politereftalato de etileno (PET) de 4L, contendo uma planta de *M. paniculata* (Figura 2.1C). Nestas gaiolas foram mantidos adultos de *D. citri* destinados à reprodução (Figuras 2.2A e B). Após um período máximo de sete dias, as plantas com posturas de *D. citri* foram novamente separadas e armazenadas em gaiolas como as descritas anteriormente, para o desenvolvimento ninfal (Figura 2.2C).

Em estudos prévios foi estabelecido um método de individualização dos psílídeos em gaiolinhas (Figura 2.3A). Essas gaiolinhas foram utilizadas sobre as folhas das plantas, aprisionando ninfas de 5º instar até que elas atingissem a fase adulta, evitando assim, qualquer contato entre adultos recém emergidos (Figura 2.3B). As gaiolinhas foram confeccionadas com duas peças de silicone de 0,5cm de diâmetro e 1,0 cm de altura cada peça, recoberta com tela de ‘voile’ para evitar a fuga dos insetos. Estas gaiolinha foram presas nas folhas com o auxílio de um grampo metálico, que quando justapostos formaram o espaço disponível para a permanência do inseto, sem, no entanto, interferir com seu comportamento (Figura 2.3C). Para evitar que as peças de silicone ferassem as plantas, foi colado na borda das mesmas, uma espuma plástica.

Para a padronização da idade dos psilídeos nas faixas etárias adequadas aos bioensaios, os insetos recém emergidos foram separados nas gaiolinhas de desenvolvimento ninfal. Deste modo, nas épocas de realização dos bioensaios, todos os adultos foram coletados diariamente, permanecendo na gaiola, apenas as ninfas.

Imediatamente após cada coleta de adultos, os indivíduos foram separados por sexo e agrupados em gaiolas específicas para machos ou fêmeas com idade conhecida. A separação dos sexos foi realizada em estereomicroscópio com aumento de seis vezes, por meio da visualização da porção final do abdome dos psilídeos em vista ventral, distinguindo-se o aparelho reprodutor de cada sexo como demonstrado por Aubert (1987).



Figura 2.1 - Criação de *Diaphorina citri* em laboratório: (A) Gaiolas de acrílico destinadas à reprodução e desenvolvimento ninfal (60 x 60 x 50 cm); (B) detalhes do interior das gaiolas com mudas de *Murraya paniculata*; e (C) gaiolas alternativas para a manutenção dos adultos de psilídeos destinados aos bioensaios

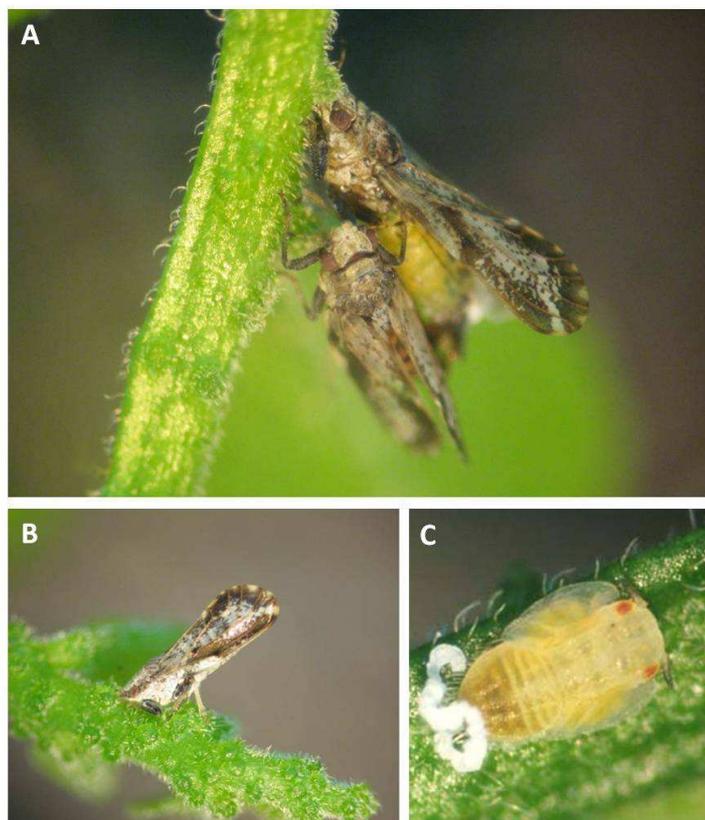


Figura 2.2 - Fases do desenvolvimento de *Diaphorina citri*: (A) Casal em cópula; (B) adulto em brotação de *Murraya paniculata*; e (C) ninfa num ramo de *M. paniculata*

Para os bioensaios envolvendo olfatometria, a criação de *D. citri* foi realizada em plantas de *Citrus limonia* (L.) Osbeck, com 25 a 30 cm de altura, cultivadas em ‘tubetes’ plásticos de 20 cm de altura por 1,5 cm de diâmetro, contendo substrato formulado com vermiculita mais composto vegetal (1:1). As plantas foram constantemente podadas para estimular a produção de brotações visando favorecer a alimentação e oviposição dos insetos (AUBERT, 1987; TSAI; LIU, 2000). No momento dos bioensaios as plantas foram transferidas para o laboratório. Para evitar um possível condicionamento de *D. citri* à planta *M. paniculata*, a criação deste inseto foi realizada exclusivamente em plantas de *C. limonia* (limão-cravo) ou *Citrus sinensis* (L.) Osbeck variedade Pêra.

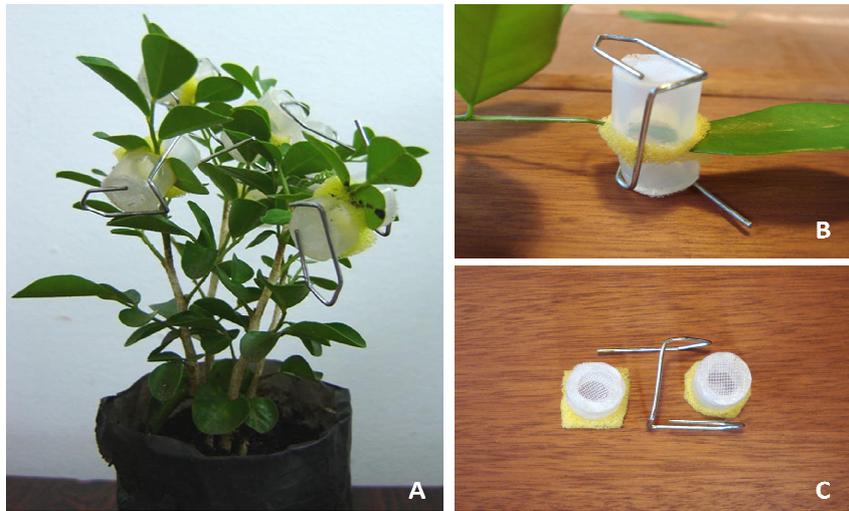


Figura 2.3 - Gaiolas de individualização do psíldeo *Diaphorina citri*: (A) Plantas de *Murraya paniculata* com ninfas de *D. citri* individualizadas; (B) detalhe de um ramo de *M. paniculata* com uma gaiola; (C) gaiola desmontada composta por dois compartimentos e um grampo

Determinação da atividade sexual de *Diaphorina citri*

Com o objetivo de conhecer os horários e idades de maior atividade sexual em *D. citri*, os adultos foram inicialmente individualizados e o sexo determinado em tubos de ensaio de 1 x 7cm (Figuras 2.4A e B) conforme descrito anteriormente. Os casais com idades conhecidas foram dispostos em gaiolas de vidro de 42 mL contendo um ramo da planta hospedeira murta, *M. paniculata* (Figura 2.4C). Os casais foram classificados por faixas de idade em sete categorias, sendo: (i) 0-1; (ii) 1-2; (iii) 2-3; (iv) 3-4; (v) 4-5; (vi) 5-6; e (vii) 6-7 dias após a emergência. Cada faixa de idade foi observado durante 15 minutos a cada 45 minutos, num ciclo de 24 horas. Todas as observações foram realizadas ao longo de 24 horas em condições de laboratório, com $25 \pm 1^\circ\text{C}$, UR $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo 12:12 (luz: escuro) – iniciando-se as 6:00 e finalizando as 18:00h. Foram observados 30 casais por idade, totalizando 210 casais (Figura 2.4D).

O horário de início dos experimentos foi sempre às 12:00 horas visando permitir preservar as observações durante a inversão luminosa ('entardecer e amanhecer'). Nas condições de escotofase, as observações foram conduzidas com lâmpadas de luz vermelha monocromática, para não influenciar o comportamento dos insetos (COMMON, 1964 apud SILVEIRA NETO et al., 1976).

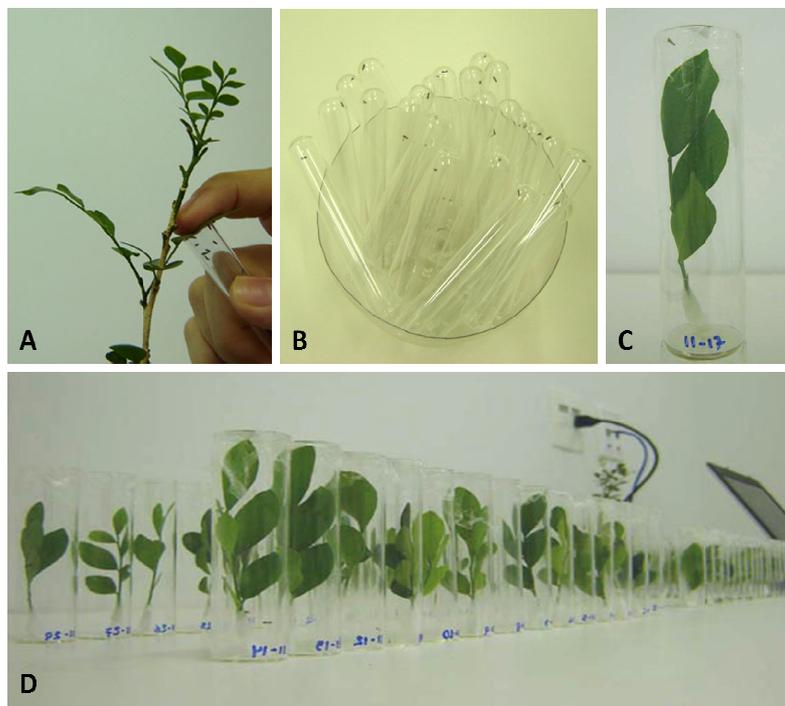


Figura 2.4 - Bioensaios com observação dos adultos de *Diaphorina citri* de diferentes idades 0-1, 1-2, 2-3, 3-4, 4-5, 5-6, e 6-7 dias após a emergência por 24 horas: (A) Coleta dos adultos recém emergidos; (B) individualização dos machos e fêmeas em tubos de ensaio; (C) gaiola de vidro de 42mL (em detalhe) contendo um ramo da planta hospedeira *M. paniculata* e um casal de *D. citri*; (D) gaiolas de vidro dispostas numa bancada para as observações do comportamento sexual de *D. citri*

Bioensaios de olfatometria

Para verificar o efeito dos voláteis da planta *M. paniculata* sobre o comportamento de *D. citri* e/ou seus coespecíficos foi utilizado um olfatômetro ‘Y’ constituído de um tubo principal e dois tubos laterais de vidro (15 x 3 cm) formando um ângulo de 120° (Figura 2.5A), aos quais foram conectadas câmaras contendo os tratamentos a serem testados (Figura 2.5B). O fluxo de ar foi gerado por uma bomba de vácuo (Figura 2.5C) conectada ao olfatômetro, que permitiu a passagem do ar pelos tubos laterais e a chegada dos odores ao tubo principal. O fluxo utilizado foi de 400 mL.min⁻¹, controlado por fluxômetros (Figura 2.5D) dispostos nas extremidades da entrada de ar. Todas as conexões entre o olfatômetro e as câmaras contendo os tratamentos foram feitas com PTFE (Teflon®), e o ar presente no sistema foi inicialmente

filtrado por um carvão ativado (Figura 2.5E) e umidificado (Figura 2.5F), sendo ao final desumidificado em sílica gel (Figura 2.5G) e eliminado para uma área externa à sala de bioensaios. Em cada braço do olfatômetro foi disponibilizado um campo de odor, possibilitando assim a livre escolha dos psilídeos em relação aos tratamentos.

