

**EFICIÊNCIA DE TRANSMISSÃO DE *Xylella fastidiosa*
POR CIGARRINHAS (HEMIPTERA, CICADELLIDAE) EM
Citrus sinensis (L.) OSBECK E *Coffea arabica* L.**

ROSANGELA CRISTINA MARUCCI

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. **JOÃO ROBERTO SPOTTI LOPES**
Co-orientador: Prof. Dr. **RODNEY RAMIRO CAVICHIOLI**

Tese apresentada à Escola Superior de
Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade
de São Paulo, para obtenção do título de
Doutor em Ciências, Área de Concentração:
Entomologia.

PIRACICABA

Estado de São Paulo – Brasil

Janeiro – 2003

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Marucci, Rosangela Cristina

Eficiência de transmissão de *Xyella fastidiosa* por cigarrinhas (Hemiptera, Cicadellidae) em *Citrus sinensis* (L.) Osbeck e *Coffea arabica* L. / Rosangela Cristina Marucci. -- Piracicaba, 2003.

139 p. : il.

Tese (doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2003.
Bibliografia.

1. Cafeicultura 2. Cigarrinhas 3. Citricultura 4. Clorose-variegada-dos-citros 5. Hábito alimentar animal 6. Insetos vetores I. Título

CDD 632.752

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

Aos meus Pais: Romário e Marilena;

A quem devo tudo que sou, minha educação,
persistência e autoconfiança.

Por me ensinarem que a vida é repleta de desafios a
serem superados a cada dia, sem jamais desistir.

E

Aos meus Avós: Luís Armando e Lídia;

Pelos exemplos de vida, trabalho e fé.

A quem admiro e respeito.

Dedico

À minha irmã: Regiane;

Por seus exemplos de determinação e persistência.

Pela união, cumplicidade e alegria sempre
presentes em nossas vidas.

E

Ao meu noivo: Silvano;

Por sua presença incondicional em todos os
momentos, pelos incentivos, carinho e amor.

Por me mostrar que a vida pode ser
infinitamente melhor do que se pode
imaginar ou sonhar.

Ofereço

AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte infinita de sabedoria, por sua presença e apoio incondicional em todos os momentos de minha vida.

Ao Prof. Dr. João Roberto Spotti Lopes, pela orientação, confiança, amizade e principalmente por seu entusiasmo como pesquisador que foi imprescindível para a concretização deste trabalho e para meu desenvolvimento profissional.

Ao Prof. Dr. José Djair Vendramim, pelo auxílio na elaboração e execução dos experimentos de comportamento e por seus exemplos de dedicação e profissionalismo.

Ao Prof. Dr. Rodney Ramiro Cavichioli, da Universidade Federal do Paraná, por sua amizade, incentivos e por todas as sugestões e críticas no transcorrer deste trabalho.

Ao Prof. Dr. José Eduardo Corrente do Departamento de Ciências Exatas e à pesquisadora Ivani Pozar Otsuk do Instituto de Zootecnia de Nova Odessa, pelo auxílio com as análises estatísticas e interpretação dos resultados.

Aos professores do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da ESALQ/USP, pelos ensinamentos transmitidos; em particular ao Prof. Dr. José Roberto P. Parra, pela viabilização do transporte das mudas para a Fazenda Areão; ao Prof. Dr. Sérgio B. Alves pelo uso de equipamentos em seu laboratório e ao Prof. Dr. Sérgio F. Pascholati pelo apoio financeiro.

Ao Prof. Celso Omoto e demais professores responsáveis pela disciplina Entomologia Geral, pela possibilidade de participar do PAE de uma maneira mais ativa e atuante que muito contribuiu para minha formação profissional.

À Profa. Dra. Eliana G. Lemos, do Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal (UNESP), pela concessão de reagentes e treinamento na técnica de nested-PCR para detecção de *Xylella* nas cigarrinhas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos, ao Fundo de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Programa Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento do Café – PNP&D/Café – EMBRAPA, pelo apoio financeiro aos experimentos de transmissão.

Ao Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus), pelo fornecimento das mudas cítricas e pelo apoio financeiro.

Ao pesquisador Dr. Pedro T. Yamamoto, pela viabilização das coletas de cigarrinhas e aos coletores, Antonio A. Mamprim, Mario L. Groti e José de F. Barbosa pela constante colaboração.

Ao pesquisador Dr. Adalton Raga, do Instituto Biológico de Campinas e à Cooperativa de Garça pelo apoio na obtenção das mudas de café.

Às bibliotecárias Eliana M. Garcia e Silvia Zinsly, da Divisão de Biblioteca e Documentação/ESALQ, pela colaboração na correção das referências bibliográficas e normas da tese.

À equipe de trabalho do Laboratório de Insetos Vetores: André, Charles, Érica, Fernanda, Flávio, Helen, Marcelo, Maria Teresa, Miguel, Paulo César, Rafael, Rodrigo Marques, Simone, Teresinha e Thiago, pelo auxílio na realização e avaliação dos experimentos e pela convivência harmoniosa que foram imprescindíveis para a concretização deste trabalho.

Ao funcionário José Carlos R. Castilho pelo auxílio no transporte das mudas para a Fazenda Areão e irrigação das plantas nos finais de semana e feriados e ao Sr. Joaquim pela irrigação e cuidados com as plantas mantidas na Fazenda Areão.

Ao Biólogo Heraldo Negri pelas fotos de cigarrinhas.

Às amigas Cláudia M. Toffanelli, Marina R. Frizzas, Mônica J.B. Pereira, Ranyse, B.Q. Silva, Rita C.R.G. Gervásio e Teresinha A. Giustolin, pela oportunidade de convívio mais intenso, pelas críticas, sugestões e auxílio durante o curso.

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

Aos funcionários do Setor de Entomologia da ESALQ/USP, pelo apoio e simpatia com que sempre me trataram.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	x
SUMMARY.....	xii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Caracterização da bactéria <i>Xylella fastidiosa</i> Wells et al.....	4
2.2 Doenças causadas por <i>X. fastidiosa</i>	6
2.3 Diversidade genética entre as estirpes de <i>X. fastidiosa</i>	8
2.4 Patologia e sintomatologia de <i>X. fastidiosa</i> em citros e cafeeiro.....	10
2.5 Epidemiologia e transmissão de <i>X. fastidiosa</i> em citros e cafeeiro.....	13
2.6 Mecanismos de transmissão de <i>X. fastidiosa</i>	17
2.7 Comportamento alimentar das cigarrinhas.....	20
2.8 Técnicas de detecção de <i>X. fastidiosa</i>	23
2.8.1 Detecção de <i>X. fastidiosa</i> em plantas.....	23
2.8.2 Detecção de <i>X. fastidiosa</i> nos insetos vetores.....	26
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1 Obtenção e manutenção dos isolados de <i>X. fastidiosa</i>	29
3.2 Seleção de plantas não hospedeiras de <i>X. fastidiosa</i> para obtenção de cigarrinhas sadias.....	30
3.3 Obtenção e manutenção de cigarrinhas sadias.....	32
3.4 Experimentos de transmissão de <i>X. fastidiosa</i> por cigarrinhas em citros e cafeeiro.....	34
3.4.1 Análise dos dados.....	40
3.5 Testes de comportamento alimentar das cigarrinhas em citros.....	41
3.5.1 Estudos de preferência em livre escolha.....	41
3.5.1.1 Seleção na planta cítrica.....	41

3.5.1.2 Seleção do local de alimentação na planta cítrica.....	42
3.5.1.3 Seleção entre plantas cítricas com e sem brotação.....	42
3.5.1.4 Seleção entre plantas cítricas com sintomas de CVC e sadias.....	42
3.5.1.5 Seleção entre plantas infectadas assintomáticas e plantas sadias	43
3.5.1.6 Delineamento experimental e análise dos estudos de preferência.	43
3.5.2 Avaliação da taxa de ingestão em plantas sadias ou infectadas por <i>X. fastidiosa</i>	44
3.6 Técnicas de detecção de <i>X. fastidiosa</i>	46
3.6.1 Isolamento em meio de cultura.....	46
3.6.1.1 Teste de inibição do isolamento de <i>X. fastidiosa</i> por macerados vegetais.....	48
3.6.2 DAS-ELISA indireto.....	48
3.6.3 Testes de PCR.....	50
3.6.3.1 Nas plantas hospedeiras.....	50
3.6.3.2 Nos insetos vetores.....	53
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
4.1 Seleção de plantas não hospedeiras de <i>Xylella fastidiosa</i> Wells et al. para obtenção de cigarrinhas sadias.....	55
4.2 Obtenção e manutenção de cigarrinhas sadias.....	60
4.3 Transmissão de <i>X. fastidiosa</i> por cigarrinhas em citros e cafeeiro.....	63
4.3.1 Mortalidade durante o período de acesso à aquisição (PAA) e período de acesso à inoculação (PAI).....	63
4.3.2 Detecção de <i>X. fastidiosa</i> nos insetos vetores após o PAA.....	65
4.3.3 Detecção de <i>X. fastidiosa</i> em plantas-teste.....	68
4.3.3.1 Detecção de <i>X. fastidiosa</i> em função da espécie vetora.....	72
4.3.3.2 Detecção de <i>X. fastidiosa</i> em função da planta hospedeira.....	73
4.3.3.3 Detecção de <i>X. fastidiosa</i> em função da época de inoculação.....	75
4.3.4 Eficiência de transmissão de <i>X. fastidiosa</i> pelos insetos vetores.....	79
4.4 Testes de comportamento alimentar das cigarrinhas em citros.....	86
4.4.1 Estudos de preferência em livre escolha.....	86
4.4.1.1 Seleção na planta cítrica.....	88

4.4.1.2 Seleção do local de alimentação na planta cítrica.....	89
4.4.1.3 Seleção entre plantas cítricas com e sem brotação.....	95
4.4.1.4 Seleção entre plantas cítricas com sintomas de CVC e sadias.....	98
4.4.1.5 Seleção entre plantas infectadas assintomáticas e plantas sadias.....	103
4.4.2 Avaliação da taxa de ingestão em plantas sadias ou infectadas por <i>X. fastidiosa</i>	105
4.5 Considerações finais.....	109
5 CONCLUSÕES.....	112
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	114

**EFICIÊNCIA DE TRANSMISSÃO DE *Xylella fastidiosa* POR CIGARRINHAS
(HEMIPTERA, CICADELLIDAE) EM *Citrus sinensis* (L.) OSBECK E
Coffea arabica L.**

Autora: ROSANGELA CRISTINA MARUCCI

Orientador: Prof. Dr. JOÃO ROBERTO SPOTTI LOPES

Co-orientador: Prof. Dr. RODNEY RAMIRO CAVICHIOLI

RESUMO

Este trabalho foi realizado com o objetivo de estudar a eficiência de transmissão de *Xylella fastidiosa* por cigarrinhas em citros e cafeeiro, em relação a aspectos comportamentais e taxonômicos desses insetos vetores. Inicialmente, avaliou-se a ocorrência de infecção e sobrevivência de dois isolados de *X. fastidiosa* em plantas de boldo (*Vernonia condensata*) e lixeira (*Aloysia virgata*), que são usadas na criação de cigarrinhas. Nenhuma infecção foi detectada nessas plantas, em avaliações realizadas com poucos dias ou vários meses após a inoculação dos isolados por agulha. Hospedeiros imunes ao patógeno são ideais para obtenção de insetos vetores sadios. Desenvolveu-se, então, uma técnica de produção e manutenção de cigarrinhas sadias em plantas de boldo e laranja-doce, a partir de posturas obtidas de adultos coletados no campo. Com os insetos sadios da criação, iniciaram-se os experimentos de transmissão em citros e em cafeeiro com quatro espécies de cigarrinhas representativas das tribos Cicadellini (*Bucephalogonia xanthophis* e *Dilobopterus costalimai*) e Proconiini (*Homalodisca ignorata* e *Oncometopia facialis*), em quatro épocas de

inoculação: outono-inverno/2000; primavera/2000; verão/2000-2001 e primavera/2001. Não houve diferença na porcentagem de plantas positivas, inoculadas pelas cigarrinhas nas quatro épocas, mas no caso das plantas de café inoculadas mecanicamente durante o verão, houve menor taxa de infecção em relação às demais épocas. Em citros, a taxa de transmissão por um único indivíduo, foi maior para *H. ignorata* (30%) em relação à *B. xanthophis* (5%) e *O. facialis* (1,1%), mas não houve diferença para as quatro espécies em cafeeiro, cujas taxas de transmissão variaram de 1,2 a 7,2%. *H. ignorata*, foi mais eficiente na transmissão de *X. fastidiosa* para citros (30%) em relação ao cafeeiro (2,2%), enquanto que os demais vetores transmitiram a bactéria para os dois hospedeiros com eficiência semelhante. Não houve relação entre eficiência de transmissão e as divisões taxonômicas de Tribos (Cicadellini X Proconiini) dos vetores. Visando-se compreender a variável eficiência de transmissão entre as espécies em citros, realizaram-se testes de preferência de *D. costalimai* e *O. facialis* por diferentes partes da planta cítrica, plantas com ou sem brotação e plantas sadias ou infectadas por *X. fastidiosa*. Comparou-se também a taxa de ingestão por essas cigarrinhas, quando confinadas em plantas sadias x infectadas (sintomáticas ou não) por *X. fastidiosa*. Verificou-se para *D. costalimai* a importância das folhas no início da seleção hospedeira e a preferência dessa espécie pela nervura secundária da folha, seguida pelo ramo secundário. Já para *O. facialis* não houve diferença na preferência entre folhas e ramos secundários. Para as duas espécies, comprovou-se que a brotação aumenta a atratividade das plantas cítricas e que as plantas sadias são preferidas em relação às plantas com sintomas de CVC. No entanto, a preferência de *O. facialis* pelas plantas sadias não diferiu da preferência por plantas infectadas assintomáticas. A alimentação por *D. costalimai* é reduzida drasticamente quando confinada em plantas cítricas com sintomas de CVC, mas não em plantas infectadas sem sintomas. Já a taxa de ingestão por *O. facialis* não foi afetada pela presença de sintomas de CVC.

**TRANSMISSION EFFICIENCY OF *Xylella fastidiosa* BY SHARPSHOOTERS
(HEMIPTERA, CICADELLIDAE) IN *Citrus sinensis* (L.) OSBECK AND
Coffea arabica L.**

Author: ROSANGELA CRISTINA MARUCCI

Adviser: Prof. Dr. JOÃO ROBERTO SPOTTI LOPES

Co-adviser: Prof. Dr. RODNEY RAMIRO CAVICHIOLI

SUMMARY

The transmission efficiency of *Xylella fastidiosa* by sharpshooter leafhoppers was studied in *Citrus sinensis* and *Coffea arabica*, and analyzed in relationship to vector taxonomy and feeding behavior. A preliminary study was carried out to evaluate the ability of two isolates of *X. fastidiosa* to infect and survive in plants of *Vernonia condensata* and *Aloysia virgata*, which are vector rearing hosts. No infection was detected in these plant species assays either at short or long periods after needle inoculation of the bacterial isolates. By using these non-host plants of *X. fastidiosa*, a technique was developed to rear healthy sharpshooters from egg masses of field-collected insects. Transmission experiments were carried out in citrus and coffee plants with healthy adults of four sharpshooter species representative from the tribes Cicadellini (*Bucephalagonia xanthophis* and *Dilobopterus costalimai*) and Proconiini (*Homalodisca ignorata* and *Oncometopia facialis*), during four inoculation seasons: fall-winter/2000; spring/2000; summer/2000-2001; and spring/2001. There was no effect of season on transmission

efficiency by sharpshooters. Interestingly, coffee plants needle-inoculated in summer showed a lower rate of infection than those inoculated in the other seasons. In citrus, the transmission rate by single insects was higher for *H. ignorata* (30%) than for *B. xanthophis* (5%) e *O. facialis* (1.1%). There was no differences in transmission efficiency among the four vector species in coffee, whose mean transmission rates ranged from 1.2 to 7.2%. *H. ignorata* was more efficient as vector of *X. fastidiosa* in citrus (30%) than in coffee (2.2%), whereas the other vectors showed similar transmission rates in the two host plants. No relationship was found between transmission efficiency and taxonomic tribes (Proconiini x Cicadellini) of the four sharpshooter vectors tested. In order to understand the variable transmission efficiency of *X. fastidiosa* in citrus, choice studies were carried out to assess the preference of *D. costalimai* and *O. facialis* adults for different parts of the citrus plant, plants with x without young shoots and healthy x infected plants. Also, the ingestion rates of these vectors were compared when confined on healthy x infected (symptomatic or not) plants. It was observed that leaves play an important role in host selection by *D. costalimai*. This vector prefers to feed on the secondary leaf veins, followed by the secondary (youngest) branches, whereas *O. facialis* shows similar preferences for these parts of the plant. Both species prefer plants with young shoots, but not with CVC symptoms. However, *O. facialis* does not distinguish between healthy and asymptomatic infected plants. The ingestion rate by *D. costalimai* is drastically reduced when confined on citrus plants with CVC symptoms, but not in asymptomatic infected plants. No significant effect of *X. fastidiosa* infection (either symptomatic or asymptomatic) was found on the rate of sap ingestion by *O. facialis*.

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, a Clorose Variegada dos Citros (CVC) e a Atrofia dos Ramos do Cafeeiro (ARC) são duas doenças de importância econômica e de similar distribuição geográfica causadas pela bactéria endofítica *Xylella fastidiosa* Wells et al. Embora este seja um patógeno muito estudado na atualidade, principalmente após o seqüenciamento genético, tornando possível a compreensão das bases moleculares do desenvolvimento da doença, muitos aspectos da relação patógeno-hospedeiro-vetor necessitam de maiores esclarecimentos para adoção de medidas adequadas de manejo e controle dessas doenças.

X. fastidiosa é uma bactéria limitada ao xilema das plantas infectadas e de lento crescimento em meio de cultura especializado (Davis et al., 1981; Wells et al., 1987), embora em condições naturais esteja adaptada a um ambiente extremamente pobre em termos nutricionais. Sua transmissão entre plantas se dá através de cigarrinhas vetoras que também têm sua alimentação específica e localizada no xilema de diversas plantas hospedeiras (Purcell, 1989), por serem insetos tipicamente polípagos (Turner & Pollard, 1959). Nos insetos vetores, a bactéria se adere e multiplica na parte anterior do aparelho bucal (estomodéu) que apresenta características físicas, morfológicas e nutricionais semelhantes às dos vasos do xilema (Brlansky et al., 1983; Purcell et al., 1979).

Cigarrinhas especializadas em se alimentar no xilema são encontradas nas famílias Cicadellidae (Cicadellinae) e Cercopidae (Purcell, 1989). Testes de transmissão em citros já identificaram várias espécies de Cicadellinae como vetoras de *X. fastidiosa* (Descobertos, 1999) e testes preliminares, também

comprovaram a transmissão por uma dessas espécies em cafeeiro (Marucci et al., 2001).

Embora um pré-requisito para a transmissão seja a alimentação no xilema das plantas, tem-se observado uma variável eficiência de transmissão em citros entre as diversas espécies vetoras (0,3 a 17%) (Descobertos, 1999; Krügner et al., 2000; Yamamoto et al., 2002). Além disso, os dados disponíveis sugerem que as cigarrinhas da Tribo Cicadellini transmitem *X. fastidiosa* com maior eficiência que as da Tribo Proconiini (Krügner et al., 2000; Lopes et al., 1999; Yamamoto et al., 2002). Severin (1949) também observou diferenças na eficiência de transmissão da estirpe de videira de *X. fastidiosa*, agente causal da doença de Pierce (PD), entre as cigarrinhas das duas tribos.

O comportamento alimentar do vetor relacionado à aquisição e inoculação de *X. fastidiosa* é um dos prováveis fatores condicionantes da eficiência de transmissão, no entanto, há outros como, tempo gasto pelo vetor na alimentação em tecido infectivo, taxa de infectividade natural das espécies de cigarrinhas, sobrevivência de infecções iniciais (Purcell, 1981), concentração (Almeida et al., 2001; Hill & Purcell, 1997) e distribuição de *X. fastidiosa* (Mizubuti et al., 1994) nas plantas hospedeiras e épocas de inoculação (Purcell, 1981).

Em algumas regiões do Brasil as áreas de produção de citros e café são adjacentes (Li et al., 2001), com chances de ocorrência de inoculações cruzadas, principalmente por existirem espécies de cigarrinhas vetoras comuns às duas culturas, tais como *Oncometopia facialis* (Signoret) e *Dilobopterus costalimai* Young (Lopes et al., 1998; Paradela Filho et al., 1997). Li et al. (2001) observaram que a estirpe de CVC causa sintomas de ARC em plantas de café inoculadas mecanicamente, sugerindo que o mesmo poderia ocorrer naturalmente através da transmissão das cigarrinhas.

Em função das diversas variáveis condicionantes da eficiência de transmissão de *X. fastidiosa* por insetos, as possíveis relações epidemiológicas entre CVC e ARC devem ser pesquisadas urgentemente, principalmente por se tratar de duas estirpes do mesmo patógeno, transmitidas pelo mesmo grupo de cigarrinhas.

Assim, os objetivos deste trabalho foram comparar a transmissão de *X. fastidiosa* em citros e em cafeeiro por quatro espécies de cigarrinhas representativas das tribos Cicadellini e Proconiini, em quatro épocas de inoculação, bem como estudar o comportamento alimentar desses insetos em plantas de citros sadias ou infectadas pela bactéria, na tentativa de justificar a variável e baixa eficiência de transmissão entre os vetores de *X. fastidiosa*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Caracterização da bactéria *Xylella fastidiosa* Wells et al.

Inicialmente, acreditava-se que as doenças causadas por *X. fastidiosa* estivessem associadas a organismos habitantes do xilema do tipo rickettsia, em função das similaridades morfológicas e estruturais (Goheen et al., 1973; Hopkins & Mollenhauer, 1973). No entanto, estudos relacionando serologia, ultraestrutura, composição de DNA, proporção guanina + citosina e composição celular de ácidos graxos e lipídeos indicaram que *X. fastidiosa* e bactérias do tipo rickettsia são organismos pertencentes a diferentes grupos taxonômicos (Raju & Wells, 1986; Wells & Raju, 1984).

X. fastidiosa é uma bactéria gram negativa; catálise positiva; obrigatoriamente aeróbica; distinta por suas características ultraestruturais, incluindo parede celular espessa (multilaminar) e enrugada; dificuldade de desenvolvimento em meios convencionais de cultivo de bactéria e crescimento lento em meios especializados (Davis et al., 1981; Hopkins, 1977). Corresponde a pequenos bastonetes (0,3-0,5 µm de diâmetro e 1-5 µm de comprimento) com forma filamentosa comum em meio artificial (Davis et al., 1981, Wells et al., 1981). Está limitada ao xilema das plantas (Mollenhauner & Hopkins, 1976) ou às peças bucais (estomodéu) dos insetos vetores (Brlansky et al., 1983; Purcell et al., 1979). Constitui um grupo homogêneo e as estirpes são nutricionalmente fastidiosas (difíceis de cultivar), razão de sua denominação específica. A temperatura ótima de desenvolvimento está em torno de 26 a 28°C (bactéria mesofílica) e o pH ótimo varia de 6,5 a 6,9 (Wells et al., 1987). Feil & Purcell (2001) verificaram que populações de *X. fastidiosa* nos vasos do xilema da videira declinam quando a temperatura no vaso fica abaixo de 5°C.

O limiar mínimo de temperatura para o crescimento de *X. fastidiosa* em plantas deve estar entre 17° e 25°C. O crescimento in vitro ainda ocorre a 18°C, mas não a 12°C.

Nas plantas, a bactéria é observada embebida em uma matriz extracelular translúcida (Chagas et al., 1992) composta de polissacarídeos extracelulares sintetizados por enzimas (Simpson et al., 2000). Estruturas a semelhança de fímbrias são visíveis em observações de *X. fastidiosa* sobre microscópio eletrônico, tanto em plantas hospedeiras quanto nos insetos vetores (Raju & Wells, 1986). Em função da alta velocidade da seiva do xilema passando através de estreitas porções do estomodéu dos insetos, a adesão mediada pelas fímbrias pode ser essencial na colonização das cigarrinhas. Nas partes bucais do inseto, as células bacterianas são aderidas em arranjo ordenado, indicando uma adesão específica e polar (Brlansky et al., 1983), semelhante a um tapete de lã (Hill & Purcell, 1995a).

Acredita-se que as fímbrias estejam envolvidas tanto nas interações entre planta-bactéria quanto bactéria-bactéria durante a colonização dos vasos do xilema. O seqüenciamento da estirpe de *X. fastidiosa* de citros possibilitou a identificação de 26 genes codificando proteínas responsáveis pela biogênese e função dos filamentos de fímbrias tipo IV (Simpson et al., 2000). Além disso, sugere-se que a formação de um biofilme seja o fator chave da virulência de *X. fastidiosa* às plantas, tendo um papel decisivo na oclusão mecânica dos vasos do xilema. A identificação dos genes e moléculas responsáveis por esta característica pode auxiliar na prevenção da fixação e desenvolvimento de biofilme no tecido das plantas e no estomodéu dos insetos, além da possibilidade de favorecer o deslocamento do biofilme formado nas plantas infectadas (Marques et al., 2002).

X. fastidiosa aparentemente tem funções metabólicas eficientes, tendo os açúcares como fonte principal de energia, além do carbono, sobrevivendo no ambiente do xilema pobre em nutrientes (Simpson et al., 2000). No entanto, o próprio tamanho do genoma pode estar relacionado ao seu ambiente natural, essencialmente invariável, implicando em opções metabólicas limitadas. Assim, quando *X. fastidiosa* é colocada em um ambiente mais rico em nutrientes,

como os meios de cultura, ela mostra-se incapaz de se desenvolver mais rapidamente por causa do seu comportamento fastidioso. Dessa forma, falta capacidade metabólica para tirar vantagens de nutrientes adicionais, por estar adaptada a sobreviver em um ambiente constante, mas nutricionalmente diluído (Van Sluys et al., 2002).

Nas plantas propagadas vegetativamente, como a maioria das frutíferas, a bactéria *X. fastidiosa* vem-se disseminando via material vegetal infectado que se utiliza na produção clonal de novas árvores, sendo um fator importante, sobretudo na dispersão a longas distâncias. Experimentalmente, o uso de borbulhas infectadas, a garfagem e a encostia de ramos contaminados, ou mesmo a perfuração de pecíolo ou ramos com agulha e a subsequente deposição de uma porção de suspensão da bactéria têm possibilitado a inoculação de hospedeiros com *X. fastidiosa* (Coletta Filho et al., 2000; Hartung et al., 1994; Li, 1997; Medina et al., 1998).

2.2 Doenças causadas por *X. fastidiosa*

No Brasil, *X. fastidiosa* tem sido responsável por doenças em culturas perenes de importância econômica como ameixa (French & Kitajima, 1978), citros (Rossetti et al., 1990) e café (Paradela Filho et al., 1995). O maior prejuízo econômico ocorre na cultura da laranja-doce que tem sofrido uma perda anual de cerca de 100 milhões de dólares. Entretanto, o prejuízo total na agricultura brasileira deve ser maior, porque os danos econômicos causados por *X. fastidiosa* nas culturas do café e da ameixa ainda não foram quantificados (Colleta Filho et al., 2001).

A escaldadura das folhas da ameixeira foi observada no Brasil e Paraguai em 1978 (French & Kitajima, 1978), embora já tivesse sido relatada na Argentina (Kitajima et al., 1975). Está limitada ao clima temperado dos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e São Paulo (Vale do Paranapanema) comprometendo a produção de ameixa nessas regiões (French & Feliciano, 1982).

A Clorose Variegada dos Citros (CVC) foi detectada no Brasil em 1987, nos Estados de São Paulo e Minas Gerais, em plantas de laranja-doce, devido ao aparecimento de sintomas de clorose foliar e presença de frutos pequenos nas plantas (Rossetti et al., 1990). Encontra-se disseminada em quase todas as regiões do país (Goes et al., 1993; Laranjeira et al., 1996; Lee et al., 1991; Leite & Jacomino, 1993; Mizubuti et al., 1994; Tubelis et al., 1993) e também ocorre na Argentina, com o nome de 'pecosita', desde 1984 (Brlansky et al., 1991; Contreras, 1992).

Alguns anos depois, *X. fastidiosa* foi encontrada em café (Beretta et al., 1996) causando a Requeima das folhas do cafeeiro (RC) (Lima et al., 1998) ou Atrofia dos ramos do cafeeiro (ARC) (Paradela Filho et al., 1995 e 1997), na mesma região em que se detectaram as primeiras plantas com CVC (Paradela Filho et al., 1999). Além do Brasil, *X. fastidiosa* já foi detectada em café na Costa Rica, embora com outro padrão de sintomatologia, devido, provavelmente, às diferentes condições climáticas (Rodríguez et al., 2001).

Como as áreas de produção de citros e de café do estado de São Paulo, Paraná e Minas Gerais são adjacentes (Li et al., 2001), as possíveis relações epidemiológicas entre ARC e CVC devem ser pesquisadas urgentemente (Quin et al., 2001). A epidemiologia das duas doenças torna-se mais complexa por envolver duas estirpes de *X. fastidiosa* aparentemente distintas e duas plantas hospedeiras visitados pelo mesmo grupo de cigarrinhas vetoras.

A presença de *X. fastidiosa* em plantas de cafeeiro em regiões onde não existem plantações de citros e, portanto, não ocorre a CVC, levanta a possibilidade de que a bactéria tenha se originado em cafeeiro, disseminando-se posteriormente para laranjeiras, pois na região onde apareceu a CVC existiam muitas lavouras cafeeiras (Paradela Filho et al., 1997). Segundo esses autores, outro fato que reforça esta hipótese é que as cigarrinhas consideradas vetoras de *X. fastidiosa* em citros, *Acrogonia terminalis* Young, *Dilobopterus costalimai* Young e *Oncometopia facialis* (Signoret), são constantemente encontradas em plantas de café.

Nos Estados Unidos, *X. fastidiosa* é responsável por doenças em videira, pessegueiro, alfafa, amendoeira, amoreira, ameixeira, vinca e espécies

florestais como olmo, carvalho, plátano, bordo, oleandro e outras (Hartman et al., 1995; Hopkins, 1989; Hopkins & Adlerz, 1988; Hopkins & Mollenhauer, 1973; McCoy et al., 1978; Purcell, 1980 e 1997; Purcell & Hopkins, 1996; Raju et al., 1982; Sherald, 1993; Sherald & Kostka, 1992; Sherald et al., 1987; Wells et al., 1983).

Embora as doenças causadas por *X. fastidiosa* tenham sido relatadas exclusivamente no continente americano (Hopkins, 1989), a bactéria já foi detectada na Ásia, em amendoeira na Índia (Jindal & Sharma, 1987) e em pereira em Taiwan (Leu & Su, 1993) e na Europa, em videira (Berisha et al., 1996 e 1998). O clima parece desempenhar o maior papel na distribuição geográfica das doenças causadas por este patógeno; assim, climas tropicais e subtropicais, incluindo o mediterrâneo são, provavelmente, os que favorecem o desenvolvimento de *X. fastidiosa* (Purcel, 1997).

2.3 Diversidade genética entre as estirpes de *X. fastidiosa*

Todas as estirpes de *X. fastidiosa* são classificadas e descritas como uma única espécie (Chen et al., 1992; Henderson et al., 2001; Wells et al., 1987), no entanto, há uma relação complexa e bem definida entre os hospedeiros e as estirpes deste patógeno (Freitag, 1951; Hopkins, 1989), sendo estas consideradas patogenicamente especializadas (Henderson et al., 2001; Monteiro et al., 2001). Além disso, existe variabilidade genética suficiente para justificar a separação ao nível subespecífico ou patovar (Chen et al., 1992; Henderson et al., 2001; Hopkins, 1989; Wells et al., 1987), embora Henderson et al. (2001) tenham encontrado uma baixa variabilidade na sequência da região intergênica 16S-23S rRNA entre as estirpes de *X. fastidiosa* estudadas, indicando que são filogeneticamente relacionadas.

Segundo Albibi et al. (1998), as técnicas utilizadas para separar as estirpes de *X. fastidiosa* incluem sensibilidade a antibióticos, meios de culturas de desenvolvimento diferencial, comprimento polimórfico dos fragmentos de restrição (RFLP), reação da polimerase em cadeia (PCR) e amplificação polimórfica de DNA ao acaso (RAPD). RFLP e estudos de hibridização DNA-DNA

revelaram diferenças entre a estirpe de videira e as estirpes do pessegueiro, ameixeira e vinca (Chen et al., 1992). Análises de RAPD distinguem a estirpe de café da estirpe de citros (Costa et al., 2000b; Rosato et al., 1998), embora similaridades entre as duas estirpes tenham sido sugeridas por alguns autores (Ferreira et al., 2000; Lima et al., 1998; Paradela Filho et al., 1997). Dessa forma, alguns grupos genéticos de *X. fastidiosa* poderiam representar espécies distintas (Hendson et al., 2001).

Para as estirpes norte americanas, reconhece-se pelo menos dois patovares com hospedeiros específicos. A doença de Pierce da videira (PD), a escaldadura da folha da amendoeira (ALS) e o nanismo da alfafa (AD) são todas causadas pela mesma estirpe de *X. fastidiosa*. Similarmente, há patogenicidade cruzada entre as estirpes que causam escaldadura da folha da ameixeira (PLS) e redução do porte do pessegueiro (PP). Porém, segundo Sherald (1993), não há evidência de patogenicidade cruzada entre estes dois grupos. Os requerimentos nutricionais das estirpes de ameixeira e videira são diferentes, mesmo sendo ambos patógenos limitados ao xilema e transmitidos por cigarrinhas. Pode-se considerar que essas duas estirpes são fisiologicamente e patogenicamente distintas, ao passo que as estirpes de ameixeira e pessegueiro são patogenicamente e serologicamente similares (Raju et al., 1982).

Embora alguns autores (Chen et al., 1995; Costa et al., 2000b; Pooler & Hartung, 1997; Rosato et al., 1998) sugiram que as estirpes de *X. fastidiosa* possam ser taxonomicamente diferenciadas em subespécies ou patovares, é importante ter em mente que a habilidade das várias estirpes de infectar e causar doenças em diversas plantas hospedeiras necessita ser melhor examinada antes de uma nova designação (Hendson et al., 2001). Além disso, a separação entre as estirpes de *X. fastidiosa* pode ser consistente com a área geográfica (Quin et al., 2001). Uma avaliação da diversidade genética entre as estirpes de *X. fastidiosa* permitiu verificar que a estirpe de ameixeira nos EUA está agrupada com a de videira; no entanto, a estirpe de ameixeira isolada no Brasil está agrupada com as estirpes brasileiras de citros e de café, havendo

inclusive baixa similaridade entre as estirpes americanas e brasileiras (Costa et al., 2000b).

Alguns trabalhos têm mostrado que os isolados de *X. fastidiosa* de citros e café são morfologicamente, serologicamente e geneticamente relacionados (Costa et al., 2000b; Lima et al., 1998; Paradela Filho et al., 1995; Rosato et al., 1998). As estirpes de citros estão presumivelmente mais adaptadas a viver em plantas de citros do que nas de café. No entanto, observou-se que a inoculação mecânica da estirpe de CVC em plantas de café pode produzir os mesmos sintomas de ARC (Li et al., 2001).

A despeito do grande número de trabalhos de caracterização molecular e serológica da estirpe de café de *X. fastidiosa*, praticamente inexitem informações a respeito de aspectos ecológicos, tais como relação com plantas hospedeiras e insetos vetores, gama de espécies vetoras e eficiência de transmissão.

2.4 Patologia e sintomatologia de *X. fastidiosa* em citros e cafeeiro

Os sintomas foliares causados por *X. fastidiosa* sugerem que o estresse hídrico está envolvido no desenvolvimento da doença (Lee et al., 1982; Mollenhauer & Hopkins, 1974). Folhas de videira com 30% de clorose e necrose marginal têm um nível elevado de prolina em relação a folhas sadias da mesma idade, o que é uma evidência de que as folhas estão em estresse hídrico (Goodwin et al. 1988). Um exame de folhas e pecíolos doentes mostrou que 40% dos vasos foram colonizados, porém apenas 50%, estavam totalmente obstruídos (Mollenhauer & Hopkins, 1976). Um estudo posterior mostrou que 78% dos vasos da nervura foliar e 12% do pecíolo foram colonizados na época de desenvolvimento dos sintomas em variedades suscetíveis de videira (Hopkins, 1981).

Devido ao baixo número de vasos do xilema obstruídos e à falta de uma visível murcha das folhas doentes, tem-se levantado a hipótese de que alguma toxina cause clorose marginal e necrose (Goodwin et al., 1988; Lee et al., 1982; Raju & Wells, 1986). Resultados do seqüenciamento genético indicaram que os

mecanismos associados a patogenicidade e virulência de *X. fastidiosa* envolvem toxinas, antibióticos e sistema de seqüestro de íons, tanto nas interações bactéria-bactéria quanto bactéria-hospedeiro (Simpson et al., 2000).

Embora não seja possível determinar se a causa primária do sintoma de estresse hídrico é o entupimento físico do xilema ou o efeito da presença da bactéria, ou de alguma substância produzida, sobre os estômatos, evidencia-se que o estresse hídrico aparece antes dos sintomas foliares da CVC (Dal Bosco et al., 2001). Em videira, geralmente os sintomas se desenvolvem das folhas velhas para as novas, diminuindo de acordo com a posição da folha (Goodwin et al., 1988).

Queiroz-Voltan et al. (1998) e Queiroz-Voltan & Paradela Filho (1999) estudaram os distúrbios fisiológicos em cafeeiro e citros, respectivamente, infectados com *X. fastidiosa* e verificaram, nos ramos com sintomas, deposição de goma nos vasos do xilema de frutos, caule, pecíolo e nervura; divisões celulares anormais e número reduzido de cloroplastos no mesófilo, associado a uma concentração maior de cristais arenosos de oxalato de cálcio.

Em citros, os principais sintomas observados são clorose foliar, similar à deficiência de zinco, mais facilmente observado nas folhas mais velhas, as quais apresentam pontuações pardas visíveis em ambos os lados do limbo foliar que podem coalescer e formar áreas necrosadas. Ocorre redução das brotações, menor desenvolvimento das plantas e presença de frutos miúdos, duros, com alto teor de açúcar e inadequados à comercialização (Carlos et al., 1997; Lee et al., 1991; Rosseti et al., 1990).

As árvores cítricas são mais suscetíveis quando estão com idade de 2 a 8 anos, embora plantas em viveiro também possam ser afetadas. Nas árvores mais velhas, os sintomas de CVC geralmente ocorrem em padrão setorial com pouca dispersão para os ramos adjacentes. Os sintomas são mais severos no começo do outono, época que coincide com a paralisação do desenvolvimento dos frutos nos galhos sintomáticos (Beretta et al., 1993a). Palazzo & Carvalho (1992) verificaram que a incidência e a intensidade dos sintomas de CVC em folhas, aumenta nos períodos de maior desenvolvimento vegetativo das plantas cítricas, ou seja, entre a primavera e verão. Laranjeira et al. (1998a) também

chegaram a essa conclusão, levantando-se a hipótese de que infecções efetivas de *X. fastidiosa* somente ocorrem nessa época do ano.

Em cafeeiro, os ramos das plantas infectadas apresentam-se invariavelmente com os internódios curtos e um tufo de folhas na ponta. Posteriormente, as folhas caem e os ramos ficam secos com aspecto de varetas (Paradela Filho et al., 1997). Ocorre necrose apical e marginal da folha, redução no tamanho e quantidade de frutos e total atrofia da planta (Li et al., 2001; Lima et al., 1998). Os sintomas são mais evidentes no inverno, especialmente durante o período de estresse hídrico. Na primavera, com as chuvas, as plantas se recuperam (Lima et al., 1998).

Até recentemente não eram conhecidos os mecanismos que permitiam *X. fastidiosa* mover-se sistemicamente ou sobreviver no ambiente diluído do xilema, embora provavelmente sua patogenicidade seja dependente desse fator (Fry et al., 1994). Fry & Milholland (1990) e Hopkins (1985) observaram que a intensidade dos sintomas em videiras em resposta à infecção por *X. fastidiosa* está relacionada à concentração bacteriana. A relação entre a concentração de *X. fastidiosa* e o movimento sistêmico sugere que a multiplicação bacteriana resultando em altas concentrações (log 7-9 UFC/g) é necessária para o movimento sistêmico (Hill & Purcell 1995b).

O período compreendido entre a inoculação e o aumento da população de *X. fastidiosa* corresponde, provavelmente, ao estabelecimento da bactéria no hospedeiro. As plantas mais velhas parecem ter um maior fluxo de transpiração e serem capazes de transportar a bactéria para ramos mais distantes do que as plantas jovens. Assim, em geral, a translocação da bactéria nos pecíolos parece ser um indicativo da posição relativa da bactéria nos ramos (Fry & Milholland, 1990). O deslocamento de *X. fastidiosa* para as raízes foi observado em citros e não está relacionado com a resistência do porta-enxerto a CVC, podendo mover-se rapidamente no sentido descendente, talvez tão rápido quanto o movimento ascendente (He et al., 2000). No entanto, o mecanismo usado para mover-se sistemicamente ainda não é totalmente conhecido.

