



## CRIAÇÃO EM LABORATÓRIO DO INSETO-PRAGA DE POMARES CÍTRICOS DO ESTADO DE SÃO PAULO *DIAPHORINA CITRI* (HEMIPTERA: LIVIIDAE)

Mateus Santos Oliveira **Prando**<sup>1</sup>; Luiz Alexandre Nogueira de **Sá**<sup>2</sup>

Nº 19407

**RESUMO** - A citricultura nacional está sendo ameaçada por mais uma praga exótica, o psíldeo-dos-citros, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae), vetor da doença Huanglongbing (HLB). O objetivo do trabalho foi desenvolver metodologia modificada de criação em condições de laboratório de *Diaphorina citri* utilizando-se de mudas de murta (*Murraya paniculata*) no interior de gaiolas de criação de insetos, para posterior criação e manutenção do parasitoide exótico importado dos Estados Unidos, *Diaphorencyrtus aligarhensis* (Hymenoptera: Encyrtidae) para o controle biológico clássico dessa praga-exótica. A metodologia de criação modificada dessa praga-alvo e de *D. aligharensis*, endoparasitoide específico de 2º e 3º instares foi realizada em gaiolas de criação com filete de mel em suas laterais e parte frontal com mudas de murta em seu interior, contendo algodão umedecido em água destilada. As gaiolas de criação foram mantidas em salas de criação com condições controladas. Os adultos do parasitoide emergidos foram mantidos em BOD a 18°C até se obter brotações novas de murta infestadas com ninfas de 2º e 3º instares de *D. citri* para serem oferecidas ao *D. aligarhensis*. O resultado da produção de *D. citri* entre os meses de Agosto/2018 a Junho/2019 foi de 22.880 adultos. A produção do *D. aligarhensis* em gaiola de criação contendo mudas de murta infestadas por *D. citri* foi a partir de agosto/2018 a junho de 2019 de 1.549 indivíduos. Este parasitoide exótico foi criado e estabelecido em condições de quarentena somente após três processos de importações.

**Palavras-chaves:** praga exótica, quarentena, parasitoide exótico, inseto vetor

<sup>1</sup> Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Ciências Biológicas, Pontifícia Universidade Católica de Campinas, Campinas- SP; lindayanamonroe@hotmail.com

<sup>2</sup> Colaborador: Graduação em Ciências Biológicas, Pontifícia Universidade Católica de Campinas, Campinas- SP; nathalie.gulfier@hotmail.com

<sup>3</sup> Orientador: Pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP; luiz.sa@embrapa.br



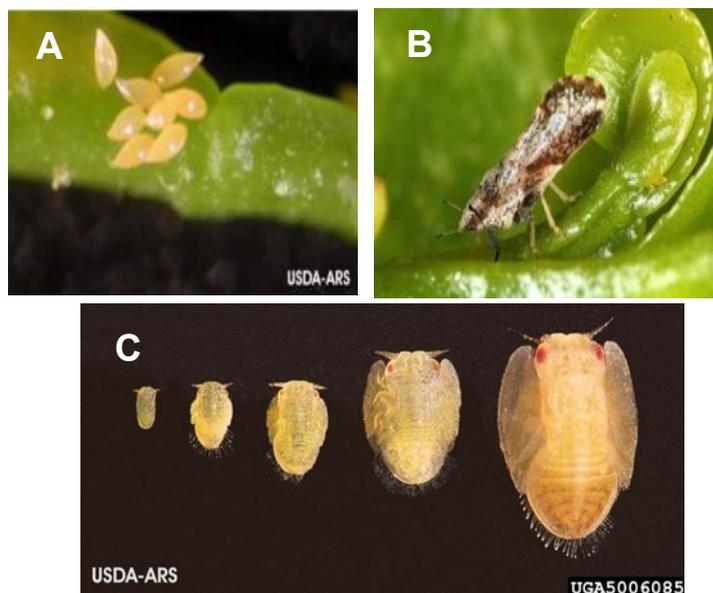
**ABSTRACT** – National citriculture is being threatened by one more exotic pest, the citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae), vector of Huanglongbing disease (HLB). The objective of the work was to develop a modified methodology to maintain *D. citri* in laboratory conditions using seedlings of orange jessamine (*Murraya paniculata*) in insect rearing cages, for a later production and maintenance of the exotic parasitoid *Diaphorencytrus aligarhensis* (Hymenoptera: Encyrtidae) imported from United States of America for the classic biological control of this exotic pest. The modified rearing methodology of this target pest and of *D. aligharensis*, a specific endoparasitoid of the 2<sup>nd</sup>. and 3<sup>rd</sup>. instars, was performed in rearing cages with threads of honey on the borders and on the fronts, with seedlings of orange jessamine on the inside along with cotton damped in distilled water. Cages were kept inside rearing rooms with controlled conditions. The emerged adult parasitoids were kept in B.O.D. at 18°C until young buds of the plant, infested with 2<sup>nd</sup>. and 3<sup>rd</sup>. instars of *D. citri*, are offered to *D. aligarhensis*. The resulting production of *D. citri* between the months of August/2018 and June/2019 was 22.880 adults. The production of *D. aligharensis* in cages containing infested plantlets of orange jessamine with *D. citri* was 1.549 insects between August/2018 and June/2019. This exotic parasitoid was reared and established in quarantine conditions only after three importation processes.