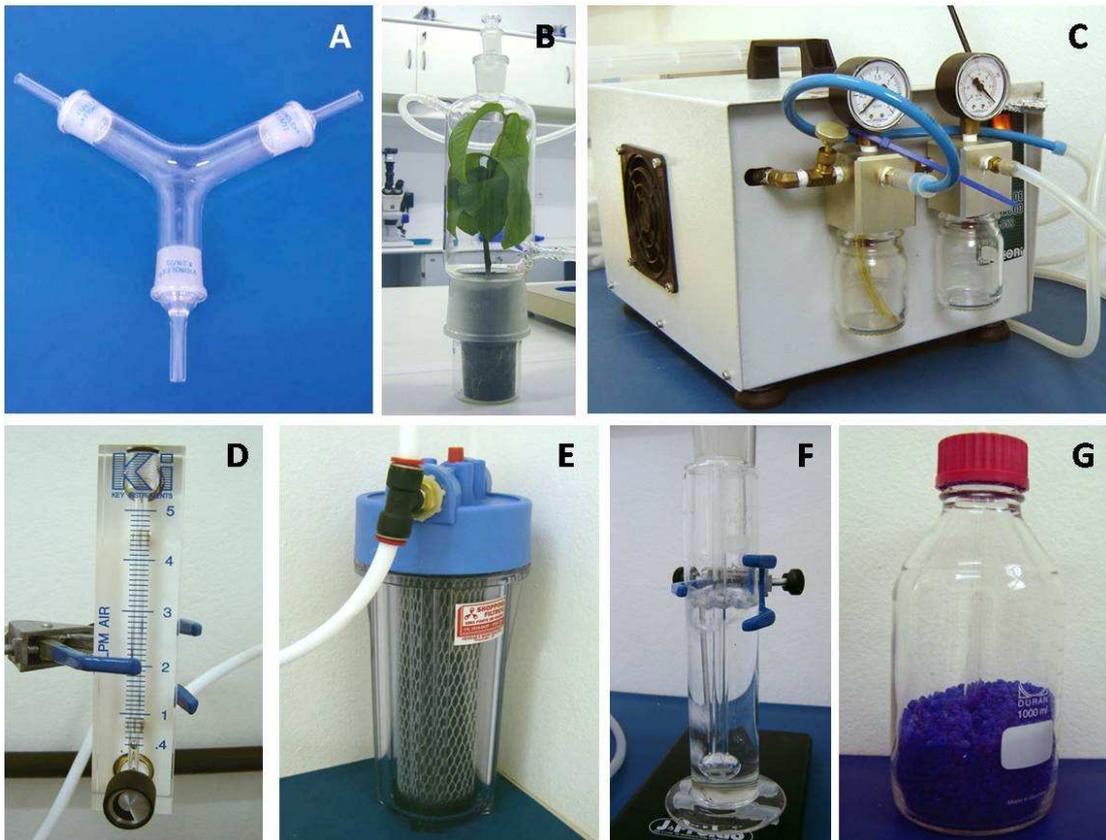


Figura 2.5 - Equipamentos utilizados no sistema de olfatometria: (A) Bomba de vácuo; (B) filtro de carvão ativado; (C) fluxômetro; (D) umidificador; (E) câmara de coleta de voláteis de plantas; (F) tubo “Y”(arena); (G) desumidificador com grânulos de sílica

Bioensaios de olfatometria- Etapa 1

Visando-se conhecer as respostas olfativas de *D. citri* aos estímulos das plantas de murta *M. paniculata*, e/ou seus coespecíficos, machos ou fêmeas, com 3 a 7 dias de idade foram expostos em grupos de 10 indivíduos simultaneamente no olfatômetro ‘Y’ aos voláteis dos seguintes tratamentos: (i) Planta sadia (ou seja, sem a presença de *D. citri*); (ii) planta

sadia + 20 fêmeas; (iii) planta sadia + 20 machos; (iv) 20 fêmeas; (v) 20 machos; e (vi) ar limpo (controle). Nos tratamentos (ii) e (iii) as plantas de murta foram oferecidas em conjunto com os psílídeos, porém sem o contato direto entre eles, por meio de um tecido de ‘voile’ durante os bioensaios (plantas sem indução). Foram realizadas 20 repetições para cada tratamento.

As respostas comportamentais de *D. citri* foram registradas em três diferentes tempos (5, 10 e 15 minutos), contados a partir início de cada bioensaio, conforme a metodologia proposta por Soroker et al. (2004).

A cada repetição o olfatômetro foi girado em 180° para evitar um possível condicionamento dos insetos em relação ao ambiente. Do mesmo modo, após cada bioensaio, tanto o olfatômetro quanto os tubos laterais e cubas de vidro foram lavados com detergente neutro, e, secos em estufa a 120° C por 60 minutos. Todos os bioensaios foram realizados em sala com $25 \pm 1^\circ \text{C}$ e $70 \pm 10\%$ UR, das 14 e 16h, e os insetos descartados após cada repetição.

Bioensaios de olfatometria- Etapa 2

Nesta etapa machos e fêmeas de *D. citri* com 3 a 7 dias de idade foram expostos individualmente no olfatômetro ‘Y’ contendo os voláteis da planta de murta *M. paniculata* (induzidas ou não) e/ou seus coespecíficos nos seguintes tratamentos: (i) Planta sadia (ou seja, sem a presença de *D. citri*); (ii) planta sadia + 20 fêmeas; (iii) planta sadia + 20 machos; (iv) plantas induzidas durante 24 horas por 20 fêmeas; (v) plantas induzidas durante 24 horas por 20 machos; (vi) 20 fêmeas; (vii) 20 machos; e (viii) ar limpo (controle). Nos tratamentos (ii) e (iii) as plantas de murta foram oferecidas em conjunto com os psílídeos, porém sem o contato direto entre eles, por meio de um tecido de ‘voile’ durante os bioensaios (plantas sem indução). Quanto aos tratamentos (iv) e (v) envolvendo indução das plantas, os psílídeos tiveram acesso livre a estas num período compreendido por 24 horas para alimentação antes dos bioensaios.

Pelo fato do olfatômetro ‘Y’ ser um sistema que permite apenas a comparação entre dois odores por vez, a princípio, todos os tratamentos foram confrontados com o controle (ar limpo). Numa etapa posterior, os tratamentos que diferiram do controle, foram confrontados entre si (dois a dois), até completar todas as combinações possíveis.

Com base em testes preliminares o período de tempo de 10 minutos foi estabelecido para a resposta dos psilídeos. A escolha se deu quando cada indivíduo cruzou uma linha demarcada na porção final do tubo, denominada linha de escolha (*le*), situada a 3 cm da conexão final do tubo (Figura 2.6A). Tanto os machos quanto as fêmeas de *D. citri* foram introduzidos individualmente no braço principal do tubo ‘Y’ (Figura 2.6B) e observados durante o tempo pré-estabelecido.

Foram realizadas 20 repetições para cada sexo. A cada repetição o olfatômetro girado em 180° para evitar um possível condicionamento dos insetos em relação ao ambiente. Após cada bioensaio, tanto o olfatômetro quanto os tubos laterais e cubas de vidro foram lavados com detergente neutro, e, secos em estufa a 120° C por 60 minutos. Os bioensaios foram realizados em sala com $25 \pm 1^\circ \text{C}$ e $70 \pm 10\% \text{UR}$, das 14 e 16h, e os insetos descartados após cada repetição.

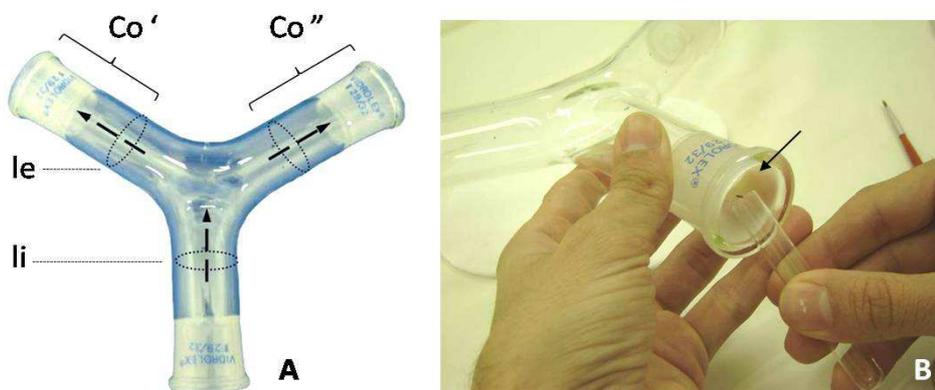


Figura 2.6 - Arena do olfatômetro ‘Y’: (A) Marcações utilizadas nos bioensaios, (*Co*) campos de odor, (*le*) linha de escolha dos tratamentos, (*li*) linha inicial do bioensaio. As setas indicam a direção de caminhamo dos insetos na arena; (B) introdução de *Diaphorina citri* no braço principal da arena. A seta indica o psilídeo sendo liberado no tubo ‘Y’

Análise dos dados

Os dados referentes ao número de casais em cópula por idade foram analisados pelo teste ‘G’ ($P \leq 0,05$). Os dados obtidos para cópulas totais e por casal, para as diferentes idades foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn ($P \leq 0,05$). Os

dados referentes aos casais em função dos horários onde houve cópulas foram analisados pelo teste 'G' ($P \leq 0,05$).

Os dados referentes aos bioensaios de olfatométrica Etapas 1 e 2 foram analisados pelo teste 't' pareado ($P \leq 0,05$) e Qui-quadrado (χ^2) ($P \leq 0,05$), respectivamente.

2.3 Resultados e discussão

Determinação da atividade sexual de *Diaphorina citri*

A partir das observações da atividade sexual de *D. citri*, foi possível estabelecer a frequência e idade de início das cópulas, bem como o número médio de cópulas por casal para as diferentes idades, e os horários em que elas mais ocorreram.

Casais com até dois dias e a partir do sexto dia após a emergência não copularam. A maior frequência de cópulas ocorreu com casais entre 2-3 dias (64%), que coincidiu com o início da atividade sexual nesta espécie, como já demonstrado por Wenninger e Hall (2007). A ausência de cópulas no primeiro dia de vida em *D. citri*, de acordo com estes mesmos autores, poderia estar relacionada a uma não completa esclerotização dos órgãos reprodutivos. Isso implicaria na dificuldade da fêmea em receber os espermatóforos dos machos, ou que ainda não teriam quantidades de gametas estocados suficientes para serem transferidos às fêmeas. Para os demais casais com idades de 3-4, 4-5 e 5-6 dias, a frequência de cópulas foi de 18, 9 e 9% sobre o total de cópulas observado, respectivamente (Tabela 2.1).

As cópulas em *D. citri* ocorreram somente na fotofase entre às 10:00 e 18:00h, não havendo uma preferência dos insetos neste período ($P=0,541$). Na escotofase, os casais apresentaram pouca movimentação, sendo estes resultados semelhantes aos obtidos anteriormente por Wenninger e Hall (2007). Esses autores atribuíram a restrição da atividade noturna de *D. citri*, às baixas temperaturas ocorridas durante os experimentos, porém, mesmo com a temperatura mantida por volta dos 24°C (neste estudo), a atividade dos psílídeos foi reduzida na ausência de luz, sugerindo que a luminosidade pode ser tão importante quanto à temperatura no comportamento de *D. citri*.

Aparentemente, os dados de cópulas em *D. citri* sugerem a princípio, que a população utilizada nestes bioensaios, provenientes de plantações do interior do Estado de São Paulo

(vide Material e Métodos), apresentam baixa incidência de acasalamentos, assim como observado, porém não quantificado por Wenninger e Hall (2007) em duas épocas distintas do ano em populações desta espécie na Flórida-EUA. Contudo, vale ressaltar que algumas destas fêmeas foram capazes de realizar novas cópulas, o que de acordo com os dados obtidos Wenninger e Hall (2008) poderiam aumentar a capacidade reprodutiva das fêmeas, muito embora, curiosamente, a presença e assédio constante dos machos, junto às fêmeas, acabaram por suprimir sua oviposição.

Nos casais com 2-3 dias de idade foi também onde ocorreu o maior número de recópulas, representando 80% destas, com 3 cópulas em média por casal (Tabela 2.1).

Uma ressalva importante é que as observações realizadas neste estudo foram quantificadas durante 15 min. a cada hora do dia, o que não descarta a hipótese de que outras cópulas tenham ocorrido fora destes intervalos, muito embora, a duração das cópulas neste psilídeo é de $48,3 \pm 8,4$ min. em média segundo Wenninger e Hall (2007). Contudo, a incidência de acasalamentos em *D. citri* aparenta ser baixa, e parece estar relacionado às características intrínsecas da espécie, o que necessita ser melhor investigado.

Tabela 2.1 – Número de casais em cópula, totais de cópulas e média de cópulas por casal de *Diaphorina citri* em diferentes idades em ramos da planta murta, *Murraya paniculata* (n=30/idade)

	Idade dos psilídeos <i>Diaphorina citri</i>							Total
	0-1	1-2	2-3	3-4	4-5	5-6	6-7	
Casais em cópula ¹	0	0	7(64%)a	2(18%)b	1(9%)b	1(9%)b	0	11(100%)
Totais de cópulas ²	0	0	21(80%)a	3(12%)b	1(4%)b	1(4%)b	0	26 (100%)
Cópulas por casal ³	0	0	3a	1,5b	1b	1b	0	-

Notas: ¹ Valores seguidos de mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste 'G' ($P \leq 0,05$).

² Valores seguidos de mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn ($P \leq 0,05$).

³ Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn ($P \leq 0,05$).

Bioensaios de olfatométrica- Etapa 1

Grupos de machos e fêmeas de *D. citri* responderam de forma distinta aos voláteis da planta de murta, *M. paniculata* e de seus coespecíficos. Os machos não apresentaram interesse

pelos voláteis da planta hospedeira *M. paniculata*, tampouco aos odores de outros machos (Figura 2.7A e B); no entanto, responderam contundentemente aos estímulos promovidos pelas fêmeas (Figura 2.7C), e de plantas de murta + fêmeas (Figura 2.7D).

As fêmeas, por sua vez, foram atraídas somente aos voláteis da planta hospedeira *M. paniculata* (Figura 2.8B). Quando os odores de machos e plantas de murta foram oferecidos em conjunto, as fêmeas não foram atraídas (Figura 2.8D).

Por exclusão, os resultados sugerem que os machos foram atraídos somente por fêmeas, uma vez que o tratamento contendo somente os voláteis das plantas de *M. paniculata* não exerceu influência sobre seu comportamento. Com isso, nota-se que plantas sadias de murta, sem presença de fêmeas não atraíram machos de *D. citri*. Aparentemente, somente as fêmeas seriam atraídas por estas plantas; e elas, possivelmente, atrairiam os machos ao seu encontro na planta, assim como já demonstrado também por Wenninger e Hall (2007). Todavia, neste último caso, tanto Wenninger e Hall (2007) quanto o estudo atual os dados não permitiram concluir se tratar de um feromônio sexual o fator responsável pela atração entre os sexos em *D. citri*. Apesar disso, particularmente durante os bioensaios em que foram oferecidos os voláteis de fêmeas aos machos, estes por várias ocasiões tentaram copular entre si, sugerindo fortemente a existência de um feromônio sexual nesta espécie.