A hipótese de Hopkins (1989) é que a bactéria pode mover-se através das pontuações do xilema (*pit membrane*) para os outros elementos dos vasos, sendo essas pontuações compostas de celulose, hemicelulose, substâncias pectínicas, lignina e proteína. Wells et al. (1987) relatam que estirpes de *X. fastidiosa* de vários hospedeiros produzem proteases extracelulares. Assim, as enzimas pectolíticas, proteolíticas e celulolíticas que não são produzidas em meio de cultura, podem ser sintetizadas nos hospedeiros degradando sua parede celular. Além disso, essas enzimas podem ser liberadas no xilema em resposta à presença da bactéria e romper as pontuações, permitindo seu movimento sistêmico (Hopkins, 1989).

O seqüenciamento genético reforçou essa hipótese, pois comprovou-se que *X. fastidiosa* apresenta um sistema tipo II de secreção, provavelmente envolvido na exportação de enzimas que degradam a parede celular, incluindo endoglucanase, poligalacturonase e talvez diversas proteases. Uma das possíveis funções dessas enzimas está na degradação das pontuações, permitindo o movimento da bactéria para vasos ainda não colonizados (Dow & Daniels, 2000). A natureza dos genes da estirpe de citros sugere a existência de numerosos mecanismos potenciais de patogenicidade, assim como hidrólise da parede celular, adesão, migração intervastos e toxicidade (Simpson et al., 2000).

2.5 Epidemiologia e transmissão de *X. fastidiosa* em citros e cafeeiro

Os insetos vetores de *X. fastidiosa* restringem-se a grupos taxonômicos que têm sua alimentação localizada no xilema das plantas, tais como as cigarrinhas das famílias Cicadidae, Cercopidae e Cicadellidae (subfamília Cicadellinae). Os nutrientes diluídos, indubitavelmente, têm moldado a evolução dos alimentadores do xilema através de um sistema digestivo altamente eficiente (Purcell, 1989). Os cicadelineos apresentam cabeça relativamente grande em relação ao tamanho do corpo e musculatura do cibário bem desenvolvida, como adaptações para alimentação no xilema que circula nas plantas sob pressão negativa (Nielson, 1985).

A ampla distribuição e a rápida dispersão da CVC no Brasil sugeriu a transmissão associada a insetos vetores (Beretta et al., 1993a). Levantamentos e observações de campo, associados aos estudos de transmissão de *X. fastidiosa* por cigarrinhas vetoras identificaram inicialmente cinco espécies da subfamília Cicadellinae como vetoras: *D. costalimai*, *O. facialis*, *A. terminalis* (Lopes et al., 1996; Roberto et al., 1996), *Bucephalagonia xanthophis* (Berg) e *Plesiommata corniculata* Young (Krüchner et al., 2000). Recentemente, mais seis espécies vetoras foram relatadas: *Ferrariana trivittata* (Signoret), *Macugonalia leucomelas* (Walker), *Parathona gratiosa* (Blanchard), *Sonesimia grossa* (Signoret), *Acrogonia virescens* (Metcalf) e *Homalodisca ignorata*. Melichar (Descobertos, 1999, Yamamoto et al., 2002). Dessas, sete espécies pertencem à tribo Cicadellini e quatro à tribo Proconiini.

Cigarrinhas vetoras de *X. fastidiosa* têm uma ampla gama de plantas hospedeiras (Hopkins, 1995). Em um levantamento dos vetores da PD na Flórida, foram observados adultos de *Oncometopia nigricans* (Walker) em 63 plantas hospedeiras e as ninfas em 41; adultos de *Homalodisca coagulata* (Say) foram observados em 46 hospedeiros e as ninfas em 33. (Adlerz, 1980).

Em função da proximidade entre pomares e cafezais no norte do Estado de São Paulo, suspeitou-se que as mesmas espécies vetoras pudessem estar envolvidas na disseminação da CVC e da ARC. Em levantamentos realizados nessa região, observaram-se 23 espécies comuns entre as duas culturas, sendo que dois vetores que ocorrem em citros, *D. costalimai* e *O. facialis*, também são observados em cafeeiro (Lopes et al., 1998). No entanto, somente *D. costalimai* foi confirmada como vetora de *X. fastidiosa* para cafeeiro em testes preliminares de transmissão da estirpe de café (Marucci et al., 2001). A detecção de *X. fastidiosa* em cigarras (Cicadidae) e sua transmissão para plantas de café também já foram confirmadas (Paião et al., 2002).

Os insetos que apenas contactam o xilema não são vetores de *X. fastidiosa* (Purcell, 1989). Mas, todos os insetos que se alimentam a seiva do xilema são, teoricamente, vetores potenciais (Pooler et al., 1997). Embora a alimentação no xilema seja um requisito básico para transmissão por vetores, tem-se observado uma eficiência variável de transmissão entre as cigarrinhas

vetoras em citros, sendo que as cigarrinhas da tribo Cicadellini tendem a ser mais eficientes que as da tribo Proconiini (Krügner et al., 2000; Lopes, 1996). Severin (1949) observou que as espécies de *Pagaronia* e *Oncometopia* (Proconiini) são bem menos eficientes que as cigarrinhas vetoras da tribo Cicadellini na transmissão de *X. fastidiosa* para videira.

Mejdalani (1998) encontrou algumas modificações no clipeo e cibário de uma espécie de Proconiini que não foram observadas em Cicadellini. Diferenças anatômicas no aparelho bucal das espécies podem estar correlacionadas com a otimização dos movimentos de alimentação (Backus, 1988), influenciando conseqüentemente na aquisição e inoculação de *X. fastidiosa*, e representando talvez, a base para a transmissão diferencial entre as espécies vetoras.

Segundo Freitag (1951), parece não haver correlação entre a planta hospedeira da bactéria e da cigarrinha. Muitas plantas hospedeiras das cigarrinhas podem não ser suscetíveis à bactéria e/ou vice-versa. Além disso, a resistência à infecção de *X. fastidiosa* pode sucumbir sob condições climáticas favoráveis. Esse autor encontrou 36 plantas pertencentes a 18 famílias naturalmente infectadas por *X. fastidiosa*, e através de testes de transmissão com insetos em 116 espécies de plantas, identificou 91 hospedeiros da estirpe de *X. fastidiosa* de videira; muitos desses assintomáticos.

Há relatos de que a bactéria infecta cerca de 30 famílias de plantas incluindo mono e dicotiledôneas (Hopkins, 1989). Muitas, entretanto, não desenvolvem sintomas quando infectadas (Sherald, 1991). Listas de plantas hospedeiras de *X. fastidiosa* nos EUA podem ser encontradas nos trabalhos de Hopkins (1989); Hopkins & Adlerz (1988) e Purcell & Saunders (1999).

Estudos realizados por Hill & Purcell (1995b) mostraram que a taxa de multiplicação, a translocação e a concentração máxima de *X. fastidiosa* varia com a planta hospedeira. Além disso, a eficiência de transmissão acaba sendo menor em alguns hospedeiros em relação à videira e poucas plantas desenvolvem sintomas de infecção por *X. fastidiosa*. A probabilidade de uma planta hospedeira servir como fonte de aquisição de *X. fastidiosa* pelo vetor depende da sua atratividade e aceitabilidade para alimentação do inseto. A

importância dos hospedeiros alternativos na disseminação da doença depende da sua habilidade em permitir a multiplicação e o movimento sistêmico da bactéria (Hill & Purcell, 1995b). Assim, espécies de plantas com altas populações bacterianas e infecção sistêmica somente são consideradas importantes fontes epidemiológicas de dispersão de *X. fastidiosa* para videiras se garantirem uma maior eficiência na aquisição pelo vetor (Hill & Purcell, 1997). A transmissão pelo vetor não ocorre antes que a população de *X. fastidiosa* na planta-fonte atinja 10^4 UFC/g, sendo que a taxa de transmissão aumenta na medida em que a população bacteriana na planta-fonte também aumenta (Hill & Purcell, 1997). Deve-se considerar, entretanto, que a população bacteriana flutua estacionalmente nas plantas hospedeiras (Raju et al., 1983).

No Brasil, *X. fastidiosa* foi detectada em 11 espécies de plantas invasoras em pomares de ameixa infectados (Leite et al., 1997), assim como em 11 hospedeiros em pomares de citros com CVC (Travensolo & Leite Júnior 1996). O papel epidemiológico e a importância relativa dos hospedeiros alternativos como fonte primária de inóculo, são ainda pouco compreendidos.

Laranjeira et al. (1998a) verificaram que a disseminação da CVC no norte do Estado de São Paulo ocorre principalmente de planta para planta dentro dos pomares ou de talhões vizinhos, e não das plantas daninhas para o citros. Assim, é provável que espécies de cicadélíneos mais especializados em citros tenham um papel mais relevante na disseminação da CVC que vetores predominantes na vegetação rasteira do pomar (Lopes, 1999).

As plantas hospedeiras de *X. fastidiosa*, além de atuarem como fonte para aquisição da bactéria pelos insetos, podem servir como hospedeiros experimentais da estirpe de citros, propiciando um rápido desenvolvimento de sintomas, como ocorre em fumo (*Nicotiana tabacum* L.) (Lopes et al., 2000) e vinca [*Catharanthus roseus* (L.)] (Monteiro et al., 2001). Além disso, algumas plantas podem ser hospedeiras das cigarrinhas vetoras e não favorecerem a multiplicação de *X. fastidiosa*, constituindo-se em hospedeiros imunes ao patógeno e, portanto, apropriados para criação ou manutenção de cigarrinhas sadias, essenciais aos estudos das relações patógeno-vetor.

A compreensão das relações entre as duas estirpes de *X. fastidiosa* afetando os diferentes hospedeiros e as relações com os vetores são extremamente necessárias. Como não existem caracteres taxonômicos muito consistentes na separação das tribos Cicadellini e Proconiini (Young, 1968; Young, 1977), caracteres morfológicos, comportamentais e bioecológicos contrastantes entre as cigarrinhas das duas tribos podem fornecer subsídios para melhor compreender a relação patógeno-vetor, principalmente em relação à eficiência de transmissão em dois patossistemas.

2.6 Mecanismos de transmissão de *X. fastidiosa*

A bactéria *X. fastidiosa* é transmitida de modo persistente e não circulativo por inúmeras espécies de cigarrinhas (Purcell, 1989) e não há evidência de transmissão transovariana de *X. fastidiosa* para a progênie (Freitag, 1951). Muitas informações sobre *X. fastidiosa* e seus vetores são oriundas dos estudos com os vetores associados à PD em videiras. Em citros, acredita-se que o modo de transmissão seja semelhante, podendo haver diferenças em algumas características da transmissão, como por exemplo, período de acesso à aquisição e/ou inoculação, persistência da bactéria no vetor e eficiência de transmissão (Lopes, 1996).

Uma vez infectivas, as cigarrinhas adultas podem transmitir *X. fastidiosa* indefinidamente, devido à capacidade da bactéria multiplicar-se no vetor (Hill & Purcell, 1995a; Severin, 1949). Ninfas de *Graphocephala atropunctata* (Signoret) perdem a habilidade em transmitir *X. fastidiosa* após a muda (Purcel & Finlay, 1979). Como o forro cuticular do estomodéu é perdido durante a ecdise, o inóculo provavelmente se restringe à parte anterior do aparelho digestivo e peças bucais. Além disso, o intervalo muito curto entre a aquisição e inoculação sugere que *X. fastidiosa* não é circulativa via glândula salivar e hemolinfa, não necessitando de um período latente no vetor para que ocorra a sua inoculação (Purcel & Finlay, 1979).

Embora as cigarrinhas consigam adquirir e inocular *X. fastidiosa* em poucas horas, a eficiência de transmissão aumenta com períodos de acesso à aquisição e inoculação mais longos (Purcell & Finlay, 1979). Além disso, a falta de um período latente perceptível sugere que um pequeno número de bactéria no estomodéu seja suficiente para a inoculação (Hill & Purcell, 1995a).

Tem-se observado uma baixa especificidade das espécies vetoras e variações na eficiência de transmissão entre estirpes de *X. fastidiosa*. Isso pode ser notado entre estirpes de citros (CVC) e videira (PD) (Lopes, 1999), pela mesma espécie de cigarrinha em plantas diferentes (Severin, 1949) e por vetores diferentes em citros (Krügner et al., 2000; Lopes, 1999).

Os estudos com CVC têm revelado uma baixa eficiência de transmissão de *X. fastidiosa* pelas cigarrinhas dos citros quando comparadas aos vetores da estirpe de PD. Vários podem ser os fatores condicionantes desse fato, tais como, baixa concentração da bactéria em citros (Almeida et al., 2001), o que poderia indiretamente, reduzir a eficiência de aquisição pelas cigarrinhas (Lopes, 1999), distribuição diferencial nos tecidos da planta (Mizubuti et al., 1994) e padrões comportamentais e bioecológicos das cigarrinhas por ocasião da alimentação e movimentação nos pomares (Purcell, 1985).

A eficiência de transmissão de *X. fastidiosa* é dependente de muitos fatores, incluindo eficiência de aquisição e inoculação, tempo gasto pelo vetor na alimentação em tecido infectivo, taxa de infectividade natural da população de cigarrinhas e sobrevivência de infecções iniciais (Purcell, 1981). Além disso, em alguns hospedeiros a bactéria se desenvolve lentamente, chegando a morrer algumas semanas após ter iniciado sua multiplicação (Hill & Purcell, 1995a; Purcell & Saunders, 1999).

Segundo Hill & Purcell (1997), altas populações de bactéria em plantas resultam em maiores taxas de transmissão. Em videira, a taxa de transmissão aumenta com o tempo de incubação após inoculação por agulha. Houve aumento na população bacteriana da planta entre 10 e 25 dias após inoculação mecânica, resultando em maior eficiência de transmissão pelos vetores quando a aquisição foi realizada aos 25 dias.

Outro fator interessante, ainda não estudado, seria a existência de possíveis diferenças estruturais no estomodéu entre as espécies de cigarrinhas, influenciando a inoculação. Tavella & Arzone (1993) encontraram variações morfológicas nos estiletos entre grupos distintos de cicadelídeos, mas há ausência de estudos com cicadelíneos. O atual mecanismo de inoculação pelo qual as células de *X. fastidiosa* são introduzidas no xilema das plantas a partir do vetor não é totalmente conhecido. Acredita-se que ocorra refluxo de seiva do estomodéu para a planta durante a alimentação da cigarrinha, através do qual, células bacterianas provenientes do vetor atingiriam o xilema (Purcell & Hopkins, 1996).

O cibário dos alimentadores do xilema pode ser considerado um microambiente altamente seletivo em função da baixa concentração de nutrientes, com alta velocidade de fluxo e turbulência durante a atividade alimentar (Purcell et al., 1979). Acredita-se que a inoculação possa ocorrer pela ação de uma forte bomba de sucção e o conseqüente fluxo de líquido durante a alimentação, que provavelmente desloca algumas células bacterianas, as quais seriam então expelidas através do canal alimentar para os vasos do xilema das plantas hospedeiras (Hopkins, 1989).

Uma transmissão eficiente de *X. fastidiosa* requer menos do que 100 células cultiváveis por cabeça de inseto, sendo que populações da bactéria acima desse número não aumentam a eficiência de transmissão (Hill & Purcell, 1995a). No entanto, a câmara de sucção no estomodéu das cigarrinhas (câmara do cibário) pode conter mais do que 1000 células bacterianas (Brlansky et al., 1983; Hill & Purcell, 1995a).

Nos vetores, as colônias de *X. fastidiosa* encontram-se restritas às paredes do cibário, ao sulco apodemal do diafragma e no forro cuticular do precibário (porção anterior e posterior da válvula pré-cibarial) (Purcell et al., 1979). A operação da válvula na alimentação das cigarrinhas e a localização da bactéria em relação à válvula podem ser importantes na transmissão de *X. fastidiosa* (Brlansky et al., 1983). Além disso, as adaptações de *X. fastidiosa* para aderir ao estomodéu dos alimentadores do xilema podem ser decisivas ou mesmo essenciais para a transmissão. A ocorrência da bactéria em agregados

sugere que perdas ocasionais de células agregadas da superfície do estomodéu do inseto sejam responsáveis pela inoculação da planta, mas essas perdas não são dependentes de uma alta população bacteriana. Provavelmente, as células bacterianas que são transferidas para as plantas residem no canal alimentar dos estiletes entre a porção anterior do pré-cibário e a válvula precibarial (Hill & Purcell, 1995a), já que esta regula o fluxo de líquidos dos estiletes para o cibário, representando um obstáculo ao movimento de massas de *X. fastidiosa* do cibário para o xilema das plantas (Brlansky et al., 1983).

2.7 Comportamento alimentar das cigarrinhas

Há longo tempo a alimentação dos hemípteros tem intrigado os entomologistas no que diz respeito à transmissão de patógenos de plantas. Infelizmente, os estudos alimentares envolvendo esses insetos são particularmente difíceis porque a penetração do aparelho bucal e a subsequente salivagem e ingestão ocorrem no interior do tecido da planta (Triplehorn et al., 1984). Os estiletes são certamente importantes na seleção hospedeira e dos locais de alimentação por receberem os estímulos de alimentação e serem o meio de aquisição e transmissão de patógenos pelas espécies vetoras (Forbes & Raine, 1973).

O estudo do comportamento alimentar das cigarrinhas vetoras de *X. fastidiosa* é um passo fundamental para compreensão da transmissão, pois durante esse processo ocorre a aquisição de células do patógeno das plantas infectadas e sua posterior inoculação em plantas sadias, iniciando-se o processo de colonização das plantas hospedeiras que não se restringem somente ao citros e cafeeiro, mais aos hospedeiros alternativos da área.

As preferências alimentares das espécies que se alimentam do xilema são largamente determinadas pelas diferenças no conteúdo de nutrientes na seiva do xilema entre as espécies de plantas (Brodbeck et al., 1990; Thompson, 1994) e entre partes da planta (Horsfield, 1977), ajustadas pelas mudanças diurnas na química da seiva do xilema (Brodbeck et al., 1993).

De um modo geral, todos os membros da subfamília Cicadellinae se alimentam no xilema (Nielson, 1985; Young, 1968), mas muitas espécies também ingerem fluidos de outros tecidos de preferência secundária. Por exemplo, 20% das provas feitas por *G. atropunctata* revelam ingestão no mesofilo ou floema (Backus, 1988). Além disso, essa cigarrinha excreta grandes quantidades de *honeydew* (até 2,5 ml em 24 h) (Backus, 1985), que é um indicativo de alimentação no xilema. Os insetos que se alimentam na seiva do xilema sobrevivem e se reproduzem numa fonte de alimento nutricionalmente e energeticamente muito diluída. Conseqüentemente, eles ingerem quantidades de seiva que são muitas vezes o volume do seu corpo (Andersen et al, 1989; Brodbeck et al., 1993).

O volume ingerido, contendo solutos em baixas concentrações, fica concentrado na câmara filtro (modificação do aparelho digestivo) onde o fluxo de água passa por osmose passiva, diretamente da extremidade anterior para a posterior do mesêntero (Cheung & Marshall, 1973b). Os nutrientes são filtrados fora ou concentrados na câmara filtro para que possam ser absorvidos no mesêntero (Cheung & Marshall, 1973a). Evidências histológicas e análise dos excreta de cicadelineos têm mostrado que a alimentação é limitada aos vasos do xilema de todas as plantas hospedeiras que foram examinadas (Andersen et al., 1989).

Um dos obstáculos à alimentação é que o xilema circula sobre pressão negativa, fazendo com que as cigarrinhas paralitem a alimentação durante altas temperaturas, quando o potencial da água causado por altas taxas de transpiração for superior a 2,4MPa (Brodbeck et al., 1993). A tensão do xilema pode não ser necessariamente um forte determinante da taxa de alimentação, porém, essa torna-se essencialmente limitada sob tensões menores que 2,1MPa (Andersen et al., 1992). A pressão hidrostática negativa torna necessário o uso constante dos músculos do cibário para que o fluido passe através da câmara cibarial (Backus & McLean, 1982).

Existem processos que parecem maximizar tanto a tomada quanto a utilização de nutrientes das plantas hospedeiras pelos insetos alimentadores do xilema, como a excreção de amônia como produto nitrogenado primário

(conservando o carbono); a alta eficiência na conversão de quase todos os componentes orgânicos (>98%); a alta taxa de alimentação (100-300 vezes o peso seco do corpo por dia) e a sincronização da atividade alimentar com a flutuação na química do fluido do xilema (Brodbeck et al., 1993).

Novotny & Wilson (1997) sugerem que os alimentadores do xilema têm maior tamanho que os do floema, pois consideram que o custo energético está associado ao tamanho do corpo e são polípagos, o que parece ser uma vantagem, em função da alimentação em uma dieta extremamente pobre. Há uma forte correlação entre a concentração de nutrientes e a preferência alimentar (Brodbeck et al., 1990, 1993 e 1995; Horsfield, 1977; Thompson, 1994), indicando que a limitação nutricional é comum nos alimentadores do xilema. Dessa forma, uma menor gama de plantas hospedeiras limitaria a escolha de uma fonte alimentar momentaneamente nutritiva (Novotny & Wilson 1997).

As ninfas alimentam-se em órgãos novos da planta, onde o xilema está localizado mais próximo da superfície. Já os adultos, podem atingir o xilema de órgãos jovens e velhos da planta (Houston et al., 1947). As fêmeas alimentam-se do mesmo modo e nas mesmas plantas hospedeiras que as ninfas. Dessa maneira, as sugestões que identificam a qualidade nutricional do alimento pela fêmea, podem também estimular a oviposição (Panda & Kush, 1995). A seleção para oviposição depende das características e da idade fisiológica das folhas (DeLong, 1971).

Há poucas informações quanto às preferências alimentares das cigarrinhas dos citros e, as que estão disponíveis restringem-se a observações de campo. Segundo Gravena et al. (1997) as cigarrinhas têm preferência por se localizarem em brotações ou na face da planta onde não incidem diretamente os raios solares e são atraídas pela coloração amarela. Aparentemente, cada espécie tem preferência por determinados tecidos (folhas, ramos e pecíolos) localizados em regiões específicas da planta cítrica (Gravena et al., 1997; Leite & Nakano, 2000; Yamamoto et al., 1997).

Como *X. fastidiosa* não se distribui de maneira uniforme nas plantas hospedeiras, a preferência alimentar dos vetores por partes específicas da

planta cítrica (folhas, ramos e pecíolos) ou pela fenologia (brotação, manifestação de sintomas) é de extrema importância para seleção de cigarrinhas eficientes na transmissão de *X. fastidiosa* e disseminação da CVC.

2.8 Técnicas de detecção de *X. fastidiosa*

Em função das próprias características da bactéria *X. fastidiosa*, tais como a baixa concentração e distribuição desuniforme nos tecidos vegetais, dificuldade de cultivo, presença de contaminantes e crescimento lento, sua detecção exige técnicas específicas, com alta sensibilidade, repetibilidade e rapidez.

Assim, as técnicas de detecção de *X. fastidiosa* em plantas e nos insetos vetores são de extrema importância para o diagnóstico das doenças, principalmente porque os patossistemas envolvem várias estirpes ou isolados, diversas plantas hospedeiras e uma ampla gama de insetos vetores com eficiência variável de transmissão. Além disso, nem todas as plantas infectadas por *X. fastidiosa* desenvolvem sintomas e, se estes estão presentes, são muito variáveis ou de ocorrência sazonal.

2.8.1 Detecção de *X. fastidiosa* em plantas

Para estudos de etiologia, o uso de anticorpos fluorescentes tem permitido a detecção de *X. fastidiosa* em plantas (Auger & Shalla, 1975; Brlansky et al., 1982), muitas vezes associado ao uso da microscopia eletrônica de varredura e transmissão (Brlansky et al., 1982). Porém, técnicas baseadas em microscopia demandam tempo, principalmente no caso de um grande número de amostras, e nem sempre permitem a nítida distinção entre as células de parede rugosa de *X. fastidiosa* e a matriz presente no xilema (Purcell & Hopkins, 1996).

Para facilitar a visualização das células de *X. fastidiosa*, Lima et al. (1997) desenvolveram uma técnica de extração de líquidos do xilema através da passagem forçada de água pelos pecíolos das folhas e observação em

microscópio ótico. Esse método consiste num teste rápido, barato e com sensibilidade de 100 a 300 bactérias/ μ l do extrato. No entanto, essas técnicas (microscópio de imunofluorescência, eletrônico e ótico) não são práticas para testes diagnósticos de rotina (Derrick & Beretta, 1996).

O isolamento primário de *X. fastidiosa* foi desenvolvido por Hopkins (1985), possibilitando uma estimativa da população de células viáveis de *X. fastidiosa* em videiras com PD. Para estudos com plantas hospedeiras diversas e insetos vetores, Hill & Purcell (1995a) introduziram uma modificação nessa técnica, permitindo a estimativa do número de unidades formadoras de colônia (UFC) por grama de tecido baseada no peso inicial das amostras e em diluições. Almeida et al. (2001) adaptaram-na para a quantificação de *X. fastidiosa* em citros. O limiar teórico de detecção dessa técnica é de cerca de 10^2 - 10^3 UFC/g, no entanto, ela não permite a detecção de estirpes de *X. fastidiosa* de difícil cultivo, está sujeita à presença de contaminantes diversos (Purcell, 1997) e algumas plantas podem conter substâncias que inibem o crescimento de *X. fastidiosa* em meio de cultura (Purcell & Saunders, 1999). Sua maior vantagem é a possibilidade de quantificar células viáveis com alta confiabilidade, desde que a identidade bacteriana seja confirmada por outros métodos envolvendo PCR ou serologia. A desvantagem é a demora na obtenção dos resultados (15 a 20 dias), com índices consideráveis de insucesso (Coletta Filho & Machado, 2001).

Os métodos serológicos também são empregados em testes diagnósticos de *X. fastidiosa*, tais como o DIBA (*dot immubinding assay*), ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) e *Western-blot*. Nesses testes são utilizados anticorpos policlonais contra *X. fastidiosa* (Coletta Filho & Machado, 2001).

O ELISA (Raju et al., 1983; Yonce & Chang, 1987) e o DIBA (Beretta et al., 1993b) têm sido amplamente desenvolvidos, mas apresentam baixa sensibilidade (Nomé et al., 1980) para detectar baixas populações de *X. fastidiosa* que ocorrem em algumas espécies de plantas, além do problema de detecção de falsos positivos (Hill & Purcell, 1995a e b). Mesmo assim, Leu et al. (1998) desenvolveram anticorpos capazes de revelar diferenças serológicas entre estirpes de *X. fastidiosa* com resultados similares aos obtidos por

análises de RAPD. Como vantagens, possibilitam a quantificação de *X. fastidiosa* (mortas ou vivas) nas amostras e o processamento de várias amostras ao mesmo tempo (Barnard et al., 1998). As desvantagens são a ocorrência de reações inespecíficas, baixa sensibilidade (mínimo 10^4 células por amostra) (Minsavage et al., 1994) e falhas em distinguir células vivas das mortas.

Em testes moleculares como o de PCR (*polymerase chain reaction*) (Henson & French, 1993), ocorre amplificação de seqüências específicas de DNA, que se tornam visíveis como bandas em gel após separação em um campo elétrico. O teste de PCR tem a vantagem de ser o método mais sensível, permitindo a detecção de apenas 10 a 100 células por reação (Pooler & Hartung, 1995), além de poder ser usado mesmo para amostras preservadas em freezer e possibilitar distinção entre as estirpes. Apresenta as desvantagens de não ser um método quantitativo e não distinguir o DNA da bactéria viva e da morta e ser afetado pela presença de outros microrganismos. Além disso, algumas substâncias químicas de ocorrência natural em plantas podem inibir a reação em cadeia da enzima polimerase, resultando em detecções negativas, mesmo que a presença de *X. fastidiosa* em plantas já esteja confirmada por outros métodos (Purcell & Hopkins, 1996).

Minsavage et al. (1994) relataram que a sensibilidade do teste de PCR é pelo menos 100 vezes maior do que a do ELISA para detecção de *X. fastidiosa*. Embora o ELISA seja conveniente para avaliar a infecção da bactéria nas plantas, o teste de PCR pode ajudar na resolução de resultados ambíguos de testes serológicos e na confirmação da identidade de isolados bacterianos. Além disso, o teste de PCR permite a detecção da bactéria nos estágios iniciais, antes do aparecimento dos sintomas na planta.

Para patógenos latentes como *X. fastidiosa*, é indicado sistemas de PCR em tempo real, baseados na hibridização de seqüências específicas de DNA. Esses sistemas combinam a alta sensibilidade do PCR com a alta especificidade do ácido nucleico, além de requererem pouco tempo para detecção (2 a 3 h) (Schaad et al., 2002). Segundo os autores, esses sistemas eliminam o tempo consumido na extração de DNA, tornando o sistema mais

fechado e eliminam contaminações cruzadas e corrida em gel de agarose. Entretanto, implicam na utilização de equipamentos sofisticados e onerosos. Essa técnica já foi adaptada para detecção da estirpe de citros de *X. fastidiosa* e permite quantificar o número de células bacterianas nas plantas infectadas naturalmente ou artificialmente, com alta sensibilidade e reprodutividade (Oliveira et al., 2002).

Mais de um método deve ser utilizado para a detecção de *X. fastidiosa*, devendo-se levar em consideração o número de amostras a serem processadas, rapidez, sensibilidade, praticidade, repetibilidade e confiabilidade do teste.

2.8.2 Detecção de *X. fastidiosa* nos insetos vetores

Yonce & Chang (1987) utilizaram-se do método de isolamento em meio de cultura para detectar *X. fastidiosa* em cigarrinhas durante um monitoramento na cultura de pêssego. O ELISA foi usado extensivamente para detecção de *X. fastidiosa* em insetos vetores (Raju & Wells, 1986; Yonce & Chang, 1987), porém, com limitações, devido sua baixa sensibilidade. O limite de detecção de *X. fastidiosa* por ELISA é da ordem de 10^4 células (Nomé et al., 1980), ou seja, duas ordens de magnitude acima do número de bactérias presentes no lúmen do canal alimentar do inseto vetor, necessário para uma eficiente transmissão deste (Hill & Purcell, 1995a).

Tebar et al. (1994) detectaram *X. fastidiosa* na cabeça de sete espécies de cigarrinhas coletadas em pomares com CVC, através de testes serológicos, tais como DAS-ELISA indireto, DIBA e *Western-blotting*. Essa foi uma das primeiras evidências de que as cigarrinhas estavam envolvidas na transmissão de *X. fastidiosa* entre plantas cítricas. Roberto et al. (1995) também detectaram *X. fastidiosa* nas cigarrinhas *D. costalimai*, *Acrogonia* e *O. facialis* por microscopia eletrônica, ótica ou ELISA.

O uso de técnicas moleculares para detectar *X. fastidiosa* nos insetos vetores, tem sido prejudicada pela presença de inibidores de PCR nos extratos de insetos. No entanto, a técnica da imunocaptura remove esses inibidores e permite a concentração e purificação da bactéria no inseto (Pooler et al., 1997).

Aliado a isso, o uso de um teste duplo de PCR (*nested-PCR*) aumenta a sensibilidade dos ensaios de PCR simples em aproximadamente 50-160 vezes (Hartung et al., 1996). O método de imunocaptura associado ao *nested-PCR* desenvolvido por Pooler et al. (1997) é muito sensível, permitindo a detecção de menos de 5 bactérias por cigarrinha, embora seja um método bastante oneroso.

Em função do baixo número de bactérias aderidas à parede cuticular do canal alimentar (Hill & Purcell, 1995a) e da possível presença de inibidores de PCR nos insetos vetores (Pooler et al., 1997), requer-se uma técnica especial para extração e purificação do DNA de *X. fastidiosa* nas cigarrinhas, mais simples e barata. Essa técnica envolve a utilização do Chelex 100 como agente que evita a degradação do DNA durante a fervura, por quelar íons metálicos que poderiam atuar como catalisadores na quebra do DNA em altas temperaturas, em soluções de baixa força iônica. Além disso, essa resina é facilmente removida das amostras e não interfere com o $MgCl_2$ durante a amplificação por PCR (Walsh et al., 1991).

Paião & Leite Júnior (2001) testaram três métodos de extração de DNA dos insetos vetores e verificaram que o método de extração tem pouca influência no *nested-PCR*, sendo a alta sensibilidade apresentada pela técnica (10 UFC/mL), o fator responsável pela detecção de *X. fastidiosa*.

É importante salientar que estes testes de detecção de *X. fastidiosa* não necessariamente revelam a habilidade do inseto vetor em transmitir a bactéria. Por exemplo, a infectividade do vetor pode ser perdida durante a ecdise, mas a infecção bacteriana retida no mesêntero e detectada no corpo das cigarrinhas por ELISA (Purcell, 1989). Além disso, tem sido constatada a transmissão de *X. fastidiosa* por cigarrinhas sem agregados de bactéria visíveis por microscopia eletrônica de varredura (Brlansky et al., 1983; Purcell et al., 1979) ou detectáveis através de cultura (Hill & Purcell, 1995a).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Para atingir os objetivos propostos, o trabalho foi conduzido em várias etapas, incluindo o estabelecimento de uma criação para obtenção de insetos sadios e a seleção de plantas não hospedeiras de *Xylella fastidiosa* Wells et al. para a manutenção dos vetores, que se constituíram em uma etapa básica e essencial para a execução dos experimentos de transmissão em plantas de citros e café. Os experimentos de transmissão representaram a etapa principal do trabalho, sendo realizados em quatro épocas de inoculação, comparando-se duas espécies de cigarrinhas de cada tribo: *Bucephalogonia xanthophis* (Berg) (Figura 1A) e *Dilobopterus costalimai* Young (Figura 1B) como representantes de Cicadellini, e *Homalodisca ignorata* Melichar (Figura 1C) e *Oncometopia facialis* (Signoret) (Figura 1D) de Proconiini.

Como a aquisição e inoculação de *X. fastidiosa* ocorrem durante a alimentação das cigarrinhas, postula-se que o comportamento alimentar desses insetos nas plantas hospedeiras tenha influência sobre a eficiência que os mesmos transmitem a bactéria, podendo explicar as baixas taxas de transmissão por vetores em citros relatadas em estudos anteriores. Portanto, em caráter complementar, procurou-se estudar as preferências alimentares de *D. costalimai* e *O. facialis* em plantas cítricas sadias (≈planta-teste) e infectadas (≈planta-fonte) em testes de livre escolha, assim como a taxa ingestão de seiva das plantas por indivíduos dessas espécies em teste de confinamento.

Os experimentos foram executados no período de janeiro de 2000 a outubro de 2002, nas dependências do Laboratório de Insetos Vetores e casas de vegetação do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

As plantas de laranja-doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] foram obtidas junto ao Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus) e as de café (*Coffea arabica* L.) no campo experimental Dr. Alcides Carvalho, pertencente à Cooperativa Garcafé, em Garça, SP. Essas plantas foram conduzidas em condições protegidas contra o acesso de insetos vetores e adubadas periodicamente. As plantas de boldo (*Vernonia condensata* Baker) foram propagadas por estaquia e as de lixeira [*Aloysia virgata* (Ruiz & Pavan) Juss.] obtidas a partir de sementes, sendo ambas espécies produzidas em casa de vegetação.

Os experimentos e as técnicas de detecção utilizadas foram divididos em várias etapas, descritas a seguir.

3.1 Obtenção e manutenção dos isolados de *X. fastidiosa*

O isolado de *X. fastidiosa* de citros (CVC) foi proveniente de uma planta-fonte sintomática da Estação Experimental de Citricultura de Bebedouro, SP e o de cafeeiro (ARC), de uma planta sintomática da Fazenda Cambuí, Matão, SP. Os isolados foram obtidos através do isolamento em meio de cultura (item 3.6.1) do pecíolo e nervura central das folhas coletadas. Cerca de 15 dias após o isolamento, obtiveram-se as primeiras colônias de *X. fastidiosa* em meio sólido *Periwinkle wilt gelrite* (PWG) (Hill & Purcell, 1995a). A partir de uma única colônia de cada isolado de *X. fastidiosa*, foram realizadas três repicagens consecutivas (tríplice clonagem) em meio PWG, visando-se purificar o isolado.

Após a tríplice clonagem, os isolados foram preservados em ultrafreezer a -80°C . O meio utilizado na preservação foi o succinato-citrato-fosfato (SPC) (8,6 mM K_2HPO_4 ; 7,3 mM KH_2PO_4 ; 3,7 mM succinato dissódico; 3,4 mM citrato dissódico; pH 7,0) acrescido de 30 % de glicerol, sendo autoclavado e transferido para tubos estéreis de 1,5 mL antes da preservação.

A partir do material purificado em meio sólido PWG, preparou-se uma suspensão bacteriana concentrada, raspando-se as colônias do meio sólido com uma alça de platina e adicionando-as em um tubo de polipropileno contendo tampão fosfato salino (*Phosphate buffer saline* - PBS) (10 mM

Na₂HPO₄; 1,7 mM KH₂PO₄; 0,14 mM NaCl; 2,7 mM KCl; pH 7,0) estéril, até a obtenção de uma suspensão turbida. A suspensão foi homogeneizada através de micropipeta com ponteira esterilizada, sendo que 30-60 µl da mesma foi transferida para os tubos estéreis contendo 200 µl do meio de preservação. Em seguida, os tubos foram etiquetados e mantidos no ultrafreezer até a utilização dos isolados.

Os isolados de CVC e de ARC de *X. fastidiosa* utilizados nas inoculações das plantas de citros e café, respectivamente, estão depositados na Coleção de Culturas Tropicais da Fundação André Tosello (Campinas, SP) sob os códigos de acesso CCT 6570 e CCT 6756, respectivamente.

As plantas-fonte de *X. fastidiosa* de citros e café foram obtidas através de inoculações mecânicas com agulha (Almeida et al., 2001) de suspensões concentradas dos isolados preservados em ultrafreezer. Através desse procedimento, padronizou-se a passagem e o perfil genético dos isolados nos vários experimentos e épocas de inoculação. As suspensões eram produzidas após duas repicagens em meio sólido PWG da cultura preservada, raspando-se as colônias do segundo repique com uma alça de platina e homogeneizando-as em PBS até a obtenção de uma concentração equivalente a 10⁷, 10⁸ ou 10⁹ unidades formadoras de colônias (UFC)/mL de tampão.

3.2 Seleção de plantas não hospedeiras de *X. fastidiosa* para obtenção de cigarrinhas sadias

Plantas hospedeiras ideais para produção de insetos vetores sadios são aquelas imunes ao patógeno. Assim, realizou-se um experimento para avaliar a infecção e sobrevivência dos isolados de *X. fastidiosa* de citros e cafeeiro em boldo (*V. condensata*) e lixeira (*A. virgata*), que são bons hospedeiros para criação das cigarrinhas (Almeida, 1999; Giustolin et al., 2002; Milanez et al., 2001).

Placas de cultura com colônias do isolado de citros (CCT 6570) e de cafeeiro (CCT 6756) foram obtidas após duas passagens do inóculo purificado e preservado a - 80°C. A suspensão bacteriana foi preparada seguindo os

procedimentos descritos no item 3.1. As concentrações de bactéria viável, determinadas por diluição serial (10^{-2} , 10^{-4} e 10^{-6}) do inóculo e plaqueamento em meio sólido PWG foram $1,1 \times 10^7$ UFC/mL e $2,5 \times 10^8$ UFC/mL para os isolados de citros e cafeeiro, respectivamente.

Para cada isolado, vinte plantas de boldo e cinco de lixeira, foram inoculadas pelo método da agulha (Almeida et al., 2001) (Figura 2). As plantas-teste foram inoculadas em três pontos da haste principal, marcados com caneta, sendo que cada ponto recebeu uma gota de 5 μ L da suspensão da bactéria (Figura 2A). A gota foi colocada na superfície da haste e perfurada cinco vezes com um estilete contendo um alfinete entomológico (n^o 0) na ponta (Figura 2B). Esse procedimento possibilitou a absorção do inóculo pela planta no período de 3-5 min após a perfuração. As inoculações mecânicas foram feitas no horário mais quente do dia, quando a planta absorve rapidamente.

Como controle positivo, 10 mudas de *C. sinensis* (var. Caipira) e 15 de *C. arabica* (cv. Mundo Novo) foram inoculadas simultaneamente com os isolados de citros e de cafeeiro, respectivamente. Como controle negativo, 5 (citros, cafeeiro e lixeira) a 10 (boldo) plantas de cada espécie foram inoculadas somente com PBS.