**Keywords:** exotic pest, quarantine, exotic parasitoid, vector insect

## 1. INTRODUÇÃO

A cultura dos citros é de origem asiática, e suas plantas foram provavelmente introduzidas no estado da Bahia, devido as condições ótimas aqui encontradas, onde as plantas cítricas se desenvolveram, sendo atualmente o estado de São Paulo o maior produtor (LOPES, *et al.*, 2011).

A cultura dos citros é afetada por inúmeras pragas, algumas causam danos diretos enquanto outras são vetores de patógenos (PARRA *et al.* 2010). O psilídeo-dos-citros *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) é uma importante praga (**Figura 1**) que afeta a cultura de citros (BOVÉ, 2006) porém apresenta também preferência por plantas da família Rutaceae como a espécie ornamental muito utilizada no Brasil, *Murraya paniculata* (L.) Jack, popularmente conhecida como murta-de-cheiro (PARRA *et al.*, 2010). Esse psilídeo se tornou a mais importante praga da cultura (HALBERT; MANJUNATH, 2004), sendo capaz de inviabilizar uma produção inteira ao atingir os pomares (DINIZ, 2013).



Disponível em: <http://www.fundecitrus.com.br/doencas/diaphorina-citri> - 2019

**Figura 1.** A) Ovos da praga *Diaphorina citri*; B) Adulto do psíldeo; C) Ínstares do desenvolvimento de *Diaphorina citri*. Fotos: David Hall, United States Department of Agriculture, USA (HALL, 2008). Disponível em: [www.ars.usda.gov](http://www.ars.usda.gov)

O psíldeo-dos-citros, *D. citri* é vetor da doença Huanglongbing (HLB) causada por bactérias de floema. Segundo Gottwald (2010) o HLB está associado a três espécies de bactérias: *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Candidatus Liberibacter africanus* e *Candidatus Liberibacter americanus*. São bactérias gram-negativas de colonização restrita ao floema e não cultiváveis em meio de cultura (BELASQUE JUNIOR *et al.*, 2009). Os sintomas mais característicos da doença são folhas com manchas amareladas, frutos com pequena dimensão, inversão das cores típicas da maturação e colonização do sistema vascular pela bactéria (BOVÉ, 2006).

A metodologia de criação em condições de laboratório de *Diaphorina citri* vem sendo realizada utilizando-se de mudas de plantas murta no interior de gaiolas de criação de insetos citada por Diniz (2013). Esta criação e manutenção de uma população da praga exótica-alvo principal de *D. citri* em condições controladas em laboratório, foi modificada para a produção específica das fases imaturas de 2º e 3º instares realizada em gaiolas de criação sobre murta (*Murraya paniculata*) infestadas pelo inseto-praga, e mantidas em salas de criação (com médias de temperatura de 25,1°C, umidade relativa (UR) 72% e fotofase 12:12h).