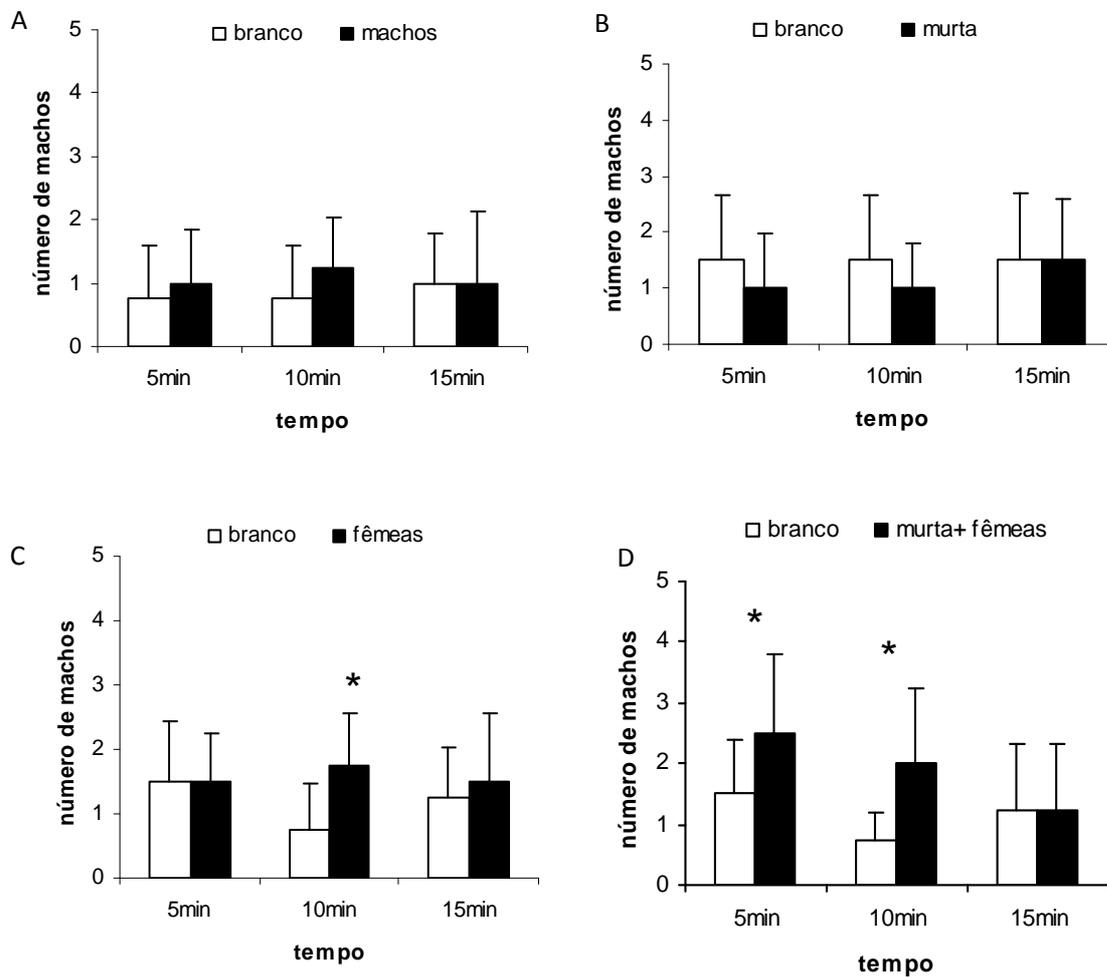


Figura 2.7 - Respostas dos machos de *Diaphorina cirti* aos voláteis de *Murraya paniculata* e insetos coespecíficos de ambos os sexos aos 5, 10 e 15min. do início dos bioensaios: (A) Proporção de respostas aos machos; (B) proporção de respostas à *M. paniculata*; (C) proporção de respostas às fêmeas; (D) proporção de respostas à *M. paniculata* + machos. (*) Indica diferença significativa entre tratamentos pelo Teste 't' pareado ($P \leq 0,05$)

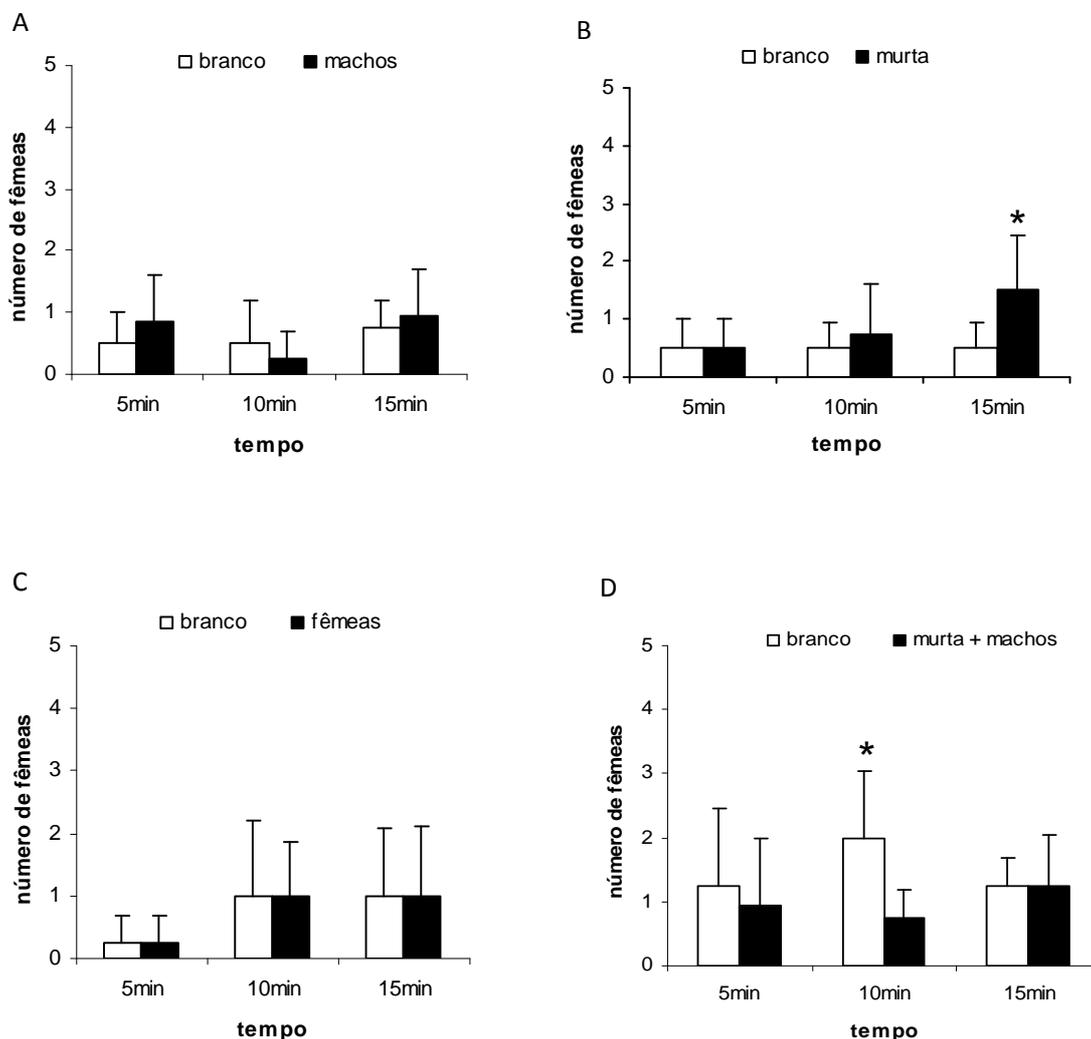


Figura 2.8 - Respostas das fêmeas de *Diaphorina citri* aos voláteis de *Murraya paniculata* e coespecíficos de ambos os sexos aos 5, 10 e 15min. do início dos bioensaios: (A) Proporção de respostas aos machos; (B) proporção de respostas à *M. paniculata*; (C) proporção de respostas às fêmeas; (D) proporção de respostas à *M. paniculata* + machos. (*) Indica diferença significativa entre tratamentos pelo Teste 't' pareado ($P \leq 0,05$)

Bioensaios de olfatosmetria- Etapa 2

Nesta etapa foi possível avaliar individualmente a resposta olfativa de machos e fêmeas do psíldeo *D. citri* aos voláteis de plantas de murta *M. paniculata* sadias e/ou induzidas pelos psíldeos (machos e fêmeas); plantas de murta em conjunto com coespecíficos

(machos ou fêmeas), porém sem entrarem em contato evitando uma possível indução; e aos seus coespecíficos (machos e fêmeas).

Como demonstrado na Etapa 1, ficou evidente que os machos foram atraídos somente por fêmeas, em detrimento aos voláteis da planta hospedeira *M. paniculata* e de outros machos (Figura 2.9). Embora os machos tenham respondido a planta de murta + fêmea, quando esta foi esteve sozinha, na ausência de fêmeas, não houve atração, sugerindo se tratar somente de uma resposta às fêmeas. Além disso, os machos também não demonstraram interesse por voláteis de plantas de murta induzidas por machos ou fêmeas.

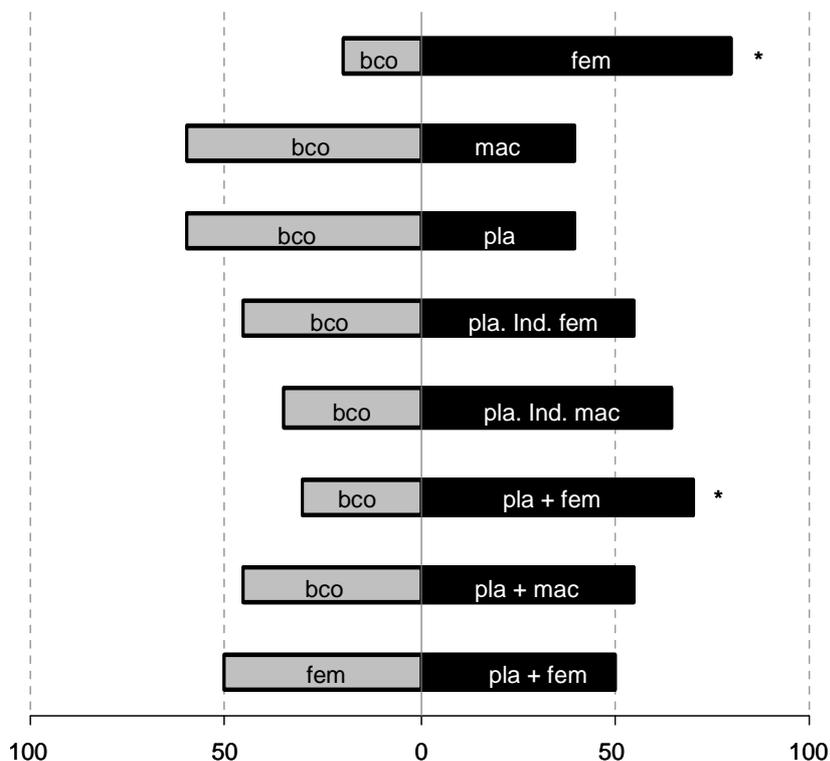


Figura 2.9 - Porcentagem do número de respostas de machos adultos de *Diaphorina citri* aos diferentes odores oferecidos em olfatômetro 'Y'. (*) Indica diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Qui-quadrado (χ^2) ($P \leq 0,05$). Tratamentos: branco (*bco*), machos (*mac*), fêmeas (*fem*), planta de *Murraya paniculata* (*pla*), indução por 24h (*Ind*)

Para fêmeas do psilídeo *D. citri*, constatou-se que os voláteis da planta hospedeira murta, *M. paniculata* sadias ou induzidas por outras fêmeas foram decisivas no

desencadeamento de atração nesta espécie (Figura 2.10). Ficou claro que as plantas de murta tornaram-se não atrativas quando associadas aos machos. Além disso, as fêmeas não responderam aos tratamentos contendo plantas de murta induzidas por machos ou pelos próprios machos.

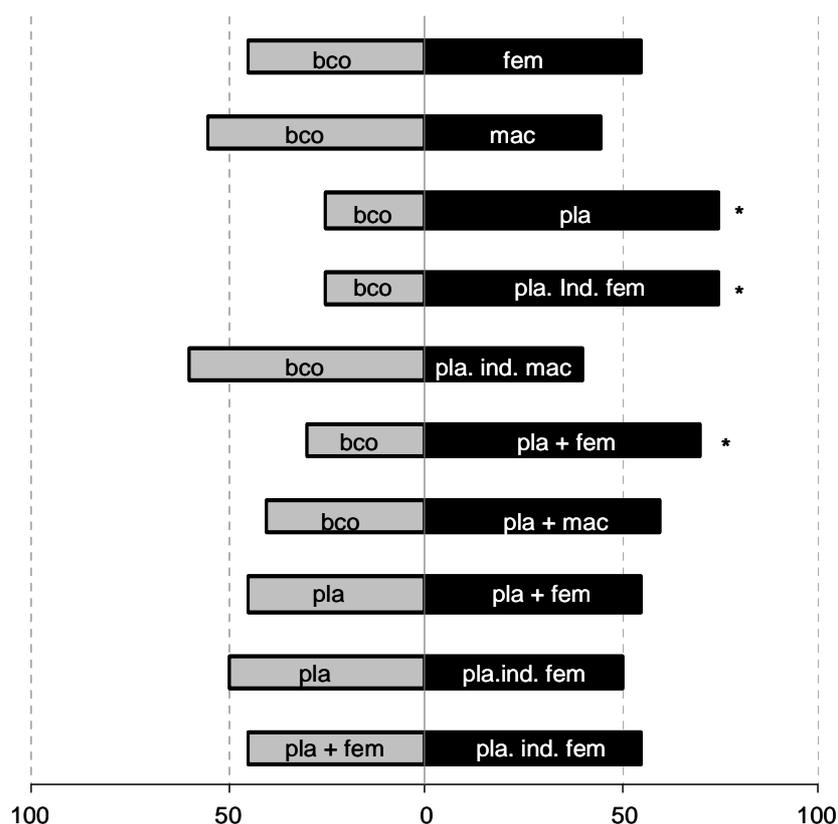


Figura 2.10 - Porcentagem do número de respostas de fêmeas adultas de *Diaphorina citri* aos diferentes odores oferecidos em olfatômetro 'Y'. (*) Indica diferença significativa entre os tratamentos pelo teste Qui-quadrado (χ^2) ($P \leq 0,05$). Tratamentos: branco (*bco*), machos (*mac*), fêmeas (*fem*), planta (*pla*), e indução (*ind*)

Quando as fêmeas foram submetidas ao confronto entre os tratamentos contendo plantas de murta sadias versus induzidas por fêmeas – ambas atrativas isoladamente – não houve diferença na resposta. Isso, aparentemente anulou a resposta das fêmeas, sugerindo que ambas as plantas são capazes de atrair as fêmeas. Contudo, somente uma análise química dos voláteis (*em andamento*) dessas plantas e um bioensaio destes compostos poderá esclarecer o

mecanismo de atração envolvido neste processo. Resta saber, por exemplo, se os compostos liberados pelas plantas induzidas por fêmeas, modificam seu leque de compostos químicos ou se mesmo induzidas essas plantas continuam liberando aquele(s) composto(s) atrativos.