As avaliações de infecção das plantas por *X. fastidiosa* foram realizadas 1, 4, 6 e 12 meses após a inoculação, retirando-se as folhas localizadas logo acima do ponto de inoculação. Os testes de detecção utilizados foram isolamento em meio de cultura (item 3.6.1), DAS-ELISA (*Double antibody sandwich-Enzime-linked immunosorbent assay*) indireto (item 3.6.2) e o de reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction - PCR*) (item 3.6.3.1). O aparecimento de sintomas foi acompanhado semanalmente através de observações comparativas de plantas inoculadas e não inoculadas de cada espécie vegetal. A viabilidade do inóculo e virulência dos isolados de *X. fastidiosa* foi demonstrada através da observação de sintomas e detecção da bactéria nas plantas inoculadas de citros e de café (controles positivos).

Um segundo experimento foi realizado para avaliar uma possível sobrevivência de infecções iniciais de *X. fastidiosa* em plantas de boldo. Trinta plantas-teste de boldo e 10 de *C. sinensis* (var. Caipira) (controle positivo)

foram inoculadas na haste pelo método da agulha (1 ponto de inoculação por planta) com 5 µL de uma suspensão de $8,8 \times 10^8$ UFC/mL do isolado de citros (CCT 6570). Dez plantas de boldo e cinco de citros foram inoculadas somente com PBS (controle negativo). Aos 7 e 14 dias após a inoculação, amostras de hastes e pecíolos foliares, localizadas 1 cm acima do ponto inoculado, foram retiradas de cada planta-teste e submetidas ao isolamento primário em meio de cultura (item 3.6.1) para detecção de células bacterianas viáveis.

3.3 Obtenção e manutenção de cigarrinhas sadias

Um sistema de criação para produção de cigarrinhas livres de *X. fastidiosa* foi desenvolvido de forma que ninfas recém-eclodidas, obtidas em laboratório, são transferidas para plantas sadias ou não hospedeiras da bactéria. Como não se conhece a ocorrência da transmissão transovariana de *X. fastidiosa* (Freitag, 1951) e este tipo de transmissão é muito rara entre os procaríotos, ninfas recém-eclodidas estão livres da bactéria, a não ser que se alimentem em um tecido infectado. No caso de ocorrer aquisição acidental do patógeno, qualquer ninfa infectiva perderá o inóculo bacteriano durante o desenvolvimento em plantas sem *X. fastidiosa*, porque a bactéria aderida ao estomodéu dos vetores é eliminada juntamente com a cutícula a cada ecdise (Purcell & Finlay, 1979).

Para obtenção de posturas de cigarrinhas, adultos de diversas espécies foram coletados no campo (região de Bebedouro), transportados em mudas de laranja-doce para Piracicaba e em seguida confinados para oviposição durante 7-14 dias em plantas sadias de boldo (*V. condensata*) ou em mudas sadias de laranja-doce, em casa de vegetação. O boldo foi usado como hospedeiro de oviposição e desenvolvimento para *B. xanthophis*, enquanto que laranja-doce foi o hospedeiro de oviposição para *Acrogonia citrina* Marucci & Cavichioli, *D. costalimai*, *H. ignorata* e *O. facialis*. Durante a oviposição, os insetos foram confinados sobre plantas de boldo mantidas em gaiolas de criação (32x32x50 cm) (Figura 3A) ou em plantas de citros envoltas por sacos de *voil* (Figura 3B).

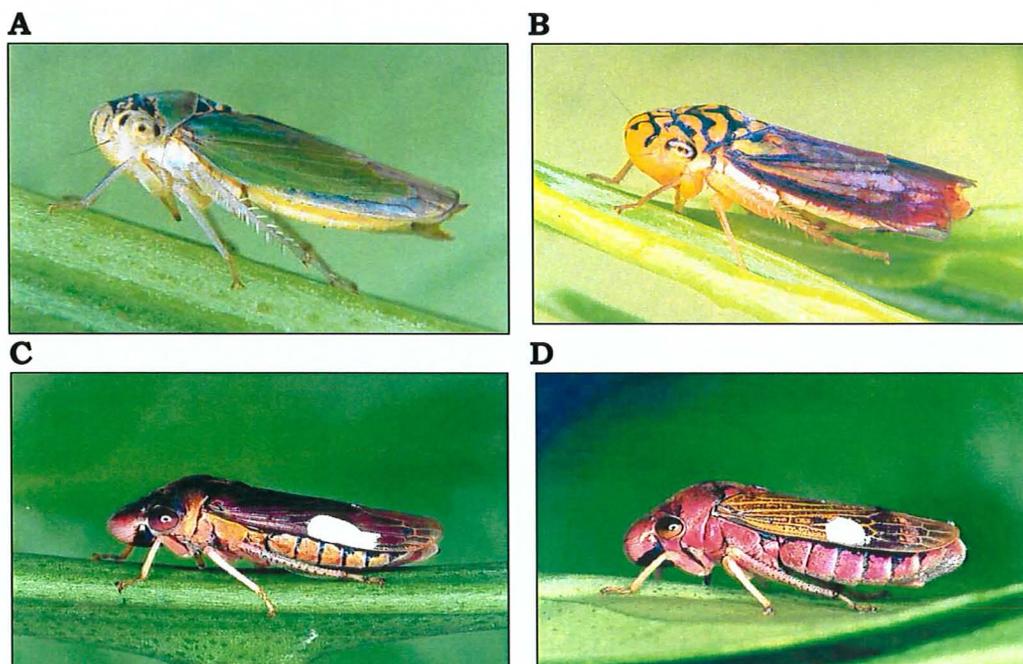


Figura 1 - Espécies de cigarrinhas utilizadas nos testes de transmissão (A, B, C e D) e nos testes de preferência alimentar (B e D), (A) *Bucephalogonia xanthophis*; (B) *Dilobopterus costalimai*; (C) *Homalodisca ignorata* e (D) *Oncometopia facialis*.

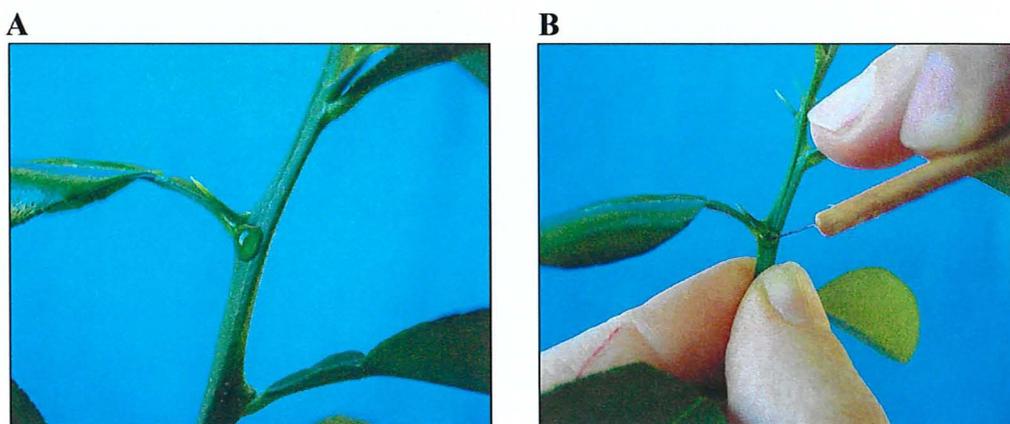


Figura 2 - Esquema da inoculação de plantas pelo método da agulha. (A) Gotas de 5 μ l no ponto de inoculação; (B) Perfurações sobre a suspensão bacteriana.

As plantas de boldo contendo os ovos de *B. xanthophis* foram transferidas diretamente para caixas maiores (50x60x70 cm) (Figura 3C) para o desenvolvimento ninfal. Os adultos assim obtidos, antes de serem utilizados nos testes, eram confinados sobre novas plantas de boldo em gaiolas (32x32x50 cm) para realização de posturas, objetivando-se a continuidade da criação.

Quando as plantas cítricas foram utilizadas para oviposição, as folhas contendo as posturas foram retiradas das plantas e colocadas dentro de placas de Petri. Os pecíolos foram cobertos com algodão umedecido para manutenção da turgidez das folhas (Figura 3D). As placas de Petri foram mantidas em uma incubadora a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotofase de 14 h, sendo avaliadas diariamente quanto à eclosão das ninfas. Logo após a eclosão, as ninfas de primeiro instar de *A. citrina*, *D. costalimai*, *H. ignorata* e *O. facialis* foram transferidas para mudas sadias de boldo, mantidas em caixas de criação (50x60x70 cm). Por serem insetos polípagos, plantas de citros sadias foram adicionadas às gaiolas para completar o desenvolvimento dos últimos instares ninfais (Figuras 3E). Para este segundo sistema de criação, houve necessidade de coletas semanais ou quinzenais de cigarrinhas para obtenção das posturas e manutenção da criação.

Um lote das cigarrinhas adultas obtidas por este sistema de criação (Figura 3F) foi selecionado para avaliação de infectividade através de um teste duplo de PCR (*nested-PCR*), utilizando-se oligonucleotídeos específicos para detecção de *X. fastidiosa* (item 3.6.3.2).

3.4 Experimentos de transmissão de *X. fastidiosa* por cigarrinhas em citros e cafeeiro

Visando-se determinar a proporção de plantas infectivas e a eficiência de transmissão de *X. fastidiosa* por quatro espécies de cigarrinhas entre plantas de citros e de café, realizaram-se experimentos de inoculação por cigarrinhas e por agulha em quatro épocas (outono-inverno 2000, primavera 2000, verão 2000/2001 e primavera 2001).

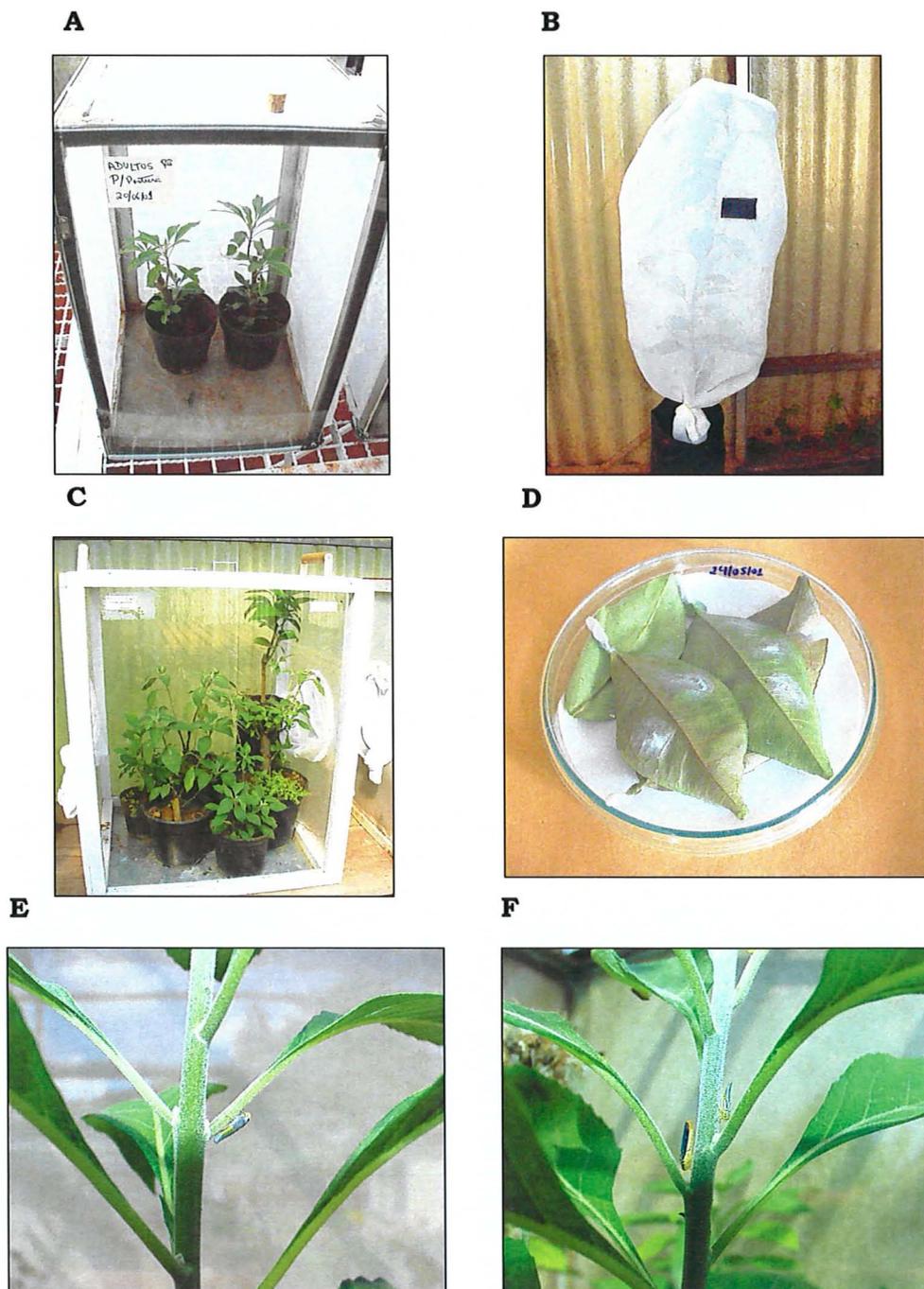


Figura 3 - Sistema de criação de cigarrinhas sadias. (A) Caixa para postura em *Vernonia condensata*; (B) Posturas em mudas cítricas; (C) Caixa para transferência das ninfas recém-eclodidas em plantas sadias de citros e de *V. condensata*; (D) Incubação dos ovos nas folhas destacadas; (E) Planta de *V. condensata* usada para desenvolvimento ninfal; (F) Ninfas e adultos de *Dilobopterus costalimai* criados em *V. condensata*.

Nesses experimentos utilizaram-se de mudas sadias obtidas de sementes de laranja-doce da variedade Westin e de café da cultivar Catuaí vermelho, clone 99. Após atingirem uma altura de 30-50 cm, os *seedlings* de laranja-doce foram podados a uma altura de 8-10 cm do solo (deixando-se cerca de 4 folhas basais) e adubados com nitrocálcio (3g/10L), de forma que após cerca de 25 dias estivessem brotando uniformemente e em estágio ideal para utilização nos testes de transmissão.

Foram selecionadas para os experimentos de transmissão duas espécies de cigarrinhas da tribo Cicadellini (*B. xanthophis* e *D. costalimai*) e duas de Proconiini (*A. citrina* e *O. facialis*). No entanto, as tentativas de criar e manter indivíduos de *A. citrina* falharam, devido à excessiva mortalidade de imaturos durante o desenvolvimento ninfal e dos adultos durante os períodos de acesso à aquisição e inoculação. Assim, substituiu-se *A. citrina* por outra espécie de Proconiini, *H. ignorata*.

Para a aquisição de *X. fastidiosa*, as cigarrinhas obtidas da criação em diferentes épocas foram confinadas sobre plantas-fonte infectadas com os isolados de CVC (CCT 6570) e de ARC (CCT 6756), respectivamente, nas quais a população bacteriana viável havia sido previamente quantificada por isolamento primário em meio de cultura, conforme descrito no item 3.6.1 (~10⁶ UFC/g de tecido) (Tabela 1). Os insetos foram mantidos nas plantas-fonte utilizando-se de um saco de tecido tipo *voil*, por um período de acesso à aquisição (PAA) de 48 h (Figura 4A).

A seguir, os insetos foram transferidos para plantas-teste (mudas sadias de citros e café) por um período de acesso à inoculação (PAI) de 48 h (Figura 4B). Durante esse período, as cigarrinhas foram confinadas nas brotações de citros ou nas folhas novas de cafeeiro utilizando-se de uma gaiola retangular (12x16 cm) de isopor com duas aberturas laterais de ventilação cobertas por *voil* (7x11 cm). A gaiola, formada por duas partes simétricas acopladas, foi presa às plantas através de elásticos (de dinheiro) e sustentada por uma estaca fina de bambu. Utilizou-se uma fita de espuma na área de encaixe das duas partes, para vedação e acomodação do tecido vegetal (Figura 4C). Utilizaram-se três cigarrinhas por planta-teste para *B. xanthophis*, *D. costalimai* e *O. facialis*.

Apenas um indivíduo da espécie *H. ignorata* foi utilizado por planta-teste, por essa cigarrinha ser menos abundante no campo, o que restringiu a obtenção das posturas e dos adultos sadios.

Tabela 1. Número de plantas-teste de citros e de café inoculadas por cigarrinhas em diferentes épocas.

Época ^a	Meses	Nº. de plantas-teste inoculadas		População viável de <i>Xylella fastidiosa</i> nas plantas-fonte (UFC/g de tecido)	
		Citros	Café	Citros	Café
1	maio-julho/00	25	29	2,0X10 ⁶	2,4X10 ⁶
2	agosto-outubro/00	47	45	2,4X10 ⁶	2,0X10 ⁶
3	dezembro-março/01	64	64	1,5X10 ⁶	1,8X10 ⁶
4	agosto-novembro/01	43	41	1,6X10 ⁶	1,8X10 ⁶

^aÉpocas de inoculação, 1: outono-inverno 2000; 2: primavera 2000; 3: verão 2000/2001; 4: primavera 2001.

Simultaneamente às inoculações por cigarrinhas, grupos de 8 a 17 mudas de citros e de café foram inoculadas com suspensões dos isolados de *X. fastidiosa* de CVC e de ARC, respectivamente, através do método da agulha (item 3.2), constituindo-se nos controles positivos dos experimentos de transmissão (Tabela 2). A concentração bacteriana das suspensões inoculadas foi determinada por diluição em série (10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} e 10^{-7}) e plaqueamento em meio sólido PWG, conforme descrito em 3.2. As concentrações das suspensões bacterianas inoculadas em citros nas quatro épocas foram: outono-inverno/00 - 10^7 UFC/mL; primavera/00 - 10^9 UFC/mL; verão 00/01 - 10^8 UFC/mL; primavera/01 - 10^7 UFC/mL e em cafeeiro: outono-inverno/00 - 10^8 UFC/mL; primavera/00 - 10^8 UFC/mL; verão 00/01 - 10^8 UFC/mL; primavera/01 - 10^9 UFC/mL.

De forma análoga, grupos de 3 a 6 mudas de citros e café foram inoculadas somente com PBS, constituindo-se nos controles negativos das inoculações. Para checar a sanidade das plantas-teste, 9-60 mudas de citros e

de café não inoculadas foram deixadas como controle negativo em cada época de inoculação (Tabela 2).

Os experimentos de transmissão foram realizados no período de maio de 2000 a outubro de 2001, na medida em que se obtinham insetos adultos na criação. Números similares de plantas-teste de citros e de café foram inoculados por cigarrinhas (Tabela 1) e por agulha (controle positivo) (Tabela 2) em cada época de inoculação.

As cigarrinhas mortas durante os PAA e PAI, foram guardadas em recipientes devidamente etiquetados, sendo armazenadas a -80°C para posterior extração de DNA e detecção de *X. fastidiosa* pelo teste de PCR duplo (item 3.6.3.2). As que sobreviveram após o PAI foram mantidas por 10 dias em plantas saudias de citros ou de café para propiciar a multiplicação das células bacterianas eventualmente adquiridas pelos insetos. Essas plantas foram avaliadas diariamente, retirando-se as cigarrinhas mortas e anotando-se a data nos recipientes. Após o referido período, os insetos remanescentes foram retirados das plantas, sendo também armazenados para os testes de detecção.

Tabela 2. Número de plantas-teste de *Citrus sinensis* e de *Coffea arabica* inoculadas por agulha com suspensão de *Xylella fastidiosa* (controle+), apenas com tampão (PBS) ou não inoculadas (controle-), nas diferentes épocas.

Época ^a	<i>C. sinensis</i>			<i>C. arabica</i>		
	Controle+	PBS	Controle-	Controle+	PBS	Controle-
1	8	3	10	9	3	9
2	8	3	12	9	3	10
3	16	6	27	17	6	60
4	9	3	12	9	3	15

^aÉpocas de inoculação, 1: outono-inverno 2000; 2: primavera 2000; 3: verão 2000/2001; 4: primavera 2001.

As plantas-teste de citros e de café foram transplantadas para vasos de 5 dm³ contendo mistura de solo, esterco e areia na proporção de 3: 2: 1, sendo

mantidas em uma casa de vegetação livre de insetos vetores, na Fazenda Areão (ESALQ/USP). As plantas foram adubadas quinzenalmente com 2,5 g/L de Chelal RD: BMS Micro-nutrients N.V., Bornem, Bélgica (B= 2%; Cu= 0,5%; Fe=3,25%; Mn=4,0%; Zn=5,1%) e a cada quatro meses com 3 g/vaso de Vip Enduro: Nutriplant Indústria e Comércio, Paulínia, SP (N= 30%; P₂O₅= 11%; Mg= 1,3%; B= 0,05%; Zn= 1,0%). As plantas foram pulverizadas sempre que ocorria infestação de alguma praga, sendo que os inseticidas utilizados estão listados na Tabela 3.

Tabela 3. Inseticidas utilizados para o controle de pragas nas plantas-teste de *Citrus sinensis* e de *Coffea arabica*, dos experimentos de transmissão.

Ingrediente ativo	Produto comercial	Praga visada	
		<i>C. sinensis</i>	<i>C. arabica</i>
abamectina	Vertimec 18 CE	Minadora, Ácaro	Ácaro
cartap	Thiobel 500 OS	-	Bicho mineiro
dicofol	Kelthane 480 CE	Ácaro	-
dimetoato	Perfekthion 400 CE	Pulgão, Cochonilha	Cochonilha
enxofre	Enxofre 800 PM	Ácaro	Ácaro
fenpropatrina	Meothrin 300 CE	Ácaro, Pulgão	Bicho mineiro
imidacloprid	Confidor 700 GRDA	Pulgão, Cochonilha	Cochonilha
mevinfós	Phosdrin 183 CE	Cochonilha, Pulgão	Cochonilha
paration metílico	Folidol 600 CE	Pulgão, Cochonilha	Bicho mineiro

A avaliação das plantas-teste quanto à infecção por *X. fastidiosa* foi realizada a partir dos 6 meses após inoculação através dos testes de isolamento primário em meio de cultura (item 3.6.1) e de PCR (item 3.6.3.1), sendo repetida aos 12 e/ou 18 meses apenas por PCR. Apenas para o lote inoculado entre agosto e outubro de 2001 (época 4) não foi realizada avaliação aos 18 meses. A confirmação de uma planta como infectada por *X. fastidiosa* (ou positiva) foi baseada em pelo menos um dos seguintes critérios: a)

isolamento primário da bactéria de amostra foliar e confirmação da identidade do isolado por PCR; b) detecção positiva de *X. fastidiosa* em amostra foliar pelo teste de PCR em duas ou mais tentativas. Todas as amostras que contaminaram durante o isolamento em meio de cultura, ou que tiveram resultados duvidosos pelo teste de PCR foram repetidas até a obtenção de resultados consistentes.

3.4.1 Análise dos dados

Os dados de porcentagem de mortalidade durante os PAA e PAI e de infectividade das quatro espécies de cigarrinhas foram comparados entre os dois hospedeiros (citros e cafeeiro) através do teste de diferença entre duas proporções (Magalhães & Lima, 2002).

A análise dos experimentos de transmissão em citros e em cafeeiro foi realizada separadamente utilizando-se o programa SAS Institute (1996). Para a comparação da porcentagem de plantas positivas entre as quatro espécies de cigarrinhas, utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial considerando quatro espécies de cigarrinhas e quatro épocas de inoculação. Os valores observados foram 0 e 1, referentes à planta negativa ou positiva, respectivamente, quanto à presença de *X. fastidiosa*. Considerando que os dados seguiram a distribuição de Bernoulli, utilizou-se um modelo linear generalizado com ligação logística. Quando a estatística da razão de verossimilhança (Qui-quadrado) revelou efeito de um dos fatores (espécies e épocas) ou da interação espécie/época, os fatores foram comparados através de contrastes. As comparações das porcentagens de plantas positivas entre citros e café foram realizadas através do teste de diferenças entre duas proporções (Magalhães & Lima, 2002).

A taxa de transmissão por indivíduo das quatro espécies de cigarrinhas em citros e em cafeeiro foi calculada de acordo com Swallow (1985). A comparação da eficiência de transmissão de cada espécie entre citros e cafeeiro e entre cada duas espécies num mesmo hospedeiro foi realizada através do teste de diferença entre duas proporções (Magalhães & Lima, 2002).

3.5 Testes de comportamento alimentar das cigarrinhas em citros

O comportamento alimentar das cigarrinhas foi estudado em seis experimentos com *O. facialis* e cinco com *D. costalimai*. Os três primeiros experimentos (3.5.1.1 - 3.5.1.3) foram realizados com mudas saudáveis de laranja 'Pera' (*C. sinensis*), com ~70 cm de altura, enxertadas sobre limão cravo (*Citrus limonia* Osbeck) e mantidas em sacos plásticos com substrato Plantmax. Nos demais (itens 3.5.1.4 e 3.5.1.5), utilizaram-se pés-francos (*seedlings*) de *C. sinensis* ('Westin' e 'Caipira') inoculados com o isolado de *X. fastidiosa* de CVC (CCT 6570) e transplantados para vasos de 5 dm³ contendo solo, esterco bovino e areia nas proporções de 3: 2: 1, para a manifestação dos sintomas. As inoculações foram realizadas conforme descrito para plantas-fonte no item 3.1.

3.5.1 Estudos de preferência em livre escolha

As câmaras de observação utilizadas nos experimentos 3.5.1.1 a 3.5.1.5 constituíram-se de caixas (63x63x120 cm) com estrutura de madeira e teto e laterais de acrílico; uma das laterais (porta) foi revestida com tela antiáfida, apresentando uma manga de tecido tipo *voil* para transferência dos insetos e irrigação das plantas (Figura 5A). Cerca de 40 insetos foram liberados na porção central de cada câmara no final da tarde (17 h). Os experimentos foram avaliados em intervalos de tempos fixos após 3 (20 h), 15 (8 h), 20 (14 h), 24 (17 h), 39 (8 h), 45 (14 h) e 48 (17 h) h da instalação, anotando-se o número de insetos mortos, dispersos e os que escolheram uma das mudas cítricas ou um dos locais de alimentação. Desprezaram-se os insetos mortos e dispersos no cálculo do número de cigarrinhas que escolheram cada tratamento.

3.5.1.1 Seleção na planta cítrica

Realizou-se um experimento de livre escolha para verificar a parte da muda cítrica que atrai o inseto durante a seleção hospedeira, colocando-se numa mesma câmara de observação uma planta completa, uma planta com as

folhas cobertas com filme plástico aderente do tipo PVC e outra com os ramos secundários cobertos. Considerou-se como ramo secundário aquele formado acima do porta-enxerto de limão cravo.

Utilizaram-se plantas de tamanho e coloração uniforme, que foram posicionadas nas caixas de forma a não tocarem umas nas outras. Preferiu-se cobrir as folhas e ramos com plástico aderente, pois a retirada das mesmas poderia alterar a fisiologia das plantas ou possibilitar a emissão de voláteis, alterando o comportamento do inseto.

3.5.1.2 Seleção do local de alimentação na planta cítrica

Colocou-se uma única muda cítrica na câmara de observação para determinar o local preferido de alimentação entre: pecíolo (P), nervura central (NC) ou secundária (NS) da folha e ramo primário (RP) ou secundário (RS) da planta.

Considerou-se como ramo primário aquele proveniente do porta-enxerto de limão cravo e como ramo secundário aquele formado acima do porta-enxerto de limão cravo (haste principal).

3.5.1.3 Seleção entre plantas cítricas com e sem brotação

Para avaliar o papel da brotação na atratividade de citros às cigarrinhas, realizou-se um experimento de livre escolha colocando-se na mesma câmara duas mudas de laranja, uma com e outra sem brotação no ápice.

As brotações das plantas do tratamento sem brotação foram retiradas logo no início de sua emissão, cerca de 15 dias antes de serem utilizadas nos experimentos.

3.5.1.4 Seleção entre plantas cítricas com sintomas de CVC e sadias

Procurou-se estudar a influência da infecção por *X. fastidiosa* na atratividade de citros às duas espécies de cigarrinhas, utilizando-se plantas de

C. sinensis ('Westin') com alta manifestação de sintomas, de modo que todas ou a maioria das folhas se mostravam cloróticas ou com início de necrose e com população bacteriana viável em torno de 10^6 UFC/g de tecido. Plantas sadias da mesma variedade e idade foram colocadas juntamente com as sintomáticas nas câmaras de observação. Utilizou-se em cada câmara de observação uma planta sadia e uma planta com sintoma de CVC.

3.5.1.5 Seleção entre plantas infectadas assintomáticas e plantas sadias

Esse experimento foi realizado para verificar a preferência de *O. facialis* entre plantas sadias de *C. sinensis* ('Caipira') e plantas infectadas por *X. fastidiosa*, porém ainda sem expressão de sintomas, com população bacteriana em torno de 10^4 ou 10^5 UFC/g de tecido. As plantas infectadas foram mantidas nas câmaras de observação juntamente com plantas sadias da mesma variedade e idade. Colocou-se uma planta sadia e uma planta infectada assintomática por câmara de observação, as quais eram semelhantes externamente.

Devido à baixa disponibilidade de *D. costalimai* no campo e sua excessiva mortalidade durante a execução dos testes, não foi possível obter um número suficiente de repetições para essa espécie.

3.5.1.6 Delineamento experimental e análise dos estudos de preferência

Para os cinco experimentos, utilizou-se o delineamento em blocos ao acaso, em esquema fatorial, com 10 blocos (uma repetição ou câmara de observação por bloco), em esquema de parcelas subdivididas, sendo as parcelas correspondentes aos tratamentos e as subparcelas aos tempos. Os dados coletados representaram contagem do número de insetos por tratamento para cada experimento. Inicialmente, analisou-se a ocorrência de uma superdispersão, utilizando a rotina Oswald com o software S-Plus (Statistical Science, 1993). Como não houve dados superdispersos, pôde-se supor uma distribuição de Poisson e utilizar a transformação $\log(x+1)$ para proceder à

análise de variância. Assim, de acordo com o esquema de análise em medidas repetidas no tempo, quando não houve interação significativa dos tratamentos com o tempo, realizou-se apenas um teste de Tukey ($P \leq 0,05$), comparando-se o número médio de insetos por tratamento nos sete períodos de avaliação. Caso contrário, obtiveram-se também curvas de regressão para cada tratamento, para as diversas interações de tempo.

Além disso, realizou-se uma análise conjunta, seguida de testes de comparações múltiplas entre as duas espécies de cigarrinhas nos quatro primeiros experimentos.

3.5.2 Avaliação da taxa de ingestão em plantas sadias ou infectadas por *X. fastidiosa*

Esse estudo teve por objetivo comparar a taxa de ingestão de seiva pelas cigarrinhas *O. facialis* e *D. costalimai* quando confinadas em plantas cítricas sadias em relação a plantas infectadas com *X. fastidiosa*.

O experimento foi realizado com plantas de *C. sinensis* infectadas sintomáticas ('Westin'; 8 meses após a inoculação) e assintomáticas ('Caipira'; 4 meses após a inoculação), e com plantas sadias (testemunhas) de idades correspondentes. Assim, foram constituídos quatro tratamentos: Trat. 1: planta infectada sem desenvolvimento de sintomas; Test. 1: planta sadia (mesma idade e variedade que Trat. 1); Trat. 2: planta infectada sintomática; Test. 2: planta sadia (mesma idade e variedade que Trat. 2).

A taxa de ingestão foi medida de maneira indireta através da coleta do *honeydew* excretado por unidade de tempo. Para isso, machos adultos das cigarrinhas foram confinados individualmente sobre seções de ramos com pelo menos uma folha, utilizando-se de uma gaiola plástica (tubo Falcon de 50 mL) acoplada a um reservatório graduado na parte inferior (Falcon de 15 mL) para o recolhimento da excreção (Andersen et al., 1992). As gaiolas (Figura 5B) foram posicionadas sobre os ramos de modo a favorecer o escoamento do líquido para o recipiente graduado, objetivando-se a avaliação do volume de *honeydew* excretado.

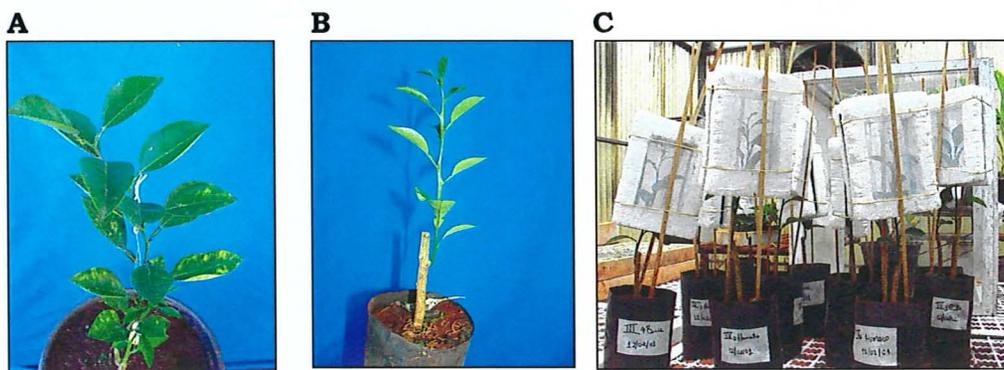


Figura 4 - Esquema do teste de transmissão com citros. (A) Planta-fonte utilizada durante o período de acesso à aquisição; (B) Planta-teste utilizada durante o período de acesso à inoculação; (C) Plantas-teste com os insetos confinados na gaiola de isopor.

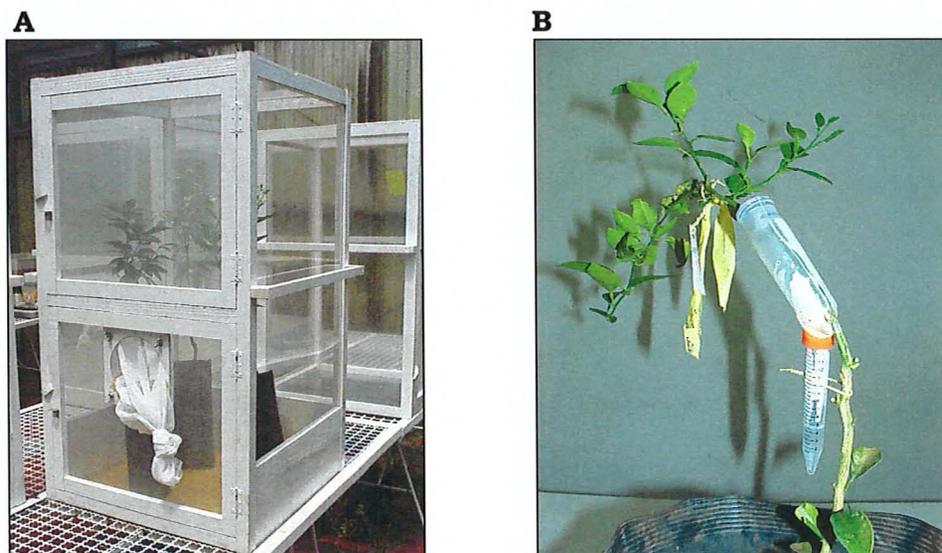


Figura 5 - (A) Câmara de observação utilizada nos testes de livre escolha e (B) Gaiola usada no teste de excreção de *honeydew*.

Durante a instalação do teste, retirou-se uma folha logo acima e outra abaixo do local do ramo onde foi posicionada a gaiola, para teste de isolamento em meio de cultura (item 3.6.1) e confirmação da presença de *X. fastidiosa* no local de alimentação das cigarrinhas. As folhas das plantas sadias também foram amostradas para confirmação da sanidade dos tecidos vegetais.

O experimento foi instalado no início da manhã (8 h) e avaliado em intervalos de tempos fixos, após 6 (14 h); 12 (20 h); 24 (8 h); 30 (14 h); 36 (20 h); 48 (8 h); 54 (14 h); 60 (20 h) e 72 (8 h) h do início do confinamento das cigarrinhas nas gaiolas, anotando-se a mortalidade e o volume excretado em cada período. Na primeira avaliação, as cigarrinhas mortas foram substituídas, devido à possibilidade do manuseio ter debilitado alguns indivíduos; nas demais avaliações, a sobrevivência foi utilizada como parâmetro de comparação entre os tratamentos.

Esse experimento constou de sete repetições (sete plantas com um inseto por gaiola) por tratamento. Os dados de mortalidade foram utilizados para obtenção de curvas de sobrevivência das duas espécies de cigarrinhas, utilizando-se o programa SAS Institute (1996). As curvas de sobrevivência foram estimadas pelo método de Kaplan-Meier (1958) e comparadas através dos testes de Wilcoxon e log-Rank (Alisson, 1995). Os dados de volume de excreção e de proporção de insetos que excretaram após 24, 48 e 72 h foram utilizados para comparação da taxa de ingestão e propensão para alimentação em plantas infectadas e sadias.

3.6 Técnicas de detecção de *X. fastidiosa*

3.6.1 Isolamento em meio de cultura

Para isolar *X. fastidiosa* e quantificar sua população em plantas inoculadas, utilizou-se a técnica de isolamento primário em meio de cultura desenvolvida por Hill & Purcell (1995a) e adaptada para citros por Almeida et al. (2001).

Inicialmente, porções do pecíolo e parte da nervura central das folhas amostradas foram cortadas com lâminas e pesadas em balança semi-analítica, estabelecendo-se um peso máximo de 0,10 g por amostra. A assepsia destas foi realizada em câmara de fluxo laminar (Mod. VLFS-09, Veco, Campinas, SP), utilizando-se instrumentos e materiais previamente autoclavados. Para esterilização superficial, cada amostra passou por banhos sucessivos de 2 min em recipientes contendo álcool (92,8%) (uma passagem), hipoclorito de sódio (2%) (uma passagem) e água destilada estéril (três passagens). A seguir, as amostras foram cortadas sobre papel de filtro em pedaços menores (1 a 2 mm), com auxílio de lâmina esterilizada, e transferidas para tubos de vidro (16 mm de diâmetro) contendo 2 mL de PBS autoclavado. As amostras foram então homogeneizadas em um triturador com haste giratória (Turrax modelo MA102, Marconi Equipamentos para Laboratório S.A., Piracicaba, SP) a 20.000 rpm por 15 s. No intervalo entre uma amostra e outra, a haste contendo as lâminas do aparelho foi desinfetada através de sua imersão em recipientes contendo água destilada estéril (5 s), álcool 92,8% (10 s) e novamente água estéril (5 s).

A suspensão assim obtida foi diluída 10 X em câmara de fluxo laminar, transferindo-se 200 µL da amostra triturada para um tubo contendo 1,8 mL de PBS autoclavado. A seguir, duas alíquotas de 20 µL de cada amostra foram plaqueadas sobre meio sólido PWG (Hill & Purcell, 1995a), permitindo seu deslizamento através da inclinação da placa. As placas foram mantidas em uma incubadora a 28°C por cerca de 15 dias, quando as colônias bacterianas foram contadas. A concentração bacteriana (C), medida em número de UFC/g de tecido foliar, foi estimada, baseando-se no peso inicial das amostras e diluição, segundo a fórmula: $C = 100 \times (1/p) \times n^{\circ} \text{ UFC} \times (10)^n$, onde: n= fator de diluição e p= peso da amostra foliar. O limite de detecção desse método sem a diluição do extrato macerado é de $\sim 10^3$ UFC/g de tecido foliar (Almeida et al., 2001).

O ritmo de crescimento das colônias, visíveis após 10 dias em meio PWG (Almeida et al., 2001), sua morfologia e testes de PCR foram utilizados para confirmação da identidade dos isolados. Colônias de cada isolado foram transferidas para tubos de microcentrifuga (*ependorf*) contendo 50 µL de TE

(10 mM de Tris HCl; 1 mM EDTA), sendo submetidas diretamente ao teste de PCR, utilizando-se os mesmos procedimentos descritos para detecção de *X. fastidiosa* em tecidos vegetais (item 3.6.3.1).

As amostras que contaminaram num primeiro isolamento foram repetidas outras vezes utilizando-se os mesmos procedimentos anteriores, porém aumentando-se as diluições para 55 X ou 100 X.

3.6.1.1 Teste de inibição do isolamento de *X. fastidiosa* por macerados vegetais

Dependendo da espécie de planta, os procedimentos de isolamento primário que envolve maceração de tecidos podem inibir o desenvolvimento da bactéria em meio de cultura, interferindo na interpretação dos resultados (Purcell & Saunders, 1999). Assim, realizou-se um teste para investigar uma possível inibição do crescimento de *X. fastidiosa in vitro*, pela presença de tecidos homogeneizados de boldo e lixeira. A partir de tubos contendo 2 mL de uma suspensão ($\sim 10^6$ UFC/mL em PBS) do isolado de citros de *X. fastidiosa*, foram estabelecidos quatro tratamentos: (A) adição de 0,05 g da nervura central e pecíolo esterilizado de plantas sadias de boldo; (B) adição de 0,05 g da nervura central e pecíolo esterilizado de plantas sadias de lixeira; (C) e (D) somente a suspensão da bactéria em PBS. Os tratamentos A, B e C foram homogeneizados a 20.000 rpm e o D foi o controle, sem homogeneização.