A problemática destas criações conjuntas da praga-alvo, *D. citri* e de seu endoparasitoide *D. aligarhensis* nas mesmas condições de laboratório foi que os adultos do parasitoide emergidos foram anteriormente mantidos em BOD a 18°C até se obter brotações novas em plantas de murta infestadas com ninfas de 2º e 3º instares de *D. citri*, para serem posteriormente oferecidas ao *D. aligarhensis*



para o controle biológico clássico dessa praga (**Figura 2**). Estas condições de temperatura, umidade relativa e fotofase utilizadas foram boas para a manutenção dessas duas criações praga e parasitoide na mesma sala, sem a ocorrência da perda dos adultos de *D. aligarhensis* recebidos das três remessas deste material importado dos Estados Unidos.

Não havia sido possível o estabelecimento permanente de uma população de *D. aligarhensis* importado sobre população de *D. citri* disponível em laboratório. Pelas dificuldades encontradas após as importações deste bioagente referentes à manutenção das duas criações desses insetos em laboratório não foram realizados ensaios de comparações de diferentes tratamentos, incluindo o tratamento controle, e testes estatísticos devido ao baixo número de *D. aligharensis* para montagem de testes de avaliação de sobrevivência em função da temperatura (°C), umidade relativa (UR%); e na avaliação da capacidade de parasitismo do parasitoide. Neste trabalho de 2018/2019 foi de acertar ainda alguns parâmetros nas criações dos insetos para poder realizar os biotestes necessários com número suficiente de indivíduos/repetições de *D. aligarhensis* para posteriores liberações nos pomares cítricos, e verificar seu efetivo controle sobre a praga. Este parasitoide importado encontra-se em quarentena, aguardando sua liberação definitiva de quarentena pelos Órgãos Reguladores do país.

Também outros parâmetros que influenciaram o sucesso das criações dos insetos foram os perfilhos jovens e sadios das plantas de murta oferecidos, e também as adubações foliares realizadas, e o controle frequente dos contaminantes infestantes, e danosos no interior das gaiolas de criações. Houve também a necessidade de se oferecer nas gaiolas de criação filetes de mel em suas laterais e parte frontal com mudas de murta em seu interior, e contendo algodão umedecido em água destilada para a alimentação dos insetos.

A hipótese testada no trabalho é que a metodologia modificada de criação da praga-alvo para obtenção das formas imaturas de 2º e 3º instares foi eficiente para a criação, e manutenção da população do parasitoide exótico introduzido.

O primeiro processo de importação de *D. aligarhensis* foi em Setembro de 2015, seguido de um segundo em Dezembro de 2016 e um terceiro em Outubro de 2017, da Califórnia-EUA para posterior criação e manutenção de população estabelecida desse parasitóide importado em quarentena.

Também a produção de *D. citri* em laboratório tem que ser de média a alta para se obter os estádios preferencias necessários para o parasitismo deste bioagente exótico introduzido no país, e não mais encontrado em outros países no mundo. Outra preocupação refere-se à manutenção

permanente desta população estabelecida de *D. aligarhensis* em laboratório, devido aos cruzamentos entre parentes; o que tem acarretado consanguinidade, e baixa heterose na população estabelecida. Também poderá ocorrer a diminuição do vigor dos insetos e a baixa capacidade de parasitismo pós liberações nos pomares cítricos. Entre outros principais fatores citados responsáveis pelo crescimento populacional de *D. citri* estão a temperatura (NAVA *et al.*, 2007), a umidade relativa do ar (NAVA *et al.*, 2007), e também a presença de brotações de citros nos pomares (YAMAMOTO *et al.*, 2014) e os agentes de mortalidade biótica, como os parasitoides, predadores e entomopatógenos.



Foto: Mike Lewis, CISR, UC Riverside

**Figura 2.** Adulto do parasitóide exótico importado *Diaphorencyrtus aligarhensis*. Disponível: [www.ucrtoday.ucr.edu](http://www.ucrtoday.ucr.edu)

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver metodologia modificada de criação em condições de laboratório de *Diaphorina citri* utilizando-se de mudas de plantas de murta no interior de gaiolas de criação de insetos, para a produção posterior e manutenção do parasitoide exótico importado dos Estados Unidos, *Diaphorencyrtus aligarhensis* para o controle biológico clássico dessa praga-exótica.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Para a criação de *Diaphorina citri* foram utilizadas mudas de murta-de-cheiro *Murraya paniculata* (L.) Jack (Rutaceae) com 25 a 30 cm de altura, em touceira com média de cinco perfilhos/planta, plantadas em sacos plásticos de cor preta de aproximadamente dois litros de capacidade, cultivadas em substrato de composto vegetal; no interior de gaiolas de criação de insetos (45cm de comprimento, 45cm de largura e 55cm de altura), feitas com tela anti-afídeos da marca Lab Creation® (**Figura 3**). Foi estabelecida nessas gaiolas de criação de insetos, a praga-psílideo-dos-citros *D. citri*, conforme metodologia modificada de (DINIZ, 2013) e de (PARRA *et al.* 2010). Essas