Uma dinâmica das respostas olfativas do psilídeo *D. citri* aos voláteis da planta hospedeira murta, *M. paniculata*, bem como o modelo de atração sexual nesta espécie foi representado na Figura 2.11.

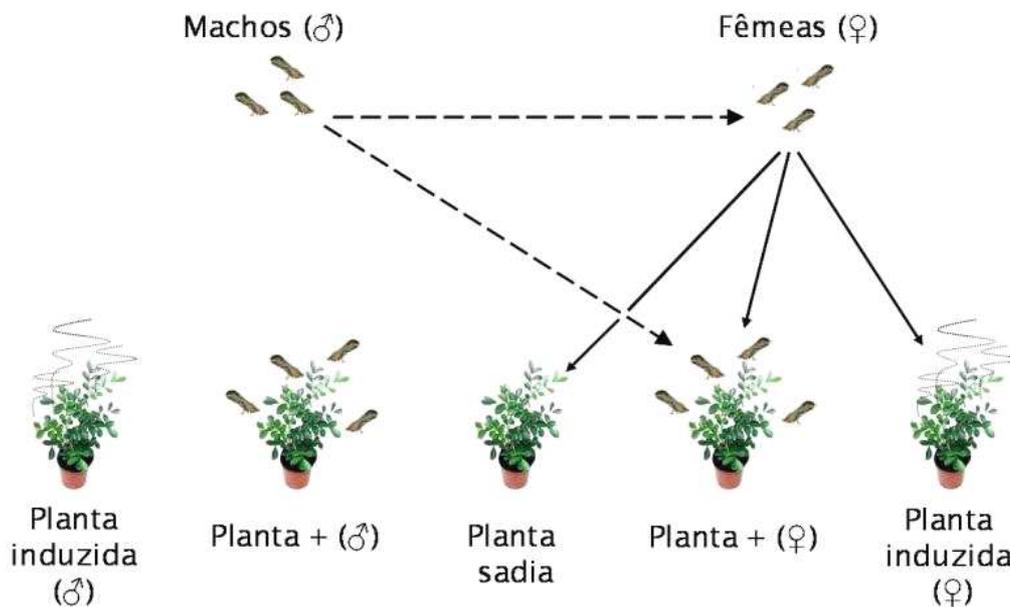


Figura 2.11 - Ilustração representando as respostas olfativas dos machos e das fêmeas de *Diaphorina citri* aos odores da planta murta *Murraya paniculata* sadia ou induzida e aos coespecíficos, em diferentes combinações. As linhas pontilhadas representam as respostas dos machos, enquanto que as linhas cheias, as respostas das fêmeas

O encontro de um parceiro sexual em muitos grupos de insetos parece estar intrinsecamente relacionado às influências químicas das plantas hospedeiras (REDDY; GUERRERO, 2004). Além disso, as plantas hospedeiras além de fornecerem nutrientes essenciais para o desenvolvimento e reprodução dos insetos, liberam uma gama de voláteis químicos que auxiliam na sua localização. Neste sentido, um hábito interessante dos insetos sugares, como os psilídeos, é sua preferência por brotações, que sabidamente por apresentarem inúmeras folhas novas, liberaram quantidades consideráveis de voláteis (KARBAN; BALDWIN, 1997). Com isso, estes insetos estabeleceram uma relação de dependência com as

novas brotações para suprir suas necessidades nutricionais e de sua prole, além favorecer a ocorrência de acasalamentos como já observado para *D. citri* (AUBERT, 1987; LIU; TSAI, 2000; TSAI; LIU, 2000; HALL; ALBRIGO, 2007).

Dentre os psílídeos, Soroker et al. (2004) demonstraram que as fêmeas de *Cacopsylla bidens* Šulc (Hemiptera: Psyllidae) foram atraídas pelos voláteis de plantas novas sadias – não induzidas – de pêra, *Pyrus* sp. (Rosaceae), e estas por sua vez foram capazes de atrair os machos por meio de um feromônio sexual. Posteriormente, Horton e Landolt (2007), Guedot, Horton e Landolt (2008), e Horton, Guedot e Landolt (2008), trabalhando com a mesma espécie em pêra, demonstraram por meio de diferentes experimentos que ramos infestados ou previamente infestados ('possivelmente induzidos') por fêmeas atraíram os machos. Resultados semelhantes foram observados neste estudo para a atração dos machos de *D. citri* quanto pela planta hospedeira de murta, *M. paniculata* sadia (sem indução) ou induzida por fêmeas.

3.4 Considerações finais

As evidências encontradas neste capítulo demonstram que machos e fêmeas de *D. citri* respondem diferentemente aos mesmos estímulos olfativos, abrindo novas perspectivas para o entendimento do comportamento sexual dessa espécie. As fêmeas foram atraídas por voláteis da planta hospedeira murta, *M. paniculata* sadias (sem indução) ou induzidas, assim como estas foram capazes de atrair os machos. Desse modo, uma provável descoberta do(s) composto(s) químico(s) envolvidos nestes processos poderão ser úteis para o manejo deste psílídeo.

Referências

AUBERT, B. Le psylle asiatique des agrumes (*Diaphorina citri*) Kuwayama au Brésil. **Fruits**, Saint Pierre, v. 42, p. 225- 229, 1987.

BOVÉ, J.M. Huanglongbing: a destructive, newly- emerging, century-old disease of citrus. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 88, n. 1, p. 7-37, 2006.

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

DE MORAES, C.M., W.J. LEWIS, P.W. PARÉ, H.T. ALBORN, & J.H. TUMLINSON. Herbivore-infested plants selectively attract parasitoids. **Nature**, London, v. 393, p. 570- 573, 1998.

DICKE, M.; LOON, J.J.A. Van. Multitrophic effects of herbivore-induced plant volatiles in an evolutionary context: review. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 97, p. 237- 249, 2000.

DRUKKER, B.; BRUIN, J.; SABELIS, M.W. Anthocorid predators learn associate herbivore-induced plant volatiles with presence or absence of prey. **Physiological Entomology**, Oxford, v. 25, p. 260- 265, 2000.

HALL, D.G.; ALBRIGO, L.G. Estimating the relative abundance of flush shoots in citrus, with implications on monitoring insects associated with flush. **HortScience**, Alexandria, v. 42, p. 364-368, 2007.

GUÉDOT, C.; HORTON, D.R.; LANDOLT, P.J. Attraction of male winterform pear psylla to female-produced volatiles and to female extracts and evidence of mame-male repellency. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 130, p. 191-197, 2008.

HORTON, D.R.; GUÉDOT, C.; LANDOLT, P.J.. Attraction of male summerform pear psylla to volatiles from female pear psylla: effects of male age, mating status, and presence of host plant. **Canadian Entomologist**, Ottawa, v. 140, p. 181-191, 2008.

HORTON, D.R.; LANDOLT, P.J. Attraction of male pear psylla, *Cacopsylla pyricola*, to female-infested pear shoots. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 123, p. 177-183, 2007.

KARBAN, R.; BALDWIN, I.T. **Induce responses to herbivory**, Chicago: University of Chicago Press, 1997, 317p.

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

MEHRNEJAD, M.R.; COPLAND, M.J.W. Behavioral responses of the parasitoid *Psyllaephagus pistaciae* (Hymenoptera: Encyrtidae) to host plant volatiles and honeydew. **Entomological Science**, Tokyo, v. 9, p. 31- 37, 2006.

REDDY, G.V.P.; GUERRERO, A. Interactions of insect pheromones and plant semiochemicals. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 9, n. 5, p. 253-261, 2004.

- SCUTEREANU, P.; DRUKKER, B.; POSTHUMUS, M.A.; SABELIS, M.W. Volatiles from psylla infested pear trees and their possible involvement in attraction of anthocorid predators. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 23, p. 2241-2260, 1997.
- SILVEIRA NETO, S.; NAKANO, O.; BARBIN, D.; VILLA NOVA, N. A. **Manual de ecologia dos insetos**. 1976. Editora Agronômica Ceres, São Paulo, 419p.
- 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.
- SOROKER, V.; TALEBAEV, S.; HARARI, A.R.; WESLEY, S.D. The role of chemical cues and mate location in the pear psylla *Cacopsylla bidens* (Homoptera: Psyllidae). **Journal of Insect Behavior**, Berlin, v. 17, n. 5, p. 613-626, 2004.
- TSAI, J.H.; LIU, Y.H. Biology of *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) on four host plants. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v.93, p.1721-1725, 2000.
- WENNINGER, E.J.; HALL, D.G. Daily matting and age at reproductive maturity in *Diaphorina citri*. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 90, n. 4, p. 715-722, 2007.
- WENNINGER, E.; STELINSKI, L. L., HALL, D. Behavioral evidence for a female-produced sex attractant in *Diaphorina citri*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 128, p. 450- 459, 2008.

3 ESTUDOS PRELIMINARES DAS RESPOSTAS OLFATIVAS DE *Diaphorina citri* KUWAYAMA (HEMIPTERA: PSYLLIDAE) AOS VOLÁTEIS DE PLANTAS DE *Citrus sinensis* (L.) OSBECK (RUTACEAE) INFECTADAS POR *Candidatus Liberibacter asiaticus*

Resumo

O ‘Huanglongbing’ ou HLB é considerado a mais séria e devastadora doença dos citros da atualidade, tendo como agente causal as bactérias fastidiosas *Candidatus Liberibacter* spp., exclusivamente transmitidas pelo inseto sugador *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). Com o avanço do HLB nas principais regiões citrícolas do mundo, o manejo da doença, bem como do inseto vetor tem se tornado um grande desafio ao manejo fitossanitário dos citros. Assim, com o interesse de melhor conhecer as interações entre inseto-planta e bactéria, levantou-se a hipótese de que *D. citri* seria capaz de reconhecer os voláteis de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (Rutaceae) infectado por *Candidatus Liberibacter asiaticus*. Para tal, as respostas olfativas de *D. citri* foram mensuradas em olfatômetro ‘Y’. A presença de *Ca. L. asiaticus* nas plantas tratadas foi confirmada por técnicas de biologia molecular. Somente quando as plantas tornaram-se sintomáticas os experimentos foram iniciados. As plantas utilizadas nos ensaios foram *C. sinensis* variedade Pêra, enxertadas em *Citrus limonia* (L.) Osbeck (Rutaceae). Nesses estudos, machos e de fêmeas de *D. citri* foram expostos individualmente aos tratamentos: (i) Plantas saudáveis; (ii) plantas infectadas por *Ca. Liberibacter asiaticus*; e (iii) controle (ar limpo). A proporção de respostas de *D. citri* aos voláteis das plantas infectadas versus plantas saudáveis foi de 79 e 71% de repostas para machos e fêmeas, respectivamente, para as plantas infectadas (Qui-quadrado; $P \leq 0,05$). Os resultados fornecem indícios de que *D. citri* não somente foi capaz de distinguir, como também ser atraído por voláteis induzidos pela infecção da bactéria *Ca. L. asiaticus* em citros. Essas informações abrem novas perspectivas na busca por compostos atrativos à *D. citri*, que poderão ser empregados no manejo integrado de pragas dos citros.

Palavras-chave: Planta hospedeira; atração; Huanglungbing; *Diaphorina citri*; *Candidatus Liberibacter asiaticus*

Abstract

‘Huanglongbing’ or HLB is currently considered the most serious and devastator disease of citrus, having as causal agent the fastidious bacteria *Candidatus Liberibacter* spp., exclusively transmitted by the sucking insect *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). With the advance of the HLB in the main regions of citrus in world, the disease as well as the insect vector control have become a great challenge to citrus management. Thus, with the interest of better understand the insect-plant and bacteria interactions, it was raised the hypothesis that *D. citri* is able to recognize volatile compounds from infected *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (Rutaceae) by *Candidatus Liberibacter asiaticus*. To that, the olfactory responses of *D. citri* were measured in Y-tube olfactometer, allowing the free choice of psyllids to odor fields. The presence of *Ca. L. asiaticus* in treated plants was confirmed by

molecular biology techniques. Only when plants became symptomatic the experiments were started. The plants used in the tests were *C. sinensis* variety Pêra, grafted on *Citrus limonia* (L.) Osbeck (Rutaceae). In these studies, *D. citri* males and females were individually exposed to the following treatments: (i) Healthy plants, (ii) plants infected by *Ca. L. asiaticus*, and (iii) clean air. The proportion of choices of *D. citri* to volatiles from infected plants *versus* healthy plants was significant, with 79% of males responses, and 71% of females responses to infected plants (chi-square test, $P \leq 0.05$). The results provide evidence that *D. citri* is not only able to distinguish, but also is attracted to volatiles induced by infection of bacteria *Ca. L. asiaticus* in citrus. This information opens up new perspectives in the search for attractive compounds to *D. citri*, which may be employed in integrated pest management of citrus.

Keywords: Host plant; attraction; Huanglungbing; *Diaphorina citri*; *Candidatus Liberibacter asiaticus*

3.1 Introdução

O HLB é uma doença altamente destrutiva que ataca todas as espécies de citros cultivadas, e que se encontra amplamente distribuída pelo mundo (BOVÉ, 2006). A doença é conhecida há décadas no sudeste da Ásia e África, contudo no continente americano sua constatação é mais recente. No Brasil o primeiro registro do HLB foi no ano 2004, enquanto que nos Estados Unidos ocorreu em 2005 (COLETTA-FILHO et al., 2004; HALBERT, 2005; TEIXEIRA et al., 2005; SUTTON, 2005). No continente Americano onde estão os maiores produtores mundiais de citros, como Brasil e Estados Unidos, o HLB é considerado a mais grave doença desta cultura (GOTTWALD et al., 2007 apud BONANI et al., 2010).