As suspensões foram diluídas 10 e 10^2 vezes após trituração e plaqueadas em meio sólido PWG. As unidades formadoras de colônia foram contadas 14 dias depois. Os tratamentos tiveram seis repetições, sendo cada tubo uma repetição. Os dados de contagem das UFC foram submetidos à análise de variância e ao teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

3.6.2 DAS-ELISA indireto

Algumas amostras (Experimento 3.2) foram submetidas ao DAS-ELISA indireto para detectar a presença de *X. fastidiosa*. Os testes utilizaram os

antissoros policlonais IgG e IgY produzidos contra o isolado de citros (CCT 6570) em coelho e galinha, respectivamente, no Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da ESALQ/USP (Pereira, 2000).

As amostras contendo pecíolo e parte da nervura central de duas folhas foram maceradas em 1 mL de solução tampão PBS-Tween (1,5 mM KH_2PO_4 ; 140 mM NaCl; 4 mM Na_2HPO_4 ; 3 mM KCl; 3 mM NaN_3 ; pH 7,4 + 0,5 mL de Tween 20), utilizando-se cadinho e pistilo. Como controle negativo utilizaram-se de folhas de plantas saudáveis e o controle positivo foi constituído de amostras foliares sintomáticas.

Inicialmente, as placas de ELISA foram sensibilizadas com 200 μl do antissoro de galinha (IgY) diluído 1:1.000 em tampão carbonato de sódio (15 mM Na_2CO_3 ; 35 mM NaHCO_3 ; 3 mM NaN_3 ; pH 9,6) e incubadas por 1,5 h a 37°C. Após triplice lavagem das placas com PBS-Tween, adicionaram-se 100 μl de cada amostra (antígeno) em dois pocinhos. As placas foram incubadas durante a noite a 4°C e lavadas quatro vezes com PBS-Tween na manhã seguinte, deixando-se a solução tampão na placa por 3 min nas duas últimas lavagens. O antissoro de coelho (IgG), diluído na proporção 1: 1.000 em tampão PBS (sem Tween) com 1% de albumina de soro bovina (*Bovine serum albumin* -BSA, Sigma A-2153), foi distribuído nas placas (100 μl por pocinho), sendo estas incubadas por 1,5 h a 37°C. Após lavagem triplice com PBS-Tween, adicionaram-se 100 μl por pocinho de *anti-rabbit* IgG, desenvolvida em cabra e conjugada com fosfatase alcalina (Sigma A-3687), diluída 1: 32.000 em tampão PBS com 2% de PVP 40.000 (polivinilpirrolidona, Sigma P-0930). Após o período de incubação de 1,5 h a 37°C, as placas foram lavadas três vezes com PBS-Tween e a elas adicionadas pastilhas de p-Nitrofenil fosfato (*p-nitrophenyl phosphate* - pNPP, Sigma, N-9389) diluídas em tampão substrato de dietanolamina (0,88 M de dietalonamina; 3 mM NaN_3 ; pH 9,8) na proporção de 0,6 mg/mL. As placas foram incubadas por cerca de 15 min a 37°C e a temperatura ambiente por até 60 min, no escuro, propiciando reação enzimática. Após 30 e 60 min, mediu-se a absorbância dos pocinhos das placas em leitor de ELISA (BIO-RAD, modelo 550, Califórnia, EUA), utilizando-se filtro de 405 nm. As amostras foram consideradas positivas quando

apresentaram leitura pelo menos duas vezes maior que a média do controle negativo. O limite de detecção desta técnica é de 10^4 UFC/mL (Minsavage et al., 1994).

Visando-se reduzir a leitura de fundo dos controles negativos das amostras de boldo e de lixeira, realizou-se uma modificação no DAS-ELISA adicionando-se extrato de plantas sadias (filtrado em tecido *voil*) juntamente com o antissoro IgG e 1% de BSA e incubando-se novamente a 4°C durante a noite (Hill & Purcell, 1995b). No dia seguinte, deu-se prosseguimento às demais etapas do teste, adicionando-se 100 µl por pocinho de *anti-rabbit* IgG, diluída 1: 32.000 em tampão PBS com 2% de PVP 40.000 e assim por diante.

3.6.3 Testes de PCR

3.6.3.1 Nas plantas hospedeiras

Extração de DNA

O protocolo de extração de DNA de tecidos vegetais de citros e de café foi baseado no trabalho de Minsavage et al. (1994), adaptado para plantas de café por Pinto & Leite (1999), através da otimização na concentração de ácido ascórbico para 0,1M e diluição do extrato em 1:100.

Para amostras infectadas com *X. fastidiosa* utilizaram-se de porções do pecíolo e parte da nervura central de quatro folhas maceradas com cadinho e pistilo em 1 mL de tampão succinato-citrato-fosfato (SPC) (8,6 mM K_2HPO_4 ; 7,3 mM KH_2PO_4 ; 3,7 mM succinato dissódico; 3,4 mM citrato dissódico; pH 7,0] contendo ácido ascórbico (0,1 M) e 5% de polivinilpolipirrolidona insolúvel (PVPP- Sigma P-6755), previamente lavado com ácido clorídrico (Holben et al., 1988). Após trituração, o extrato da planta foi diluído 1:10 e 1:100 em água destilada, sendo adicionados 10 µl do extrato em 990 mL de água e 100 µl em 900 mL, respectivamente. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 14.000 x g por 2 min, descartando-se o sobrenadante e ressuspendendo-se o precipitado em 1 mL de água destilada. As amostras foram novamente

centrifugadas a 14.000 x g por 2 min, ressuspensando-se o precipitado em uma solução contendo 567 µl de TE (10 mM de Tris HCl; 1 mM EDTA - ácido etileno diamono tetracético); 30 µl de dodecil sulfato de sódio (*sodium dodecyl sulfate* – SDS, Gibco BRL 15525-017) 10% e 3 µl de proteinase K (20 mg/mL) (Gibco BRL 25530-015). As amostras foram agitadas vigorosamente em *vortex* e incubadas a 37°C por 1 a 1,5 h. Adicionou-se 100 µl de NaCl (5 M) e agitou-se vigorosamente antes de acrescentar 80 µl de solução de CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio)/NaCl (0,7 M NaCl; 0,27 M CTAB). Agitou-se vigorosamente e as amostras foram incubadas por 10 min a 65°C. Após esse período, as mesmas permaneceram por cerca de 10 min a temperatura ambiente, quando adicionou-se 0,55 mL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) em capela de exaustão, agitou-se por 10 min e centrifugou-se a seguir por 5 min. Ainda na capela, transferiu-se o sobrenadante para novos tubos (~0,7 mL), adicionando-se em seguida igual volume de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1). Agitou-se novamente por 10 min e centrifugou-se por 5 min, transferindo-se o sobrenadante para novos tubos (repetindo esta etapa se a interface branca permanecesse). Adicionaram-se 0,6 volume (0,42 mL) de álcool isopropílico gelado para precipitar o DNA, invertendo-se os tubos lentamente até o precipitado tornar-se visível. As amostras foram então mantidas em ultrafreezer (-80°C) por 10 min ou por 12-24 h em freezer (-20°C). Em seguida, centrifugaram-se as amostras por 20-25 min a 14.000 x g, descartando-se o sobrenadante e lavando-se o DNA com 1 mL de álcool etílico 70%. Para finalizar, centrifugaram-se as amostras por 10 min a 14.000 x g na temperatura da sala, removendo-se o sobrenadante cuidadosamente. Os precipitados ficaram secando por cerca de 1 a 2 h, quando foram ressuspensados em 50 µl de TE e mantidos em temperatura ambiente por no mínimo 1 h, antes de serem estocados a 4°C para a PCR. Amostras de DNA não processadas imediatamente após a extração de DNA foram armazenadas a -20°C.

As primeiras amostras foram processadas seguindo todos esses procedimentos, no entanto, para agilizar o processo de detecção, utilizando-se de uma maior quantidade de tecidos por amostra, algumas etapas foram

alteradas. Para amostras com mais de quatro folhas, a trituração foi realizada no Turrax, adicionando-se uma quantidade de tampão SPC que permitisse a trituração dos tecidos. Alguns testes preliminares indicaram não haver diferença entre as duas diluições (1:10 e 1:100), preferindo-se utilizar a diluição 1:10. Eliminou-se a etapa do fenol: clorofórmio: álcool isoamílico, após a observação de que a mesma não influía na detecção de *X. fastidiosa* quando os testes eram realizados em poucas semanas após a extração de DNA.

PCR

Os oligonucleotídeos utilizados no teste de PCR foram RST31 e RST33 (Minsavage et al., 1994), que amplificam um fragmento de 733 pares de base (pb) e detectam várias estirpes de *X. fastidiosa* (PD, PLS e CVC) e CVC1 e 272-2-int. (Pooler & Hartung, 1995), que amplificam um fragmento de 500 pb, específicos para os isolados de citros e de cafeeiro (Coletta Filho & Machado, 2001). Os dois pares de oligonucleotídeos foram usados em uma única reação (Multiplex PCR).

Utilizou-se a seguinte mistura de reagentes para a amplificação de DNA: tampão 1X (20 mM Tris-HCl; 100 mM KCl; pH 8,0 - Promega); 2 mM MgCl₂; 200 µM de cada dNTP; 1 U de Taq DNA polimerase; 0,4 µM de cada primer (RST31, RST33, CVC1 e 272-2 int) e de 2 (colônia) a 3 (planta) uL de DNA da amostra para um volume final de reação de 12 µL. Adicionou-se a cada amostra 30 µL de óleo mineral. A amplificação foi realizada em um termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc., Watertown, MA 02172, EUA) programado para as seguintes condições: 1 ciclo inicial a 95°C por 1 min.; 40 ciclos envolvendo desnaturação a 95°C por 30 s, anelamento a 55°C por 30 s e extensão a 72°C por 45 s; e 1 ciclo final de extensão a 72°C por 5 min, estabilizando a 4°C por tempo indeterminado.

Após a amplificação, adicionaram-se cerca de 2 µL de corante (0,25% azul de bromofenol, 40% de sacarose) por amostra e visualizou-se o produto da reação de PCR através de eletroforese em gel constituído de agarose a 1,5% em tampão TBE (89 mM Tris; 89 mM Ácido Bórico e 2 mM EDTA; pH 8,0),

suplementado com 0,5 µg/mL de brometo de etídio. Os fragmentos amplificados foram visualizados sob luz UV e documentados em um fotodocumentador *Eagle Eye II* (Stratagene, La Jolla, CA 92037, EUA).

3.6.3.2 Nos insetos vetores

Extração de DNA

A extração de DNA dos insetos vetores foi realizada de acordo com protocolo desenvolvido por Ciapina & Lemos (2001). As cabeças de cigarrinhas foram retiradas com o auxílio de lâminas cortantes esterilizadas e transferidas individualmente para tubos de microcentrífuga (*ependorf*) de 1,5 mL, onde foram maceradas com auxílio de uma ponteira de micropipeta (esterilizada) em 200 µl de uma suspensão 0,25% de PVPP insolúvel. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g (temperatura ambiente), por 20 min e o sobrenadante descartado. Adicionaram-se 100 µl de Chelex 100 às amostras e estas foram incubadas a 56°C por 30 min e agitadas posteriormente em *vortex* por 10 s. Seguiu-se uma nova centrifugação a 12.000 x g (a temperatura ambiente) por 3 min, sendo as amostras posteriormente fervidas durante 8 min e novamente agitadas por 10 s. Após a fervura, centrifugaram-se as amostras a 12.000 x g por 3 min e transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo de 0,5 mL, cuidadosamente. As amostras foram mantidas a -20°C até o momento do uso.

PCR

Para a detecção de *X. fastidiosa* nas amostras, realizou-se um teste duplo de PCR (*nested-PCR*), sendo que numa primeira reação utilizou-se um par de oligonucleotídeos externos, 272-1 e 272-2, que detectam todas as estirpes de *X. fastidiosa* e amplificam um fragmento de 700 pb (Pooler & Hartung, 1995). O produto dessa reação foi utilizado como molde para uma nova amplificação, onde se utilizou outro par de oligonucleotídeos, CVC-1 e

272-2-int, que reconhecem seqüências internas ao fragmento amplificado na primeira reação e amplificam um fragmento de 500 pb (Pooler & Hartung, 1995), permitindo a detecção específica das estirpes de citros e de cafeeiro de *X. fastidiosa* (Coletta Filho & Machado, 2001).

Para as reações de amplificação de DNA, utilizou-se a seguinte mistura: tampão 1X (Tris 20 mM; KCl 50 mM; pH 8,4 - Life Technologies); 2 mM MgCl₂; 200 µM de cada dNTP; 1U de taq DNA polimerase; 0,5 µM de cada oligonucleotídeo externo, 271-1 e 272-2 e 8 µL de DNA da amostra para um volume final de reação de 20 µL. A amplificação foi realizada nas seguintes condições: 1 ciclo inicial a 94°C por 2 min; 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 62°C por 1 min e extensão a 72°C por 1,5 min; 1 ciclo final de extensão a 72°C por 5 min, estabilizando a 4°C por tempo indeterminado. Para a segunda reação, 3 µL do produto da primeira reação foram usados como molde para os oligonucleotídeos internos CVC-1 e 272-2-int, sendo a amplificação realizada com o programa já descrito.

Em todos os testes de PCR foram utilizados três controles positivos, DNA de planta infectada, de colônia de *X. fastidiosa* e de cigarrinha positiva (que se alimentou em plantas-fonte), além de dois controles negativos, água miliQ e DNA de cigarrinha sadia (proveniente da criação). Após a primeira reação de amplificação, realizou-se a eletroforese em gel de agarose somente com alíquotas dos controles positivos (DNA de planta e de colônia) e negativo (água MiliQ), a fim de evitar problemas de contaminação das demais amostras. Uma vez confirmada a amplificação do fragmento de DNA de tamanho esperado (700 pb), procedeu-se a segunda reação. Na preparação das reações de *nested-PCR* utilizaram-se pipetas novas (sem contato prévio com DNA) e ponteiras com filtro. Os procedimentos para eletroforese e visualização dos produtos amplificados foram os mesmos já descritos para detecção em plantas (item 3.6.3.1).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Seleção de plantas não hospedeiras de *Xylella fastidiosa* Wells et al. para obtenção de cigarrinhas sadias

No primeiro experimento, *X. fastidiosa* não foi detectada por cultura, PCR ou ELISA em nenhuma das plantas de *Vernonia condensata* Baker (boldo) e *Aloysia virgata* (Ruiz & Pavan) Juss. (lixreira), nas avaliações de 1, 4, 6 e 12 meses após a inoculação mecânica (Tabela 4). No entanto, como já se esperava, colônias viáveis de *X. fastidiosa* foram recuperadas por cultura de 40-100% das plantas de citros [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] e de café (*Coffea arabica* L.) (controles positivos) inoculadas com os isolados de CVC e de ARC, respectivamente, entre 6 a 12 meses após a inoculação. O ELISA detectou menor proporção de plantas positivas que os outros dois testes (cultura e PCR), nas avaliações de 1 e 6 meses após a inoculação. Resultado semelhante foi obtido por Purcell et al. (1999) em testes de detecção de *X. fastidiosa* em plantas de oleandro, em que o número de plantas positivas por cultura foi maior do que por ELISA em cinco datas de avaliação. Um problema verificado com o ELISA foi os altos valores de absorbância registrados para amostras de tecidos sadios, o que reduziu a sensibilidade do teste. Mesmo alterando-se o procedimento do ELISA para reduzir as leituras de fundo dos controles negativos de *V. condensata* e *A. virgata* (item 3.6.2), o resultado obtido não foi satisfatório. Assim, optou-se pela utilização apenas de isolamento em meio de cultura e teste de PCR como testes de detecção de *X. fastidiosa* em plantas.

Tabela 4. Detecção de isolados de *Xylella fastidiosa* em *Vernonia condensata* e *Aloysia virgata*, após inoculação mecânica com agulha.

Isolados de <i>X. fastidiosa</i>	Espécie de planta	Meses após inoculação	Proporção de plantas positivas ^a			log UFC/g (min-máx.)
			PCR	Cultura	ELISA	
Citros (CVC)	<i>Citrus sinensis</i> (controle positivo)	1	- ^b	2/10 ^c	4/10	(5,5)
		4	-	2/10 ^c	-	(4,2)
		6	-	4/10	2/6	(4,3-6,1)
		12	7/10	7/10	-	(4,4-5,4)
	<i>V. condensata</i>	1	-	0/20	0/20	-
		4	-	0/20	-	-
		6	-	0/20	0/20	-
		12	0/20	0/20	-	-
	<i>A. virgata</i>	1	-	0/5	0/5	-
		4	-	0/5	-	-
		6	-	0/5	0/5	-
		12	-	0/5	-	-
Cafeeiro (ARC)	<i>Coffea arabica</i> (controle positivo)	1	5/15	9/15 ^d	1/15	(5,0-6,3)
		4	-	15/15	-	(4,5-6,3)
		6	-	15/15	3/6	(5,2-6,5)
		12	14/15	14/15	-	(5,1-6,8)
	<i>V. condensata</i>	1	-	0/20	0/20	-
		4	-	0/20	-	-
		6	-	0/20	0/20	-
		12	0/20	0/20	-	-
	<i>A. virgata</i>	1	-	0/5	0/5	-
		4	-	0/5	-	-
		6	-	0/5	0/5	-
		12	-	0/5	-	-
Controle negativo (apenas tampão)	<i>C. sinensis</i>	1	-	0/5	0/5	-
		4	-	0/5	-	-
		6	-	0/5	0/5	-
		12	0/5	0/5	-	-
	<i>C. arabica</i>	1	0/5	0/5	0/5	-
		4	-	0/5	-	-
		6	-	0/5	0/5	-
		12	0/5	0/5	-	-

Tabela 4. Detecção de isolados de *Xylella fastidiosa* em *Vernonia condensata* e *Aloysia virgata*, após inoculação mecânica com agulha.

Isolados de <i>X. fastidiosa</i>	Espécie de planta	Meses após inoculação	Proporção de plantas positivas ^a			log UFC/g (min-máx.)
			PCR	Cultura	ELISA	
Controle negativo (apenas tampão)	<i>V. condensata</i>	1	-	0/10	0/10	-
		4	-	0/10	-	-
		6	-	0/10	0/10	-
		12	0/10	0/10	-	-
	<i>A. virgata</i>	1	-	0/5	0/5	-
		4	-	0/5	-	-
		6	-	0/5	0/5	-
		12	-	0/5	-	-

^aNúmero de plantas positivas para *X. fastidiosa* sobre o total de plantas inoculadas;

^bNão testado;

^cAmostras compostas (2 plantas por amostra);

^dAmostras compostas (3 plantas por amostra).

Nenhuma célula viável de *X. fastidiosa* foi detectada por cultura em ramos e folhas de *V. condensata* aos 7 e 14 dias após inoculação (segundo experimento), embora a bactéria tenha sido isolada dos ramos (10%) e folhas de citros (40%) (controles positivos) após 7 dias da inoculação e dos ramos (20%) após 14 dias (Tabela 5). Além disso, nenhuma planta inoculada de *V. condensata* e *A. virgata* apresentou sintomas característicos de infecção por *X. fastidiosa*.

Também, não houve efeito inibitório do homogeneizado de tecido de *V. condensata* ou *A. virgata* sobre o crescimento de *X. fastidiosa* em meio de cultura PWG (Tabela 6). Na verdade, as suspensões bacterianas homogeneizadas com tecidos das duas espécies vegetais apresentaram população de células viáveis mais elevada do que as suspensões homogeneizadas somente em PBS ou não homogeneizadas ($P \leq 0,05$).

Resultados semelhantes foram obtidos por Almeida et al. (2001), que observaram uma maior viabilidade de suspensões de *X. fastidiosa* homogeneizadas com tecido cítrico do que com PBS somente. Não se sabe o motivo da maior sobrevivência de *X. fastidiosa* na presença de homogeneizados de plantas. Entretanto, isso mostra que a não detecção de *X. fastidiosa* em *V.*

condensata e *A. virgata* através de cultura (Tabela 4) não está relacionada a um efeito inibitório do homogeneizado dessas plantas, assegurando a validade dos resultados obtidos.

Tabela 5. Avaliação por cultura da sobrevivência do isolado de citros de *Xylella fastidiosa* em plantas de *Vernonia condensata* e *Citrus sinensis*, aos 7 e 14 dias após inoculação por agulha.

Espécie de planta	Dias após inoculação	Proporção de plantas positivas ^a		Log UFC/g tecido (min-máx)
		Pecíolo	Ramo	
<i>C. sinensis</i>	7	2/5	1/5	4
	14	0/5	1/5	4
<i>V. condensata</i>	7	0/15	0/15	0
	14	0/15	0/15	0
<i>C. sinensis</i> (controle negativo) ^b	7	0/2	0/2	0
	14	0/3	0/3	0
<i>V. condensata</i> (controle negativo) ^b	7	0/5	0/5	0
	14	0/5	0/5	0

^aNumerador: número de plantas positivas para *X. fastidiosa* por cultura, denominador: total de plantas inoculadas;

^bControle negativo: plantas inoculadas apenas com tampão fosfato salino.

Purcell & Saunders (1999) classificaram várias plantas hospedeiras em relação a multiplicação, movimento e persistência de *X. fastidiosa*. Dessa forma, acredita-se que *V. condensata* e *A. virgata* se enquadram nas categorias de hospedeiros não-propagativos, não-sistêmicos e não-patológicos aos isolados de citros (CCT 6570) e de cafeeiro (CCT 6756) de *X. fastidiosa*.

Deve-se salientar, no entanto, que foram testados apenas dois isolados de *X. fastidiosa*, sendo esses provenientes de plantas de citros com CVC e de café com ARC. Mesmo *X. fastidiosa* sendo classificada como uma única espécie (Wells et al., 1987), há uma relação complexa e claramente definida entre os hospedeiros e as estirpes desse patógeno (Hopkins, 1989). A doença de Pierce

da videira (*Pierce's disease* - PD), a escaldadura da folha da amendoeira (*Almond leaf scorch* - ALS) e o nanismo da alfafa (*Alfalfa dwarf* - AD) são todas causadas pelo mesmo isolado ou estirpe de *X. fastidiosa*, constituindo-se no patovar PD. Similarmente, há patogenicidade cruzada entre as estirpes que causam a escaldadura da folha de ameixeira (*Plum leaf scald* - PLS) e a redução do porte do pessegueiro (*Phony peach* - PP), mas não há evidência de patogenicidade cruzada entre os dois patovares (PD X PLS/PP) (Sherald, 1993). Contrariamente, Leite Júnior et al. (1998) não detectaram infecção em plantas de pessegueiro 'Flordasun' enxertadas com borbulhas procedentes de plantas de ameixa com sintomas severos de PLS, indicando ausência de patogenicidade dessa estirpe de *X. fastidiosa* de ameixeira na cultivar 'Flordasun' de pessegueiro.

Tabela 6. Viabilidade de *Xylella fastidiosa* após homogeneização de suspensões bacterianas com tecidos de *Vernonia condensata* e *Aloysia virgata*

Viabilidade de <i>X. fastidiosa</i> (nº UFC/mL) por tratamento				
Repetições (tubos)	<i>V. condensata</i> ^a	<i>A. virgata</i> ^b	PBS somente, homogeneizado ^c	PBS somente, Não-homogeneizado ^d
1	1,6 X 10 ⁶	2,5 X 10 ⁶	5,3 X 10 ⁵	2,3 X 10 ⁵
2	1,8 X 10 ⁶	1,8 X 10 ⁶	7,8 X 10 ⁵	4,6 X 10 ⁵
3	2,0 X 10 ⁶	1,9 X 10 ⁶	4,3 X 10 ⁵	2,6 X 10 ⁵
4	1,6 X 10 ⁶	1,7 X 10 ⁶	6,9 X 10 ⁵	1,0 X 10 ⁵
5	1,7 X 10 ⁶	2,3 X 10 ⁶	7,0 X 10 ⁵	1,1 X 10 ⁵
6	9,8 X 10 ⁵	2,3 X 10 ⁶	5,3 X 10 ⁵	3,2 X 10 ⁵
Média	1,6 X 10⁶ a^e	2,1 X 10⁶ a	5,9 X 10⁵ b	2,1 x 10⁵ c

^aSuspensão bacteriana homogeneizada a 20.000 rpm com nervura central e peciolo de *V. condensata*;

^bSuspensão bacteriana homogeneizada a 20.000 rpm com nervura central e peciolo de *A. virgata*;

^cSuspensão bacteriana homogeneizada a 20.000 rpm sem tecido de planta;

^dSuspensão bacteriana não-homogeneizada;

^eMédias seguidas pela mesma letra não diferem entre si significativamente pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Apesar de muitas espécies de plantas não apresentarem sintomas quando infectadas por *X. fastidiosa*, elas podem servir como hospedeiros naturais e alternativos para a bactéria, contribuindo para o desenvolvimento da doença em plantas cultivadas (Hopkins, 1989). Já as espécies imunes à *X. fastidiosa*, o que parece ser o caso de *V. condensata* e *A. virgata*, possibilitam uma maior confiabilidade na obtenção de cigarrinhas vetoras sadias, necessárias aos estudos das relações patógeno-vetor.

Tanto *V. condensata* (boldo) quanto *A. virgata* (lixadeira) são citadas na literatura como plantas medicinais. As folhas de boldo, além de possuírem carboidratos (sacarose, frutose e ácido clorogênico), sesquiterpenos e saponinas, contêm óleos essenciais com ação bactericida, antiséptica e anestésica (Furlan, 1998) que podem estar relacionados à imunidade dessas plantas à bactéria *X. fastidiosa*.

Esses resultados indicam que *V. condensata* e *A. virgata* não são hospedeiros de *X. fastidiosa*; sendo, portanto, plantas apropriadas à obtenção e manutenção de cigarrinhas sadias em condições de laboratório para os estudos de transmissão.

4.2 Obtenção e manutenção de cigarrinhas sadias

O sistema de criação desenvolvido permitiu a obtenção de adultos sadios de várias espécies de cigarrinhas vetoras de *X. fastidiosa*. Nenhum dos 10 indivíduos de *Acrogonia citrina* Marucci & Cavichioli, 24 de *Bucephalagonia xanthophis* (Berg), 69 de *Dilobopterus costalimai* Young, 46 de *Homalodisca ignorata* Melichar e 26 de *Oncometopia facialis* (Signoret) testados para infectividade por *X. fastidiosa* foi positivo por *nested-PCR*.

Estudos visando determinar a infectividade natural da estirpe de videira em cigarrinhas foram iniciados por Freitag & Frazier (1954) na tentativa de encontrar fontes de insetos sadios no campo, necessários aos estudos de transmissão, em função da dificuldade de se criar cigarrinhas vetoras em largo número.

O tempo médio de desenvolvimento (ovo-adulto) das cigarrinhas no presente sistema de criação, nas condições de casa de vegetação, variou de 40 (*B. xanthophis*) a 90 (*O. facialis*) dias. O desenvolvimento foi mais rápido durante a primavera e verão, quando as temperaturas noturnas na casa de vegetação foram mais altas. Apesar do número elevado de ovos obtidos em mudas cítricas ou em boldo, o número final de adultos sadios retirados das gaiolas de criação foi limitado. Isso ocorreu porque a mortalidade das ninfas jovens foi alta (>50%) para a maioria das espécies.

Das cinco espécies estudadas, houve maior sucesso na criação de *B. xanthophis*, pelo fato desta espécie ser mais facilmente coletada em plantas ornamentais, colocar um grande número de ovos nas plantas de boldo e apresentar baixa mortalidade ninfal, garantindo assim contínua produção de adultos sadios. A planta arbustiva pingo-de-ouro (*Duranta repens* L.), muito utilizada em jardins e passarelas, mostrou ser uma excelente fonte de adultos e ninfas de *B. xanthophis*.

Almeida & Lopes (1999) utilizaram folhas de laranja-doce com posturas para estabelecer a criação, sendo que após a eclosão, as ninfas foram mantidas em plantas de laranja-doce. Esses autores verificaram alta mortalidade (65-70%) de ninfas de primeiro ínstar de *D. costalimai* e *O. facialis*, mas nos instares subseqüentes houve queda gradual dessa. Para *H. ignorata*, a mortalidade de ninfas de primeiro ínstar foi mais baixa (14%), decrescendo na medida em que foram se desenvolvendo. Paiva et al. (2001) também criaram *Acrogonia*, *D. costalimai* e *O. facialis* em mudas de laranja-doce, encontrando viabilidades ninfais de 84, 79,8 e 49,9% para as respectivas espécies de cigarrinhas. A longevidade de *O. facialis* foi a menor entre as três espécies, levando os autores a sugerirem que *C. sinensis* não oferece boas condições para o desenvolvimento dessa espécie.

Já Milanez et al. (2001) estudaram o desenvolvimento ninfal de *D. costalimai* e *O. facialis* em sistemas de criação contendo plantas de limão cravo (*Citrus limonia* Osbeck) e de boldo. Verificaram maior viabilidade (>50%) quando as ninfas foram mantidas exclusivamente em plantas de boldo, observando inclusive viabilidade nula para ninfas *D. costalimai* e 25% de

viabilidade para as de *O. facialis*, quando mantidas exclusivamente em plantas de limão. Esses autores não testaram variedades de laranja-doce (*C. sinensis*), que são muito visitadas pelas cigarrinhas no campo.

Acredita-se que as exigências nutricionais das cigarrinhas vetoras e da bactéria *X. fastidiosa* sejam similares, já que dois ambientes naturais de sobrevivência e multiplicação da bactéria são o xilema das plantas infectadas e a parte anterior do aparelho bucal (estomodéu) das cigarrinhas (Purcell, 1989). Já foi constatado que *X. fastidiosa* não infecta plantas de limão (*Citrus limon*) (Freitag, 1951). Laranjeira et al. (1998b) verificaram que, mesmo em áreas com alta pressão de inóculo, alguns cultivares de limão não apresentaram sintomas de CVC e não se detectou a bactéria *X. fastidiosa* em seus tecidos pelo teste de PCR. Li et al. (1996) também não conseguiram detectar a bactéria em tecidos de limão 'Siciliano', após a inoculação com enxerto infectado. Dessa forma, pode-se supor que a seiva de limão cravo contenha substâncias desfavoráveis à bactéria *X. fastidiosa* e que, possivelmente, afetem também a sobrevivência de ninfas das cigarrinhas.

Insetos que se alimentam do xilema são geralmente polípagos (Press & Whittacker, 1993), necessitando de mais de um hospedeiro para completar seu desenvolvimento, o que acaba sendo uma vantagem para os mesmos, pelo fato da seiva do xilema ser uma dieta extremamente pobre em nutrientes (Novotny & Wilson, 1997). As cigarrinhas que se alimentam do xilema são altamente eficientes no uso de aminoácidos e ácidos orgânicos que estão em maior concentração nas folhas jovens, o que favorece o desenvolvimento e sobrevivência das ninfas (Purcell, 1989). Acredita-se, dessa forma, que a utilização de plantas jovens e sadias de laranja-doce e de boldo na mesma caixa de criação seja um consórcio apropriado para o desenvolvimento, acasalamento e oviposição pelas cigarrinhas vetoras.

A técnica de obtenção e manutenção de cigarrinhas sadias constitui-se numa etapa básica para os estudos das relações entre *X. fastidiosa* e seus vetores, como os de eficiência de transmissão de diferentes isolados da bactéria (item 4.3.4) ou de adesão e retenção de mutantes de *X. fastidiosa* no aparelho bucal dos vetores.

4.3 Transmissão de *X. fastidiosa* por cigarrinhas em citros e cafeeiro

4.3.1 Mortalidade durante o período de acesso à aquisição (PAA) e período de acesso à inoculação (PAI)

Em geral, observou-se baixa mortalidade (0-14,3%) dos insetos durante os períodos de 48 h em que foram mantidos sobre as plantas-fonte (PAA) e plantas-teste (PAI) de citros (*C. sinensis*) e café (*C. arabica*) nesse estudo de transmissão. Para citros, a mortalidade das cigarrinhas foi maior durante o PAA em relação ao PAI ($Z=4,95$; $P<0,01$) (Tabelas 7 e 8), devido provavelmente à condição de confinamento na planta-fonte com população bacteriana ($\approx 10^6$ UFC/g de tecido) e presença de vasos obstruídos, o que pode ter limitado a alimentação e sobrevivência desses insetos. A melhor qualidade das plantas-teste de citros, as quais eram jovens, com brotação e sadias, provavelmente deve ter favorecido a alimentação e sobrevivência dos insetos durante o PAI. Em cafeeiro, não houve diferença significativa ($Z=1,55$; $P>0,05$) entre a mortalidade durante o PAA e PAI (Tabelas 7 e 8).

Em citros, a taxa total de mortalidade durante o PAA foi de 9,3%, sendo similar a de 6,4% observada em cafeeiro ($Z=1,67$; $P>0,05$) (Tabela 7). Já durante o PAI, a taxa de mortalidade total foi maior em cafeeiro (4,1%) do que em citros (1,8%) ($Z=2,0$; $P<0,05$) (Tabela 8).

Comparando-se a mortalidade das espécies de cigarrinhas em citros e cafeeiro, verificou-se maior porcentagem de *B. xanthophis* mortas durante o PAA em citros (14,3%) ($Z=2,0$; $P<0,05$) e de *H. ignorata* durante o PAI em cafeeiro (10%) ($Z=2,29$; $P<0,05$), sendo que a mortalidade das demais espécies não diferiu entre os dois hospedeiros (Tabelas 7 e 8).

Esses dados são importantes para o planejamento de testes de transmissão, pois deve-se prever que cerca de 6 a 10% dos insetos podem morrer durante o PAA, devendo-se utilizar um número extra de cigarrinhas. Além disso, deve-se considerar que a mortalidade é variável entre as espécies vetoras e entre as plantas hospedeiras.

Tabela 7. Porcentagem de mortalidade das cigarrinhas durante o período de 48 h de acesso à aquisição de *Xylella fastidiosa* em plantas infectadas de *Citrus sinensis* e *Coffea arabica*.

Espécies de cigarrinha	Mortalidade (%)	
	<i>C. sinensis</i>	<i>C. arabica</i>
<i>Bucephalagonia xanthophis</i>	14,3 ^a (175) a	7,4 (162) b
<i>Dilobopterus costalimai</i>	6,3 (160) a	5,7 (159) a
<i>Homalodisca ignorata</i>	3,8 (52) a	3,8 (52) a
<i>Oncometopia facialis</i>	8 (98) a	7,2 (97) a
Total	9,3 (485) a	6,4 (470) a

^aPorcentagens seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de diferença entre duas proporções ($P \leq 0,05$). Números entre parênteses representam o total de indivíduos avaliados.

Tabela 8. Porcentagem de mortalidade das cigarrinhas em mudas sadias de *Citrus sinensis* e *Coffea arabica* durante o período de 48 h de acesso à inoculação de *Xylella fastidiosa*.

Espécies de cigarrinhas	Mortalidade (%)	
	<i>C. sinensis</i>	<i>C. arabica</i>
<i>Bucephalagonia xanthophis</i>	1,4 ^a (150) a	2 (150) a
<i>Dilobopterus costalimai</i>	3,4 (150) a	6 (150) a
<i>Homalodisca ignorata</i>	0 (50) b	10 (50) a
<i>Oncometopia facialis</i>	1,1 (90) a	1,1 (90) a
Total	1,8 (440) b	4,1 (440) a

^aPorcentagens seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de diferença entre duas proporções ($P \leq 0,05$). Números entre parênteses representam o total de indivíduos avaliados.

4.3.2 Detecção de *X. fastidiosa* nos insetos vetores após o PAA

Todos os 1105 insetos utilizados nos testes de transmissão foram processados para detecção de *X. fastidiosa*, no entanto as 500 primeiras amostras foram perdidas por degradação de DNA. Dessa forma, os dados de detecção de *X. fastidiosa* em cigarrinhas correspondem aos dois últimos períodos de inoculação (verão 2000-2001 e primavera 2001).

Para as quatro espécies de cigarrinhas, a taxa de infectividade foi baixa após o PAA de *X. fastidiosa* em plantas-fonte de citros e café (Tabela 9). Em citros, a infectividade variou de 0% em *H. ignorata* para o máximo de 12,1% em *B. xanthophis*. Em café, a variação foi de 4,7% em *D. costalimai* para 11,5% em *H. ignorata*.

Para uma mesma espécie de cigarrinha, a taxa de infectividade em citros e cafeeiro foi semelhante, com exceção da espécie *H. ignorata* que apresentou maior proporção de insetos infectivos em cafeeiro do que em citros. No entanto, processou-se um menor número de indivíduos de *H. ignorata*, o que pode ter gerado uma sub ou superestimativa de sua taxa de infectividade em citros e cafeeiro, respectivamente.

Considerando-se o número total de insetos infectivos em citros (19) e em cafeeiro (15), observou-se uma diferença substancial no número de insetos positivos por *nested-PCR* entre as cigarrinhas testadas para infectividade aos 0 e 12 dias após o PAA em plantas de citros e de café infectadas com *X. fastidiosa* (Figura 6). Talvez seja requerido um período após a aquisição para a multiplicação da bactéria na cabeça das cigarrinhas vetoras, aumentando-se as chances de detecção de *X. fastidiosa*. No caso da transmissão da estirpe de videira de *X. fastidiosa* por *Graphocephala atropunctata* (Signoret), observou-se um aumento na proporção de insetos vetores infectivos e na eficiência de transmissão entre 1 h e 7 dias após aquisição (Hill & Purcell, 1995a). Entretanto, esses autores constataram que grandes populações da bactéria na cabeça do inseto não asseguram a transmissão; alguns insetos que falharam em transmitir *X. fastidiosa* tiveram elevada população bacteriana detectada por cultura. Além disso, a falta de um período latente perceptível sugere que um

pequeno número de células bacterianas no estomodéu já é suficiente para a transmissão (Hill & Purcell, 1995a).

Tabela 9. Proporção de cigarrinhas infectivas após 0-12 dias do período de 48 h de acesso à aquisição de *Xylella fastidiosa* em plantas infectadas de *Citrus sinensis* e *Coffea arabica*.

Espécies de cigarrinhas	Proporção de cigarrinhas infectivas ^a	
	<i>C. sinensis</i>	<i>C. arabica</i>
<i>Bucephalagonia xanthophis</i>	11/91 ^b (12,1) a	6/88 (6,8) a
<i>Dilobopterus costalimai</i>	6/90 (6,7) a	3/64 (4,7) a
<i>Homalodisca ignorata</i>	0/21 (0) b	3/26 (11,5) a
<i>Oncometopia facialis</i>	2/29 (6,8) a	3/41 (7,3) a
Total	19/231 (8,2)	15/219 (6,8)

^aProporção de cigarrinhas positivas para *X. fastidiosa* pelo teste de *nested-PCR* sobre o total de cigarrinhas avaliadas;

^bProporções seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de diferença entre duas proporções ($P \leq 0,05$). Números entre parênteses representam a porcentagem de infectividade.

McCoy et al. (1978) verificaram que nem todos os insetos confinados em plantas de *Catharanthus roseus* L. infectadas por *X. fastidiosa* tornaram-se infectivos, possivelmente devido à distribuição desuniforme da bactéria na planta hospedeira. Nos citros, *X. fastidiosa* também se encontra distribuída irregularmente (Chang et al., 1993), o que pode explicar as baixas taxas de infectividade obtidas. A baixa população bacteriana em plantas de citros ($\approx \log$ 5-6 UFC/g de tecido) também pode afetar a eficiência de aquisição pelos vetores (Almeida et al., 2001).

A taxa média de infectividade natural de vetores coletados em pomares cítricos do estado de São Paulo, determinada por DAS-ELISA com antissoros policlonais para *X. fastidiosa*, foi de 4,2%, sendo que *D. costalimai* e *B. xanthophis* apresentaram infectividade de 4,8 e 2,6%, respectivamente (Pereira, 2000). Essas taxas são um pouco inferiores às observadas neste trabalho, possivelmente pelo fato de que nesta pesquisa os insetos foram confinados

sobre uma planta-fonte da bactéria, além de o método de detecção utilizado (PCR) ser mais sensível que o DAS-ELISA (Minsavage et al., 1994).