gaiolas foram mantidas em salas de criação em condições médias de temperatura de 25,1°C, umidade relativa (UR) 72% e fotofase 12:12h. Para a manutenção dessa criação foram desenvolvidas as seguintes atividades de laboratório: semanalmente foram realizadas podas de aproximadamente 30 mudas de *M. paniculata* (**Figura 4**), cujas brotações surgem em aproximadamente 15 dias após poda. Também foi oferecido nas gaiolas de criação filetes de mel em suas laterais e parte frontal com mudas de murta em seu interior, e contendo algodão umedecido em água destilada para a alimentação dos insetos adultos.

Foi realizada também a adubação a cada quinze dias com uma solução de fertilizante mineral misto para aplicação via foliar e fertilização a 1% de NPK 20-20-20 solúvel em água da marca Everris®. Para a manutenção da sanidade das mudas de murta, em touceiras com cinco perfilhos/planta, plantados em sacos plásticos; o controle das contaminantes/infestantes cochonilhas, afídeos e outros insetos foram realizadas pulverizações de solução de detergente neutro a 10% na parte aérea das mudas. A coleta dos adultos dos psíldeos foram realizadas conforme o calendário de oviposição dos adultos fêmeas de *D. citri* (de acordo com seu ciclo de vida), e com o surgimento de novos adultos.

Estes adultos foram coletados no interior das gaiolas de criações através da sucção por aspirador bucal de insetos, sendo os mesmos liberados em novas gaiolas de criação contendo mudas saudáveis de murta (montagem de quatro gaiolas de criação por semana). Também as coletas de adultos do psíldeo ocorreram em campo em cercas vivas de murta plantadas nos arredores de pomares cítricos na região de Mogi-Guaçu-SP. Essas coletas foram realizadas por duas pessoas com o uso de aspirador bucal de insetos, e posterior armazenamento dos adultos coletados em frascos plásticos com tampa acondicionados no interior de caixa de isopor com gel resfriado para manutenção de temperatura ao redor de 15 a 18°C até a chegada desse material ao laboratório.

Na sala de criação esses adultos coletados em campo foram liberados em número de 400 indivíduos no interior de cada gaiola de criação de insetos para infestação das mudas de murta, abrindo-se a tampa do frasco para a liberação dos adultos no interior da gaiola. Estas coletas de campo foram necessárias para realizações de cruzamentos com material selvagem da praga para aumentar posteriormente a heterose do material biológico em manutenção da criação em condições controladas de laboratório; como também aumentando assim, o vigor dos insetos das populações estabelecidas por gerações em laboratório. Após sete dias da infestação pelos adultos do psíldeo nas quatro gaiolas, os insetos foram coletados e contados, e então transferidos para novas gaiolas de criação com novas plantas de murta com brotações novas nos ponteiros, para a continuação do

ciclo de oviposição da praga. Depois da retirada desses adultos de *D. citri* esperou-se 15 dias para o desenvolvimento das ninfas (1º a 5º estádios) até a fase adulta.

A criação modificada visou uma produção de média a alta de indivíduos de *D. citri* referente a uma maior obtenção das fases imaturas de 2º e 3º instares. Posteriormente estas ninfas foram oferecidas para o parasitismo pelo bioagente exótico importado, *Diaphorencyrtus aligarhensis* (Hymenoptera: Encyrtidae). Foram realizadas três importações do bioagente da Califórnia-EUA (Setembro/2015, Dezembro de 2016 e Outubro de 2017), sendo estabelecida uma população de *D. aligarhensis* em condições de quarentena.