O HLB é causado por um complexo de bactérias *Candidatus Liberibacter* spp. que tem como principal vetor o psílideo *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), transmissor de diferentes formas da doença (CAPOOR; RAO; VISWANATH, 1972 apud BONANI et al., 2010; YAMAMOTO et al., 2006). A espécie *D. citri* está presente no Brasil há pelo menos seis décadas (GOMES, 1940; COSTA-LIMA, 1942), sendo considerada até então praga secundária dos citros. Contudo, com a entrada das bactérias do HLB no país, *D. citri* tornou-se uma das mais importantes pragas da citricultura.

Apesar da severidade do HLB, os agentes causais *Candidatus Liberibacter asiaticus* e *Candidatus Liberibacter americanus* dependem da ação do psílideo *D. citri* para que sejam disseminados; que por sua vez, dependem das plantas dos gêneros *Citrus* e *Murraya* da família Rutaceae, como seus únicos conhecidos hospedeiros (HALBERT; MANJUNATH, 2004).

Essa restrição quanto ao vetor, bem como à planta hospedeira são aspectos importantes do ponto de vista evolutivo, com enormes implicações nos mecanismos de interação destes organismos.

Neste sentido, as bactérias *Ca. Liberibacter* spp. são tidas como capazes de promover alterações bioquímicas em seus hospedeiros, promovendo um acúmulo significativo de compostos secundários nas folhas (CEVALLOS-CEVALLOS; REYES-DE-CORCUERA, 2008; MANTHEY, 2008).

Dentre os psílídeos são ainda poucos os trabalhos que abordam as respostas comportamentais desses insetos aos voláteis de plantas induzidas por fitopatógenos. Para o psílídeo *Cacopsylla picta* (Syn. *Cacopsylla costalis* Flor) (Hemiptera: Psyllidae), Mayer et al. (2007; 2008) demonstraram que plantas de macieira, *Malus domestica* L. (Rosaceae) uma vez infectadas pelo fitoplasma *Candidatus* Phytoplasma mali, foram capazes de atrair um maior número de insetos comparadas às plantas sadias.

Este capítulo investiga a indução de voláteis em plantas de citros promovida pela bactéria *Ca. L. asiaticus*, causadora do HLB, e seu efeito sobre o comportamento de *D. citri*.

3.2 Material e métodos

Obtenção dos insetos

A criação de *D. citri* foi estabelecida a partir da obtenção de adultos provenientes do Laboratório de Biologia dos Insetos, ESALQ-USP mantidos a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa (UR) $70\pm 10\%$ e fotofase de 14 horas.

A técnica adaptada de Skelley e Hoy (2004) foi empregada para a manutenção das populações de *D. citri* em plantas de *C. limonia*, com 25 a 30 cm de altura, cultivadas em tubetes plásticos de 20 cm de altura por 1,5 cm de diâmetro, contendo substrato formulado com vermiculita mais composto vegetal (1:1). As plantas foram constantemente podadas para estimular a produção de brotações que são importantes para a alimentação e oviposição destes insetos (AUBERT, 1987).

As plantas foram mantidas em grades de metal com capacidade para 40 tubetes, e colocadas no interior de bandejas plásticas (34x23x7cm) contendo água e mantidas em

câmaras climatizadas ($25 \pm 1^\circ\text{C}$, $60 \pm 10\%$ UR e fotofase de 14 h) (CHAGAS et al., 2002). Após um período, entre 8 a 15 dias, as plantas que apresentaram brotações foram transferidas para gaiolas de acrílico (60x60x50 cm) contendo adultos de *D. citri* para a obtenção de ovos, por um período máximo de sete dias. Após esse período, as plantas contendo posturas foram então colocadas em gaiolas para o desenvolvimento dos insetos.

Obtenção das plantas

As plantas utilizadas nos bioensaios foram cedidas pelo Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus), sendo previamente inoculadas com borbulhas infectadas pela bactéria *Ca. L. asiaticus*. O sucesso desta inoculação foi confirmado por meio do uso de PCR ('Polymerase Chain Reaction') conforme o protocolo utilizado por Teixeira et al. (2005). Somente após as plantas tornarem-se sintomáticas (Figuras 3.1A, B e C) os experimentos foram iniciados. Considerando-se que os primeiros sintomas do HLB costumam surgir somente alguns meses após a aquisição das bactérias pelas plantas (BOVÉ, 2006), optou-se por plantas de médio porte, com altura de 100 ± 10 cm, para que estivessem viáveis no momento dos bioensaios (Figura 3.1D). As plantas utilizadas foram de *C. sinensis* variedade Pêra, com porta-enxerto de *C. limonia*.

Bioensaios

O estudo da atratividade de plantas de citros com HLB à *D. citri* foi realizado em um olfatômetro 'Y' constituído de um tubo principal e dois tubos laterais de vidro (15 x 3 cm) formando um ângulo de 120° (Figura 2.5A), aos quais foram conectadas câmaras contendo os tratamentos a serem testados (Figura 2.5B). O fluxo de ar foi gerado por uma bomba de vácuo (Figura 2.5C) conectada ao olfatômetro, que permitiu a passagem do ar pelos tubos laterais e a chegada dos odores ao tubo principal. O fluxo utilizado foi de $400 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, controlado por fluxômetros (Figura 2.5D) dispostos nas extremidades da entrada de ar. Todas as conexões entre o olfatômetro e as câmaras contendo os tratamentos foram feitas com PTFE (Teflon®), e o ar presente no sistema foi inicialmente filtrado por um carvão ativado (Figura 2.5E) e umidificado (Figura 2.5F), sendo ao final desumidificado em sílica gel (Figura 2.5G) e

eliminado para uma área externa à sala de bioensaios. Em cada braço do olfatômetro foi disponibilizado um campo de odor, possibilitando assim a livre escolha dos psílídeos em relação aos tratamentos.

Os bioensaios foram realizados durante o horário de maior atividade dos insetos (10 às 16h), utilizando-se adultos de 3 a 7 dias de idade. Para todos os bioensaios, foram liberados, individualmente, machos (n=38 a 46 repetições) e fêmeas (n=38 a 52 repetições) de *D. citri* no tubo principal do olfatômetro, verificando-se a frequência de insetos que se dirigiu para plantas de citros *C. sinensis* infectadas ou não. Os tratamentos foram: (i) Planta de citros sadia (PCS); (ii) planta de citros sintomática infectada por *Ca. L. asiaticus* (PCI); e (iii) controle (ar limpo). Todos os tratamentos foram confrontados entre si e depois combinados dois a dois na arena do olfatômetro ‘Y’ em um tempo máximo de 10 minutos, conforme estabelecido em estudos preliminares. A cada 10 repetições as plantas de citros foram substituídas por outras plantas, pertencentes ao mesmo tratamento e os insetos descartados a cada repetição. Os insetos não tinham contato visual com as plantas, pois entre o olfatômetro e os tratamentos havia um anteparo de papelão que cobria totalmente as plantas.

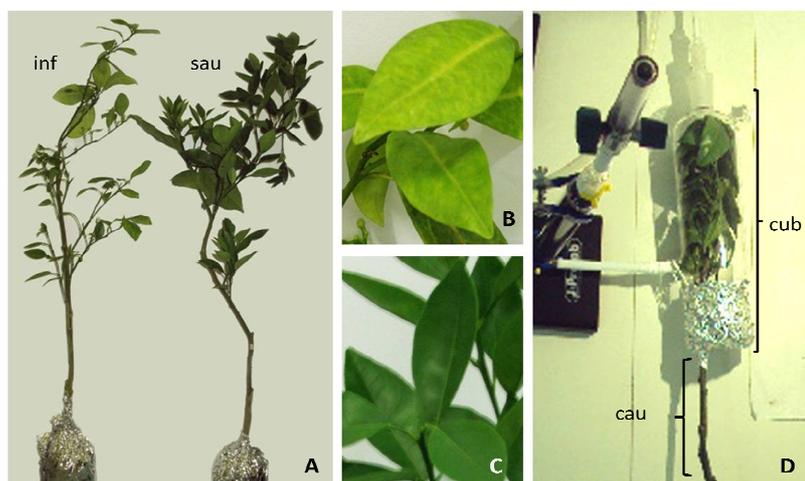


Figura 3.1 – Plantas de *Citrus sinensis* utilizadas nos bioensaios de atração do psílídeo *D. citri*: (A) Planta com HLB (*inf*), planta saudável (*sau*); (B) detalhe de folhas de planta sintomática; (C) detalhe de folhas de planta saudável; (D) cuba de coleta de voláteis, copa isolada (*cub*), caule da planta (*cau*)

Análise estatística

Os dados referentes aos bioensaios de olfatometria de *D. citri* foram analisados pelo teste de Qui-quadrado (χ^2) ($P \leq 0,05$), testando-se a hipótese de igualdade entre as frequências observadas e esperadas de indivíduos que se dirigiam para cada tratamento. Já as médias do tempo despendido pelos insetos em cada campo de odor foram comparadas pelo teste 't' ($P \leq 0,05$).

3.3 Resultados e discussão

Fêmeas (64%) e machos (79%) do psílídeo *D. citri* foram fortemente atraídos por voláteis de plantas de citros, *C. sinensis*, variedade Pêra, infectadas (PCI) pelo HLB ocasionado pela bactéria *Ca. L. asiaticus* (Tabela 3.1). Além disso, quando foi confrontado o tratamento PCI versus plantas de citros sadias (PCS), as fêmeas apresentaram clara preferência (71%) por PCI, apesar de isoladamente também responderem (63%) as plantas sadias. Estes dados demonstraram que mesmo sem uma identificação química, o fitopatógeno *Ca. L. asiaticus* foi capaz de induzir a produção de voláteis nas plantas de citros, que atraiu *D. citri*. Numa próxima etapa da pesquisa, a coleta e identificação destes voláteis poderão elucidar o(s) composto(s) químico(s) envolvido(s) na atração deste psílídeo.

Perante os resultados é possível que as plantas com HLB tenham sofrido alterações bioquímicas que possam ter modificado a emissão de voláteis. Essa possibilidade é reforçada por dados descritos por Manthey (2008) que demonstrou a capacidade de bactérias do HLB de promoverem o acúmulo de compostos orgânicos como 'hidroxicinamato' em aproximadamente duas vezes mais concentrados nas plantas de citros infectadas. O mesmo autor verificou ainda que compostos secundários como o 'limonin glucosid' apareceram em maior quantidade nas folhas sintomáticas de *C. sinensis*. Em outro estudo, Cevallos-Cevallos e Reyes-De-Corcuera (2008) detectaram o acúmulo de 'arabitol' e 'ribitol' também em folhas de plantas de citros sintomáticas, com HLB.

Tabela 3.1 - Respostas de machos e fêmeas de *Diaphorina citri* aos voláteis de plantas de *Citrus sinensis* variedade Pêra, sadias ou infectadas por *Candidatus* Lieberibacter asiaticus

Sexo	Tratamentos	N	Escolhas			Tempo médio (min.)			
			Trat. ^e	χ^2	P	Trat.	Controle	t	P
Fêmeas	PCS vs controle	42 (35)	0,63	4,6	0,031*	5,50	3,36	1,97	0,027*
Fêmeas	PCI vs controle	38 (33)	0,64	4,9	0,027*	7,21	5,30	1,55	0,063
Fêmeas	PCI vs PCS	52 (49)	0,71	7,5	0,006*	5,22	3,27	2,02	0,023*
Machos	PCS vs controle	45 (38)	0,61	3,4	0,665	5,04	2,96	2,20	0,016*
Machos	PCI vs controle	38 (35)	0,57	1,4	0,232	4,68	3,53	1,00	0,126
Machos	PCI vs PCS	46 (42)	0,79	18,0	0,0001*	6,39	4,36	2,61	0,006*

Notas: N – Número de insetos utilizados (número de insetos que responderam); (Trat.^e) proporção de escolhas no braço tratado do olfatômetro; (Trat.) tratamento.

PCS – Planta de citros sadia; PCI – planta de citros infectada por *Candidatus* Lieberibacter asiaticus

(*) Diferença significativa, $P \leq 0,05$; Teste qui-quadrado (χ^2) para escolhas e Teste t para tempo gasto em cada campo de odor.

Vale ressaltar que neste estudo, apesar das plantas de citros com HLB terem sofrido alterações em sua coloração, os psílídeos não tiveram contato visual com as mesmas. Assim durante os bioensaios, os adultos de *D. citri* receberam apenas estímulos olfativos, inerentes dos compostos voláteis emitidos pelas plantas de citros infectadas ou não pela doença.

Muito dos insetos pertencentes ao grupo do psílídeos, são consideradas pragas importantes na agricultura, por transmitirem fitopatógenos como bactérias e fitoplasmas que causam doenças graves nas plantas cultivadas (SOROKER et al., 2004; HORTON; LANDOLT, 2007; MAYER; VILSINSKAS; GROSS, 2007; 2008; DA GRAÇA, 1991) (WEINTRAUB; BEANLAND, 2006). Esses agentes, por sua vez, parecem ter evoluído de tal modo sendo capazes de promover alterações nas plantas que os hospedam, tornando-as mais atrativas aos insetos vetores, que às plantas saudáveis. Isso tem uma implicação direta nas interações entre fitopatógeno-planta hospedeira-inseto vetor, já que seria parte da estratégia de sobrevivência desses microorganismos.

Mecanismos envolvendo alterações nas plantas, causadas por agentes fitopatogênicos, e seus impactos em psilídeos vetores são escassos na literatura. Deste modo apenas dois trabalhos foram encontrados. Ambos abordam macieiras, *Malus domestica* (Rosaceae) e as alterações promovidas por *Candidatus Phytoplasma mali*, tendo como vetor o psilídeo *Cacopsylla picta* (Syn. *Cacopsylla costalis* Flor) (Hemiptera: Psyllidae). Nesses estudos, verificou-se que os voláteis induzidos pelo fitoplasma tornaram as plantas infectadas mais atrativas ao inseto vetor, quando comparadas às plantas saudáveis (MAYER; VILCINSKAS; GROSS, 2007, 2008). Além da indução de voláteis por *Ca. P. mali*, os mesmos autores verificaram que as plantas infectadas atraíram psilídeos inexperientes, sem a aquisição do fitopatógeno. Concomitantemente, as plantas não infestadas apresentaram-se atrativas aos insetos experientes, porém não infectados.