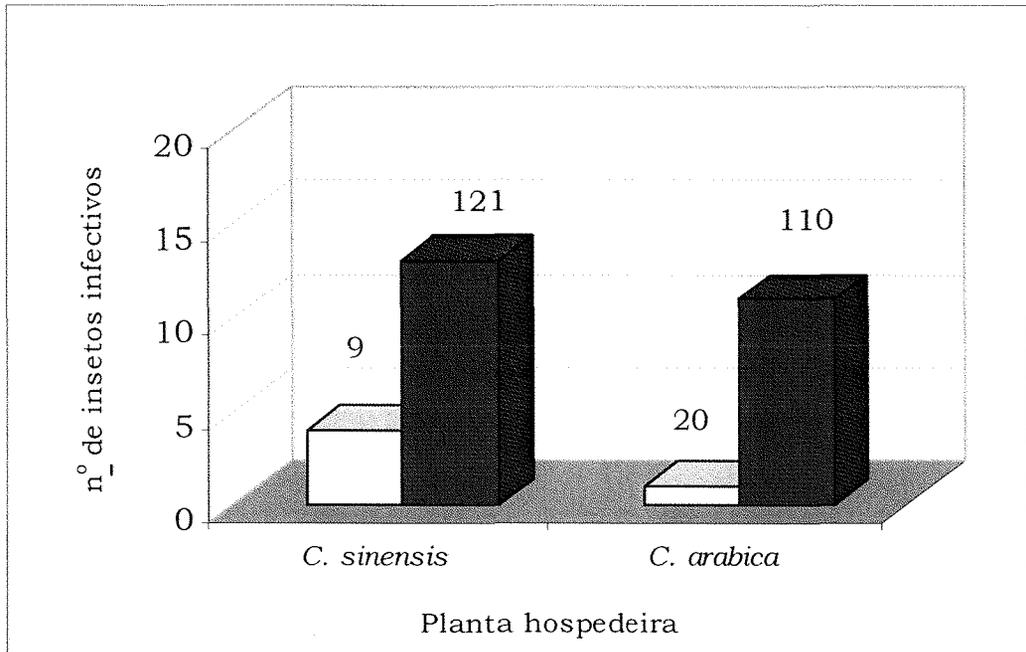


Figura 6 - Número de cigarrinhas infectivas aos 0 (barra branca) e 12 (barra escura) dias após o período de 48 h de acesso à aquisição (PAA) de *Xylella fastidiosa* em plantas infectadas de *Citrus sinensis* e *Coffea arabica*. Números sobre as barras representam o total de indivíduos avaliados.

Dados de infectividade são importantes como indicativos de que as cigarrinhas adquiriram *X. fastidiosa*, o que não implica necessariamente na transmissão do patógeno. Almeida (1999) avaliou a infectividade e transmissão por 225 cigarrinhas adultas das espécies *O. facialis* e *D. costalimai*, que haviam sido submetidas a um PAA de 48 h em plantas cítricas infectadas por *X. fastidiosa*. Este autor encontrou 20 indivíduos infectivos por isolamento em meio de cultura, mas em nenhuma planta-teste inoculada foi detectada *X. fastidiosa*. Contrariamente, tem sido constatada a transmissão de *X. fastidiosa* por cigarrinhas sem agregados de bactéria visíveis por microscopia eletrônica de varredura (Brlansky et al., 1983; Purcell et al., 1979) ou detectáveis através

de cultura (Hill & Purcell, 1995a). Assim, os testes de detecção de *X. fastidiosa* não necessariamente revelam a habilidade do inseto vetor em transmitir a bactéria.

4.3.3 Detecção de *X. fastidiosa* em plantas-teste

Aos 6 meses após a inoculação já foi possível a detecção de *X. fastidiosa* em plantas de citros e de café inoculadas por cigarrinhas, mas a proporção de plantas positivas aumentou sensivelmente após 12 a 18 meses da inoculação (Tabela 10). Já para as plantas de citros e de café inoculadas por agulha, a proporção de plantas positivas foi maior aos 6 meses, provavelmente devido às altas concentrações bacterianas inoculadas por este método artificial.

Tabela 10. Detecção de *Xylella fastidiosa* em plantas de *Citrus sinensis* e *Coffea arabica* inoculadas por cigarrinhas e por agulha, avaliadas aos 6 e 12-18 meses após a inoculação.

Espécie de cigarrinha	Proporção de plantas positivas ^a			
	<i>C. sinensis</i>		<i>C. arabica</i>	
	6 meses	12-18 meses	6 meses	12-18 meses
<i>Bucephalogonia xanthophis</i>	6/49	1/49	2/50	3/50
<i>Dilobopterus costalimai</i>	7/48	9/48	6/50	6/50
<i>Homalodisca ignorata</i>	4/47	8/47	1/50	0/50
<i>Oncometopia facialis</i>	0/30	1/30	0/30	1/30
Controle positivo (agulha) ^b	31/39	1/39	27/44	2/44
Controle negativo ^c	0/76	0/76	0/109	0/109
Total	48/292	20/292	36/333	12/333

^aProporção de plantas positivas para *X. fastidiosa* pelos testes de PCR e/ou cultura sobre o total de plantas avaliadas em todas as épocas de inoculação;

^bPlantas inoculadas mecanicamente por agulha com 5 µL de uma suspensão de células cultivadas dos respectivos isolados de *X. fastidiosa*, com concentração de $\approx 10^7$ - 10^8 UFC/mL de tampão;

^cPlantas-teste não inoculadas.

A quantidade de células bacterianas depositadas pelas cigarrinhas no xilema das plantas é inferior. Esse fato, associado à dificuldade de sobrevivência de infecções iniciais de *X. fastidiosa* em determinadas épocas do ano (Purcell, 1981), pode resultar em menor proporção de plantas positivas aos 6 meses após a inoculação, com chances de aumento com o passar do tempo ou em épocas que sejam mais favoráveis à detecção de *X. fastidiosa* em plantas. Paradela Filho et al. (1997) verificaram que a concentração de *X. fastidiosa* em ramos de cafeeiro varia com a época do ano em que os ramos são coletados, sendo que durante o período de janeiro a março (verão) as plantas apresentaram uma quantidade muito pequena de bactéria.

O teste de PCR detectou mais plantas positivas inoculadas por cigarrinhas do que o isolamento primário (Tabelas 11 e 12), indicando que um baixo número de células bacterianas é depositado pelas cigarrinhas nas plantas de citros e de café. Para as plantas inoculadas mecanicamente, os dois testes (cultura e PCR) foram semelhantes na detecção de *X. fastidiosa* devido à inoculação de suspensões mais concentradas dessa bactéria. Como o teste de PCR é mais sensível, detectando de 10 a 100 células bacterianas (Minsavage et al., 1994), é justificável a detecção de um menor número de plantas por isolamento, cujo limite de detecção está em torno de 10^3 UFC/g de tecido (Almeida et al., 2001). Como o isolamento foi realizado somente aos 6 meses após a inoculação, a população bacteriana poderia estar abaixo do limite de detecção da técnica. Deve-se considerar também que *X. fastidiosa* está irregularmente distribuída nas plantas hospedeiras (Smart et al., 1998) e que a população da bactéria varia grandemente com a estação do ano (Hopkins et al., 1991). No entanto, a maioria das amostras foi positiva nos dois testes ou tiveram repetibilidade no teste de PCR, que foi realizado no mínimo em duas ocasiões. Em nenhuma das plantas inoculadas com tampão PBS ou que foram mantidas como testemunha das épocas de inoculação (controles negativos), foi detectada *X. fastidiosa* por isolamento ou teste de PCR (Tabelas 11 e 12), comprovando-se a sanidade das mudas cítricas e de café utilizadas no experimento.

Tabela 11. Detecção de *Xylella fastidiosa* em plantas de *Citrus sinensis* inoculadas por cigarrinhas e taxa de transmissão por indivíduo nas quatro épocas de inoculação.

Espécie	Época ^a	Nº. plantas inoculadas ^b	Proporção de plantas positivas ^c			Pd
			Cultura	PCR	Total	
<i>Bucephalagonia xanthophis</i>	1	4	0/4	0/4	0/4	0
	2	12	1/12	1/12	2/12	0,059
	3	16	1/16	3/16	3/16	0,067
	4	17	0/17	2/17	2/17	0,041
<i>Dilobopterus costalimai</i>	1	6	3/6	5/6	5/6	0,450
	2	11	0/11	4/11	4/11	0,140
	3	17	1/17	1/17	3/17	0,063
	4	14	2/14	4/14	4/14	0,106
<i>Homalodisca ignorata</i>	1	5	1/5	1/5	1/5	0,200
	2	15	0/15	5/15	5/15	0,333
	3	22	0/22	4/22	4/22	0,182
	4	5	0/5	2/5	2/5	0,400
<i>Oncometopia facialis</i>	1	10	0/10	0/10	0/10	0
	2	9	0/9	1/9	1/9	0,039
	3	5	0/5	0/5	0/5	0
	4	6	0/6	0/6	0/6	0
Controle Negativo ^e	1	10	0/10	0/10	0/10	NA ^g
	2	10	0/10	0/10	0/10	NA
	3	20	0/20	0/20	0/20	NA
	4	10	0/10	0/10	0/10	NA
Controle Positivo ^f	1	8	5/8	4/8	5/8	NA
	2	8	6/8	7/8	7/8	NA
	3	15	10/15	10/15	13/15	NA
	4	9	5/9	6/9	7/9	NA

^aÉpocas de inoculação, 1: outono-inverno 2000 (maio-junho); 2: primavera 2000 (agosto-outubro); 3: verão 2000/2001 (dezembro/00-março/01); 4: primavera 2001 (agosto-novembro); ^bCada planta-teste foi inoculada por um grupo de três indivíduos, exceto no caso de *H. ignorata*, em que se utilizou apenas um inseto por planta; ^cOs testes de detecção foram realizados aos 6, 12 e 18 meses após a inoculação, com exceção do último lote (inoculado de agosto a outubro de 2001) que foi avaliado aos 6 e 12 meses após inoculação; ^dTaxa de transmissão por indivíduo, estimada pela fórmula $P = 1 - (1 - I)^{1/k}$, onde I corresponde à proporção de plantas positivas e K ao número de insetos por planta (Swallow, 1985); ^ePlantas-teste não expostas às cigarrinhas; ^fPlantas-teste inoculadas mecanicamente por agulha com suspensão de células cultivadas de *X. fastidiosa* (isolado de citros CCT 6570) na concentração de 10^8 UFC/mL; ^gNA: não aplicável.

Tabela 12. Detecção de *Xylella fastidiosa* em plantas de *Coffea arabica* inoculadas por cigarrinhas e taxa de transmissão por indivíduo nas quatro épocas de inoculação.

Espécie	Época ^a	nº. plantas inoculadas ^b	Proporção de plantas positivas ^c				Pd
			Cultura	PCR	Total		
<i>Bucephalagonia xanthophis</i>	1	3	0/3	0/3	0/3	0	
	2	11	0/11	0/11	0/11	0	
	3	20	0/20	1/20	1/20	0,017	
	4	16	0/16	4/16	4/16	0,091	
<i>Dilobopterus costalimai</i>	1	12	1/12	2/12	2/12	0,059	
	2	12	3/12	4/12	4/12	0,126	
	3	16	0/16	2/16	2/16	0,044	
	4	10	0/10	2/10	2/10	0,072	
<i>Homalodisca ignorata</i>	1	10	1/10	0/10	0/10	0	
	2	9	0/9	0/9	0/9	0	
	3	26	1/26	1/26	1/26	0,038	
	4	5	0/5	0/5	0/5	0	
<i>Oncometopia facialis</i>	1	4	0/4	0/4	0/4	0	
	2	13	0/13	0/13	0/13	0	
	3	2	0/2	0/2	0/2	0	
	4	10	0/10	1/10	1/10	0,035	
Controle Negativo ^e	1	10	0/10	0/10	0/10	NA ^g	
	2	10	0/10	0/10	0/10	NA	
	3	20	0/20	0/20	0/20	NA	
	4	10	0/10	0/10	0/10	NA	
Controle Positivo ^f	1	9	5/9	6/9	7/9	NA	
	2	9	5/9	5/9	7/9	NA	
	3	17	2/17	4/17	6/17	NA	
	4	9	8/9	2/9	9/9	NA	

^aÉpocas de inoculação, 1: outono-inverno 2000 (maio-junho); 2: primavera 2000 (agosto-outubro); 3: verão 2000/2001 (dezembro/00-março/01); 4: primavera 2001 (agosto-novembro); ^bCada planta-teste foi inoculada por um grupo de três indivíduos, exceto no caso de *H. ignorata*, em que se utilizou apenas um inseto por planta; ^cOs testes de detecção foram realizados aos 6, 12 e 18 meses após a inoculação, com exceção do último lote (inoculado de agosto a outubro de 2001) que foi avaliado aos 6 e 12 meses após inoculação; ^dTaxa de transmissão por indivíduo, estimada pela fórmula $P = 1 - (1 - I)^{1/k}$, onde I corresponde à proporção de plantas positivas e K ao número de insetos por planta (Swallow, 1985); ^ePlantas-teste não expostas às cigarrinhas; ^fPlantas-teste inoculadas mecanicamente por agulha com suspensão de *X. fastidiosa* (isolado de café CCT 6756) na concentração de 10^8 UFC/mL; ^gNA: não aplicável.

4.3.3.1 Detecção de *X. fastidiosa* em função da espécie vetora

Através do teste Qui-quadrado, verificou-se diferença significativa na porcentagem de plantas de citros positivas inoculadas pelas quatro espécies de cigarrinhas ($X^2=17,37$; $P=0,0006$). Através da comparação entre duas espécies por contrastes, verificou-se que *D. costalimai* transmitiu *X. fastidiosa* para uma maior proporção de plantas do que *B. xanthophis* e *O. facialis*, mas não diferiu de *H. ignorata*, sendo que essa apresentou maior proporção de plantas positivas do que *O. facialis*, não diferindo de *B. xanthophis* (Tabela 13).

Para o cafeeiro, também houve diferença significativa entre as espécies ($X^2=10,76$; $P=0,013$), sendo que *D. costalimai* apresentou maior porcentagem de plantas positivas que *H. ignorata* e *O. facialis*, mas não diferiu de *B. xanthophis*. As demais espécies não diferiram significativamente quanto à porcentagem de plantas positivas (Tabela 13).

Tabela 13. Comparação estatística da porcentagem total de plantas-teste positivas para *Xylella fastidiosa* após 12 a 18 meses da inoculação por diferentes espécies de cigarrinhas.

Espécies de cigarrinhas ^a	Porcentagem de plantas positivas (%) ^b	
	<i>C. sinensis</i>	<i>C. arabica</i>
<i>Bucephalagonia xanthophis</i>	14,35 b	10 ab
<i>Dilobopterus costalimai</i>	34,8 a	20 a
<i>Homalodisca ignorata</i>	30 ab	2,2 b
<i>Oncometopia facialis</i>	3,2 c	3,6 b

^aUtilizaram-se grupos de três indivíduos por planta-teste, exceto no caso de *H. ignorata* em que se utilizou apenas um indivíduo por planta;

^bPorcentagens totais seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si por comparação de contrastes ($P \leq 0,05$). Valores obtidos agrupando-se os dados das quatro épocas de inoculação.

Assim, as espécies que transmitiram *X. fastidiosa* para uma maior porcentagem de plantas cítricas foram *D. costalimai* e *H. ignorata*, pertencentes às tribos Cicadellini e Proconiini, respectivamente. Já em cafeeiro, *D. costalimai*

(Cicadellini) apresentou maior porcentagem de plantas positivas que *O. facialis* e *H. ignorata* (ambas Proconiini).

4.3.3.2 Detecção de *X. fastidiosa* em função da planta hospedeira

Considerando as quatro épocas de inoculação, verificou-se que as proporções totais de plantas positivas inoculadas pelas quatro espécies de cigarrinhas foram mais altas em citros do que em cafeeiro, com exceção da primavera 2001 em que foi detectada *X. fastidiosa* em um número similar de plantas de citros e café (Figura 7). As proporções de plantas positivas inoculadas mecanicamente oscilaram, sendo superiores em citros na primavera 2000 e verão 2000/2001 e em cafeeiro no outono-inverno 2000 e primavera 2001.

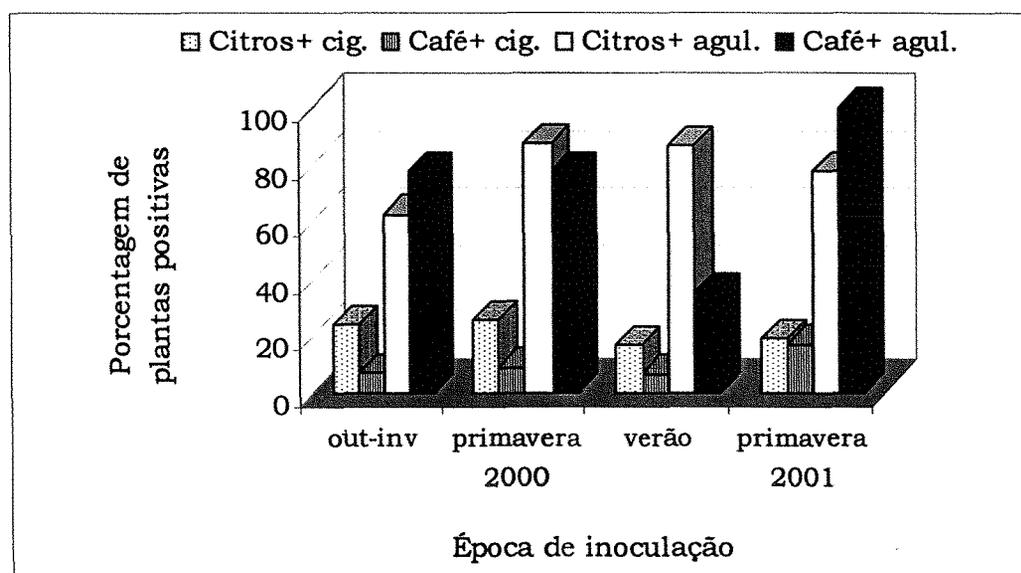


Figura 7 - Porcentagem total de plantas de *Citrus sinensis* e *Coffea arabica* positivas para *Xylella fastidiosa* após inoculação por cigarrinhas e por agulha (controle positivo) em quatro épocas distintas. Out-inv: maio-junho/00; primavera 2000: agosto-outubro; verão 2000/2001: dezembro/00-março/01; primavera 2001: agosto-novembro.

Comparando-se as porcentagens de plantas positivas de citros e de café inoculadas por cada espécie de cigarrinha, observou-se diferença significativa apenas para *H. ignorata* ($Z=3,56$; $P<0,01$) que apresentou maior porcentagem de plantas positivas de citros do que de café (Figura 8). Para *B. xanthophis* ($Z=0,66$; $P>0,05$), *D. costalimai* ($Z=1,63$; $P>0,05$) e *O. facialis* ($Z=0,085$; $P>0,05$) não houve diferença significativa na porcentagem de plantas positivas entre os dois hospedeiros (Figura 8).

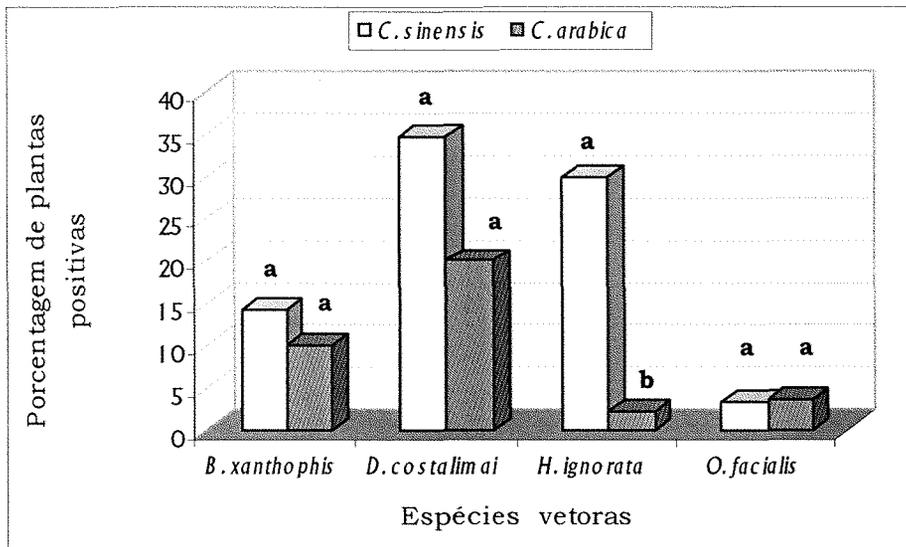


Figura 8 - Detecção de *Xylella fastidiosa* em plantas de *Citrus sinensis* e *Coffea arabica* inoculadas por *Bucephalagonia xanthophis*, *Dilobopterus costalimai*, *Homalodisca ignorata* e *Oncometopia facialis*, agrupando-se os dados de todas as épocas de inoculação. Porcentagens obtidas para uma mesma espécie de cigarrinha e com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de diferença entre duas proporções ($P\leq 0,05$).

4.3.3.3 Detecção de *X. fastidiosa* em função da época de inoculação

Observou-se oscilação na porcentagem de plantas positivas inoculadas no período de outono-inverno 2000 em relação à primavera 2000, tanto do controle positivo de citros, quanto das plantas inoculadas por *B. xanthophis*, *H. ignorata* e *O. facialis* em citros e *D. costalimai* em cafeeiro (Tabelas 11 e 12 e Figuras 9A e B). Nas plantas de citros inoculadas por *D. costalimai*, verificou-se inclusive uma redução acentuada na porcentagem de plantas positivas de 83% para 36% do primeiro em relação ao segundo período de inoculação (Figura 9A); no entanto, deve-se salientar que o menor número (6) de plantas testadas para *D. costalimai* no outono-inverno pode ter contribuído para uma super estimativa da transmissão nessa época. Na primavera 2000, a proporção de plantas de citros positivas nos vários tratamentos foi aparentemente similar à da mesma época em 2001 (primavera 2001) (Figura 9A). No cafeeiro, embora se observou redução na proporção de plantas positivas inoculadas por *D. costalimai*, houve aumento naquelas inoculadas por *B. xanthophis* e *O. facialis* na primavera 2001 (Figura 9B). Além disso, *X. fastidiosa* foi detectada em 100% das plantas de café inoculadas mecanicamente nessa última época de inoculação.

Apesar das oscilações observadas, o teste Qui-quadrado não detectou diferença significativa na porcentagem de plantas positivas inoculadas por cigarrinhas em citros ($X^2=1,79$; $P=0,617$) e cafeeiro ($X^2=3,44$; $P=0,329$) em função da época de inoculação e, para as duas plantas hospedeiras, não houve interação espécie x época de inoculação. Tais oscilações podem ter ocorrido devido ao número variável de plantas de citros e de café inoculadas em cada época, devido à disponibilidade irregular de insetos vetores sadios para os testes (Tabelas 11 e 12). No verão foi possível inocular um maior número de plantas por haver maior disponibilidade de insetos na criação; isto foi devido ao encurtamento do ciclo biológico das cigarrinhas pelas temperaturas mais elevadas no verão.

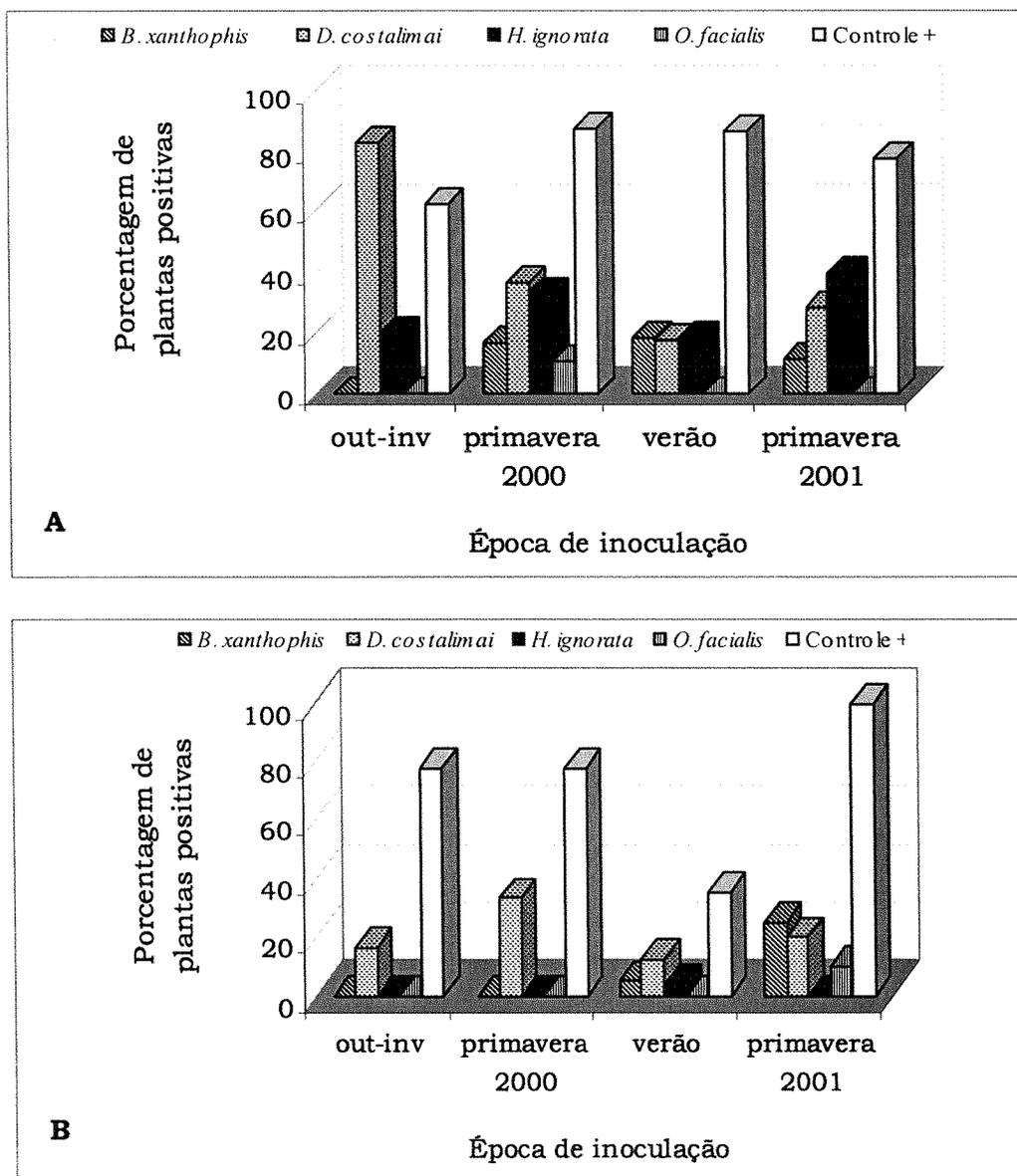


Figura 9 - Porcentagem de plantas positivas de *Citrus sinensis* (A) e *Coffea arabica* (B) positivas para *Xylella fastidiosa* após inoculação por *Bucephalagonia xanthophis*, *Dilobopterus costalimai*, *Homalodisca ignorata*, *Oncometopia facialis* e por agulha (controle positivo) em quatro épocas distintas. Out-inv: maio-junho/00; primavera 2000: agosto-outubro; verão 2000/2001: dezembro/00-março/01; primavera 2001: agosto-novembro.

Já no caso das plantas inoculadas mecanicamente, houve diferença significativa na porcentagem de plantas positivas entre as épocas de inoculação para o cafeeiro ($X^2=15,32$; $P=0,0016$), mas não para citros ($X^2=2,10$; $P=0,5511$). Essa constatação em cafeeiro foi evidente para a inoculação de verão, na qual a porcentagem de plantas positivas foi bem menor do que nas outras três épocas de inoculação (Tabela 12 e Figura 9B).

O período posterior à inoculação pode ser decisivo na sobrevivência das infecções iniciais, multiplicação e movimento sistêmico de *X. fastidiosa* em plantas hospedeiras. A capacidade da bactéria em se multiplicar e se movimentar no xilema das plantas está relacionada com a virulência das estirpes (Hopkins, 1985), clima (Hopkins e Thompson, 1984), tempo de acúmulo (Fry & Milholand, 1990; Hill & Purcell, 1995b) e mudanças fisiológicas na planta após a infecção (Hopkins & Thompson, 1984; Queiroz-Voltan & Paradela Filho, 1999). Em alguns hospedeiros a bactéria se desenvolve lentamente, chegando a morrer algumas semanas após ter iniciado sua multiplicação (Hill & Purcell, 1995b; Purcell & Saunders, 1999). Talvez em cafeeiro, a época posterior a março seja desfavorável para a proliferação da bactéria na planta ou o próprio cafeeiro apresente mecanismos mais eficientes para impedir a multiplicação e infecção de *X. fastidiosa*. Essa hipótese é reforçada pelo fato de que mesmo inoculando-se altas concentrações bacterianas (10^8 a 10^9 UFC/mL) a proporção de plantas de café positivas foi baixa (35,3%) nas inoculações mecânicas realizadas no verão.

Segundo Queiroz-Voltan & Paradela Filho (1999), os danos causados por *X. fastidiosa* nos tecidos foliares de cafeeiro foram bem menores quando comparados com os observados para citros, reforçando a idéia de que o cafeeiro apresenta maior tolerância a essa bactéria do que plantas de citros.

Já em citros, os resultados obtidos por Pereira (2000) indicaram tendência de maior recuperação de células viáveis de *X. fastidiosa* de ramos inoculados mecanicamente no campo quando as inoculações foram realizadas nos meses de dezembro e fevereiro (verão). A fenologia da árvore pode influenciar no sucesso da inoculação e infecção de citros com *X. fastidiosa*, em função de possíveis alterações na fisiologia do xilema em diferentes épocas do

ano (Lopes, 1999). O mesmo pode ocorrer em plantas de café. Para a estirpe de PD, pode haver redução no sucesso de infecção da inoculação se esta for seguida por prolongado período de frio no início da primavera e se um menor número de células de *X. fastidiosa* forem introduzidas nas plantas pelo vetor (Feil & Purcell, 2001).

Nesta pesquisa, embora a proporção de plantas cítricas positivas inoculadas mecanicamente no verão tenha sido alta (87%), houve redução nas inoculadas por *D. costalimai* e *H. ignorata* (Figura 9A). Na última época de inoculação (primavera 2001), a proporção de plantas positivas de citros e cafeeiro inoculadas por cigarrinhas aumentou em relação ao verão, com exceção de *B. xanthophis* para a qual houve uma pequena redução em citros. Quanto às plantas de café inoculadas mecanicamente, houve um aumento acentuado dessa proporção na inoculação de primavera (agosto/novembro 2001) em relação à de verão (dezembro/00-março/01). Assim, o período posterior à inoculação da primavera (outubro/novembro), com altas temperaturas e umidade elevada pode ser mais adequado à sobrevivência de infecções iniciais da bactéria, favorecendo a sua multiplicação e movimento sistêmico pelo aumento na disponibilidade de água e nutrientes e pela redução na tensão dos vasos do xilema (Pereira, 2000).

A transmissão de *X. fastidiosa* para videira no início da primavera é mais importante no estabelecimento de infecções crônicas (Purcell, 1981). Esse autor constatou que somente as inoculações realizadas por cigarrinhas nos meses de primavera resultam em infecções que podem persistir de um ano para o outro em videira. Assim, as infecções de *X. fastidiosa*, mediadas pelos vetores que ocorrem nos meses de verão não desenvolvem sintomas e, em anos subsequentes, o patógeno desaparece na maioria das videiras que foram infectadas nessa época.

4.3.4 Eficiência de transmissão de *X. fastidiosa* pelos insetos vetores

A eficiência de transmissão de *X. fastidiosa* por cigarrinhas variou com a planta hospedeira e foi significativamente maior em citros do que em cafeeiro para *H. ignorata* ($Z=3,71$; $P<0,01$). Para *B. xanthophis* ($Z=0,4$; $P>0,05$), *D. costalimai* ($Z=1,0$; $P>0,05$) e *O. facialis* ($Z=0,04$; $P>0,05$) não houve diferença significativa na eficiência de transmissão entre as duas plantas hospedeiras (Figura 10).

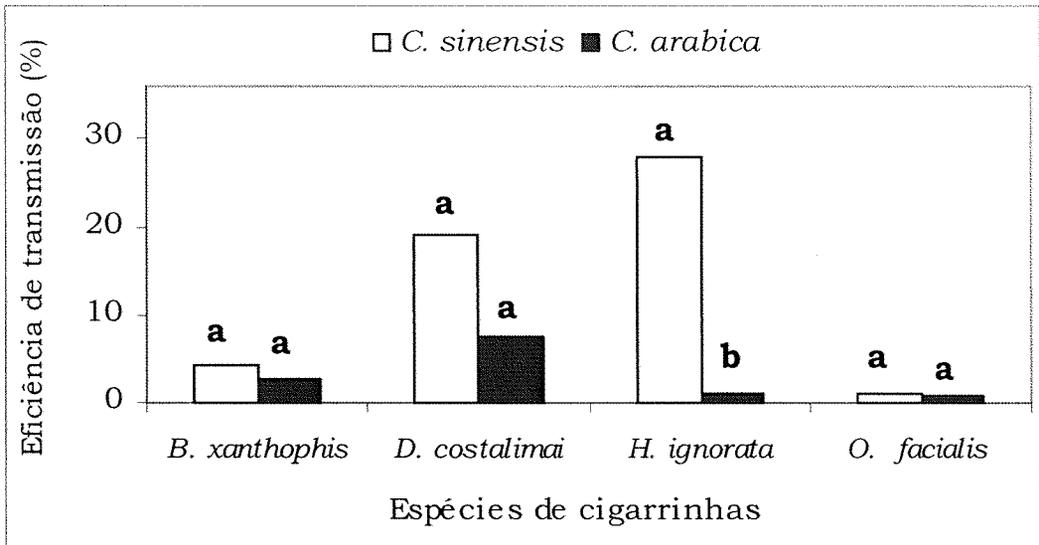


Figura 10 - Taxa de transmissão de *Xylella fastidiosa* por indivíduo de *Bucephalagonia xanthophis*, *Dilobopterus costalimai*, *Homalodisca ignorata* e *Oncometopia facialis* para plantas de *Citrus sinensis* e *Coffea arabica*, agrupando-se os dados das quatro épocas de inoculação. As taxas foram estimadas pela fórmula $P= 1-(1-I)^{1/k}$, onde I corresponde à proporção de plantas positivas e K ao número de insetos por planta (Swallow, 1985); os valores de P foram convertidos para porcentagem ($\times 100$). Porcentagens obtidas para uma mesma espécie de cigarrinha e com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de diferença entre duas proporções ($P\leq 0,05$).

Em citros, *H. ignorata* diferiu significativamente de *B. xanthophis* ($Z=3,18$; $P<0,01$) e *O. facialis* ($Z=3,2$; $P<0,01$) quanto à eficiência de transmissão, destacando-se como uma das espécies mais eficientes, mas não diferiu significativamente de *D. costalimai* ($Z=1,89$; $P>0,05$) (Tabela 14). As demais espécies, quando comparadas duas a duas, não diferiram significativamente entre si quanto à eficiência de transmissão para citros. Em cafeeiro, não houve diferença significativa na eficiência de transmissão entre as quatro espécies de cigarrinhas (Tabela 14).

Tanto na porcentagem de plantas positivas para *X. fastidiosa* quanto na eficiência de transmissão dessa bactéria para o citros, *H. ignorata* destacou-se em relação às outras espécies de cigarrinhas. A maior taxa de transmissão obtida para *H. ignorata* em citros, pode estar relacionada à utilização de apenas um indivíduo dessa espécie por gaiola para inocular as plantas-teste. Por essa razão, a eficiência de transmissão por indivíduo de *H. ignorata* igualou-se à porcentagem de plantas positivas. Para as demais espécies de cigarrinhas, em que foram utilizados três indivíduos por planta-teste, a utilização da binomial de terceiro grau no cálculo da estimativa de transmissão por indivíduo fez com que a eficiência de transmissão fosse inferior à porcentagem de plantas positivas (Tabelas 13 e 14).

Em estudos de transmissão da estirpe de videira de *X. fastidiosa* por *G. atropunctata* envolvendo diferentes espécies de plantas, Hill & Purcel (1997) utilizaram grupos de quatro insetos por planta-teste na tentativa de aumentar a probabilidade de transmissão, porque se esperava uma taxa de transmissão mais baixa em outras plantas que não videiras. No entanto, esses autores também verificaram que quando se utiliza grupo de insetos a estimativa da probabilidade de um indivíduo transmitir é mais baixa, por ser calculada a partir de uma binomial de quarta ordem. Utilizando-se quatro indivíduos por planta-teste, a taxa de transmissão individual foi de 24%, enquanto que em outros estudos, em que se utilizou apenas um indivíduo por planta, a taxa ficou entre 90 e 100% (Hill & Purcell, 1995a; Purcell & Finlay, 1979).

Tabela 14. Comparação estatística da taxa de transmissão de *Xylella fastidiosa* por quatro espécies de cigarrinhas, para mudas de *Citrus sinensis* e *Coffea arabica*.

Espécie de cigarrinha ^a	Taxa de transmissão (%) ^{b,c}	
	<i>C. sinensis</i>	<i>C. arabica</i>
<i>Bucephalagonia xanthophis</i>	5,0 b	3,45 a
<i>Dilobopterus costalimai</i>	13,3 ab	7,17 a
<i>Homalodisca ignorata</i>	30 a	2,2 a
<i>Oncometopia facialis</i>	1,1 b	1,21 a

^aUtilizaram-se grupos de três indivíduos por planta-teste, exceto no caso de *H. ignorata* em que se utilizou apenas um indivíduo por planta;

^bTaxa de transmissão por indivíduo estimada pela fórmula $P = 1 - (1 - I)^{1/k}$, onde I corresponde à proporção de plantas positivas e K ao número de insetos por planta (Swallow, 1985). Os valores de P foram convertidos para porcentagem ($\times 100$). As taxas foram obtidas agrupando-se os dados de todas as épocas de inoculação;

^cPorcentagens seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de diferença entre duas proporções ($P \leq 0,05$).

Com a estirpe de citros (CVC), Yamamoto et al. (2002) utilizaram grupos de 10 indivíduos de *H. ignorata* por planta-teste para inocular mudas cítricas e relataram uma eficiência de transmissão por indivíduo (0,5%) muito mais baixa que a obtida para a mesma espécie neste trabalho (30%). Talvez, a utilização de 10 insetos por planta-teste possa ter influenciado de forma negativa o comportamento alimentar dos insetos, ocasionando competição por espaço e dispersão excessiva durante o período de acesso à inoculação.

Costa et al. (2000a), estudando a transmissão de *X. fastidiosa* por *Homalodisca coagulata* (Say) para oleandro na Califórnia, verificaram que a probabilidade de infecção não diferiu significativamente quando as plantas foram inoculadas com um inseto (83%) ou com três (94%). Entretanto, observaram altas taxas de mortalidade das plantas quando essas foram inoculadas por três insetos, indicando que um maior número de locais de infecção podem causar a morte das plantas de oleandro.

Nesta pesquisa, quando se optou pela utilização de mais de um indivíduo por planta-teste durante a inoculação, na verdade procurou-se aumentar as chances de inoculação em função das baixas eficiências de

transmissão de *X. fastidiosa* por cigarrinhas relatadas em citros (Descobertos, 1999; Krügner, et al., 2000). No entanto, devido à menor disponibilidade de *H. ignorata* nas coletas de campo, o que limitava a obtenção de posturas, optou-se pela utilização de apenas um indivíduo dessa espécie por planta-teste. Surpreendentemente, foi para *H. ignorata* que se obtiveram as maiores taxas de transmissão em citros. O mesmo não foi observado para o cafeeiro, em que a eficiência de transmissão por *H. ignorata* foi somente 2,2%, com detecção de *X. fastidiosa* em apenas uma planta dentre as 50 inoculadas (Tabela 12). Provavelmente, esse fato deve estar associado às preferências alimentares dessa espécie, já que a taxa de mortalidade de *H. ignorata* em café durante o PAI foi de 10%, enquanto que em citros não houve mortalidade (Tabela 8), indicando maior aceitabilidade da planta cítrica.

Outro fato que surpreendeu foi a baixa eficiência de transmissão de *X. fastidiosa* por *B. xanthophis* em citros (5%), inferior à média de 11,7% obtida por Krügner et al. (2000). Pela sua abundância em pomares cítricos em formação, *B. xanthophis* é apontada como uma das espécies mais importantes na transmissão de *X. fastidiosa* no campo (Yamamoto et al., 2001). Contrariamente, a eficiência de transmissão por *D. costalimai*, em citros foi mais elevada (13,3%) do que à relatada por Krügner et al. (2000) para a mesma espécie (5,5%).

Verificou-se que a eficiência de transmissão é uma característica inerente à espécie vetora ou à interação vetor-planta hospedeira, não estando necessariamente relacionada com subdivisões taxonômicas como tribos de cigarrinhas, como se supunha no início da realização deste trabalho. Em citros, *H. ignorata* (Proconiini) foi mais eficiente que *B. xanthophis* (Cicadellini) e *O. facialis* (Proconiini), mas em cafeeiro não houve diferença na eficiência de transmissão entre cigarrinhas das duas tribos (Tabela 14).