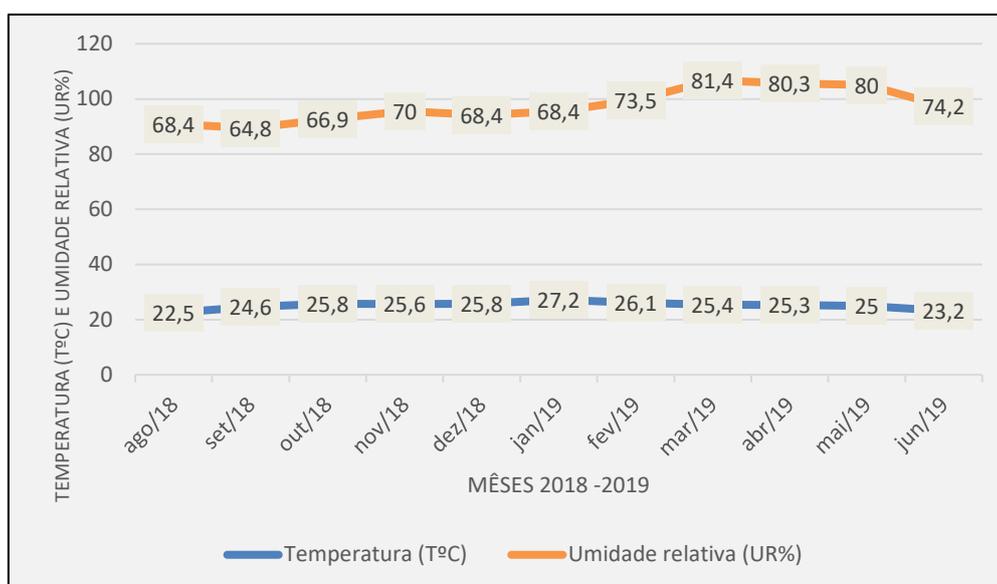
Foi utilizada uma gaiola de criação da praga infestada pelas ninfas de *D. citri* por semana, para posterior parasitismo por cerca de 50 a 60 adultos do parasitóide *D. aligarhensis*, num total de quatro gaiolas por mês. Os adultos do parasitóide emergidos foram mantidos em BOD a 18°C até se obterem brotações novas de murta infestadas com ninfas de 2º e 3º instares de *D. citri*, para serem oferecidas novamente ao *D. aligarhensis*. A manutenção deste parasitóide introduzido tem sido mantida permanente em condições de gaiolas de criação anti-afídeos da marca Lab Creation® (**Figura 3**). Os dados médios de temperatura (°C) e umidade relativa (UR %) para o período de agosto de 2018 a junho de 2019 são mostrados na **Figura 5**.



**Figura 3.** Gaiolas de criação de *Diaphorina citri* com mudas de *Murraya paniculata*. Foto: M. S. O. Prando, Laboratório de Quarentena “Costa Lima”, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna- SP



**Figura 4.** Mudas de murta de cheiro *Murraya paniculata* em casa-de-vegetação quarentenada. **Foto:** A. C. G. de França, Laboratório de Quarentena “Costa Lima”, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna- SP

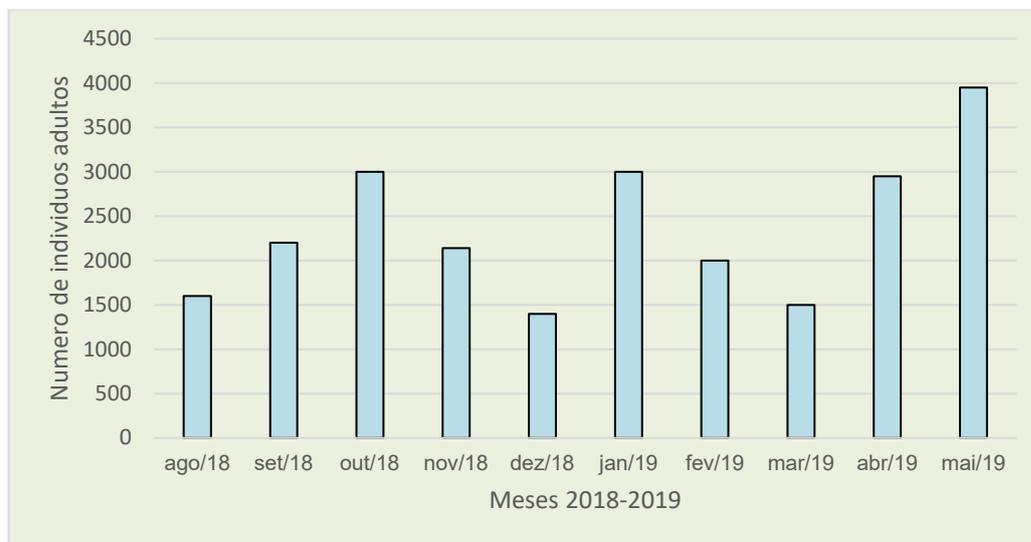


**Figura 5.** Dados meteorológicos médios mensais (Temperatura °C e Umidade relativa %) no período de agosto de 2018 a junho de 2019