3.4 Considerações finais

Recentes estudos têm evidenciado a influência dos voláteis de plantas nos hábitos de vida dos psilídeos. Para *D. citri*, a atratividade exercida pelos voláteis de plantas de citros doentes pelo HLB ocasionado pela bactéria *Ca. L. asiaticus* foi demonstrada neste capítulo. Interessantemente, plantas de citros infectadas por HLB foram mais atrativas que plantas saudáveis, demonstrando uma estreita evolução destes fitopatógenos com as plantas que o hospedam e seu vetor para seu benefício próprio. Apesar da necessidade de mais estudos, os dados apresentados sugerem novas perspectivas para o manejo deste psilídeo. A elucidação de possíveis compostos atrativos para o monitoramento desta praga, bem como em estratégias de biologia molecular como o silenciamento dos genes que expressam a produção dos voláteis atrativos para *D. citri* são algumas das possibilidades.

Referências

AUBERT, B. Le psylle asiatique des agrumes (*Diaphorina citri*) Kuwayama au Brésil. **Fruits**, Saint Pierre, v. 42, p. 225- 229, 1987.

BONANI J.P.; FERERES, A.; GARZO, E.; MIRANDA, M.P; APPEZZATO-DA-LORIA, B.; LOPES, J.R.S. Characterization of electrical penetration graphs of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, in sweet orange seedlings. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 134, n. 1, p. 35-49, 2010.

BOVÉ, J.M. Huanglongbing: a destructive, newly- emerging, century-old disease of citrus. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 88, n. 1, p. 7-37, 2006.

CEVALLOS-CEVALLOS, J.M.; CORCUERA, R.J.I. Metabolite changes in HLB Orange leaves by GC-MS and other techniques. In: INTERNATIONAL RESEARCH CONFERENCE ON HUANGLONGBING, 2008, Orlando. **Proceedings...** Orlando: USDA, ARS, 2008. p. 176-177.

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

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**, Davis, v. 88, p. 1382, 2004.

COSTA-LIMA. **Insetos do Brasil**: homópteros. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Agronomia, 1942. t. 3, cap. 23, p. 94-111. (Série Didática, 4).

DA GRAÇA, J.V. Citrus greening disease. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 29, p. 109- 36, 1991.

GOMES, J.G. Chave de campo para a determinação das principais pragas dos citros. **Revista da Sociedade Brasileira de Agronomia**, Rio de Janeiro, v.3, n.1, p. 58-108, 1940.

HALBERT, S.E. The discovery of huanglongbing in Florida. In: INTERNATIONAL CITRUS CANKER AND HUANGLONGBING RESEARCH WORKSHOP, 2., 2005, Orlando. **Proceedings...** Orlando: Florida Department of Agriculture & Consumer Services, 2005. p. 50.

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, p. 330-353, 2004.

HORTON, D.R.; LANDOLT, P.J. Attraction of male pear psylla, *Cacopsylla pyricola*, to female-infested pear shoots. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 123, p.177-183, 2007.

MANTHEY, J.A. Differences in secondary metabolites in leaves from trees affected with the greening (HLB) disease. In: INTERNATIONAL RESEARCH CONFERENCE ON HUANGLONGBING, 2008, Orlando. **Proceedings...** Orlando: USDA, ARS, 2008. p. 182.

MAYER, C.J.; VILSINSKAS, A.; GROSS, J. Chemo-ecologically mediated interactions among “*Candidatus Phytoplasma mali*”, its vector *Cacopsylla picta*, and their host plant *Malus domestica*. **Bulletin of Insectology**, Bologna, v. 60, n. 2, p. 209-210, 2007.

_____. Phytopathogen lures its insect vector by altering host plant odor. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 34, p. 1045-1049, 2008.

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.

SOROKER, V.; TALEBAEV, S.; HARARI, A. R.; WESLEY, S.D. The role of chemical cues and mate location in the pear psylla *Cacopsylla bidens* (Homoptera: Psyllidae). **Journal of Insect Behavior**, Berlin, v. 17, n. 5, p. 613-626, 2004.

SUTTON, B.D. Detection and identification of citrus huanglongbing (Greening) in Florida, USA. In: INTERNATIONAL CITRUS CANCKER AND HUANGLONGBING RESEARCH WORKSHOP, 2., 2005, Orlando. **Proceedings...** Orlando: Florida University, 2005. Abstract H-11.

TEIXEIRA, D.C.; DANET, J.L.; EVEILLARD, S.; MARTINS, E.C.; JESUS JR., W.C.; YAMAMOTO, P.T.; LOPES, S.A.; BASSANEZI, R.B.; AYRES, A.J.; SAILLARD, C.; BOVE, J. M. Citrus huanglongbing in Sao Paulo State, Brazil: PCR detection of the ‘*Candidatus*’ Liberibacter species associated with the disease. **Molecular and Cellular Probes**, London, v. 19, p. 173-179, 2005.

WEINTRAUB, P.G.; BEANLAND, L. Insect vectors of phytoplasmas. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 51, p. 91–111, 2006.

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-GREENING INTERNATIONAL WORKSHOP, 2006, Ribeirão Preto. Ribeirão Preto: FUNDECTRUS, 2006. p. 96.

4 EFEITO DOS VOLÁTEIS DE GOIABEIRAS, *Psidium guajava* L. (MYRTACEAE) NA LOCALIZAÇÃO DE PLANTAS DE LIMÃO-CRAVO, *Citrus limonia* (L.) OSBECK (RUTACEAE) POR *Diaphorina citri* KUWAYAMA (HEMIPTERA: PSYLLIDAE)

Resumo

Estudos recentes realizados no Vietnã, sudeste asiático, mostraram que o cultivo intercalado de citros, *Citrus* spp. e goiaba, *Psidium guajava* L. (Myrtaceae) poderia reduzir a infestação do psilídeo asiático, *Diaphorina citri* Kuwayma (Hemiptera: Psyllidae). Esse inseto é vetor do ‘Huanglongbing’, uma importante doença bacteriana dos citros. De acordo com esses estudos, os voláteis de *P. guajava* poderiam repelir o psilídeo. Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar as respostas olfativas de *D. citri* aos voláteis de *P. guajava*. Para tanto, duas etapas experimentais foram estabelecidas para responder as seguintes perguntas: (1) Os voláteis de *P. guajava* seriam capazes de alterar o comportamento de *D. citri*?; e (2) de que modo esses voláteis poderiam afetar *D. citri*? Para responder a questão (1) foi utilizado um olfatômetro ‘Y’ com os seguintes tratamentos: (i) Voláteis de goiaba, *P. guajava*; (ii) voláteis de *Citrus limonia* (L.) Osbeck (Rutaceae); (iii) uma mistura de ambos os voláteis; e (iv) controle (ar limpo). Para responder a questão (2) foi utilizado um olfatômetro de quatro vias, com os seguintes tratamentos: (i) Voláteis de *P. guajava*; e (ii) controle (ar limpo). Machos e fêmeas de *D. citri* foram utilizados em cada bioensaio. O tempo de permanência e o número de escolhas para cada campo de odor foram registrados. Os resultados demonstraram alterações comportamentais em *D. citri* após o contato com os voláteis de *P. guajava* e citros. Os insetos foram atraídos para os voláteis de citros (número de escolhas totais = 78,3%, $P \leq 0,01$ qui-quadrado). Notavelmente, quando os voláteis de citros foram misturados aos voláteis de *P. guajava*, ou quando apenas voláteis de *P. guajava* foram oferecidos separadamente, não houve resposta do psilídeo *D. citri* aos voláteis. Quando os voláteis de *P. guajava* foram testados em olfatômetro de quatro vias, os indivíduos foram repelidos para o campo controle (ar limpo) (número total de escolhas = 22,2%, $P \leq 0,01$ qui-quadrado). Esses resultados apresentaram fortes indícios de que as folhas de *P. guajava* contêm voláteis que podem conferir repelência à *D. citri*.

Palavras-chave: Voláteis de plantas; repelência; comportamento de insetos; *Diaphorina citri*

Abstract

Recent studies carried out in Vietnam, Southeast Asia showed that intercropping of citrus and guava plants, *Psidium guajava* L. (Myrtaceae) could reduce the infestation of the asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayma (Hemiptera: Psyllidae). This psyllid is the vector of ‘Huanglongbing’, a very important bacterial disease in citrus. According to these studies, volatiles from guava plants hypothetically could be repellent to *D. citri*. In regard to that, the aim of this work was to study the olfactory response of *D. citri* to the volatiles of *P. guajava* plants. Therefore, it was established two experimental steps asking the following questions: (1) Do *P. guajava* volatiles alter the behavior in *D. citri*?; and (2) in which way do these volatiles affect *D. citri*? To answer (1) it was used Y-tube olfactometer bioassays exposed to the following treatments: (i) Volatiles of either *Citrus limonia* (L.) Osbeck (Rutaceae); (ii)

volatiles of *P. guajava* plants; (iii) a combination of both volatiles; and (iv) control (clean air). To answer (2) it was used a 4-way-olfactometer setup to the following treatments: (i) *P. guajava* volatiles; and (ii) control (clean air). Males and females of *D. citri* were tested in each bioassay. The residence time in an odor field as well as the total number of choices for an odor field were recorded. The results showed an alteration of the *D. citri* behavior after contact with volatiles of either *P. guajava* or *C. limonia*. Compared to the control (clean air) individuals preferred odor fields containing citrus volatiles (total number of choices = 78.3%, $P \leq 0.01$ chi-square). Interestingly when offered *P. guajava* alone and a mixture of *P. guajava* and *C. limonia* volatiles in comparison to control in Y-tube olfactometer we observed no response in the same parameters in both sexes. When testing *D. citri* to volatiles in the 4-way olfactometer setup, individuals significantly avoided guava plant volatiles (total number of choices = 22.2%, $P \leq 0.01$ chi-square). Our results strongly suggest that *P. guajava* leaves contain volatiles acting as effective repellents against *D. citri*.

Keywords: Plant volatiles; repellence; insect behavior; *Diaphorina citri*

4.1 Introdução

Diaphorina citri Kuwayma (Hemiptera: Psyllidae) é considerado atualmente uma das principais pragas dos citros, em razão de ser o vetor de uma grave doença dos citros, o ‘Huanglongbing’ ou HLB (BOVÉ, 2006). Por esta razão há grande interesse em se descobrir novas estratégias para o seu controle. A manipulação do seu comportamento é uma delas (HANIOTAKIS et al., 1991).

Muitos são os estímulos que influenciam as respostas comportamentais dos insetos. Dentre eles, estímulos físicos como cores e sons, ou químicos como os semioquímicos, poderiam desencadear respostas como a atração, repelência, inatividade, entre outros (COOK; KHAN; PICKETT, 2007). Os semioquímicos na agricultura tem sido uma das formas mais úteis para se promover alterações comportamentais nos insetos (BELL; CARDÉ, 1984; HARRIS; FOSTER, 1995).

Essa ampla utilização de estímulos químicos se deve principalmente à facilidade de se manipulá-los, praticidade em reproduzir seus efeitos artificialmente, além de poderem ser estudados com maior precisão (FOSTER; HARRIS, 1997). Uma aplicabilidade bastante interessante dos semioquímicos é o uso de repelentes e atrativos simultaneamente. Deste modo a aplicação desses compostos, liberados em locais estratégicos nas plantações visando a

repelência de pragas, e ao mesmo tempo oferecer atrativos em armadilhas é conhecida na literatura como ‘push-pull’, ou seja, repele e atrai (COOK; KHAN; PICKETT, 2007).

Muitos dos compostos químicos, capazes de desencadear respostas comportamentais em insetos como os repelentes, podem ser obtidos a partir de extratos naturais de plantas (ISMAN, 2006). Assim, na busca por novos compostos para o manejo do psíldeo *D. citri*, foram encontrados relatos no Vietnã, sudeste asiático, de que pomares de citros intercalados com goiabeiras, *Psidium guajava* L. (Myrtaceae) foram menos atacados por *D. citri*. Nesses estudos os autores evidenciaram que plantas jovens de citros permaneceram livres do HLB por mais tempo quando comparados aos pomares contendo apenas citros. Além disso, onde havia apenas citros constatou-se que 30% a mais das plantas estavam infectadas pela doença em apenas quatro meses após o plantio em comparação às plantas intercaladas com *P. guajava* (HALL et al., 2008; BEATTIE et al., 2008).

O objetivo deste trabalho foi investigar os voláteis de plantas de goiaba *P. guajava* e seu efeito sobre o comportamento do psíldeo *D. citri*.

4.2 Material e métodos

Obtenção dos insetos e plantas

Os exemplares de *D. citri* foram obtidos inicialmente a partir de uma criação previamente estabelecida no Laboratório de Biologia de Insetos da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ) e outra do Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus). A partir daí uma nova criação foi estabelecida em sala com $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa (UR%) de $70\pm 10\%$ e fotofase de 14 horas, seguindo a metodologia modificada de Skelley e Hoy (2004).

As plantas de murta, *Murraya paniculata* (L.) Jack. foram mantidas em casa-de-vegetação, onde receberam podas, adubação, tratamento fitossanitário, transplante, etc. Após um período entre 8 a 15 dias, as plantas com brotações foram separadas e transferidas para gaiolas de acrílico (60 x 60 x 50 cm) (Figuras 2.1A e B). Os adultos recém emergidos foram separados por sexo e agrupados em gaiolas feitas com garrafas de politereftalato de etileno (PET) de 4L, contendo uma planta de *M. paniculata* (Figura 2.1C). Nestas gaiolas foram

mantidos adultos de *D. citri* destinados à reprodução (Figuras 2.2A e B). Após um período máximo de sete dias, as plantas com posturas de *D. citri* foram novamente separadas e armazenadas em gaiolas como as descritas anteriormente, para o desenvolvimento ninfal (Figura 2.2C).

Para a padronização da idade dos psilídeos nas faixas etárias adequadas aos bioensaios, os insetos recém emergidos foram separados nas gaiolas de desenvolvimento ninfal. Deste modo, nas épocas de realização dos bioensaios, todos os adultos foram coletados diariamente, permanecendo na gaiola, apenas as ninfas.