Grande variação tem sido observada na eficiência de transmissão de *X. fastidiosa* por cigarrinhas entre patossistemas. No caso da CVC, as taxas de transmissão relatadas até o momento variaram de 0,3 a 17% (Descobertos, 1999; Krügner et al., 2000; Yamamoto et al., 2002). Em videiras com PD, valores maiores que 90% foram obtidos (Purcell & Finlay, 1979), sendo que as

espécies vetoras variam grandemente na eficiência de transmissão (Hewitt et al., 1949). Embora existam várias diferenças entre os dois patossistemas, tais como planta hospedeira, estirpes do patógeno, espécies de vetores, condições climáticas, métodos experimentais, algumas características comportamentais e alimentares dos vetores podem estar relacionadas às grandes variações na eficiência entre espécies numa mesma planta hospedeira.

Diferenças na eficiência de transmissão dos vetores podem ser relacionadas com a preferência hospedeira (Lopes, 1996). Por exemplo, *Draeculocephala minerva* Ball e *Carneocephala fulgida* Nott. alimentam-se primariamente em gramíneas e apenas ocasionalmente em videiras e amendoeiras, enquanto que *G. atropunctata* é encontrada primariamente em árvores perenes, incluindo videiras (Raju & Wells, 1986). Assim, *G. atropunctata*, transmite *X. fastidiosa* com maior eficiência para videira que para hospedeiros herbáceos como alfafa. Já a espécie *D. minerva*, transmite *X. fastidiosa* para alfafa com maior eficiência que *G. atropunctata*, embora seja um vetor ineficiente na transmissão para videira (Purcell, 1979). Espécies de *Pagaronia* se mostraram ineficientes em teste de transmissão de *X. fastidiosa* para videira e alfafa, sendo que a sobrevivência dessas nos dois hospedeiros foi baixa (Severin, 1949), indicando, provavelmente, uma menor aceitabilidade de alfafa e videiras para alimentação (Purcell, 1979). Dessa forma, a importância do vetor varia com a sua preferência hospedeira.

Cordeiro et al. (2002) compararam a taxa de alimentação de *O. facialis* e *B. xanthophis* em diversas espécies de plantas hospedeiras de *X. fastidiosa*, através de quantificação da excreção líquida (*honeydew*) dos insetos durante 24 h de confinamento nessas plantas. Verificou-se maior volume e frequência de excreção em vinca (*C. roseus*) e videira (*Vitis vinifera* L.) do que em citros, indicando que citros não é um hospedeiro preferencial de alimentação para essas duas espécies de cigarrinhas. Esses dados, embora preliminares, podem explicar a baixa eficiência de transmissão dessas duas espécies de cigarrinhas em citros, uma vez que a eficiência do vetor pode estar condicionada a preferência alimentar pela espécie de planta hospedeira de *X. fastidiosa* (Hill & Purcell, 1997). Além disso, estudos de livre escolha realizados nesta pesquisa

(item 4.4.1.4) mostraram que as cigarrinhas *D. costalimai* e *O. facialis* rejeitam plantas cítricas infectadas por *X. fastidiosa* e sintomáticas e que *D. costalimai* praticamente não ingere seiva em plantas cítricas sintomáticas após 72 h de confinamento (item 4.4.2).

A eficiência de aquisição e inoculação de *X. fastidiosa* pode também estar relacionada ao local da planta onde os vetores se alimentam. Em videira, *G. atropunctata* alimenta-se nos pecíolos, nervuras foliares e ramos suculentos no topo da planta evitando alimentar-se nos ramos do baixeiro. Já *D. minerva* prefere se alimentar de gramíneas em ramos próximos à coroa. Quando colocada em plantas de videira, *D. minerva* alimenta-se nas porções baixas da planta e apresenta taxa de infectividade de 0-5%, enquanto que *G. atropunctata* chega a atingir quase 100% de infectividade alimentando-se nas porções mais altas. Dessa forma, supõe-se que a eficiência de aquisição de *X. fastidiosa* nos ramos do baixeiro seja menor do que próximo ao fluxo de crescimento das plantas (Hill & Purcell, 1997). A habilidade em transmitir o patógeno depende do local preferencial de alimentação do vetor e não necessariamente do hábitat ou da escolha da planta hospedeira (Turner & Pollard, 1955).

Além disso, no caso da videira, a taxa de aquisição de *X. fastidiosa* pelo vetor está positivamente relacionada com as altas populações da bactéria na planta-fonte, sendo que populações menores que 10^6 a 10^7 UFC/g, determinadas por cultura, resultam em reduzida eficiência de transmissão (Hill & Purcell, 1997). Segundo Almeida et al. (2001), a baixa população de células cultiváveis de *X. fastidiosa* em tecidos de plantas com CVC (10^5 a 10^6 UFC/g), comparada com plantas de videira com PD (10^8 a 10^9 UFC/g), sugere que muitas células em tecidos sintomáticos de citros podem estar mortas, explicando em parte a baixa taxa de transmissão por vetores em citros.

Neste trabalho, a eficiência de transmissão em citros variou de 1,1 a 30% e em cafeeiro de 1,2 a 7,2%, mesmo utilizando-se espécies de cigarrinhas iguais, plantas-fonte de citros e café com mesma população bacteriana, números semelhantes de plantas-teste por época de inoculação e mesmas condições experimentais. Provavelmente, as variações encontradas devem-se

aos inúmeros fatores já citados anteriormente, tais como: tempo gasto pelo vetor na alimentação em tecido infectivo, sobrevivência de infecções iniciais da bactéria (Purcell, 1981), distribuição de *X. fastidiosa* nas plantas hospedeiras (Mizubuti et al., 1994; Smart et al., 1998), preferências alimentares por plantas hospedeiras ou por porções específicas das plantas (Raju & Wells, 1986; Turner & Pollard, 1955) e épocas de inoculação (Purcell, 1981).

Assim, os resultados obtidos indicam que existe uma complexa relação planta-patógeno-vetor, sendo que a eficiência de transmissão varia com a espécie vetora e com a planta hospedeira de *X. fastidiosa* e não está condicionada a grupos taxonômicos (tribos Cicadellini X Proconiini) como se supôs em trabalhos prévios de transmissão da estirpe de CVC (Krügner et al., 2000) e de PD (Severin, 1949).

Para melhor compreender a epidemiologia das doenças transmitidas por *X. fastidiosa*, é importante conhecer os habitats dos insetos vetores e saber como seus movimentos estão relacionados com a distribuição e o título do inóculo nas plantas (Adlerz, 1980). A definição da época mais racional para o controle dos vetores, visando à redução na disseminação da CVC requer não apenas o conhecimento da dinâmica populacional das espécies chaves, mas também, uma análise da probabilidade de transmissão e infecção das plantas cítricas em diferentes épocas do ano (Lopes, 1999). Essas mesmas considerações são válidas para o manejo da ARC.

4.4 Testes de comportamento alimentar das cigarrinhas em citros

4.4.1 Estudos de preferência em livre escolha

Nos testes de livre escolha, verificou-se nos três primeiros experimentos (seleção entre planta cítrica com exposição total ou parcial de suas estruturas, seleção do local de alimentação na planta cítrica e seleção entre plantas cítricas com e sem brotação) que logo após a liberação dos insetos nas câmaras de observação a maioria manteve-se dispersa, o que foi diminuindo gradativamente ao longo das primeiras 24 h (Figuras 11A, C e E), quando os insetos já haviam localizado a planta cítrica. Para *D. costalimai* ocorreu maior dispersão dos indivíduos nas gaiolas nos dois primeiros experimentos (Figuras 11A e C), enquanto que para *O. facialis* essa dispersão foi mais acentuada no terceiro experimento (Figura 11E).

A mortalidade passou a ser observada principalmente a partir das 15 h após a liberação dos insetos, estabilizando-se, entretanto, após as 24 h (Figuras 11B, D e F). Nos três experimentos, a mortalidade de *D. costalimai* foi mais acentuada que a de *O. facialis* em quase todos os horários de avaliação, indicando que essa espécie é mais sensível a este tipo de manipulação.

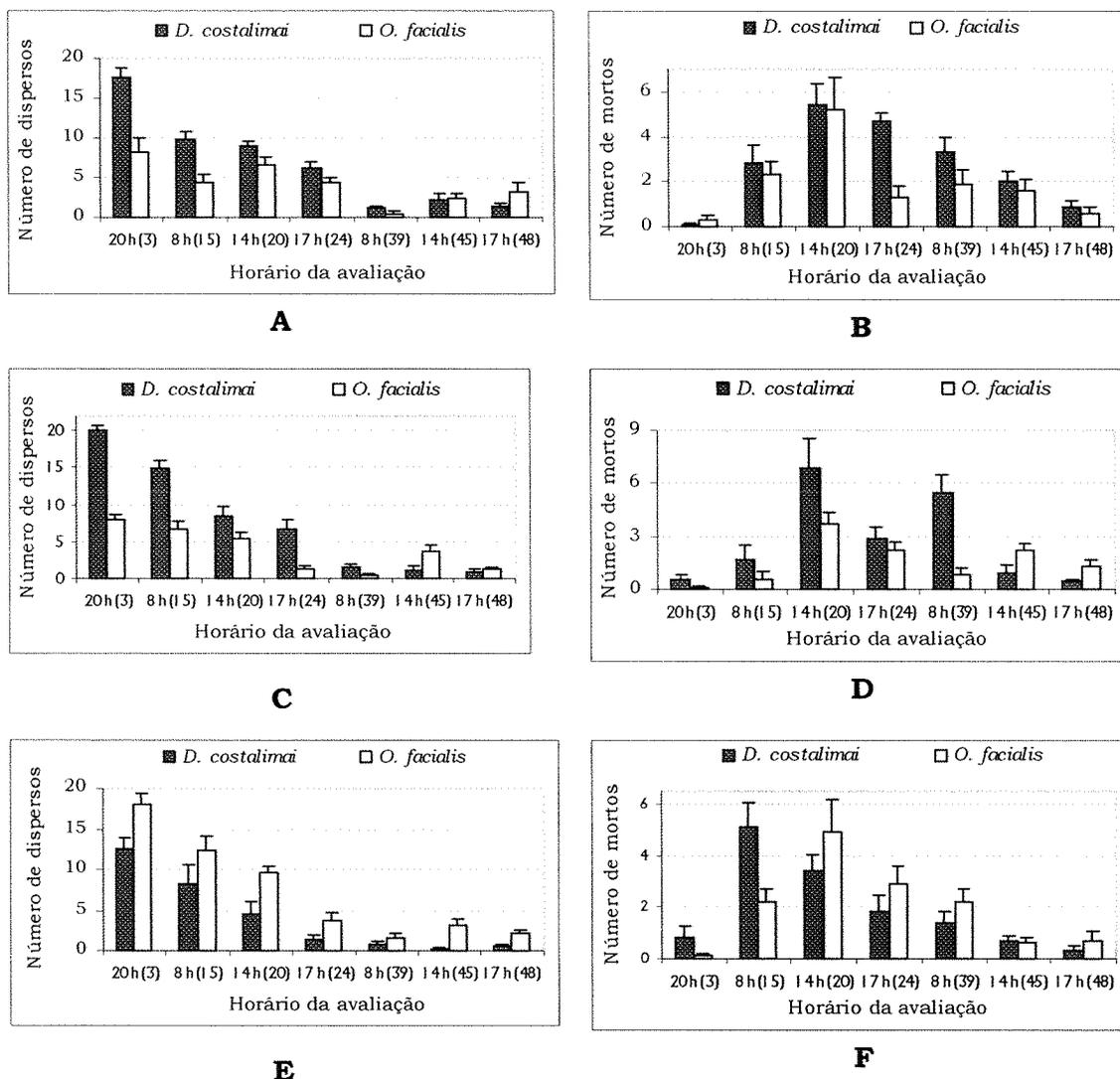


Figura 11 - Número médio (\pm desvio padrão da média) de adultos de *Dilobopterus costalimai* e *Oncometopia facialis* dispersos (A, C, E) e mortos (B, D, F) em três experimentos de livre escolha. Exp. 1 (A e B): seleção entre planta inteira, planta sem folhas e planta sem ramos secundários; Exp. 2 (C e D): seleção entre pecíolo, nervura central e secundária da folha, ramo primário e secundário; Exp. 3 (E e F): seleção entre planta com e sem brotação, durante os sete períodos de avaliação. Números entre parênteses correspondem ao tempo (horas) após a liberação dos insetos.

4.4.1.1 Seleção na planta cítrica

Não houve diferença significativa entre planta completa, planta com folhas cobertas e planta com os ramos secundários cobertos quanto ao número médio de adultos pousados de *D. costalimai* ($F=3,26$; $P=0,052$) e *O. facialis* ($F=0,30$; $P=0,75$) (Tabela 15), considerando os sete horários de avaliação. Para *D. costalimai*, houve interação tratamento x tempo ($F=2,28$; $P=0,01$), sendo a regressão significativa para os três tratamentos permitindo verificar que nas primeiras avaliações a planta completa ($F=10,71$; $P=0,0017$; $R^2=0,65$) e a muda com os ramos cobertos ($F=10,97$; $P=0,0015$; $R^2=0,71$) apresentaram maior número de insetos (Figura 12), indicando que as folhas orientam o início da seleção hospedeira. Com o tempo, principalmente após 39 h, foi aumentando o número de insetos na planta com as folhas cobertas ($F=6,98$; $P=0,0089$; $R^2=0,82$), revelando preferência pelo ramo em relação às folhas. Para *O. facialis*, não houve interação tratamento x tempo ($F=1,55$; $P=0,111$), não permitindo a comparação do número de insetos nos três tratamentos em relação aos horários de avaliação.

Tabela 15. Número médio (\pm desvio padrão da média) de adultos de *Dilobopterus costalimai* e *Oncometopia facialis* em teste de livre escolha entre plantas cítricas com exposição total ou parcial de suas estruturas, durante sete períodos de avaliação.

Tratamentos	<i>D. costalimai</i>	<i>O. facialis</i>
Planta completa	2,58 \pm 0,34 ^a a	8,68 \pm 0,62 a
Planta com folhas cobertas	2,31 \pm 0,37 a	6,41 \pm 0,47 a
Planta com ramos secundários cobertos	1,26 \pm 0,18 a	7,29 \pm 0,79 a

^amédias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P\leq 0,05$).

Comparando-se as duas espécies de cigarrinhas ($F=52,76$; $P=0,00001$), verificou-se maior número médio de *O. facialis* ($7,5 \pm 0,38$) que de *D. costalimai* ($2,0 \pm 0,24$) nos tratamentos. Essa diferença já era esperada, pois a última apresentou dispersão e mortalidade mais acentuada que *O. facialis*.

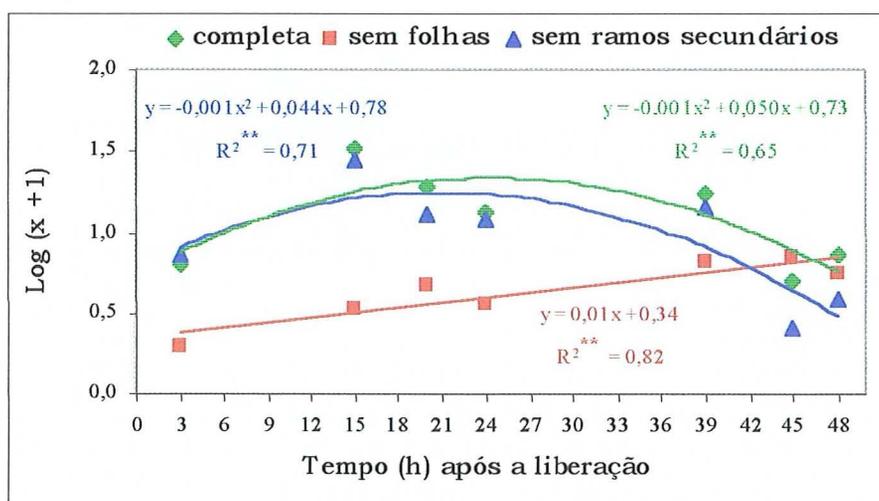


Figura 12 – Curvas de regressão obtidas para a relação entre o número médio (x) de adultos de *Dilobopterus costalimai* por planta e o tempo após a liberação, em teste de livre escolha envolvendo três categorias de plantas cítricas: planta completa; planta sem folhas e planta sem ramos secundários.

4.4.1.2 Seleção do local de alimentação na planta cítrica

D. costalimai ($F=51,56$; $P=0,0001$) apresentou maior preferência pela nervura secundária (NS) da folha, seguida pelo ramo secundário (RS), sendo que as demais partes da planta, pecíolo (P) e nervura central (NC) da folha e ramo primário (RP) não diferiram entre si (Tabela 16). Observou-se interação significativa entre tratamento e tempo ($F=6,82$; $P=0,00001$) e as análises de regressão revelaram que a preferência pela NS prevaleceu em todas as avaliações ($F=22,70$; $P=0,00004$; $R^2=0,58$), reduzindo-se à medida que a preferência pelo RS foi aumentando ($F=49,83$; $P=0,00001$; $R^2=0,33$) (Figura

13A). A preferência pelo P ($F=4,82$; $P=0,027$; $R^2=0,95$) e pela NC da folha ($F=3,97$; $P=0,044$; $R^2=0,39$) teve uma ligeira redução durante as avaliações.

Tabela 16. Número médio (\pm desvio padrão da média) de adultos de *Dilobopterus costalimai* e *Oncometopia facialis* em teste de livre escolha entre partes da planta cítrica, durante sete períodos de avaliação.

Partes da planta	<i>D. costalimai</i>	<i>O. facialis</i>
Pecíolo	0,33 \pm 0,06 ^a c	0,41 \pm 0,11 b
Nervura central	0,48 \pm 0,11 c	2,21 \pm 0,23 a
Nervura secundária	4,14 \pm 0,52 a	3,14 \pm 0,71 a
Ramo primário	0,01 \pm 0,01 c	0,085 \pm 0,04 b
Ramo secundário	1,57 \pm 0,052 b	2,27 \pm 0,45 a

^amédias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Para *O. facialis* ($F=19,77$; $P=0,00001$), não houve diferença quanto à preferência por NS, NC e RS, mas P e RP foram menos preferidos que os demais locais e não diferiram entre si (Tabela 16). A interação tratamento x tempo foi significativa ($F=6,6$; $P=0,00001$), sendo que o número de insetos diminuiu com o tempo na NS ($F=48,31$; $P=0,0001$; $R^2=0,43$) e aumentou no RS ($F=15,91$; $F=0,00025$; $R^2=0,78$), igualando-se nas últimas avaliações (Figura 13B).

A análise comparativa entre as duas espécies revelou novamente maior número médio de *O. facialis* (1,63 \pm 0,16) em relação a *D. costalimai* (1,3 \pm 0,13) nos diferentes locais da planta ($F=6,56$; $P=0,011$), provavelmente em decorrência da menor dispersão e mortalidade da primeira espécie.

As preferências alimentares das espécies que se alimentam da seiva do xilema são largamente determinadas por diferenças no conteúdo de nutrientes entre as espécies de plantas (Brodbeck et al., 1990; Thompson, 1994) e partes da planta (Horsfield, 1977), ajustando-se também às mudanças diurnas na química do xilema (Brodbeck et al., 1993). Deve-se levar em consideração,

portanto, que a quantidade e composição dos nutrientes na seiva do xilema varia com a idade, estação, hora do dia, local de alimentação e sanidade da planta (Andersen & Brodbeck, 1989; Hopkins, 1995; Moreno & García-Martinez, 1993). Assim, o local de alimentação na planta (galhos, ramos ou folhas) pode afetar a eficiência com que diferentes espécies de cigarrinhas adquirem ou inoculam *X. fastidiosa* (Lopes, 1996.)

A escolha do local preferido para alimentação, entre folhas, ramos e pecíolos, varia entre as espécies de cigarrinhas (Gravena et al., 1997). Yamamoto & Roberto (1997) relataram que em citros *D. costalimai* alimenta-se preferencialmente de ramos novos e *O. facialis* de ramos já lenhosos. Segundo Leite & Nakano (2000), *D. costalimai* prefere ramos novos e folhas jovens e *O. facialis* uma maior diversidade de órgãos vegetais. No entanto, os resultados obtidos no presente estudo, sob condições ambientais mais restritas de casa de vegetação, revelaram preferências alimentares similares entre as duas espécies de cigarrinhas, sendo que para *D. costalimai* nota-se preferência pelas folhas em relação às outras partes da planta cítrica.

Analisando-se as porcentagens de *D. costalimai* e *O. facialis* nas folhas, pecíolos e ramos, percebe-se que a presença no pecíolo foliar se manteve reduzida e estável durante os horários de avaliação (Figuras 14A e B). Em contraste, as porcentagens de insetos pousados nas folhas e ramos se alternaram de acordo com os horários do dia. Houve tendência de maior concentração de cigarrinhas nas folhas nos períodos de temperatura mais amena (17, 20 e 8 h), e de movimentação de parte dos indivíduos para os ramos com a elevação da temperatura na avaliação das 14 h.

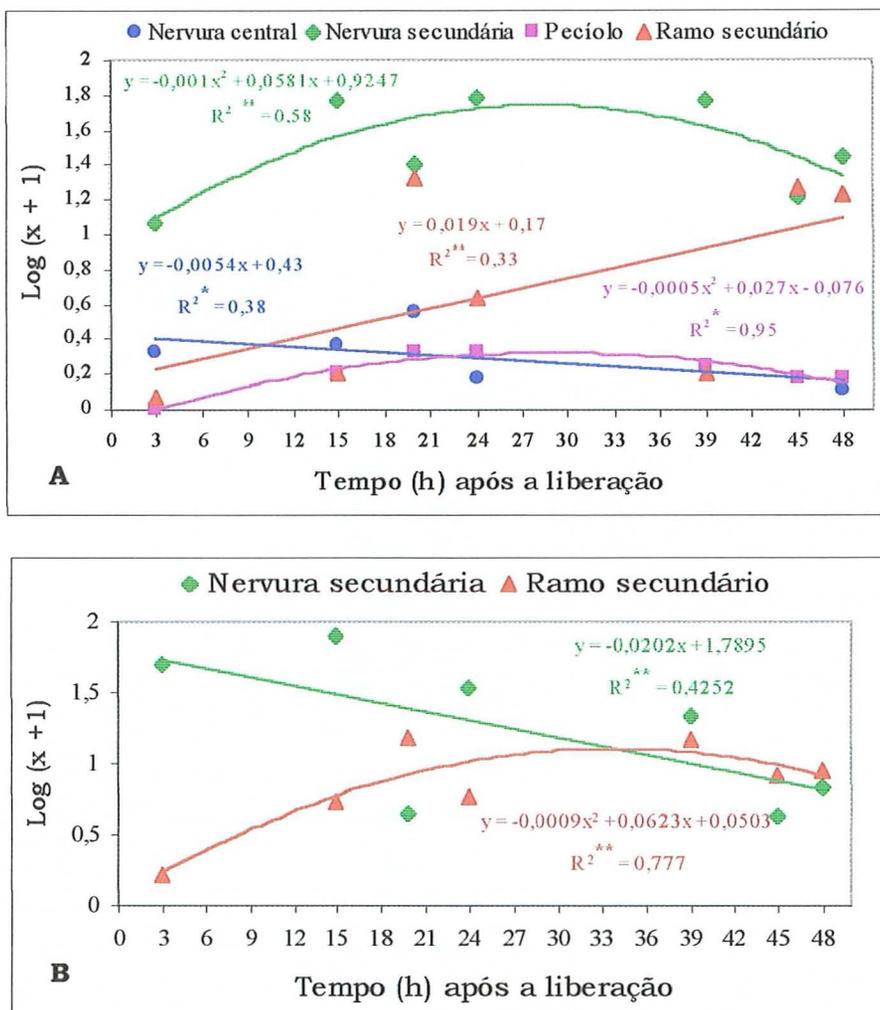


Figura 13 – Curvas de regressão obtidas para a relação entre o número médio (x) de adultos de *Dilobopterus costalimai* (A) e *Oncometopia facialis* (B) pousados em diferentes partes da muda cítrica e o tempo após a liberação, em teste de livre escolha.

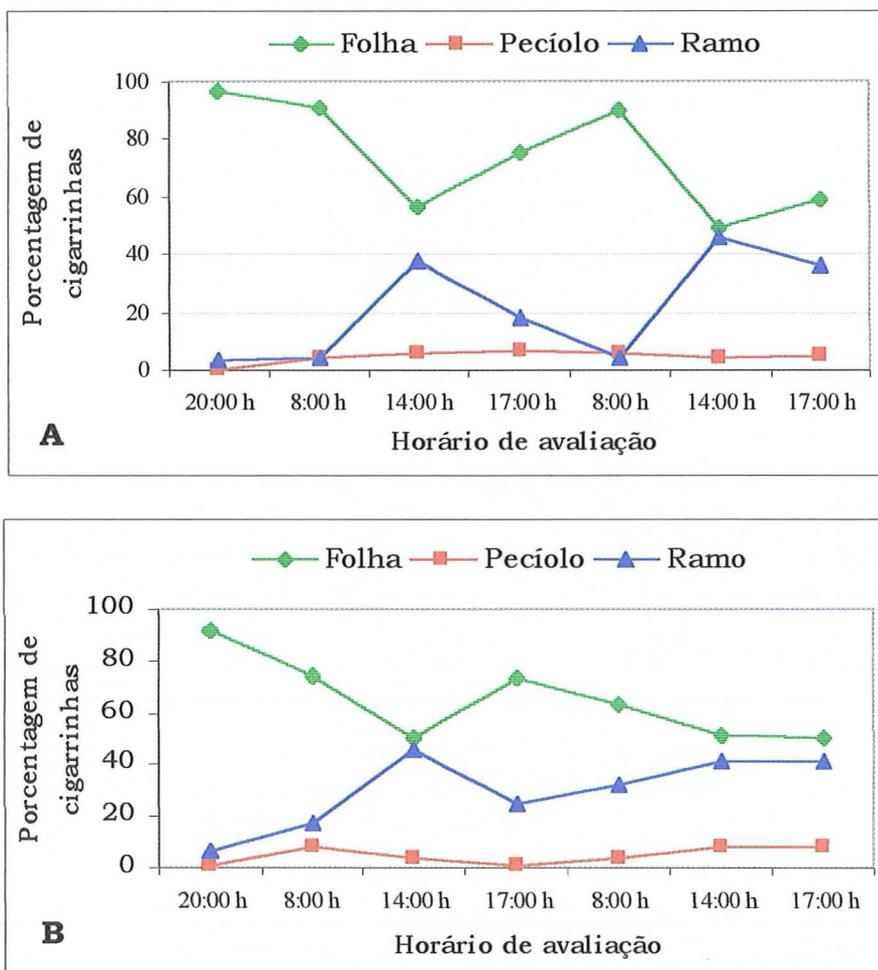


Figura 14 - Distribuição de adultos de *Dilobopterus costalimai* (A) e *Oncometopia facialis* (B) em folhas, pecíolos e ramos da planta cítrica, nos sete horários de avaliação do experimento de livre escolha.

Essa constatação é importante porque em videira com PD a concentração de *X. fastidiosa*, expressa em porcentagem de vasos colonizados, é menor nos ramos do que nas folhas (Hopkins, 1981). Além disso, nas folhas com sintomas de necrose marginal, há maior porcentagem de vasos contendo bactéria nas nervuras foliares do que nos pecíolos. Hopkins & Mollenhauer (1973) observaram células bacterianas nos elementos de vasos do xilema nos pecíolos, nervuras medianas e secundárias das folhas de videira infectadas, mas os ramos não foram avaliados. As bactérias ficam confinadas ao lúmen dos vasos do xilema, mais freqüentemente nos pequenos vasos, onde formam agregados que aparentemente restringem a passagem de água (Mollenhauer & Hopkins, 1974). Dessa forma, pode-se considerar que em videira há maiores chances de aquisição de *X. fastidiosa* durante a alimentação nos vasos do xilema do pecíolo ou nervuras foliares.

Em citros com CVC, a obstrução dos vasos diminui das folhas para o caule (Queiroz-Voltan & Paradela Filho, 1999). Assim, postula-se que a eficiência de aquisição de *X. fastidiosa* possa estar condicionada ao local preferencial de alimentação do vetor na planta infectada.

Para as duas espécies de cigarrinhas avaliadas neste estudo, embora não tenha tido diferença quanto à preferência por locais de permanência na planta cítrica, provavelmente a que se alimenta durante mais tempo em tecido infectivo, por exemplo, pecíolo e nervuras foliares, teria maiores chances de adquirir a bactéria. Tal diferença em comportamento alimentar poderia explicar as taxas de transmissão variáveis de 1,3% para *O. facialis* a 5,5% para *D. costalimai*, relatadas por Krügner et al., 2000 e de 1,1% a 13,3% obtidas para as mesmas espécies no estudo de transmissão do item 4.3.4 desta tese.

4.4.1.3 Seleção entre plantas cítricas com e sem brotação

Tanto para *D. costalimai* ($F=22,34$; $P=0,00033$) quanto para *O. facialis* ($F=37,41$; $P=0,00005$), verificou-se nítida preferência pela planta com brotação (Figura 15). No entanto, para *D. costalimai*, a interação tratamento x tempo não foi significativa ($F=2,17$; $P=0,051$), não permitindo a comparação do número de insetos nas plantas com e sem brotação em relação aos horários de avaliação. A interação tratamento x tempo foi significativa para *O. facialis* ($F=9,16$; $P=0,00001$), sendo que com 3 h após a liberação dos insetos, não houve diferença de atratividade entre as duas plantas, mas a partir de 15 h aumentou a preferência pela planta com brotação ($F=5,22$; $P=0,023$; $R^2=0,95$), com correspondente redução pela planta sem brotação ($F=3,09$; $P=0,077$; $R^2=0,64$) (Figura 16).

A análise comparativa neste experimento revelou maior número de *D. costalimai* ($6,4 \pm 0,39$) do que de *O. facialis* ($5,7 \pm 0,34$) nas plantas ($F=4,23$; $P=0,044$), já que essa última se mostrou mais dispersa em praticamente todos os horários de avaliação. Essa constatação pode indicar a influência que a brotação exerce na localização da planta hospedeira por *D. costalimai*, pois nos outros dois experimentos menor número de indivíduos dessa espécie pousou sobre as plantas em relação a *O. facialis*.

Nos três experimentos verificou-se que mesmo havendo interação tratamento x tempo altamente significativa, o coeficiente de determinação (R^2) foi baixo (0,3-0,5) para algumas curvas de regressão, o que já era esperado em razão da grande dispersão dos insetos na câmara de observação em certos horários do dia. Mesmo assim, esses dados são úteis para revelar oscilações quanto à preferência alimentar desses insetos em função do horário. A variação no local de alimentação ou de permanência do inseto pode estar relacionada com possíveis alterações diurnas na concentração dos nutrientes da seiva em certas estruturas da planta (Brodbeck et al. 1993) ou com variações microclimáticas na copa da árvore cítrica (Leite & Nakano, 2000).

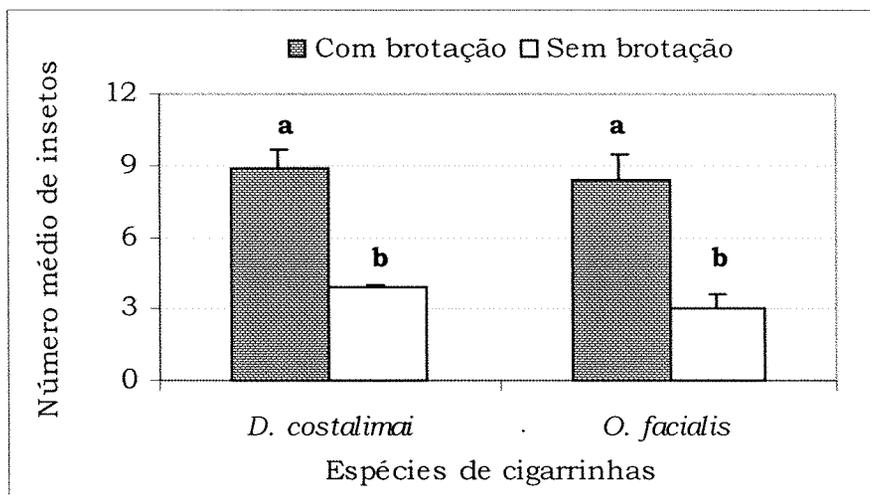


Figura 15 - Número médio (\pm desvio padrão da média) de adultos de *Dilobopterus costalimai* e *Oncometopia facialis* por planta em teste de livre escolha entre plantas cítricas com e sem brotação, durante sete períodos de avaliação. Para uma mesma espécie, médias com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

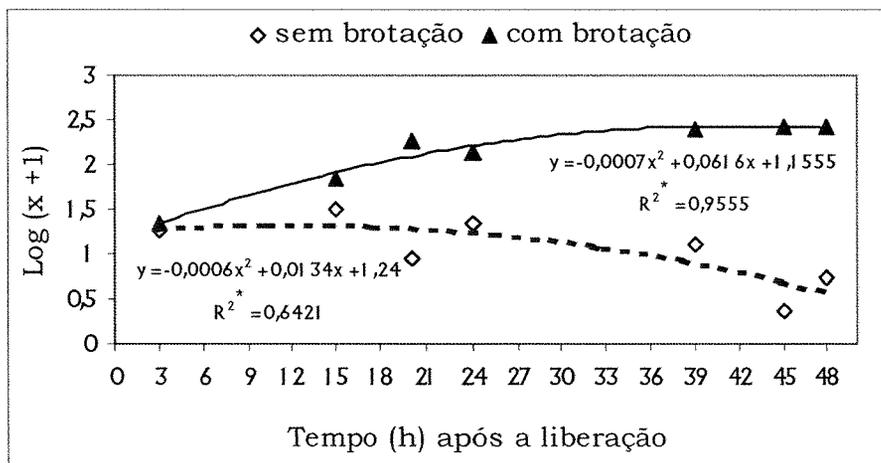


Figura 16 - Curvas de regressão obtidas para a relação entre o número médio (x) de adultos de *Oncometopia facialis* por planta e o tempo após liberação, em teste de livre escolha entre plantas cítricas com e sem brotação.

Roberto & Yamamoto (1998) verificaram que a flutuação populacional das cigarrinhas é influenciada pelo clima, sendo que em anos com seca mais prolongada após o inverno, observou-se infestação mais tardia das cigarrinhas, provavelmente pela interferência da estiagem sobre o hospedeiro, causando atraso no início de brotação das plantas, já que as cigarrinhas preferem alimentar-se das brotações novas e tenras da planta. Assim, a deficiência hídrica em áreas não irrigadas resulta em baixa formação de brotações pelas árvores cítricas e altera o nível de nutrientes e a tensão do xilema, o que pode afetar a população e a preferência das cigarrinhas (Garcia Júnior et al., 1997).

Outra evidência da preferência de cigarrinhas por tecidos tenros é que folhagens mais velhas de muitos cultivares de uva foram mais resistentes à infecção por *X. fastidiosa* após a inoculação pelas cigarrinhas, do que folhagens mais novas, o que também pode resultar em diferenças na eficiência de transmissão do vetor (Hopkins, 1983). A maior taxa de infecção pode estar relacionada com a concentração de aminoácidos que é maior no xilema das folhas jovens do que nas folhas mais velhas (Purcell, 1989). Em videiras, as cigarrinhas têm forte preferência por tecidos suculentos (Hewitt et al. 1949; Purcell, 1975), sendo essa mais pronunciada pelas folhas e ramos recém-emetidos no final da primavera e início do verão (Purcell & Feil, 2001).

O manejo das doenças causadas por patógenos transmitidos por insetos pode ser facilitado pela compreensão da melhor época em que as táticas de controle devem ser adotadas visando um maior efeito. As táticas de manejo devem focar a interação entre o vetor e a planta suscetível na época adequada. Essas táticas devem incluir o uso de inseticidas que afetam os vetores antes que eles possam inocular uma planta sadia ou que possam adquirir a bactéria em uma planta infectada (Blua et al., 2001).

Assim, a comprovação da preferência das cigarrinhas pela brotação cítrica tem implicações importantes para o manejo da CVC, devendo-se adotar medidas de controle desses insetos em períodos de maior vegetação dos pomares de laranja, que provavelmente se constituem em épocas críticas para a aquisição e transmissão de *X. fastidiosa*.

4.4.1.4 Seleção entre plantas cítricas com sintomas de CVC e sadias

Observou-se, neste experimento, maior dispersão de adultos das duas espécies de cigarrinhas até as primeiras 20 h após a liberação (Figura 17A), quando ocorreu uma redução gradual deste comportamento pela adaptação à câmara de observação e localização de uma das plantas, de acordo com a preferência. *O. facialis* mostrou-se mais dispersa que *D. costalimai* em praticamente todos os horários de avaliação.

A mortalidade foi mais elevada para as duas espécies nos horários mais quentes (14 e 17 h) e durante as primeiras 24 h, reduzindo-se nos demais períodos de avaliação (Figura 17B).

Para as duas espécies, *D. costalimai* ($F=31,74$; $P=0,00009$) e *O. facialis* ($F=11,23$; $P=0,0038$), observou-se nítida preferência pela planta sadia em relação à planta com sintomas de CVC (Figura 18), indicando que a infecção sintomática por *X. fastidiosa* na planta cítrica tem influência sobre a atratividade das cigarrinhas. Embora *O. facialis* tenha se mostrado mais dispersa na maioria das avaliações, não houve diferença no número médio total de *D. costalimai* ($5,16 \pm 0,31$) e *O. facialis* ($5,76 \pm 0,72$) pousados sobre as plantas (sadias e com CVC) nas câmaras de observação, através da análise comparativa do experimento ($F=1,28$; $P=0,265$).

Resultados semelhantes foram obtidos por Mizell & French (1987), que observaram menor ocorrência e sobrevivência da cigarrinha vetora *H. coagulata* em plantas de pêssigo infectadas por *X. fastidiosa* e com sintomas de Redução do porte do pessegueiro (PP), em relação a plantas sadias. Mudanças na concentração dos nutrientes, nas trocas gasosas nas folhas e no potencial hídrico do xilema têm sido observadas com o desenvolvimento dos sintomas em pessegueiro. Segundo Gould et al. (1991), *X. fastidiosa* ocorre em baixas concentrações em pomares de pêssigo devido à falta de atração do vetor para árvores infectadas, fazendo com que a dispersão secundária seja baixa ou inexistente, revelando forte relação entre o comportamento do vetor e a incidência da doença.

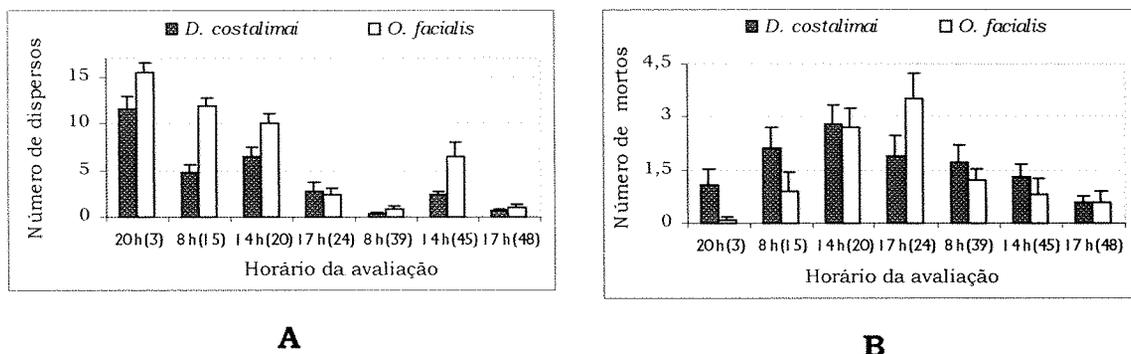


Figura 17 - Número médio (\pm desvio padrão da média) de adultos de *Dilobopterus costalimai* e *Oncometopia facialis* dispersos (A) e mortos (B) no teste de livre escolha entre plantas com sintomas de CVC e plantas saudáveis, durante os sete períodos de avaliação. Números entre parênteses correspondem ao tempo (horas) após a liberação dos insetos.

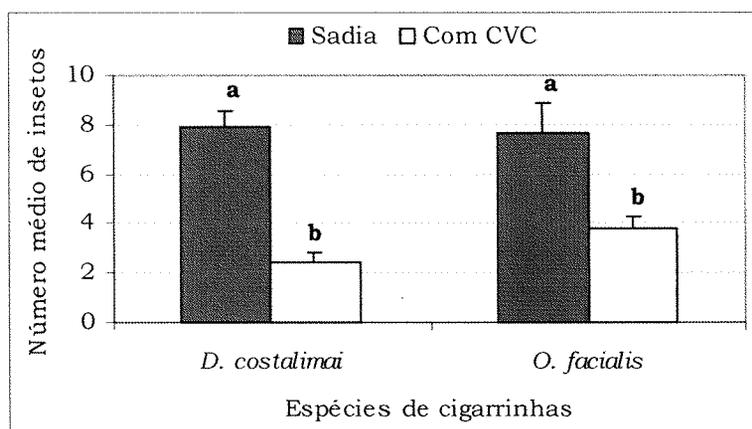


Figura 18 - Número médio (\pm desvio padrão da média) de adultos de *Dilobopterus costalimai* e *Oncometopia facialis* por planta em teste de livre escolha entre plantas cítricas saudáveis e com sintomas de CVC, durante sete períodos de avaliação. Para uma mesma espécie, médias com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Para *D. costalimai*, a interação tratamento x tempo foi significativa ($F=1,44$; $P=0,00015$) e, desde a primeira avaliação, as curvas de regressão já revelaram mais insetos na planta sadia ($F=4,66$; $P=0,03$; $R^2=0,70$) do que na com CVC ($F=6,41$; $P=0,01$; $R^2=0,69$), sendo que essa diferença aumentou com o passar do tempo (Figura 19A). A interação tratamento x tempo também foi significativa para *O. facialis* ($F=3,79$; $P=0,0021$), sendo que na primeira avaliação houve número similar de insetos nos dois tratamentos, seguida de redução na planta com CVC ($F=11,60$; $P=0,0013$; $R^2=0,49$) e proporcional aumento na sadia ($F=16,68$; $P=0,00024$; $R^2=0,92$) nas avaliações subseqüentes (Figura 19B).