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram mantidos total de 4.000 adultos referentes a dez gaiolas de criação de *D. citri* infestando as plantas de murta, para a obtenção posterior de ninfas de 2º e 3º instares necessárias para o parasitismo por *D. aligarhensis*. Foi realizada a metodologia de criação da praga nas condições de temperatura de 25,1°C, umidade relativa (UR) 72% e fotofase 12:12h. Na literatura são citadas condições semelhantes de temperatura 24 ± 2°C, umidade relativa (UR) 70% ± 10 e fotoperíodo 14:10 horas (DINIZ, 2013; PARRA *et. al.* 2010). Foram utilizadas um total de quatro gaiolas de criação do inseto-praga infestadas por ninfas de 2º e 3º instares de *D. citri* mensalmente.

Os resultados obtidos da produção de *D. citri* nesta metodologia modificada durante os meses de agosto de 2018 a junho de 2019 foi de 22.880 adultos (sendo 10.340 indivíduos em 2018 e de 10.340 em 2019) (**Figura 6**). Esta quantidade produzida em laboratório proveniente de dez gaiolas de criação com plantas de murta no seu interior permitiu uma quantidade de ninfas de 2º e 3º instares suficientes para o parasitismo, e posterior multiplicação dos adultos de *D. aligarhensis* em laboratório.

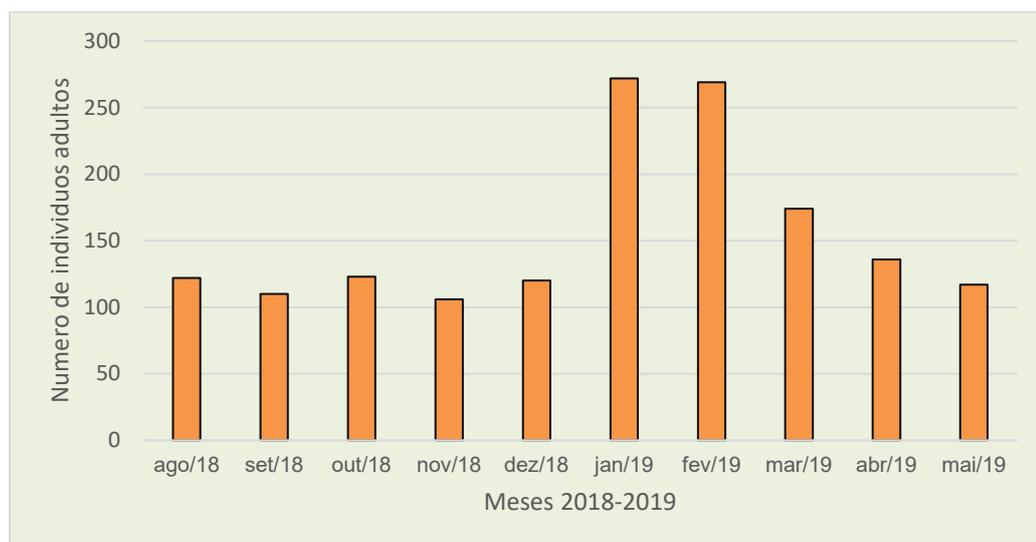


**Figura 6.** Número de indivíduos adultos do psíldeo-praga de citros *Diaphorina citri* emergidos em gaiolas de criação. Período Agosto/2018 a Junho/2019

Para o parasitismo foram liberados cerca de 50 a 60 adultos de *D. aligarhensis* no interior de uma gaiola semanalmente. Esse resultado da produção inicial desse parasitóide por gaiolas infestada por *D. citri* foi no início em 2018 de 581 adultos, e para 2019 de cerca de 968 indivíduos, ou seja, a população aumentou em 60% se comparada à população inicial desse parasitóide exótico.