Imediatamente após cada coleta de adultos, os indivíduos foram separados por sexo e agrupados em gaiolas específicas para machos ou fêmeas com idade conhecida. A separação dos sexos foi realizada em estereomicroscópio com aumento de seis vezes, por meio da visualização da porção final do abdome dos psilídeos em vista ventral, distinguindo-se o aparelho reprodutor de cada sexo como demonstrado por Aubert (1987).

As plantas de goiaba, *P. guajava* variedade 'Paluma' foram adquiridas diretamente do Departamento de Sementes e Mudanças e Matrizes (DSMM), órgão ligado à Secretaria de Agricultura do Estado de São Paulo. As plantas de *Citrus limonia* (L.) Osbeck (Rutaceae) foram adquiridas diretamente do Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus). Após a aquisição das mesmas, as mudas foram mantidas em casa-de-vegetação sob cultivo protegido, onde receberam os tratamentos culturais necessários para que se mantivessem sempre saudáveis e isentas de pragas e doenças.

Respostas comportamentais de *D. citri* aos voláteis de *P. guajava* e *C. limonia*

As respostas comportamentais de *D. citri* aos voláteis de goiabeiras, *P. guajava* foram estudadas em laboratório, por meio de olfatométria. Foram utilizados olfatômetros 'Y' e de 'quatro vias'. No primeiro estudo foi observada a capacidade de *D. citri* em reconhecer os voláteis da planta hospedeira citros, *C. limonia* e localizá-la frente aos voláteis de *P. guajava*. Assim, os adultos de *D. citri* foram expostos aos voláteis de ambas as plantas em diferentes combinações. Na segunda etapa experimental o foco foi dado aos efeitos específicos promovidos por voláteis de *P. guajava* nas respostas comportamentais de *D. citri*. Portanto nesta etapa apenas os voláteis de *P. guajava* foram estudados.

Em ambas as etapas experimentais foram utilizados adultos com idade entre 3 e 7 dias após a emergência. Além disso, ambos os sexos foram testados em iguais proporções baseando-se em estudos prévios, quando foi observada uma grande similaridade das respostas de machos e fêmeas aos odores de *P. guajava*, na razão sexual da espécie de 1:1, conforme descrito por Tsai e Liu (2000).

Tanto no olfatômetro 'Y', quanto no olfatômetro de 'quatro vias', os psilídeos foram introduzidos individualmente e observados por um período máximo de 10 minutos. Somente os insetos que fizeram escolha dentro do tempo estipulado foram considerados como repetição. A cada tratamento, os conectores de vidro e as câmaras foram lavados com detergente neutro e secos em estufa à 150°C por 60 minutos. Nenhum dos insetos foi reutilizado após o uso. Os bioensaios foram realizados em fotofase, em sala com $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e $70 \pm 10\%$ UR.

Primeira etapa experimental

Para verificar o efeito dos voláteis da planta *P. guajava* e *C. limonia* sobre o comportamento de *D. citri* foi utilizado um olfatômetro 'Y' constituído de um tubo principal e dois tubos laterais de vidro (15 x 3 cm) formando um ângulo de 120°, aos quais foram conectadas câmaras contendo os tratamentos a serem testados. O fluxo de ar foi gerado por uma bomba de vácuo conectada ao olfatômetro, que permitiu a passagem do ar pelos tubos laterais e a chegada dos odores ao tubo principal. O fluxo utilizado foi de 400 mL.min⁻¹, controlado por fluxômetros dispostos nas extremidades da entrada de ar. Todas as conexões entre o olfatômetro e as câmaras contendo os tratamentos foram feitas com PTFE (Teflon®), e o ar presente no sistema foi inicialmente filtrado por um filtro de carvão ativado, e umidificado, sendo ao final desumidificado em sílica gel e eliminado para uma área externa à sala de bioensaios. Em cada braço do olfatômetro foi disponibilizado um campo de odor, possibilitando assim a livre escolha dos psilídeos em relação aos tratamentos.

Nesta etapa foram oferecidos voláteis de: (i) *C. limonia*; (ii) *P. guajava*; (iii) *C. limonia* + *P. guajava* (mistura); e (iv) controle (ar limpo) (Figura 4.1). No tratamento contendo voláteis de *C. limonia* + *P. guajava*, as câmaras de coleta de voláteis foram conectadas em sequência, fazendo com que o fluxo de ar do sistema passasse primeiramente pela câmara com *P. guajava* e depois em *C. limonia*, e por fim chegasse a um dos braços do olfatômetro 'Y',

onde ficaram os insetos. A cada repetição o olfatômetro 'Y' foi tombado, num giro vertical de 180° a fim de evitar quaisquer influências do ambiente externo ao olfatômetro nas respostas dos insetos.

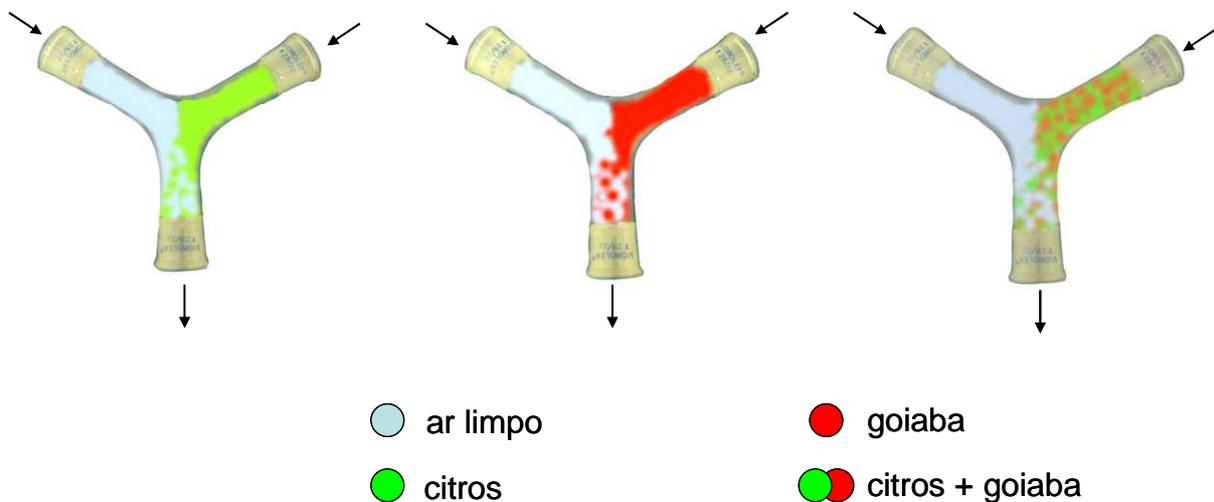


Figura 4.1 - Ilustração dos campos de odor em olfatômetro 'Y': Voláteis de *Citrus limonia* (verde); *Psidium guajava* (vermelho), e a mistura de ambos (verde + vermelho). Todos os voláteis foram confrontados com o controle (ar limpo). As setas indicam a direção do fluxo de ar em cada uma das arenas, sendo que os adultos do psilídeo *D. citri* foram introduzidos individualmente no tubo principal

A forma de avaliação das respostas comportamentais dos psilídeo foi muito semelhante aos outros bioensaios de olfatometria 'Y'. A escolha do campo atrativo se deu quando cada indivíduo cruzou uma linha demarcada na porção final do tubo, denominada linha de escolha (*le*), situada a 3 cm da conexão final do tubo (Figura 2.6A).

Cada psilídeo foi considerado uma repetição, assim os números de respostas de *D. citri* aos voláteis de plantas foram: *C. limonia* (n=60); *P. guajava* (n=40); *C. limonia* + *P. guajava* (n=40), todos comparados com o controle (ar limpo).

Segunda etapa experimental

Para o olfatômetro de ‘quatro vias’, foi montado um sistema muito semelhante ao utilizado para o olfatômetro ‘Y’, diferindo apenas quanto aos tratamentos e formato da arena de resposta (Figura 4.2A). Essa arena de quatro vias foi confeccionada em material acrílico, constituída por uma base e uma tampa, que juntas formaram uma peça semelhante a uma caixa quadrada e achatada (Figura 4.2B). Na base da peça foram alocadas quatro aberturas laterais por onde o ar se deslocou formando os campos de odor, e uma abertura central (no assoalho) por onde o ar foi sugado formando o fluxo de ar na arena de acordo com Vet et al. (1983). A tampa foi confeccionada de acrílico transparente, permitindo a visualização do inseto no interior do olfatômetro (Figura 4.2C). As dimensões da arena utilizada nos estudos foram de 14 x 14 x 2cm. Todas as aberturas da arena foram montadas com conexões de 45mm de diâmetro interno.

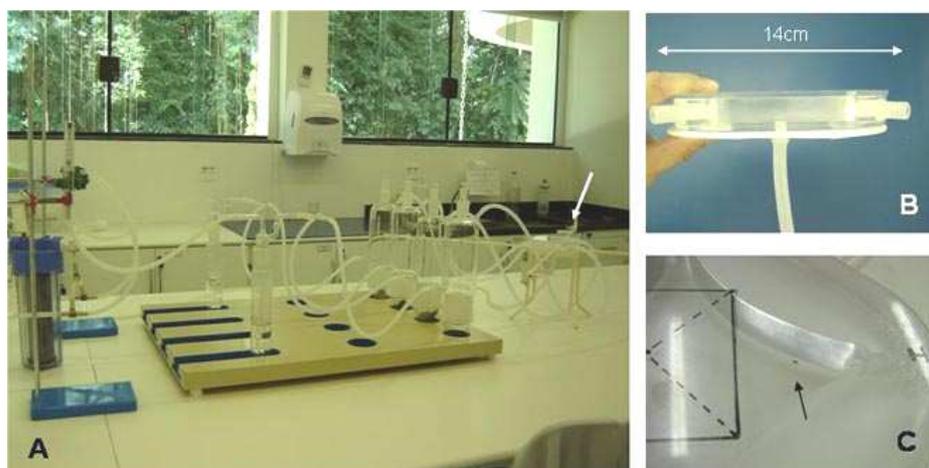


Figura 4.2 - Sistema de olfatometria de ‘quatro vias’: (A) Olfatômetro de ‘quatro vias’ (seta branca) acoplado ao sistema de sucção de ar, umidificadores e câmaras de coleta de voláteis; (B) arena de forragem e conectores; (C) detalhe da arena de forragem durante um bioensaio, a seta indica um adulto de *Diaphorina citri* num dos campos de odor

Nesta etapa foram testados os voláteis de *P. guajava* confrontados com o controle (ar limpo). O início do bioensaio se deu quando o psilídeo testado, liberado no centro do olfatômetro, ultrapassou a linha contínua demarcada na tampa do equipamento. Após o início do bioensaio, as linhas contínuas deixaram de ter valor, enquanto que as linhas pontilhadas

passaram a delimitar os campos de odor (Figura 4.3A), de acordo com a metodologia descrita por Vet et al. (1983). Neste caso, três vias foram ocupadas por voláteis de *P. guajava* e uma via por pelo controle (ar limpo) (Figura 4.3B). Em ambos os estudos foram avaliados o número de escolhas dos insetos para cada tratamento, bem como o número de respostas e não respostas dos indivíduos no intervalo de tempo estipulado.

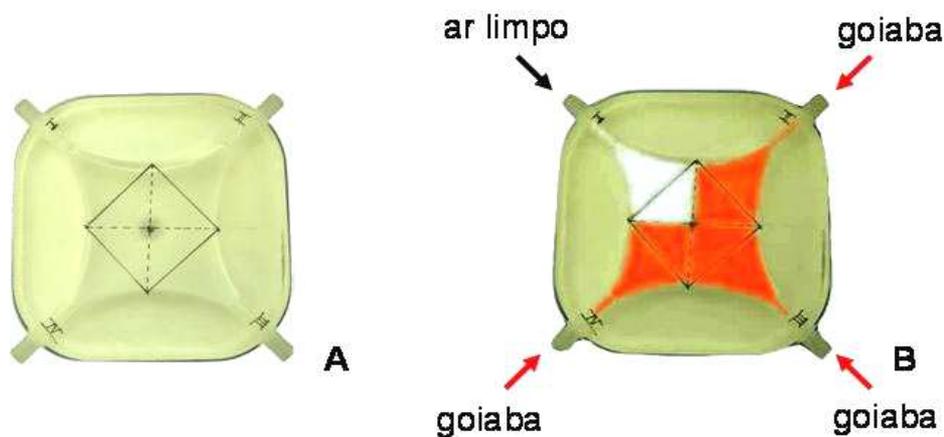


Figura 4.3 - Arena do olfatômetro de quatro vias utilizada nos testes com voláteis de plantas de goiaba, *Psidium guajava*: (A) Vista superior da arena com as linhas delimitadoras dos campos de odor e de escolhas dos insetos; (B) ilustração da proporção (3:1) entre os campos de odores, preenchidos respectivamente com voláteis de *P. guajava* e controle (ar limpo). As setas indicam a direção do fluxo de ar na arena

Para cada tratamento foram realizadas pelo menos 40 repetições, sendo que a cada cinco repetições as plantas foram substituídas por outra do mesmo tratamento. A exposição de cada psilídeo aos voláteis de *P. guajava* foi considerado uma repetição. A cada repetição, o olfatômetro de quatro vias foi girado em 90° para evitar o condicionamento dos insetos ao ambiente do laboratório.

Análise estatística

Os dados referentes ao número de escolhas de *D. citri* nas duas etapas (olfatômetro ‘Y’ e ‘quatro vias’) pelos voláteis de *P. guajava*, *C. limonia*, ou ambos foram avaliadas pelo teste de Qui-quadrado (χ^2) ($P \leq 0,05$). No caso do olfatômetro ‘quatro vias’ o teste de Qui-quadrado

(χ^2) considerou proporções esperadas desiguais, já que em três campos utilizou-se voláteis de *P. guajava* contra um único campo com controle (ar limpo), aumentando o poder estatístico.