Além de alterações morfológicas, as plantas infectadas por *X. fastidiosa* apresentam alterações bioquímicas, como aumento do teor de lignina e das enzimas β 1,3- glucanase e quitinase, associadas à resposta de defesa de plantas à presença de patógenos (Martins et al., 1999). Todos esses fatores podem dificultar a alimentação nas plantas sintomáticas, o que explicaria a nítida preferência pelas plantas sadias, sem obstrução dos vasos e com fluxo contínuo de seiva.

As preferências por partes da planta sadia (folhas, pecíolos e ramos) e com CVC variaram com os horários do dia (Figuras 20A e B, 21A e B), indicando uma inversão na proporção dos insetos presentes nas folhas e ramos em relação aos horários de menor (8 h) e maior temperatura (14 h). Nas plantas sadias ocorreu maior proporção das duas espécies nas folhas às 8 h da manhã, reduzindo-se drasticamente às 14 h, quando ocorreu aumento proporcional de cigarrinhas nos ramos (Figuras 20A e B).

No caso de *O. facialis* na planta com CVC, a distribuição dos insetos foi similar à da planta sadia (Figura 21B), mas para *D. costalimai* observou-se maior proporção de cigarrinhas nas folhas do que nos ramos em todos os horários, com exceção da avaliação das 45 h (14 h) após a instalação do experimento, em que preferência pelas folhas foi substituída ligeiramente pelos ramos (Figura 21A). A proporção de cigarrinhas das duas espécies presentes no pecíolo não variou muito entre os horários de avaliação e mesmo entre plantas sadias e sintomáticas (Figuras 20A e B, 21A e B).

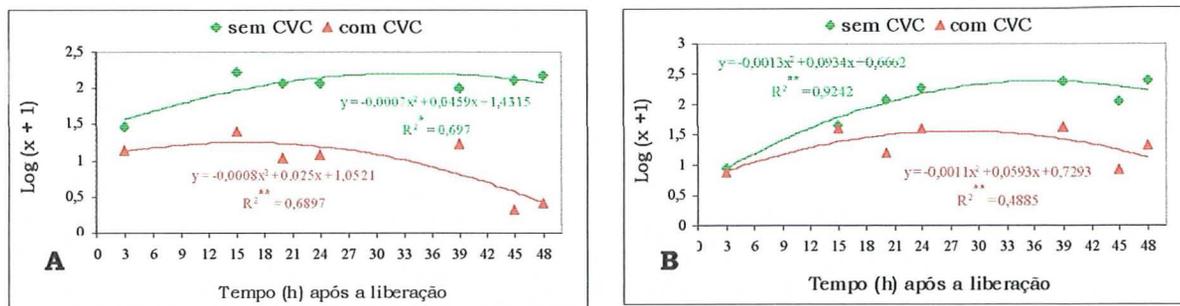


Figura 19 – Curvas de regressão obtidas para a relação entre o número médio (x) de adultos de *Dilobopterus costalimai* (A) e *Oncometopia facialis* (B) por planta e o período de avaliação, em teste de livre escolha entre plantas saudias e plantas com sintomas de CVC.

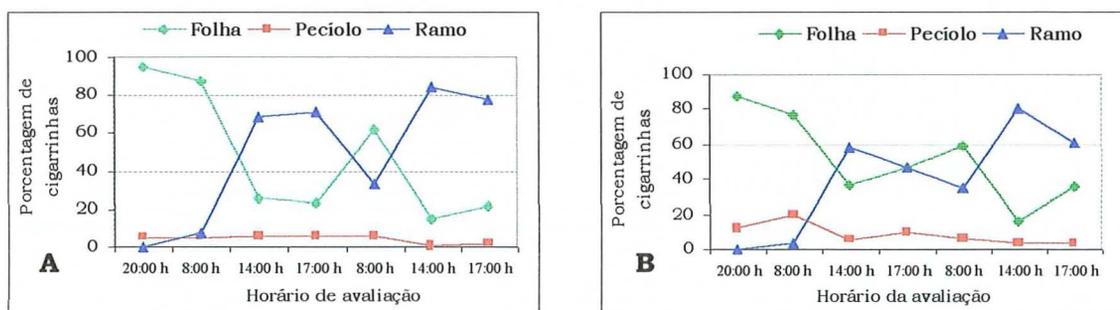


Figura 20 – Distribuição de adultos de *Dilobopterus costalimai* (A) e *Oncometopia facialis* (B) em folhas, pecíolos e ramos da planta sadia, nos sete horários de avaliação do experimento de livre escolha.

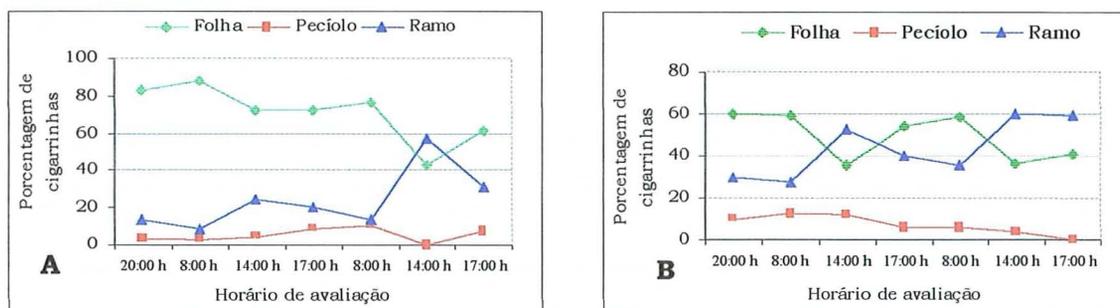


Figura 21 – Distribuição dos adultos de *Dilobopterus costalimai* (A) e *Oncometopia facialis* (B) em folhas, pecíolos e ramos da planta com sintomas de CVC, nos sete horários de avaliação do experimento de livre escolha.

Em plantas de laranja 'Pêra' com CVC, Medina et al. (1999) constataram que as taxas de fotossíntese e de transpiração e a condutância estomática foram menores em relação às plantas saudias, sendo que as maiores diferenças ocorreram durante os períodos de maior demanda atmosférica, entre 12 e 15 h. Além disso, Ribeiro (2002) verificou que o aumento de temperatura afeta o sistema planta-patógeno, agravando as disfunções no metabolismo fotossintético das plantas com CVC.

No caso da videira com PD, Goodwin et al. (1988) verificaram que as folhas sintomáticas por volta do meio dia desenvolveram potencial da água e turgescência celulares menores (próxima a valores nulos) que as plantas saudias por volta do meio dia, o que foi relacionado à diminuição no potencial osmótico na folha.

Provavelmente, as oscilações no estado fisiológico da planta durante o dia refletem na alternância de alimentação pelas cigarrinhas, em função de uma maior facilidade ou dificuldade de sucção da seiva nas folhas ou ramos num determinado horário. Machado et al. (1994) verificaram que os valores do potencial da água no xilema nas plantas de laranja 'Pêra' e 'Valência' com CVC são significativamente menores que os observados nas plantas saudias. No entanto, às 14 h o potencial da água na folha da planta sadia reduz também, embora em menor proporção, fato que poderia explicar o deslocamento das cigarrinhas para os ramos.

A proporção de *D. costalimai* mais estável nas folhas da planta sintomática constitui-se num ponto diferencial em relação a *O. facialis*. É de se esperar que a maior permanência dos insetos nas folhas, que apresentam maior obstrução de vasos com *X. fastidiosa* em relação aos caules (Queiroz-Voltan & Paradelo Filho, 1999), aumenta a chance de aquisição e conseqüente transmissão de *X. fastidiosa* em plantas cítricas. Hopkins (1981), em um estudo com videiras infectadas por *X. fastidiosa*, verificou porcentagem de vasos entupidos pelas bactérias muito menor no caule do que nas folhas, e maior nas nervuras do que no pecíolo. Assim, a maior permanência de *D. costalimai* nas folhas das plantas infectadas pode justificar a diferença na eficiência de transmissão de *X. fastidiosa* por *D. costalimai* (5,5%) em relação a

O. facialis (1,3%) (Krügner et al., 2000) e de 1,1% para *O. facialis* e 13,3% para *D. costalimai* nesta pesquisa.

4.4.1.5 Seleção entre plantas infectadas assintomáticas e plantas sadias

A mortalidade e a dispersão de *O. facialis* foram similares (Figura 22), sendo a dispersão apenas mais elevada no primeiro horário de avaliação (20 h), reduzindo-se nos demais, assim como a mortalidade. Esses resultados indicam boa adaptação dessa espécie às condições do experimento.

Não houve diferença significativa no número de *O. facialis* ($F=0,23$; $P=0,64$) entre plantas sadias ($7,9 \pm 0,83$) e plantas infectadas, mas sem sintomas evidentes ($7,0 \pm 0,62$). Assim, *O. facialis* não conseguiu discriminar entre plantas sadias e plantas infectadas assintomáticas. Nada pode ser afirmado em relação a *D. costalimai*, devido à impossibilidade da realização do teste com essa espécie.

Com a interação tratamento x tempo significativa ($F=3,47$; $P=0,0038$), as curvas de regressão revelaram que até as primeiras 15 h havia mais insetos na planta sadia ($F=5,21$; $P=0,023$; $R^2=0,63$) do que na assintomática ($F=20,55$; $P=0,00009$; $R^2=0,93$) (Figura 23). Entretanto, essa diferença foi muito pequena durante as avaliações, salientando-se a ausência de capacidade discriminatória de *O. facialis* quanto à presença de infecção de *X. fastidiosa* na planta cítrica, durante as fases iniciais de colonização da bactéria na planta.

Pascholati et al. (2002) estudaram através de microscópio eletrônico de varredura, a proporção de vasos do xilema colonizados por *X. fastidiosa* em função da sintomatologia da folha cítrica e não verificaram diferença clara na proporção de vasos colonizados entre as folhas com sintomas intensos e leves. No entanto, a população bacteriana viável variou com o grau de sintomatologia, sendo menor nas folhas com sintomas leves (Alves et al., 2003).

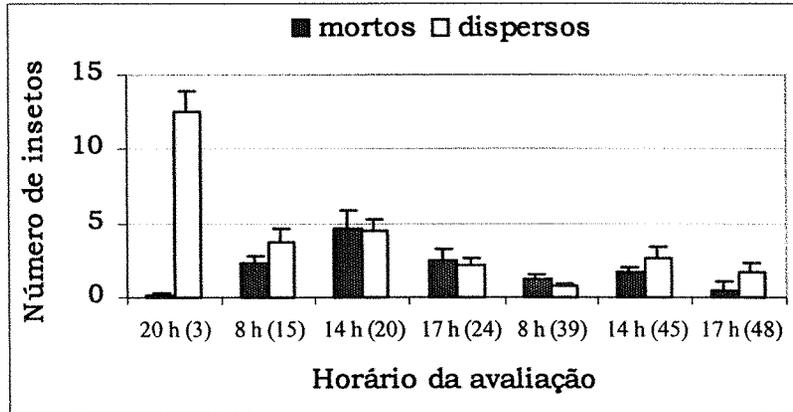


Figura 22 - Número médio (\pm desvio padrão da média) de adultos de *Oncometopia facialis* mortos e dispersos no teste de livre escolha entre plantas infectadas com *Xylella fastidiosa* assintomáticas e plantas sadias, durante os sete períodos de avaliação. Números entre parênteses correspondem ao tempo (horas) após a liberação dos insetos.

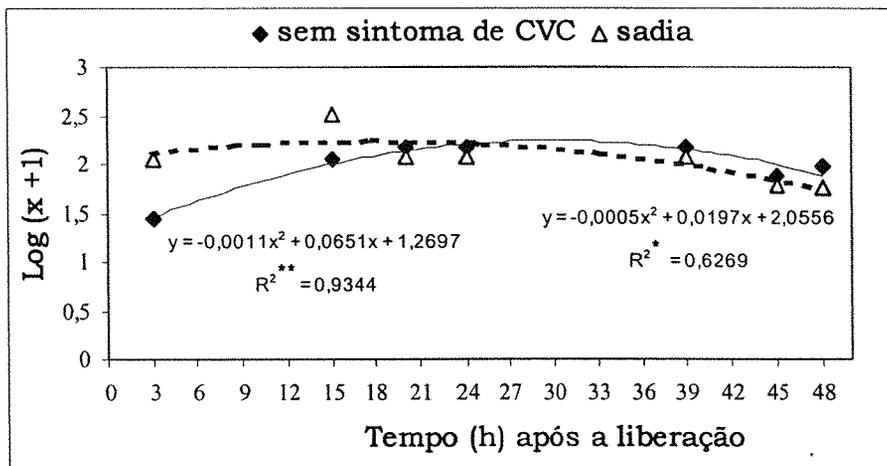


Figura 23 - Curvas de regressão obtidas para a relação entre o número médio (x) de adultos de *Oncometopia facialis* por planta e o período de avaliação em teste de livre escolha entre planta sadia e planta infectada com *X. fastidiosa* sem sintoma.

Segundo Hill & Purcell (1997), para que ocorra transmissão por vetores, a população mínima da bactéria na planta-fonte tem que ser $\geq 10^4$ UFC/g de pecíolo, sendo que altas populações bacterianas implicam em aumento da eficiência de aquisição e de transmissão.

Ficou claro neste estudo que o grau de infecção e a sintomatologia influenciam na preferência alimentar de *O. facialis*. Dessa forma, as plantas infectadas assintomáticas por serem tão preferidas quanto às sadias, talvez sejam mais importantes como fonte de inóculo para disseminação da CVC entre árvores cítricas do que as plantas sintomáticas, principalmente se a população da bactéria nas plantas sem sintomas evidentes estiver acima de 10^4 UFC/g (Hill & Purcell, 1997).

4.4.2 Avaliação da taxa de ingestão em plantas sadias ou infectadas por *X. fastidiosa*

Curvas de sobrevivência para *D. costalimai* (P Log-Rank=0,81; P Wilcoxon=0,68) e *O. facialis* (P Log-Rank=0,99; P Wilcoxon=0,82) não revelaram diferenças entre as plantas infectadas (sintomáticas e assintomáticas) e sadias (Figuras 24A e B). Houve muita variação no volume de *honeydew* excretado entre os indivíduos de um mesmo tratamento, não sendo possível detectar diferenças significativas entre esses.

Apesar da alta variabilidade dentro das repetições, nota-se que para *D. costalimai*, o volume excretado e a frequência dos insetos que excretaram foi baixa nas plantas com sintomas de CVC (Trat 2) (Figuras 25A, C e E), as quais apresentam vasos do xilema obstruídos pela bactéria. Nota-se que praticamente não houve excreção mesmo após 72 h de confinamento na planta cítrica sintomática. Tal fato não foi observado para plantas sadias e infectadas assintomáticas, já que houve excreção e a frequência de insetos que excretaram foi similar nos dois tratamentos (Test 1 e Trat 1).

Para *O. facialis*, nota-se frequência mais elevada de insetos que excretaram nas plantas Test 2 e Trat 2, mas o volume excretado não diferiu entre os tratamentos (Figuras 25B, D e F).

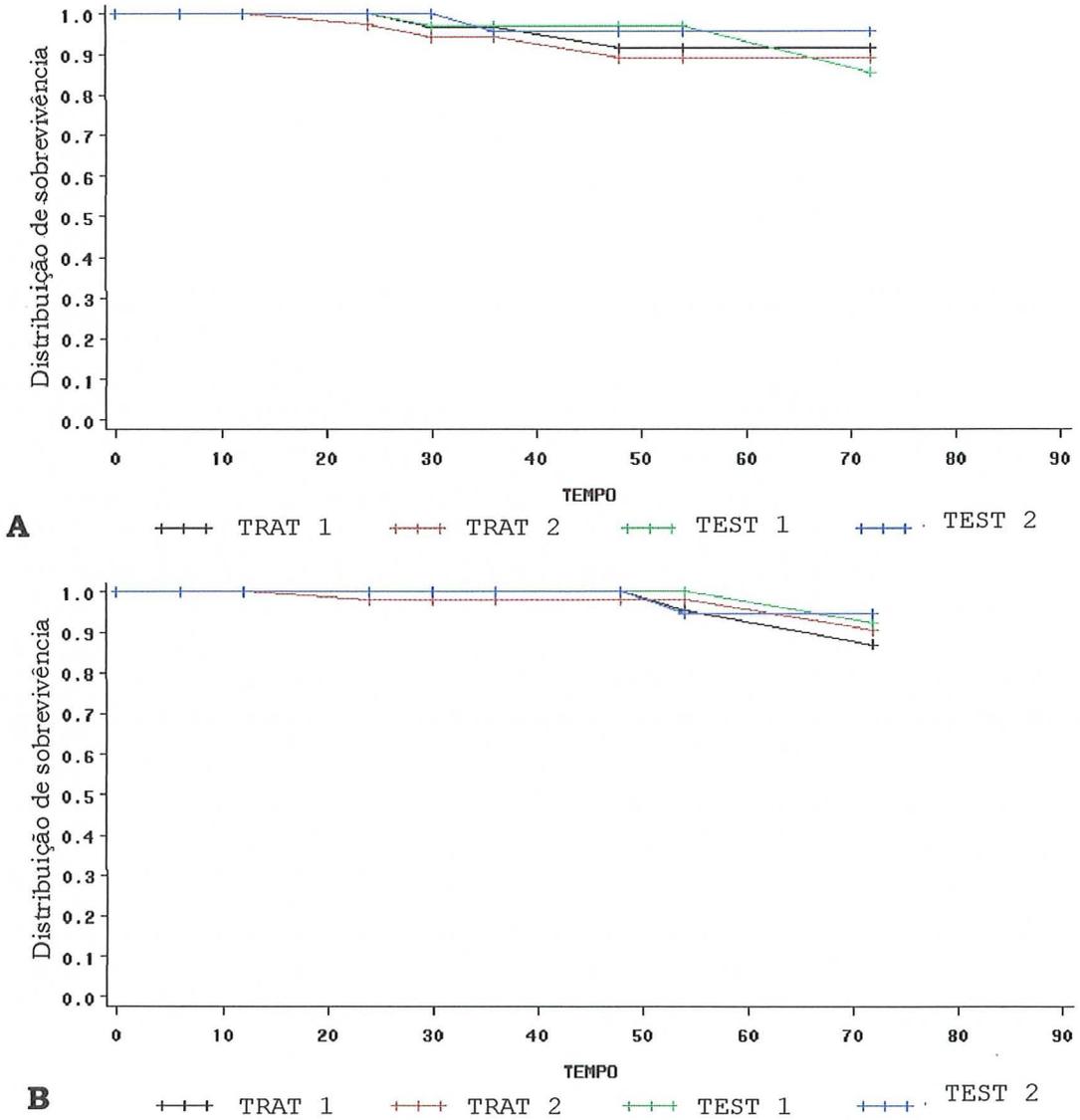
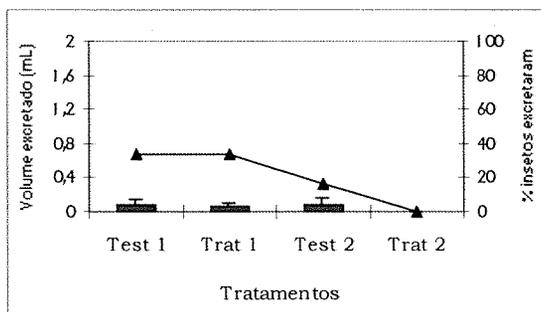
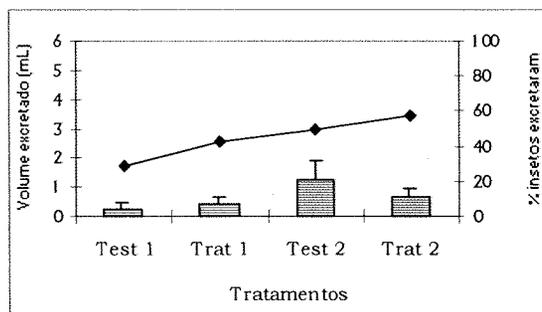


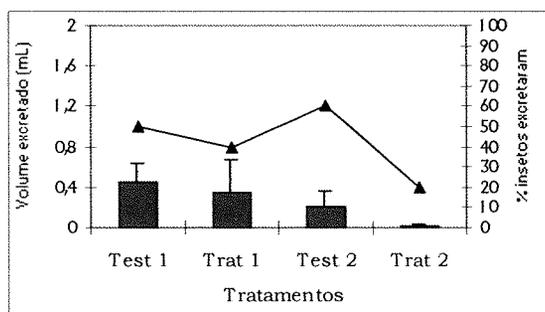
Figura 24 - Curvas de sobrevivência de adultos de *Dilobopterus costalimai* (A) e *Oncometopia facialis* (B) após 72 horas de confinamento em plantas cítricas sintomáticas (Trat 2), assintomáticas (Trat 1) e sadias (Test 1 e Test 2).



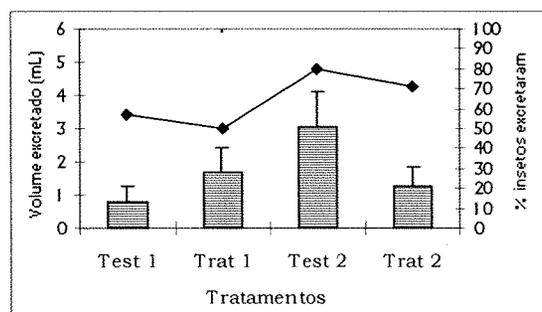
A



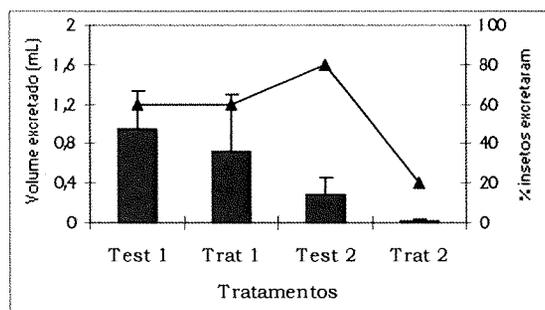
B



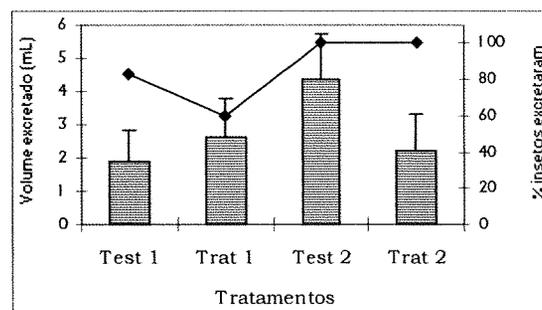
C



D



E



F

Figura 25 - Volume total excretado (barra) e frequência de indivíduos de *Dilobopterus costalimai* (A, C e E) e *Oncometopia facialis* (B, D e F) que excretaram (linhas) em cada tratamento (Test 1: planta sadia; Trat 1: planta infectada com *Xylella fastidiosa* e assintomática; Test 2: planta sadia; Trat 2: planta com sintoma de CVC) após 24 (A e B), 48 (C e D) e 72 h (E e F) de confinamento nas plantas cítricas.

A utilização de um número limitado de plantas e de insetos dificultou a obtenção de resultados conclusivos, mas os dados indicam preferências alimentares contrastantes entre *D. costalimai* e *O. facialis* em condições de confinamento. Além disso, este experimento reflete uma medida indireta da alimentação das duas espécies de cigarrinhas, o que não foi possível nos dois testes de livre escolha com plantas infectadas e sadias, já que o parâmetro utilizado foi à presença do inseto na planta, o que não implica necessariamente em alimentação. Entretanto, é importante destacar que, durante as avaliações dos testes de livre escolha, muitos indivíduos permaneceram no mesmo local durante cerca de 3-4 horas (intervalo entre uma avaliação e outra), indicativo de que estavam se alimentando.

Como os nutrientes estão diluídos na seiva do xilema, muitas vezes, é necessário que os vetores se alimentem de uma grande quantidade de seiva, 10 a 100 vezes o peso do corpo (Horsfield, 1977). A ausência de excreção implica na não-alimentação numa determinada espécie hospedeira ou porção da planta, já que *D. costalimai* foi confinada durante 72 horas nos ramos das plantas cítricas sintomáticas. Esse fato vem corroborar os dados já apresentados de porcentagem de indivíduos desta espécie em plantas com sintomas de CVC (Figura 21A) no teste de livre escolha, que permanecem pousados nas folhas na maior parte do tempo, indicando que talvez esta espécie não se alimente nos ramos quando confinada em plantas com sintomas de CVC.

Nos EUA, tem-se verificado preferências diferenciais dos vetores em relação à planta hospedeira infectada (Raju et al., 1982), pois apesar de a estirpe de videira causar doença também em amendoeira, em algumas situações de campo, não ocorre doença em videira crescendo próxima à amendoeira severamente infectada e vice-versa (Davis et al., 1980). A preferência do vetor influencia no número médio de insetos na planta e assim, cultivares menos atrativos às cigarrinhas podem reduzir a dispersão da doença (Purcell, 1985).

Neste trabalho, verificou-se que o nível de infecção por *X. fastidiosa* influi na atividade alimentar de *D. costalimai* e na preferência de *O. facialis* por

plantas cítricas, sendo as plantas infectadas sem sintomas provavelmente mais importantes que as sintomáticas como fontes de inóculo para disseminação da CVC. Assim, estes aspectos devem ser considerados por ocasião do controle dos vetores e manejo das doenças causadas por *X. fastidiosa*.

4.5 Considerações finais

A seleção de plantas de *V. condensata* e *A. virgata*, imunes à bactéria *X. fastidiosa* representou uma etapa fundamental para os estudos de transmissão, assegurando-se a sanidade dos insetos obtidos pelo sistema de criação, a partir de posturas de cigarrinhas coletadas no campo. Assim, durante os dois experimentos com citros e cafeeiro houve um maior controle das duas fases da transmissão, aquisição e inoculação, que estão diretamente relacionadas com a eficiência do vetor.

Apesar de partir-se do princípio de que a eficiência de transmissão das cigarrinhas vetoras em citros pudesse estar relacionada a grupos taxonômicos (Tribo Cicadellini X Proconiini), podendo-se selecionar espécies mais importantes para a transmissão de *X. fastidiosa*, tal hipótese não foi apoiada pelos dados desta pesquisa. Os resultados obtidos indicaram que a eficiência de transmissão varia com a planta hospedeira e a espécie de cigarrinha, porém sem relação com a tribo do inseto, existindo uma relação complexa entre as duas variáveis.

A taxa de transmissão parece estar mais relacionada às preferências alimentares que acabam condicionando uma determinada espécie de cigarrinha como a mais eficiente na transmissão de *X. fastidiosa* para um hospedeiro, mas não necessariamente para o outro. O melhor exemplo disso é que a espécie *H. ignorata* se destacou como uma das mais eficientes em citros, embora tenha apresentado eficiência de transmissão muito baixa em cafeeiro, onde apresentou maior mortalidade durante o período de acesso à inoculação.

Embora até então não se conhecesse a gama de vetores de *X. fastidiosa* em plantas de café, este trabalho possibilitou comprovação de quatro espécies de cigarrinhas como vetoras em cafeeiro, sendo que a eficiência de transmissão

de *H. ignorata* foi menor do que em citros. Como essas espécies vetoras podem ocasionalmente se alimentar das duas plantas hospedeiras (Lopes et al., 1998; Paradela Filho et al., 1997), aumenta-se a chance de inoculações cruzadas das duas estirpes de *X. fastidiosa* (CVC e ARC) em cafeeiro e citros, respectivamente, principalmente porque já se comprovou o desenvolvimento de sintomas em plantas de café inoculadas com a estirpe de CVC (Li et al., 2001).

Além disso, a realização de inoculações mecânicas e por cigarrinhas em quatro épocas (outono-inverno 2000, primavera 2000, verão 2000/2001 e primavera 2001) permitiu verificar uma certa variabilidade na porcentagem de plantas inoculadas que foram positivas pelos dois métodos de detecção, de acordo com a época de inoculação.

Os testes de livre escolha com as cigarrinhas *D. costalimai* (Cicadellini) e *O. facialis* (Proconiini) não revelaram diferenças significativas entre as preferências alimentares por plantas cítricas (porções da planta, brotação e níveis de infecção), mas evidenciaram a preferência das duas espécies vetoras por brotações cítricas e por plantas sadias em relação às sintomáticas. No entanto, para *D. costalimai* ficou mais evidente a importância das folhas como atrativo para seleção hospedeira e como tecido preferencial para alimentação. Quando confinada sobre ramos com folhas com sintomas intensos de CVC, no teste da taxa de ingestão, essa cigarrinha reduziu drasticamente a sua excreção, o que reforça a importância das folhas para a alimentação dessa espécie. Deve-se salientar que em condições de escolha, *D. costalimai* mostrou maior permanência nas folhas do que nos ramos em plantas sintomáticas. Assim, seria interessante que em trabalhos futuros se estudasse a taxa de ingestão de seiva em ramos e folhas de plantas infectadas por *X. fastidiosa* para as duas espécies de cigarrinhas.

Os estudos de preferência em relação ao nível de infecção por *X. fastidiosa* têm importância no manejo da CVC, principalmente porque *O. facialis* não discriminou as plantas sadias das plantas com infecções iniciais de *X. fastidiosa*. A infecção sintomática de citros por *X. fastidiosa* afetou a preferência hospedeira e alimentação de um dos principais vetores, *D. costalimai*. Assim, é provável que plantas cítricas com infecções iniciais de *X.*

fastidiosa, mostrando pouco ou nenhum sintoma de CVC, sejam fontes de inóculo mais importantes que plantas com sintomas óbvios dessa doença. Essa descoberta tem implicações diretas no manejo da CVC, sendo desejável a detecção e eliminação de plantas ou ramos infectados pela bactéria antes mesmo do aparecimento dos sintomas.

Embora a eficiência de transmissão de *X. fastidiosa* tenha sido baixa em citros e cafeeiro, supõe-se que os dois patossistemas (CVC e ARC) sejam influenciados por uma série de fatores, tais como, épocas de inoculação, espécies de cigarrinhas vetoras e níveis de infecção (expressão de sintomas e população bacteriana) na planta-fonte. Todas essas variáveis devem ser utilizadas para melhor direcionar as medidas de controle dos insetos vetores, visando-se impedir a disseminação das doenças causadas por *X. fastidiosa*.

5 CONCLUSÕES

- plantas de *Vernonia condensata* Baker e *Aloysia virgata* (Ruiz & Pavan) Juss. são imunes à infecção e não permitem a sobrevivência dos isolados de *Xylella fastidiosa* Wells et al. de citros e de cafeeiro, que causam clorose variegada dos citros (CVC) e atrofia dos ramos do cafeeiro (ARC), respectivamente;

- a utilização de plantas de *V. condensata* e o consórcio entre plantas sadias de laranja-doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] e plantas de *V. condensata* asseguram a produção de insetos sadios a partir de posturas realizadas por adultos de cigarrinhas;

- a eficiência de transmissão de *X. fastidiosa* por cigarrinhas varia com a espécie vetora e planta hospedeira;

- *H. ignorata* é mais eficiente na transmissão de *X. fastidiosa* para citros do que *B. xanthophis* e *O. facialis*, mas não difere de *D. costalimai*;

- em cafeeiro, as quatro espécies vetoras não diferem entre si quanto à eficiência de transmissão;

- *H. ignorata* é mais eficiente na transmissão de *X. fastidiosa* para citros em relação ao cafeeiro, enquanto que os demais vetores transmitem a bactéria para os dois hospedeiros com eficiência semelhante;

- a eficiência de transmissão não está relacionada com divisões taxonômicas de Tribos (Cicadellini X Proconiini);

- as folhas cítricas orientam o início da seleção hospedeira de *D. costalimai*; havendo a possibilidade de escolha entre plantas com folhas normais ou com folhas encobertas, esse inseto prefere pousar inicialmente nas plantas com folhas normais;

- *D. costalimai* mostra nítida preferência para alimentação nas nervuras secundárias das folhas em relação a outras partes da planta cítrica, enquanto que *O. facialis* prefere indistintamente ramo secundário e as nervuras central e secundária das folhas;

- as cigarrinhas *D. costalimai* e *O. facialis* são atraídas pelas brotações cítricas;

- plantas cítricas com sintomas de CVC são menos atrativas às cigarrinhas *D. costalimai* e *O. facialis* que plantas sadias; no entanto, *O. facialis* não consegue discriminar entre plantas cítricas sadias e plantas infectadas por *X. fastidiosa*, porém sem sintomas de CVC;

- a preferência de *D. costalimai* e *O. facialis* pela parte da planta cítrica varia com o horário do dia, ocorrendo maior concentração nas folhas no período de temperatura mais amena e nos ramos no período mais quente; *D. costalimai* altera esse comportamento em plantas com sintomas de CVC, permanecendo mais tempo nas folhas;

- a alimentação por *D. costalimai* é reduzida drasticamente quando confinada em plantas cítricas com sintomas de CVC, mas não em plantas infectadas sem sintomas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLERZ, W.C. Ecological observations on two leafhoppers that transmit the Pierce's disease bacterium. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, v.93, p.115-120, 1980.
- ALBIBI, R.; CHEN, J.; LAMIKANRA, O. et al. RAPD fingerprinting *Xylella fastidiosa* Pierce's disease strains isolated from a vineyard in North Florida. **FEMS Microbiology Letters**, v.165, p.347-352, 1998.
- ALLISON, P. D. **Survival analysis using the SAS system**: a practical guide. Cary: SAS Institute, 1995. 292p.
- ALMEIDA, R.P.P. Multiplicação e movimentação de *Xylella fastidiosa* em mudas de *Citrus sinensis* e sua eficiência de aquisição e inoculação por vetores. Piracicaba, 1999. 57p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- ALMEIDA, R.P.P.; LOPES, J.R.S.L. Desenvolvimento de imaturos de *Dilobopterus costalimai* Young, *Oncometopia facialis* (Signoret) e *Homalodisca ignorata* Melichar (Hemiptera: Cicadellidae) em citros. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.28, n.1, p.179-182, 1999.
- ALMEIDA, R.P.P.; PEREIRA, E.F.; PURCEL, A.H. et al. Multiplication and movement of a citrus strain of *Xylella fastidiosa* within sweet orange. **Plant Disease**, v.85, n.4, p.382-386, 2001.

- ALVES, E.; MARUCCI, R.C.; PASCHOLATI, S.F. et al. Relationship between leaf symptoms and the proportions of xylem-colonized vessels of plum, coffee and citrus colonized by *Xylella fastidiosa*. **Plant Disease**, v.87, 2003. /No prelo/
- ANDERSEN, P. C.; BRODBECK, B.V. Diurnal and temporal changes in the chemical profile of xylem exudate from *Vitis rotundifolia*. **Physiologia Plantarum**, v.75, p.63-70, 1989.
- ANDERSEN, P.C.; BRODBECK, B.V.; MIZELL, R.F. III. Metabolism of amino acids and organic acids and sugars extracted from the xylem fluid of 4 host plants by *Homalodisca coagulata*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.50, p.149-159, 1989.
- ANDERSEN, P.C.; BRODBECK, B.V.; MIZELL, R.F.III. Feeding by the leafhopper, *Homalodisca coagulata*, in relation to xylem fluid chemistry and tension. **Journal of Insect Physiology**, v.38, n.8, p. 611-622, 1992.
- AUGER, J.G.; SHALLA, T.A. The use of fluorescent antibodies for detection of Pierce's disease bacteria in grapevines and insect vectors. **Phytopathology**, v.65, p.493-494, 1975.
- BACKUS, E.A. Anatomical and sensory mechanisms of leafhopper and planthopper feeding behavior. In: NAULT, L.R.; RODRIGUEZ, J.G. (Ed.) **The leafhoppers and planthoppers**. New York: John Wiley, 1985. cap.7, p.163-195.
- BACKUS, E.A. Sensory systems and behaviours which mediate Hemipteran plant-feeding: a Taxonomic overview. **Journal of Insect Physiology**, v.34, n.3, p.151-165, 1988.

- BACKUS, E. A.; McLEAN, D. The sensory systems and feeding behavior of leafhoppers. I. The aster leafhopper, *Macrostelus fascifrons* Stål (Homoptera, Cicadellidae). **Journal of Morphology**, v.172, p.361-379, 1982.
- BARNARD, E.L.; ASH, E.C.; HOPKINS, D.L. et al. Distribution of *Xylella fastidiosa* in oaks in Florida and its association with growth decline in *Quercus laevis*. **Plant Disease**, v.82, n.5, p.569-572, 1998.
- BERETTA, M.J.G.; GARCIA JÚNIOR, A.; LEE, R.F. et al. Observations on citrus variegated chlorosis in Brazil. In: CONFERENCE OF INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 12., New Delhi, 1993. **Proceedings**. Riverside: IOCV, 1993a. p.291-293.
- BERETTA, M.J.G.; HARAKAVA, R.; CHAGAS, C.M. et al. First report of *Xylella fastidiosa* in coffee. **Plant Disease**, v.80, p.821, 1996.
- BERETTA, M.J.G.; LEE, R.F.; BARTHE, G.A. et al. Detection of *Xylella fastidiosa* in symptomless trees. In: CONFERENCE OF INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 12., New Delhi, 1993. **Proceedings**. Riverside: IOCV, 1993b. p.306-310.
- BERISHA, B.; CHEN, Y.D.; XU, B.Y. et al. Isolation of Pierce's disease bacteria from grapevines in Europe. **Phytopathology**, v.86, n.11, p.119, 1996. Supplement.
- BERISHA, B.; CHEN, Y.D.; ZHANG, G.Y. et al. Isolation of Pierce's disease bacteria from grapevines in Europe. **European Journal of Plant Pathology**, v.104, p.427-433, 1998.
- BLUA, M.J.; REDAK, R.A.; MORGAN, D.J.W. et al. Seasonal flight activity of two *Homalodisca* species (Homoptera: Cicadellidae) that spread *Xylella fastidiosa* in Southern California. **Journal of Economic Entomology**, v.94, n.6, p.1506-1510, 2001.

- BRLANSKY, R.H.; DAVIS, C.L. TIMMER, L.W. et al. Xylem-limited bacteria in citrus from Argentina with symptoms of citrus variegated chlorosis. **Phytopathology**, v.81, p.1212, 1991.
- BRLANSKY, R.H.; LEE, R.F.; TIMMER, L.W. et al. Immunofluorescent detection of xylem-limited bacteria in situ. **Phytopathology**, v.72, n.11, p.1444-1448, 1982.
- BRLANSKY, R.H.; TIMMER, L.W.; FRENCH, W.J. Colonization of the sharpshooter vectors, *Oncometopia nigricans* and *Homalodisca coagulata* by xylem-limited bacteria. **Phytopathology**, v.73, p.530-535, 1983.
- BRODBECK, B.V.; ANDERSEN, P.C.; MIZELL, R.F. III. Differential utilization of nutrients during development by the xylophagous leafhopper, *Homalodisca coagulata*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.75, p.279-289, 1995.
- BRODBECK, B.V.; MIZELL, R.F. III; ANDERSEN, P.C. Physiological and behavioral adaptations of three species of leafhoppers in response to the dilute nutrient content of xylem fluid. **Journal of Insect Physiology**, v.39, n.1, p.73-81, 1993.
- BRODBECK, B.V.; MIZELL, R.F. III, FRENCH, W.J. Amino acids as determinants of host preference for the xylem feeding leafhopper, *Homalodisca coagulata* (Homoptera: Cicadellidae). **Oecologia**, v.83, p.338-345, 1990.
- CARLOS, E.F.; RODRIGUES NETO, J.; BERETTA, M.J.G. A bactéria *Xylella fastidiosa*. In: DONADIO, L.C.; MOREIRA, C. S. (Ed.). **Clorose variegada dos citros**. Bebedouro: Fundecitrus, 1997. cap.2, p.22-36.