Além desses parâmetros de temperatura, umidade relativa e fotofase mencionados, outro fator importante para o sucesso da criação de *D. citri*, foi a sanidade das plantas de murta referente a eliminação de contaminantes (como insetos-pragas, ácaros fitófagos e doenças de plantas), que as infestam na parte aérea das plantas.

Das gaiolas de criação para multiplicação dos com adultos do parasitóide *D. aligarhensis* foi obtida uma produção total de 1.549 adultos do parasitóide, sendo que a partir de agosto a dezembro/2018 foi de 581 adultos; e de janeiro a junho/2019 de 968 indivíduos desse bioagente exótico importado (**Figura 7**).



**Figura 7.** Número de indivíduos adultos do parasitóide exótico *Diaphorencyrtus aligarhensis* emergidos em gaiolas de criação em laboratório. Período Agosto/2018 a Junho/2019

#### 4. CONCLUSÃO

A metodologia modificada de criação em condições de laboratório de *Diaphorina citri* e do parasitoide exótico importado, *Diaphorencyrtus aligarhensis*, apresentou resultado favorável ao estabelecimento permanente das duas populações dos insetos;

A produção de *D. citri* nesta metodologia modificada durante os meses de agosto de 2018 ao junho de 2019 foi de 22.880 adultos (sendo de 10.340 indivíduos em 2018 e de 10.340 do inseto-praga em 2019), foi suficiente para posterior multiplicação dos adultos de *D. aligarhensis* em condições de laboratório;

A produção inicial de *D. aligarhensis* por gaiolas de criação sobre mudas de murta e infestada por *D. citri* foi inicialmente em 2018 de 581 adultos, e para 2019 de 968 indivíduos, ou seja, a população aumentou em 60% se comparada à população inicial desse parasitóide exótico.

#### 5. AGRADECIMENTOS

Nossos agradecimentos ao CNPq pela bolsa PIBIC concedida, ao Laboratório de Quarentena “Costa Lima”, da Embrapa Meio Ambiente, em Jaguariúna-SP, à Esalq/USP-Piracicaba-SP e ao Fundecitrus-Araruama-SP, pela oportunidade dos inúmeros conhecimentos, dentre eles a importância do controle biológico clássico de pragas de citros, conhecimentos nas áreas de defesa fitossanitária/quarentena de bioagente de controle.



## 6. REFERÊNCIAS

- BELASQUE JUNIOR, J. *et al.* Base científica para a erradicação de plantas sintomáticas e assintomáticas de Huanglongbing (HLB, Greening) visando o controle efetivo da doença. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 34, n. 3, p.137-145, 2009.
- BOVÉ, J. M. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. **Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 88, n. 1 p. 7-37, 2006.
- DINIZ, A. J. F. **Otimização da criação de *Diaphorina citri* Kuwayama, 1908 (Hemiptera: Liviidae) e de *Tamarixia radiata* (Waterston, 1922) (Hymenoptera: Eulophidae), visando a produção em larga escala do parasitoide e avaliação do seu estabelecimento em campo.** Piracicaba, 2013. 129 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.
- GOTTWALD, T. R. Current epidemiological understanding of citrus huanglongbing. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 48, p. 119-139, 2010.
- 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**, Lutz, FL, v. 87, n. 3, p. 330-353, 2004.
- LOPES, J. M. S. *et al.* Importância econômica dos citros no Brasil. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, Garça, v. 10, n. 20, 2011. Disponível em: <[www.faeF.revista.inf.br](http://www.faeF.revista.inf.br)>. Acesso em: 26 maio 2017.
- NAVA, D. E. *et al.* Biology of *Diaphorina citri* (Hem., Psyllidae) on different hosts and at different temperatures. **Journal of Applied Entomology**, Goettingen, v. 131, n. 9-10, p. 709-715, 2007.
- PARRA, J. R. P. *et al.* Bioecologia do vetor *Diaphorina citri* e transmissão de bactérias associadas ao huanglongbing. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v. 31, n. 1, p. 37-51, 2010.
- YAMAMOTO, P. T.; ALVES, G. R.; BELOTI, V. H. Manejo e controle do huanglongbing (HLB) dos cítricos. **Investigación Agraria**, San Lorenzo, Paraguay, v.16, n. 2, p. 69-82, 2014.