4.3 Resultados e discussão

Na primeira etapa dos biensaio em olfatômetro 'Y', os adultos de *D. citri* foram atraídos intensamente pelos voláteis da planta hospedeira citros, *C. limonia* em 75% dos casos, comparativamente ao controle (P=0,0001) (Figura 4.4). O mesmo não ocorreu quando estes mesmos voláteis foram oferecidos em conjunto com os da goiabeira *P. guajava*. Curiosamente, boa parte dos insetos permaneceram imóveis no olfatômetro (29 de 40 casos). O mesmo foi verificado quando foi oferecido exclusivamente voláteis da goiabeira (37 dos 40 casos). A resposta do psilídeo *D. citri* frente à presença dos voláteis da goiabeira isoladamente ou em conjunto com os do citros, demonstrou que o olfatômetro 'Y' não foi capaz de caracterizar a razão do comportamento observado nas condições experimentais. Comparativamente aos voláteis do citros, esta resposta de inatividade dos insetos poderia estar correlacionada a uma imobilidade ou repelência dos voláteis presentes nas plantas de goiaba.

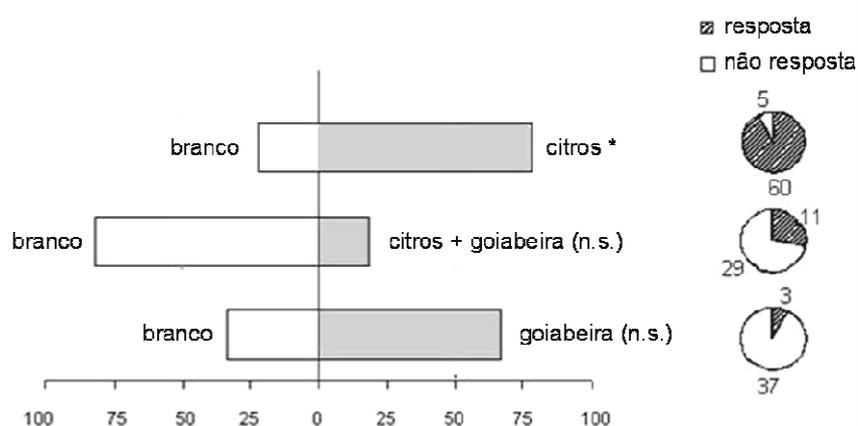


Figura 4.4 - Porcentagem e número de escolhas de *Diaphorina citri* aos voláteis de citros, *Citrus limonia*; citros, *C. limonia* + *Psidium guajava* ou apenas *P. guajava*. (*) Diferença significativa pelo teste Qui-quadrado (χ^2) ($P \leq 0,05$)

Por esta razão, empregou-se numa segunda etapa o olfatômetro de ‘quatro vias’ que permitiu visualizar o efeito dos voláteis da goiabeira sobre o psilídeo *D. citri*, já que o modelo deste olfatômetro permite que o inseto escolha o campo de odor sem que tenha de se expor a ele como acontece no olfatômetro ‘Y’. Neste caso, a grande maioria dos insetos testados responderam (45 em 48 dos casos), refletindo numa preferência de 75,6% dos insetos para o controle (ar limpo), em detrimento aos voláteis da goiabeira, *P. guajava* ($P=0,00001$) (Figura 4.5), sugerindo um intenso efeito de repelência.

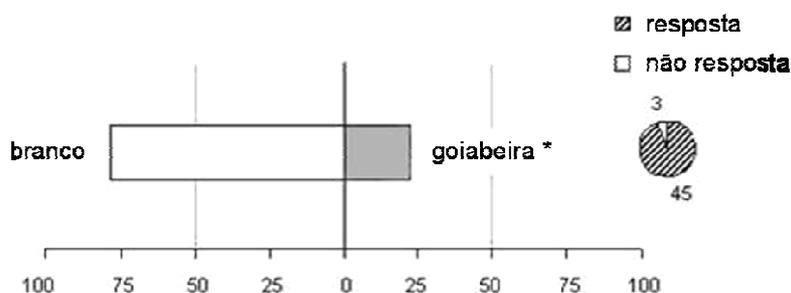


Figura 4.5 - Porcentagem e número de escolhas de *Diaphorina citri* aos voláteis de *P. guajava* em olfatômetro de quatro vias. (*) Diferença significativa pelo teste Qui-quadrado (χ^2) ($P \leq 0,05$)

Pouco se conhece sobre o efeito repelente de plantas à psilídeos. Em *Trioza apicalis* Förster (Hemiptera: Triozidae) há relatos sobre a ação repelente dos voláteis de coníferas a estes insetos em áreas cultivadas com cenoura (NEHLIN; VALTEROVA; BORG-KARLSON, 1994). Nesse caso os autores verificaram a repelência promovida por serragem de coníferas aos psilídeos, aplicadas junto aos canteiros de produção, nas condições de campo. Contudo esses resultados não foram aprofundados quanto à ação dos compostos.

Recentemente, Zaka et al. (2009) publicaram informações sobre o efeito repelente de voláteis de folhas de goiaba, *P. guajava* ao psilídeo *D. citri*. Contudo, a coleta destes voláteis não foi realizada, tampouco a identificação dos compostos envolvidos na repelência. Outro aspecto, que deve ser levado em consideração, é o fato de que os autores utilizaram ramos de

P. guajava destacados das plantas, o que não representa os voláteis que são produzidos pelas plantas vivas.

Rouseff et al. (2008) analisaram a composição dos voláteis de folhas inteiras e maceradas de *P. guajava* e com base na literatura e na identificação dos compostos de *P. guajava*, os autores estimaram compostos potencialmente repelentes à *D. citri*. Contudo não foram realizados bioensaios com os insetos. Segundo os autores, sete compostos sulfurados foram identificados nos voláteis de goiabeiras, sendo tidos como potenciais repelentes para *D. citri* a saber: (i) sulfureto de Hidrogênio, (ii) dióxido de Enxofre, (iii) metanotiol, (iv) sulfureto de dimetilo (DMS), (v) dissulfureto de dimetilo (DMDS), (vi) metional, e (vii) trissulfureto de metilo (DMTS). O DMDS foi relatado na literatura como um eficiente repelente de insetos (JANG; LIGHT, 1991 apud ZAKA et al., 2009). Além disso, o DMS e DMDS possuem ação altamente tóxica para muitos grupos de insetos, atuando na respiração celular, mais especificamente nos sistemas da citocromo oxidase (DUGRAVOT et al., 2004 apud ROUSSEFF et al., 2008). Aparentemente, estes compostos foram produzidos nas folhas de goiaba após a maceração devido a reação com o oxigênio, o que não ocorre naturalmente em plantas vivas.

Alem dos voláteis de folhas verdes, tanto os frutos quanto as folhas de *P. guajava* produzem uma ampla gama de compostos químicos secundários como terpenóides (OGUNWANDE et al., 2003) e aldeídos e alcoóis (SOARES et al., 2007). Dos 57 compostos que são constituintes de *P. guajava* há registros de, que pelo menos 27 deles são voláteis, pertencentes aos grupos dos terpenos e sesquiterpenos (PINO et al., 2001).

Deste modo deve haver outros compostos ou mesmo uma combinação de compostos que são liberados por *P. guajava* com efeito repelente. Durante os bioensaios realizados, tanto na primeira quanto na segunda etapa, plantas intactas de *P. guajava* mostraram-se repelentes aos adultos de *D. citri*. Neste caso, o intuito foi explorar o motivo pelo qual as plantações de *Citrus* sp. intercaladas com *P. guajava* permaneceram mais tempo livres de *D. citri* conforme os relatos de BEATTIE et al., 2008.

Aparentemente, o efeito repelente observado nos adultos de *D. citri* pode ter sido devido a um bloqueio na recepção dos estímulos químicos pelos órgãos sensoriais dos insetos a partir de um ou mais compostos químicos das plantas de goiaba, resultando na perda da

orientação ao seu hospedeiro, como já demonstrado em outros insetos (DAVIS, 1985 apud NEHLIN; VALTEROVA; BORG-KARLSON, 1994).

4.4 Considerações finais

Os resultados deste trabalho demonstraram um intenso efeito repelente dos voláteis das plantas de goiaba, *P. guajava* aos adultos de *D. citri*. Uma possível identificação do(s) composto(s) químico(s) envolvidos neste processo poderá ser útil no manejo desta praga em pomares comerciais, seja pela expulsão dos insetos das áreas, ou por meio da manipulação dos processos bioquímicos que induzem ou regulam a produção de voláteis nas plantas.

Referências

- AUBERT, B. Le psylle asiatique des agrumes (*Diaphorina citri*) Kuwayama au Brésil. **Fruits**, Saint Pierre, v. 42, p. 225- 229, 1987.
- BEATTIE, A.; HOLFORD, P.; HAIGH, D.T.; MABBERLEY, D.; BROADBENT, P.; BAYER, R. Retrospectives & insights: huanglongbing, *Diaphorina citri*. In: CITRUS EXPO SEMINAR PROGRAM, 2007, Ft. Myers. Disponível em: <<http://www.imok.ufl.edu/events/expo/>>. Acesso em: 14 jul. 2008.
- BELL, W.J.; CARDÉ, R.T. (Ed.). **Chemical ecology of insects**. London: Chapman and Hall, 1984. 433 p.
- BOVÉ, J.M. Huanglongbing: a destructive, newly- emerging, century-old disease of citrus. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 88, n. 1, p. 7-37, 2006.
- COOK, S.M.; KHAN, Z.R.; PICKETT, J.A. The use of push-pull strategies in integrated. pest management. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 52, p. 375-400, 2007.
- DICKE, M.; BRUIN, J. Chemical information transfer between plants: back to the future. **Biochemical Systematic Ecology**, Amsterdam, v. 29, p. 981-994, 2001.
- FOSTER, S.P.; HARRIS, M.O. Behavioral manipulation methods for insect pest-management. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 42, p. 123-146, 1997.
- HALL, D.; GOTTWALD, T.; NGUYEN, C; ICHINOSE, K.; LE, D; BEATTIE, A. **Intercropping of citrus and guava trees for management of huanglongbing**, Fort Pierce, Subtropical Insect Research: IPM Technologies for Subtropical Pests, 2008. Disponível em:

<http://www.ars.usda.gov/Services/site_publications.htm?modecode=66-18-00-00&start=41&display=20&filterYear=2007>. Acesso em: 24 jul. 2008.

HANIOTAKIS, G.; KOZYRAKIS, M.; FITSAKIS, T.; ANTONIDAKI, A. An effective mass trapping method for the control of *Dacus oleae* (Diptera: Tephritidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 84, p. 564-69, 1991.

HARRIS, M.O.; FOSTER, S.P. **Behavior and integration**. New York: Chapman & Hall, 1995. 433 p.

HORTON, D. R.; GUÉDOT, C.; LANDOLT, P. J. Attraction of male summerform pear psylla to volatiles from female pear psylla: effects of male age, mating status, and presence of host plant. **Canadian Entomologist**, Ottawa, v. 140, p. 181-191, 2008

HORTON, D.R.; GUÉDOT, C.; LANDOLT, P.J. Diapause status of females affects attraction of male pear psylla, *Cacopsylla pyricola*, to volatiles from female infested pear shoots. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam v.123, p.185-192, 2007.

HUANG, Y.; CHEN, S.X.; HO, S.H. Bioactivities of methyl allyl disulfide and diallyl trisulfid from essential oil of garlic to two species of stored-product pests *Sitophilus zeamays* (Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 93, n. 2, p. 537-543, 2000.

ISMAN, B.M. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 51, p. 45-66, 2006.

MAYER, C. J.; VILSINSKAS, A.; GROSS, J. Chemo-ecologically mediated interactions among “*Candidatus Phytoplasma mali*”, its vector *Cacopsylla picta*, and their host plant *Malus domestica*. **Bulletin of Insectology**, Bologna, v.60, n.2, p.209-210, 2007.

_____. Phytopathogen lures its insect vector by altering host plant odor. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 34, p. 1045-1049, 2008.

MILLER, J.R.; COWLES, R.S. Stimulo deterrent diversion: a concept and its possible application to onion maggot control. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 16, p. 3197- 3212, 1990.

NEHLIN, G.; VALTEROVA, I.; BORG-KARLSON, A.K. Use of conifer volatiles to reduce injury caused by carrot psyllid, *Trioza apicalis* Forster (Homoptera: Psyllidae). **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 20, p. 771-783, 1994.

OGUNWANDE, I.A.; OLAWORE, N.O.; ADELEKE, K.A.; EKUNDAYO, O.; KOENING, W.A. Chemical composition of the leaf volatile oil of *Psidium guajava* L. growing in Nigeria. **Flavour and Fragrance Journal**, Maldem, v. 8, p. 136-138, 2003.

PINO, J.A.; AGUERO, J.; MARBOT, R.; FUENTES, V. Leaf oil of *Psidium guajava* L. from Cuba. **Journal of Essential Oil Research**, Congers, v. 13, n. 1, p. 61-62, 2001.

ROUSSEFF, R.L.; ONAGBOLA, E.O.; SMOOT, J.M.; STELINSKI, L.L. Sulfur volatiles in guava (*Psidium guajava* L.) leaves: possible defense mechanism. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v. 56, p. 8905-8910, 2008.

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.

SOARES, F.D.; PEREIRA, T.; MARQUES, M.O.M.; MONTEIRO, A.R. Volatile and non-volatile composition of the White guava fruit (*Psidium guajava*) at different stages of maturity. **Food Chemistry**, Oxford, v. 100, p. 15-21, 2007.

SOROKER, V.; TALEBAEV, S.; HARARI, A.R.; WESLEY, S.D. The role of chemical cues and mate location in the pear psylla *Cacopsylla bidens* (Homoptera: Psyllidae). **Journal of Insect Behavior**, Berlin, v. 17, n. 5, p. 613-626, 2004.

VET, L.E.M.; LENTEREN, J.C.; HEYMANS, M.; MEELIS, E. An airflow olfactometer for measuring olfactory responses of hymenopterous parasitoids and other small insects. **Physiological Entomology**, Maldem, v. 8, p. 97-106, 1983.

ZAKA, S.M.; ZENG, X.N.; HOLFORD, P.; BEATTIE, G.A.C. Repellent effect of guava leaf volatiles on settlement of adults of citrus psyll, *Diaphorina citri* Kuwayama, on citrus. **Insect Science**, Maldem, v. 1, p. 1-7, 2009.

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](#)