- CHAGAS, C.M.; ROSSETTI, V.; BERETTA, M.J.G. Electron-microscopy studies of a xylem-limited bacterium in sweet orange affected with citrus variegated chlorosis disease in Brazil. **Journal of Phytopathology**, v.134, p.306-312, 1992.
- CHANG, C.J.; GARNIER, M.; ZREIK, L. et al. Culture and serological detection of the xylem-limited bacterium causing citrus variegated chlorosis and its identification as a strain of *Xylella fastidiosa*. **Current Microbiology**, v.27, p.137-142, 1993.
- CHEN, J.; CHANG, C.J.; JARRET, R.L. Plasmids from *Xylella fastidiosa*. **Canadian Journal Microbiology**, v.38, p.993-995, 1992.
- CHEN, J.; LAMIKANRA, O.; CHANG, C.J. et al. Randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Xylella fastidiosa* Pierce's disease and oak leaf scorch pathotypes. **Applied Environmental Microbiology**, v.61, p.1688-1690, 1995.
- CHEUNG, W.W.K.; MARSHALL, A.T. Studies on water and ion transport in hompteran insects: ultrastructure and cytochemistry of the cicadoid and cercopoid midgut. **Tissue Cell**, v.5, n.4, p.651-669, 1973a.
- CHEUNG, W.W.K.; MARSHALL, A.T. Water and ion regulation in cicadas in relation to xylem feeding. **Journal of Insect Physiology**, v.19, p.1801-1810, 1973b.
- CIAPINA, L.P.; LEMOS, E.G.M. Rapid DNA extraction methodology to detect *Xylella fastidiosa* in sharpshooter leafhoppers by nested-PCR (compact disc). In: SIMPÓSIO GENOMA FUNCIONAL DA XYLELLA FASTIDIOSA, 1., Serra Negra, 2001. **Posters**. São Paulo: Fapesp, 2001.
- COLETTA FILHO, H.D.; MACHADO, M.A. Hospedeiros, transmissão e técnicas de diagnóstico da bactéria *Xylella fastidiosa*. **Laranja**, v.22, n.1, p.121-132, 2001.

- COLETTA FILHO, H.D.; BORGES, K.M.; MACHADO, M.A. Ocorrência de *Xylella fastidiosa* em plantas candidatas a matrizes de laranja-doce e transmissão por borbulhas contaminadas. **Laranja**, v.21, p.372-334, 2000.
- COLETTA FILHO, H.D.; TAKITA, M.A.; SOUZA, A.A. de et al. Differentiation of strains of *Xylella fastidiosa* by a variable number of tandem repeat analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, n.9, p.4091-4095, 2001.
- CONTRERAS, J. V. Pecosita ou falsa mancha grasienta na Argentina. **Laranja e Cia**, v.31, p.6, 1992.
- CORDEIRO, T.; MARUCCI, R.C.; LOPES, J.R.S. Preferência das cigarrinhas *Bucephalagonia xanthophis* e *Oncometopia facialis* para alimentação em diferentes plantas hospedeiras da bactéria *Xylella fastidiosa* (compact disc). In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 10., Piracicaba, 2002. **Agropecuária: resumos**. Piracicaba: USP, 2002.
- COSTA, H.S.; BLUA, M.S.; BETHKE, J.A. et al. Transmission of *Xylella fastidiosa* to oleander by the glassywinged sharpshooter, *Homalodisca coagulata*. **HortScience**, v.35, n.7, p.1265-1267, 2000a.
- COSTA, P.L. da; FRANCO, C.F.; MIRANDA, V.S. et al. Strains of *Xylella fastidiosa* rapidly distinguished by arbitrarily primed PCR. **Current Microbiology**, v.40, p.279-282, 2000b.
- DAL BOSCO, A. Fluxo de seiva em laranjeira (*Citrus sinensis* L. Osb.) "Pera" infectada com *Xylella fastidiosa* Wells. Piracicaba, 2001, 53p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

- DAVIS, M.J.; THOMSON, S.V.; PURCELL, A.H. Etiological role of the xylem-limited bacterium causing Pierce's disease in almond leaf scorch. **Phytopathology**, v.70, n.6, p.472-475, 1980.
- DAVIS, M.J.; FRENCH, W.J.; SCHAAD, N.W. Axenic culture of the bacteria associated with phony disease of peach and plum leaf scald. **Current Microbiology**, v.6, p.309-314, 1981.
- DELONG, D.M. The bionomics of leafhoppers. **Annual Review of Entomology**, v.16, p.179-210, 1971.
- DERRICK, K.; BERETTA, M.J.G. Métodos de detecção e identificação de "strains" de *Xylella fastidiosa*. **Laranja**, v.17, n.1, p.233-236, 1996.
- DESCOBERTOS mais 6 vetores de CVC. **Revista do Fundecitrus**, v.14, n.94, p.8-9, ago./set. 1999.
- DOW, J.M.; DANIELS, M.J. *Xylella* genomics and bacterial pathogenicity to plants. **Yeast**, v.17, p.263-271, 2000.
- FEIL, H.; PURCELL, A.H. Temperature-dependent growth and survival of *Xylella fastidiosa* in vitro and in potted grapevines. **Plant Disease**, v.85, n.12, p.1230-1234, 2001.
- FERREIRA, H.; GONÇALVES, E.R.; RODRIGUES NETO, J. Primers specific for *Xylella fastidiosa* based on RAPD differential fragments. **Summa Pytopathologica**, v.26, n.1, p.15-20, 2000.
- FORBES, A.R.; RAINE, J. The stylets of the six-spotted leafhopper, *Macrostelus fascifrons* (Homoptera: Cicadellidae). **The Canadian Entomologist**, v.105, p.559-567, 1973.
- FREITAG, J.H. Host range of the Pierce's disease virus of grapes as determined by insect transmission. **Phytopathology**, v.41, p.920-934, 1951.

- FREITAG, J.H.; FRAZIER, N.W. Natural infectivity of leafhopper vectors of Pierce's disease virus of grape in California. **Phytopathology**, v.44, p.7-11, 1954.
- FRENCH, W.J.; FELICIANO, A. Distribution and severity of plum leaf scald disease in Brazil. **Plant Disease**, v.66, p.515-516, 1982.
- FRENCH, W.J.; KITAJIMA, E.W. Occurrence of plum leaf scald in Brazil and Paraguay. **Plant Disease Reporter**, v.62, n.12, p.1035-1038, 1978.
- FRY, S.M.; MILHOLLAND, R.D. Multiplication and translocation of *Xylella fastidiosa* in petioles and stems of grapevine resistant, tolerant, and susceptible to Pierce's disease. **Phytopathology**, v.80, n.1, p.61-65, 1990.
- FRY, S.M.; HUANG, J.S.; MILHOLLAND, R.D. Isolation and preliminary characterization of extracellular proteases produced by strains of *Xylella fastidiosa* from grapevines. **Phytopathology**, v.84, n.4, p. 357-363, 1994.
- FURLAN, M.R. **Cultivo de plantas medicinais**. Cuiabá: SEBRAE/MT, 1998. 137p.
- GARCIA JÚNIOR, A.; LOPES, J.R.S.; BERETTA, M.J.G. Population survey of leafhopper vectors of *Xylella fastidiosa* in citrus nurseries, in Brazil. **Fruits**, v.52, n.6, p.371-374, 1997.
- GIUSTOLIN, T.A.; LOPES, J.R.S.; MENDES, M.A. et al. Levantamento de hospedeiros alternativos das cigarrinhas vetoras de *Xylella fastidiosa*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 19., Manaus, 2002. **Resumos**. Manaus: INPA, 2002, p. 215.
- GOES, A.; BERETTA, M.J.G.; BARROS, J.C.de et al. Ocorrência de CVC (clorose variegada dos citros) em pomares cítricos do Estado do Rio de Janeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 18, p. 312, 1993. Suplemento./Apresentado ao 26. Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Aracajú, 1993 – Resumo/.

- GOHEEN, A.C.; NYLAND, G.; LOWE, S.K. Association of a rickettsia-like organism with Pierce's disease of grapevines and alfalfa dwarf and heat therapy of the disease in grapevines. **Phytopathology**, v.63, p.341-345, 1973.
- GOODWIN, P.H.; DEVAY, J.E.; MEREDITH, C.P. Roles of water stress and phytotoxins in the development of Pierce's disease of grapevine. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.32, p.1-15, 1988.
- GOULD, A.B.; FRENCH, W.J.; ALDRICH, J.H. et al. Rootstock influence on occurrence of *Homalodisca coagulata*, peach xylem fluid amino acids, and concentrations of *Xylella fastidiosa*. **Plant Disease**, v.75, n.8, p.767-770, 1991.
- GRAVENA, S.; LOPES, J.R.S.; PAIVA, P.E.B. et al. Os vetores da *Xylella fastidiosa*. In: DONADIO, L.C.; MOREIRA, C. S. (Ed.). **Clorose variegada dos citros**. Bebedouro: Fundecitrus, 1997. cap.3, p.37-53.
- HARTMAN, J.R.; ESHENAUER, B.C.; JARLFORS, U.E. Bacterial leaf scorch caused by *Xylella fastidiosa*: a Kentucky survey; a unique pathogen; and bur oak, a new host. **Journal of Arboriculture**, v.21, n.2, p.77-82, 1995.
- HARTUNG, J.S.; BERETTA, M.J.G.; BRLANSKY, R.H. et al. Citrus variegated chlorosis bacterium: axenic culture, pathogenicity, and serological relationships with other strains of *Xylella fastidiosa*. **Phytopathology**, v.84, n.6, p.591-597, 1994.
- HARTUNG, J.S.; PRUVOST, O.P.; VILLEMOT, I. et al. Rapid and sensitive colorimetric detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* by immunocapture and a nested-polymerase chain reaction assay. **Phytopathology**, v.86, n.1, p.95-101, 1996.

- HE, C.X.; LI, W.B.; AYRES, A.J. et al. Distribution of *Xylella fastidiosa* in citrus rootstocks and transmission of citrus variegated chlorosis between sweet orange plants through natural root grafts. **Plant Disease**, v.84, n.6, p.622-626, 2000.
- HENDSON, M.; PURCELL, A.H.; CHEN, D. et al. Genetic diversity of Pierce's disease strains and other pathotypes of *Xylella fastidiosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, n.2, p.895-903, 2001.
- HENSON, J.M.; FRENCH, R. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. **Annual Review of Phytopathology**, v.31, p.81-109, 1993.
- HEWITT, W.B.; FRAZIER, N.W.; FREITAG, J.H. Pierce's disease investigations. **Hilgardia**, v.19, p.207-264, 1949.
- HILL, B.L.; PURCELL, A.H. Acquisition and retention of *Xylella fastidiosa* by an efficient vector, *Graphocephala atropunctata*. **Phytopathology**, v.85, n.2, p.209-212, 1995a.
- HILL, B.L.; PURCELL, A.H. Multiplication and movement of *Xylella fastidiosa* within grape and four other plants. **Phytopathology**, v.85, n.11, p.1368-1372, 1995b.
- HILL, B.L.; PURCELL, A.H. Populations of *Xylella fastidiosa* in plants required for transmission by efficient vector. **Phytopathology**, v. 87, n.12, p. 1197-1201, 1997.
- HOLBEN, W.E.; JANSSON, J.K.; CHELM, B.K. DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial community. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, n.3, p.703-711, 1988.
- HOPKINS, D.L. Diseases caused by leafhopper-borne rickettsia-like bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v.15, p.277-294, 1977.

- HOPKINS, D.L. Seasonal concentration of the Pierce's disease bacterium in grapevine stems, petioles and leaf veins. **Phytopathology**, v.71, p.415-418, 1981.
- HOPKINS, D.L. Gram-negative, xylem-limited bacteria in plant disease. **Phytopathology**, v.73, n.2, p.347-350, 1983.
- HOPKINS, D.L. Physiological and pathological characteristics of virulent and avirulent strains of the bacterium that causes Pierce's disease of grapevine. **Phytopathology**, v.75, p.713-717, 1985.
- HOPKINS, D. L. *Xylella fastidiosa*: xylem-limited bacterial pathogen of plants. **Annual Review of Phytopathology**, v.27, p.271-290, 1989.
- HOPKINS, D.L. *Xylella fastidiosa*. In: SINGH, U.S.; SINGH, R.P.; KOHMOTO, K. (Ed.) **Pathogenesis and host specificity in plant diseases**. Tarrytown: Elsevier Science, 1995. v. 1, cap. 7, p. 185-197.
- HOPKINS, D.L.; ADLERZ, W.C. Natural hosts of *Xylella fastidiosa* in Florida. **Plant Disease**, v.72, n.5, p.429-431, 1988.
- HOPKINS, D.L.; MOLLENHAUER, H.H. Rickettsia-like bacterium associated with Pierce's disease of grapes. **Science**, v.179, p.298-300, 1973.
- HOPKINS, D.L.; THOMPSON, C.M. Seasonal concentration of the Pierce's disease bacterium in 'Carlos' and 'Welder' muscadine grapes compared with 'Schuyler' bunch grape. **HortScience**, v.19, n.3, p.419-420, 1984.
- HOPKINS, D.L.; BISTLINE, F.W.; RUSSO, L.W. et al. Seasonal fluctuation in the occurrence of *Xylella fastidiosa* in root and stem extracts from citrus with blight. **Plant Disease**, v.75,n.2, p.145-147, 1991.
- HORSFIELD, D. Relationship between feeding of *Philaenus spumaris* and the amino acid concentration of the xylem sap. **Ecological Entomology**, v.2, p.259-266, 1977.

- HOUSTON, B.R.; ESAU, K.; HEWITT, W.B. The mode of vector feeding and the tissues involved in the transmission of Pierce's disease virus in grape and alfalfa. **Phytopathology**, v.37, p.247-254, 1947.
- JINDAL, K.K. ; SHARMA, R.C. Outbreaks and new records: India almond leaf scorch a new disease from India. **FAO. Plant Protection Bulletin**, v.35, p.64-65, 1987.
- KAPLAN, E.L.; MEIER, P. Nonparametric estimation from incomplete observations. **Journal of American Statistical Association**, v.53, p.457-481, 1958.
- KITAJIMA, E.W.; BAKARCIC, M.; FERNANDEZ-VALIELA, M.V. Association of rickettsialike bacteria with plum leaf scald disease. **Phytopathology**, v.65, p.476-479, 1975.
- KRÜGNER, R.; LOPES, M.T.V. de C.; SANTOS, J. S. et al. Transmission efficiency of *Xylella fastidiosa* to citrus by sharpshooters and identification of two new vector species. In: CONFERENCE OF INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 14., Campinas, 2000. **Proceedings**. Riverside: IOCV, 2000. p.423.
- LARANJEIRA, F.F.; MULLER, G.W.; TRINDADE, J. et al. Constatação da clorose variegada dos citros (CVC) no Estado de Sergipe. **Fitopatologia Brasileira**, v.21, n.4, p.521, 1996.
- LARANJEIRA, F.F.; BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. et al. Aspectos práticos da epidemiologia da clorose variegada dos citros. **Laranja**, v.19, p.79-90, 1998a.
- LARANJEIRA, F.F.; POMPEU JUNIOR, J.; HARAKAVA, R. et al. Cultivares e espécies cítricas hospedeiras de *Xylella fastidiosa* em condição de campo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 23, n.2, p. 147-154, 1998b.

- LEE, R.F.; DERRICK, K.S.; BERETTA, M.J.G. et al. Citrus variegated chlorosis: a new destructive disease of citrus in Brazil. **Citrus Industry**, v.72, p.12-15, 1991.
- LEE, R.F.; RAJU, B.C.; NYLAND, G. et al. Phytotoxin(s) produced in culture by the Pierce's disease bacterium. **Phytopathology**, v.72, n.7, p.886-888, 1982.
- LEITE, C.A.; NAKANO, O. Distribuição vertical e horizontal de três espécies de cicadelídeos em plantas de citros. **Laranja**, v.21, n.2, p.271-288, 2000.
- LEITE, R.M.V.B.C.; JACOMINO, A.P. Ocorrência de clorose variegada dos citros no estado do Paraná. **Summa Phytopathologica**, v.19, p.35, 1993.
- LEITE, R.M.V.B.C.; LEITE JÚNIOR, R.P.; CERESINI, P.C. Hospedeiros alternativos de *Xylella fastidiosa* entre plantas invasoras de pomares de ameixeira com escaldadura da folha. **Fitopatologia Brasileira**, v.22, n.1, p.54-57, 1997.
- LEITE JÚNIOR, R.P.; LEITE, R.M.V.B.C.; CERESINI, P.C. Ausência de patogenicidade de *Xylella fastidiosa* da escaldadura da folha da ameixeira na cultivar de pessegueiro Flordasun. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.33, n.10, p.1653-1660, 1998.
- LEU, H.H.; LEU, L.S.; LIN, C.P. Development and application of monoclonal antibodies against *Xylella fastidiosa*, the causal bacterium of pear leaf scorch. **Journal of Phytopathology**, v.146, p.31-37, 1998.
- LEU, L.S.; SU, C.C. Isolation, cultivation, and pathogenicity of *Xylella fastidiosa*, the causal bacterium of pear leaf scorch disease in Taiwan. **Plant Disease**, v.77, n.6, p.642-646, 1993.
- LI, W.; DONADIO, L.C.; HE, C.; SEMPIONATO, O. Método de avaliação de resistência à clorose variegada dos citros. **Laranja**, v.17, p.55-66, 1996.

- LI, W.B. Estudos de resistência ou tolerância à clorose variegada dos citros. Jaboticabal, 1997. 107p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
- LI, W.B.; PRIA JÚNIOR, W.D.; TEIXEIRA, D.C. et al. Coffee leaf scorch caused by a strain of *Xylella fastidiosa* from citrus. **Plant Disease**, v.85, n.5 p.501-505, 2001.
- LIMA, J.E.O.; MIRANDA, V.S.; HARTUNG, J.S. et al. Coffee leaf scorch bacterium: axenic culture, pathogenicity, and comparison with *Xylella fastidiosa* of citrus. **Plant Disease**, v.82, p.94-97, 1998.
- LIMA, J.E.O., MIRANDA, V.S., ROBERTO, S.R. Diagnose da clorose variegada dos citros por microscopia ótica. **Fitopatologia Brasileira**, v.23, n.3, p.370-374, 1997.
- LOPES, J.R.S. Mecanismos de transmissão de *Xylella fastidiosa* por cigarrinhas. **Laranja**, v.17, n.1, p.79-92, 1996.
- LOPES, J.R.S. Estudos com vetores de *Xylella fastidiosa* e implicações no manejo da clorose variegada dos citros. **Laranja**, v.20, n.2, p.329-344, 1999.
- LOPES, J.R.S.; BERETTA, M.J.G.; HARAKAVA, R. et al. Confirmação da transmissão por cigarrinhas do agente causal da clorose variegada dos citros, *Xylella fastidiosa*. **Fitopatologia Brasileira**, v.21, p.343, 1996. Suplemento./Apresentado ao 29. Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Campo Grande, 1996 – Resumo/.

- LOPES, J.R.S.; GIUSTOLIN, T.A.; MARUCCI, R.C. et al. Composição de espécies de cigarrinhas (Hemiptera, Auchenorrhyncha) em café e citros na região de Bebedouro, SP. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 17., Rio de Janeiro, 1998. **Resumos**. Rio de Janeiro: UFRRJ, 1998. p.615.
- LOPES, S.A.; RIBEIRO, D.M.; ROBERTO, P.G. et al. *Nicotiana tabacum* as an experimental host for the study of plant-*Xylella fastidiosa* interactions. **Plant Disease**, v.84, n.8, p.827-830, 2000.
- MACHADO, E.C.; QUAGGIO, J.A.; LAGÔA, A.M.M.A. et al. Trocas gasosas e relações hídricas em laranjeiras com clorose variegada dos citros. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.6, n.1, p.53-57, 1994.
- MAGALHÃES, M.N.; LIMA, A.C.P. de. **Noções de probabilidade e Estatística**. São Paulo: EDUSP, 2002. 392p.
- MARQUES, L.L.R.; CERI, H.; MANFIO, G.P. Characterization of biofilm formation by *Xylella fastidiosa* in vitro. **Plant Disease**, v.86, n.6, p.633-638, 2002.
- MARTINS, E.M.F.; GUZZO, S.D.; PALAZZO, D.A. et al. Alterações metabólicas constatadas em plantas de laranja Natal infectadas por *Xylella fastidiosa*. **Summa Phytopatologica**, v.25, n.4, p.288-293, 1999.
- MARUCCI, R.C.; GIUSTOLIN, T.A.; MIRANDA, M.P. et al. Sharpshooter transmission of a coffee strain of *Xylella fastidiosa* to coffee seedlings. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, p.277, 2001. Suplemento./Apresentado ao 34. Congresso Brasileiro de Fitopatologia, São Pedro, 2001 – Resumo/.
- McCOY, R.E; THOMAS, D.L.; TSAI, J.H. et al. Periwinkle wilt, a new disease associated with xylem delimited rickettsialike bacteria transmitted by a sharpshooter. **Plant Disease Reporter**, v.62, n.12, p.1022-1026, 1978.

- MEDINA, C.L.; MACHADO, E.C.; GOMES, M.M.A. Condutância estomática, transpiração e fotossíntese em laranjeira “Valência” sob deficiência hídrica. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.11, n.1, p.29-34, 1999.
- MEDINA, C.L.; NUNES, W.M.C.; MACHADO, M.A. et al. Método prático para transmissão de *Xylella fastidiosa* em mudas de citros. **Fitopatologia Brasileira**, v.23, p.216, 1998. Suplemento./Apresentado ao 31. Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Fortaleza, 1998 – Resumo/.
- MEJDALANI, G. Morfologia externa dos Cicadellinae (Homoptera, Cicadellidae): Comparação entre *Versigonalia ruficauda* (Walker) (Cicadellini) e *Tretogonia cribrata* Melichar (Proconiini), com notas sobre outras espécies e análise da terminologia. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.15, n.2, p. 451-544, 1998.
- MILANEZ, J.M.; PARRA, J.R.P.; MAGRI, D.C. Alternation of host plants as a survival mechanism of leafhoppers *Dilobopterus costalimai* and *Oncometopia facialis* (Hemiptera: Cicadellidae), vectors of the citrus variegated chlorosis (CVC). **Scientia Agricola**, v.58, n.4, p.699-702, 2001.
- MINSAVAGE, G.V.; THOMPSON, C.M.; HOPKINS, D.L. et al. Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. **Phytopathology**, v.84, p.446-461, 1994.
- MIZELL, R.F. III; FRENCH, W.J. Leafhopper vectors phony peach disease: feeding site preference and survival on infected and uninfected peach, and seasonal response to selected host plants. **Journal of Entomology Science**, v.22, n.11-22, 1987.
- MIZUBUTI, E.S.G.; MATSUOKA, K.; PARIZZI, P. Associação de bactéria do tipo *Xylella* em laranjeiras com sintomas de clorose variegada na região da Zona da Mata de Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, v.19, n.2, p.241-244, 1994.

- MOLLENHAUER, H.H.; HOPKINS, D.L. Ultrastructural study of Pierce's disease bacterium in grape xylem tissue. **Journal of Bacteriology**, v.119, n.2, p.612-618, 1974.
- MOLLENHAUER, H.H.; HOPKINS, D.L. Xylem morphology of Pierce's disease-infected grapevines with different levels of tolerance. **Physiological Plant Pathology**, v.9, p.95-100, 1976.
- MONTEIRO, P.B.; RENAUDIN, J.; JAGOUEIX-EVEILLARD, S. et al. *Catharanthus roseus*, an experimental host plant for the citrus strain of *Xylella fastidiosa*. **Plant Disease**, v.85, n.3, p.246-251, 2001.
- MORENO, J.; GARCÍA-MARTINEZ, J.L. Seasonal variation of nitrogenous compounds in the xylem sap of *Citrus*. **Physiologia Plantarum**, v. 59, p.669-675, 1983.
- NIELSON, M. W. Leafhoppers systematics. In: NAULT, L.R.; RODRIGUEZ, J.G. (Ed.). **The leafhoppers and planthoppers**. New York: John Wiley, 1985. cap.2, p.11-39.
- NOMÉ, S.F.; RAJU, B.C.; GOHEEN, A.C. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for Pierce's disease bacteria in plant tissues. **Phytopathology**, v.70, n.8, p.746-749, 1980.
- NOVOTNY, V.; WILSON, M.R. Why are there no small species among xylem-sucking insects? **Evolutionary Ecology**, v.11, p.419-437, 1997.
- OLIVEIRA, A.C.; VALLIM, M.A.; SEMIGHINI, C.P. et al. Quantification of *Xylella fastidiosa* from citrus trees by real-time polymerase chain reaction assay. **Phytopathology**, v.92, n.10, p.10481054, 2002.
- PAIÃO, F.G.; LEITE JÚNIOR., R.P. Otimização da técnica de PCR para detecção de *Xylella fastidiosa* em insetos vetores associados a cafeeiro. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 2., Vitória, 2001. **Resumos**. Vitória: Embrapa, 2001. p. 82.

- PAIÃO, F.G.; MENEGUIM, A.M.; CASAGRANDE, E.C. et al. Envolvimento de cigarras (Homoptera, Cicadidae) na transmissão de *Xylella fastidiosa* em cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.27, p. 67, 2002. Suplemento. /Apresentado ao 35. Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Recife, 2002 – Resumo/.
- PAIVA, P.E.B; BENVENGA, S.R.; GRAVENA, S. Aspectos biológicos das cigarrinhas *Acrogonia gracilis* (Osborn), *Dilobopterus costalimai* Young e *Oncometopia facialis* (Signoret) (Hemiptera: Cicadellidae) em *Citrus sinensis* L. Osbeck. **Neotropical Entomology**, v.30, n.1, p.25-28, 2001.
- PALAZZO, D.A.; CARVALHO, M.L.V. Desenvolvimento e progresso da clorose variegada dos citros (CVC) em pomares de Colina, SP. **Laranja**, v.13, p.489-502, 1992.
- PANDA, N.; KUSH, G.S. **Host plant resistance to insects**. 2. ed. Wallingford: The University Press of Oxford, 1995. 431p.
- PARADELA FILHO, O.; SUGIMORI, M.H.; RIBEIRO, I.J.A. et al. Primeira constatação em cafeeiro no Brasil da *Xylella fastidiosa* causadora da clorose variegada dos citros. **Laranja**, v.16, n.2, p.135-136, 1995.
- PARADELA FILHO, O.; SUGIMORI, M.H.; RIBEIRO, I.J.A. et al. Constatação de *Xylella fastidiosa* em cafeeiro no Brasil. **Summa Phytopathologica**, v.23,n.1, p.46-49, 1997.
- PARADELA FILHO, O.; THOMAZIELLO, R.A.; BERETTA, M.J.G. et al. **Atrofia dos ramos de cafeeiro, causada por *Xylella fastidiosa***. Campinas: Instituto Agrônômico, 1999, 10p. (Boletim Técnico, 182).

- PASCHOLATI, S.F.; ALVES, E.; MARUCCI, R.C. et al. Vasos do xilema colonizados por *Xylella fastidiosa* em ameixeira, cafeeiro e citros e a sintomatologia. **Fitopatologia Brasileira**, v.27, p. 68, 2002. Suplemento./Apresentado ao 35. Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Recife, 2002 – Resumo/.
- PEREIRA, E.F. Estudo de fatores sazonais relacionados à transmissão de *Xylella fastidiosa* em pomares de citros. Piracicaba, 2000, 82p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- PINTO, F.G.S.; LEITE JÚNIOR, R.P. Detecção de *Xylella fastidiosa* em *Coffea* spp. através da técnica de PCR. **Fitopatologia Brasileira**, v. 24, p. 254, 1999. Suplemento./Apresentado ao 32. Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Curitiba, 1999 – Resumo/.
- POOLER, M.R.; HARTUNG, J.S. Specific PCR detection and identification of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chlorosis. **Current Microbiology**, v.31, p.377-381, 1995.
- POOLER, M.R.; HARTUNG, J.S. Sequence analysis of a 1296-nucleotide plasmid from *Xylella fastidiosa*. **FEMS Microbiology Letters**, v.155, p.217-222, 1997.
- POOLER, M.R.; MYUNG, I.S.; BENTZ, J. et al. Detection of *Xylella fastidiosa* in potential insect vectors by immunomagnetic separation and nested polymerase chain reaction. **Letters in Applied Microbiology**, v.25, p.123-126, 1997.
- PRESS, M.C.; WHITTAKER, J.B. Exploitation of the xylem stream by parasitic organisms. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, v.341, p.101-111, 1993.

- PURCELL, A.H. Role of blue-green sharpshooter, *Hordnia circellata*, in the epidemiology of Pierce's disease of grapevines. **Environmental Entomology**, v.4, p.745-752, 1975.
- PURCELL, A.H. Leafhopper vectors of xylem-borne plant pathogens. In: MARAMOROSCH, K.; HARRIS, K. F. (Ed.) **Leafhopper vectors and plant disease agents**. New York: Academic Press, 1979, cap.19, p.603-625.
- PURCELL, A.H. Almond leaf scorch: leafhopper and spittlebug vectors. **Journal of Economic Entomology**, v.73, n.6, p.834-838, 1980.
- PURCELL, A.H. Vector preference and inoculation efficiency as components of resistance to Pierce's disease in European grape cultivars. **Phytopathology**, v.71, n.4, p.429-435, 1981.
- PURCELL, A.H. The ecology of bacterial and mycoplasma plant diseases spread by leafhoppers and planthoppers. In: NAULT, L.R.; RODRIGUEZ, J.G. (Ed.) **The leafhoppers and planthoppers**. New York: John Wiley, 1985. cap.15, p.351-380.
- PURCELL, A.H. Homopteran transmission of xylem-inhabiting bacteria. In: HARRIS, K.F. (Ed.) **Advances in disease vector research**, New York: Springer-Verlag, 1989. v.6, cap.9, p.243-266.
- PURCELL, A.H. *Xylella fastidiosa*, a regional problem or global threat? **Journal of Plant Pathology**, v.79, n.2, p.99-105, 1997.
- PURCELL, A.H.; FEIL, H. Glassy-winged sharpshooter. **Pesticide Outlook**, v.12, n.5, p. 199-203, 2001.
- PURCELL, A.H.; FINLAY, A.H. Evidence for noncirculative transmission of Pierce's disease bacterium by sharpshooter leafhoppers. **Phytopathology**, v.69, p.393-395, 1979.

- PURCELL, A.H.; FINLAY, A.H.; McLEAN, D.L. Pierce's disease bacterium: mechanism of transmission by leafhoppers vectors. **Science**, v.206, p.839-841, 1979.
- PURCELL, A.H.; HOPKINS, D.L. Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v.34, p.131-151, 1996.
- PURCELL, A.H.; SAUNDERS, S.R. Fate of Pierce's Disease strains of *Xylella fastidiosa* in common riparian plants in California. **Plant Disease**, v.83, n.9, p.825-830, 1999.
- PURCELL, A.H.; SAUNDERS, S.R.; HENDSON, M. et al. Causal role of *Xylella fastidiosa* in oleander leaf scorch disease. **Phytopathology**, v.89, n.1, p.53-58, 1999.
- QUIN, X.; MIRANDA, V.S.; MACHADO, M. et al. An evaluation of the genetic diversity of *Xylella fastidiosa* isolated from diseased citrus and coffee in São Paulo, Brazil. **Phytopathology**, v.91, n.6, p.599-605, 2001.
- QUEIROZ-VOLTAN, R.B; PARADELA FILHO, O. Caracterização de estruturas anatômicas de citros infectados com *Xylella fastidiosa*. **Laranja**, v.20, n.1, p.55-76, 1999.
- QUEIROZ-VOLTAN, R.B; PARADELA FILHO, O.; CARELLI, M.L.C. et al. Aspectos estruturais de cafeeiro infectado com *Xylella fastidiosa*. **Bragantia**, v.57, n.1, p.23-33, 1998.
- RAJU, B.C.; WELLS, J.M. Diseases caused by fastidious xylem-limited bacteria. **Plant Disease**, v.70, n.3, p.182-186, 1986.
- RAJU, B.C.; GOHEEN, A.C.; FRAZIER, N.W. Occurrence of Pierce's disease bacteria in plants and vectors in California. **Phytopathology**, v.73, p.1309-1313, 1983.

- RAJU, B.C.; WELLS, J.M.; NYLAND, G. et al. Plum leaf scald: isolation, culture, and pathogenicity of the causal agent. **Phytopathology**, v.72, n.11, p.1460-1466, 1982.
- RIBEIRO, R.V. Influência da temperatura na fotossíntese de laranja "Pêra" com Clorose Variegada dos Citros. Piracicaba, 2002. 58p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- ROBERTO, S.R.; COUTINHO, A.; LIMA, J.E.O. et al. Transmissão de *Xylella fastidiosa* pelas cigarrinhas *Dilobopterus costalimai*, *Acrogonia terminalis* e *Oncometopia facialis* em citros. **Fitopatologia Brasileira**, v.21, n.4, p.517-518, 1996.
- ROBERTO, S.R.; COUTINHO, A.; MIRANDA, V.S. et al. Associação entre a clorose variegada e as cigarrinhas do xilema predominantes em citros. **Fitopatologia Brasileira**, v.20, p.348, 1995. Suplemento./Apresentado ao 28. Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Ilhéus, 1995 – Resumo/.
- ROBERTO, S.R.; YAMAMOTO, P.T. Flutuação populacional e controle químico das cigarrinhas em citros. **Laranja**, v.19, p.269-284, 1998.
- RODRÍGUEZ, C.M.; OBANDO, J.J.; VILLALOBOS, W. et al. First report of *Xylella fastidiosa* infecting coffee in Costa Rica. **Plant Disease**, v.85, p.1027, 2001.
- ROSATO, Y.E; NETO, J.R.; MIRANDA, V.S. et al. Diversity of a *Xylella fastidiosa* population isolated from *Citrus sinensis* affected by citrus variegated chlorosis in Brazil. **Systematic Applied Microbiology**, v.21, p.593-598, 1998.

- ROSSETTI, V.; GARNIER, M.; BOVÉ, J.M. et al. Présence de bactéries dans le xylème d'orangers atteints de chlorose variégée, une nouvelle maladie des agrumes au Brésil. **Comptés Rendus de l' Académie des Sciences**. Series 3 Sciences de la Vie, v.310, p.345-349, 1990.
- SAS INSTITUTE. **Guia do usuário SAS/STAT: versão 6**. Cary, 1996. 1028p.
- SCHAAD, N.W.; OPGENORTH, D.; GAUSH, P. Real-time polymerase chain reaction for one-hour on-site diagnosis of Pierce's disease of grape in early season asymptomatic vines. **Phytopathology**, v.92, n.7, p.721-728, 2002.
- SEVERIN, H.H.P. Transmission of the virus of Pierce's disease by leafhoppers. **Hilgardia**, v.19, p.190-202, 1949.
- SHERALD, J.L. Evaluation of a rapid ELISA test kit for detection of *Xylella fastidiosa* in landscape trees. **Plant Disease**, v.75, n.2, p.200-203, 1991.
- SHERALD, J.L. Pathogenicity of *Xylella fastidiosa* in american elm and failure of reciprocal transmission between strains from elm and sycamore. **Plant Disease**, v.77, n.2, p.190-193, 1993.
- SHERALD, J.L.; KOSTKA, S.J. Bacterial leaf scorch of landscape trees caused by *Xylella fastidiosa*. **Journal of Arboriculture**, v.18, n.2, p.57-63, 1992.
- SHERALD, J.L.; WELLS, J.M.; HURT, S.S. et al. Association of fastidious, xylem-inhabiting bacteria with leaf scorch in red maple. **Plant Disease**, v.71, n.10, p.930-933, 1987.
- SIMPSON, A.J.G., REINACH, F.C., ARRUDA, P. et al. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Nature**, v.406, p.151-157, 2000.
- SMART, C.D.; HENDSON, M.; GUILHABERT, M.R. et al. Seasonal detection of *Xylella fastidiosa* in grape vines with culture, ELISA e PCR. **Phytopathology**, v.88, n.9, p. 83, 1998. Supplement.

- STATISTICAL SCIENCE. **S-Plus for windows**: user's manual. Seattle, 1993. 2v.
- SWALLOW, W.H. Group testing for estimating infection rates and probabilities of disease transmission. **Phytopathology**, v.75, n.8, p. 882-889, 1985.
- TAVELLA, L.; ARZONE, A. Comparative morphology of mouth parts of *Zyginidia pullula*, *Empoasca vitis*, and *Graphocephala fennahi* (Homoptera, Auchenorrhyncha). **Bolletino di Zoologia**, v.60, p.33-39, 1993.
- TEBAR, L.R.; HARAKAVA, R.; GRAVENA, S. et al. Detection of *Xylella fastidiosa* antigens in sharpshooter leafhoppers collected from citrus orchards affected by citrus variegated chlorosis (CVC). **Fitopatologia Brasileira**, v.19, p.325, 1994. Suplemento./Apresentado ao 27. Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Itajaí, 1994 – Resumo/.
- THOMPSON, V. Spittlebug indicators of nitrogen-fixing plants. **Ecological Entomology**, v.35, p.391-398, 1994.
- TRAVENSOLO, R.F.; LEITE JÚNIOR, R.P. Hospedeiros alternativos de *Xylella fastidiosa* entre plantas invasoras de pomares de citros com clorose variegada. **Fitopatologia Brasileira**, v.21, p.336, 1996. Suplemento./Apresentado ao 29. Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Campo Grande, 1996 – Resumo/.
- TRIPLEHORN, B.W.; NAULT, L.R.; HORN, D.J. Feeding behavior of *Graminella nigrifrons* (Forbes). **Annals of the Entomological Society of America**, v.77, n.1, p.102-107, 1984.
- TUBELIS, A.; BARROS, J.C.; LEITE, R.M.V.B. Difusão da clorose variegada dos citros em pomares comerciais de laranja no Brasil. **Laranja**, v.14, n.1, p.239-254, 1993.
- TURNER, W.F.; POLLARD, H.N. Additional leafhopper vectors of phony peach. **Journal of Economic Entomology**, v.48, n.6, p.771-772, 1955.

- TURNER, W. F.; POLLARD, H.N. **Life histories and behavior of five insect vectors of phony peach disease**. Washington: USDA, 1959. 28p. (USDA. Technical Bulletin, 1188).
- VAN SLUYS, M.A.; MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; CAMARGO, L.E.A. et al. Comparative genomic analysis of plant-associated bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v.40, p.169-189, 2002.
- WALSH, P.S.; METZGER, D.A.; HIGUCHI, R. Chelex[®] 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. **Biotechniques**, v.10, n.4, p.506-513, 1991.
- WELLS, J.M.; RAJU, B.C. Cellular fatty acid composition of six fastidious, gram-negative, xylem-limited bacteria from plants. **Current Microbiology**, v.10, p.231-236, 1984.
- WELLS, J.M.; RAJU, B.C.; NYLAND, G. Isolation, culture, and pathogenicity of the bacterium causing phony disease of peach. **Phytopathology**, v.73, n.6, p.859-862, 1983.
- WELLS, J.M.; RAJU, B.C.; HUNG, H-Y et al. *Xylella fastidiosa* gen. nov., sp. nov: gram-negative, xylem-limited, fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.37, n.2, p.136-143, 1987.
- WELLS, J.M.; RAJU, B.C.; NYLAND, G. et al. Medium for isolation and growth of bacteria associated with plum leaf scald and phony peach diseases. **Applied Environmental and Microbiology**, v.42, p.357-363, 1981.
- YAMAMOTO, P.T.; ROBERTO, S.R. Aspectos relacionados às principais espécies de cicadelineos (Hemiptera:Cicadellidae:Cicadellinae) que ocorrem em citros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 16., 1997, Salvador, **Resumos**, p.237, 1997.

- YAMAMOTO, P.T.; PRIA JÚNIOR, W.D.; ROBERTO, S.R. et al. Flutuação populacional de cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae) em pomar cítrico em formação. **Neotropical Entomology**, v.30, n.1, p.175-177, 2001.
- YAMAMOTO, P.T.; ROBERTO, S.R.; PRIA JÚNIOR, W.D. et al. Transmissão de *Xylella fastidiosa* por cigarrinhas *Acrogonia virescens* e *Homalodisca ignorata* (Hemiptera:Cicadellidae) em plantas cítricas. **Summa Phytopathologica**, v.28, n.2, p.178-181, 2002.
- YONCE, C.E.; CHANG, C.J. Detection of xylem-limited bacteria from sharpshooter leafhoppers and their feeding hosts in peach environs monitored by culture and Elisa techniques. **Environmental Entomology**, v.16, n.1, p.68-71, 1987.
- YOUNG, D. A. **Taxonomic study of the Cicadellinae. Part 1, Proconiini.** Washington: United States National Museum, 1968. 287p. (Bulletin, 261).
- YOUNG, D. A. **Taxonomic study of the Cicadellinae (Homoptera: Cicadellidae). Part2, New World Cicadelliini and genus Cicadella.** Washington: North Carolina Agricultural Experiment Station, 1977. 1135p. (Technical Bulletin, 239).