

RÚBIA DE OLIVEIRA MOLINA

**ESTUDO POPULACIONAL DAS CIGARRINHAS VETORAS DE *Xylella*
fastidiosa EM POMARES CÍTRICOS DA REGIÃO NOROESTE DO
PARANÁ**

**MARINGÁ
PARANÁ - BRASIL
NOVEMBRO – 2006**

RÚBIA DE OLIVEIRA MOLINA

**ESTUDO POPULACIONAL DAS CIGARRINHAS VETORAS DE *Xylella*
fastidiosa EM POMARES CÍTRICOS DA REGIÃO NOROESTE DO
PARANÁ**

Dissertação apresentada à
Universidade Estadual de Maringá,
como parte das exigências do
Programa de Pós-graduação em
Agronomia, área de concentração
em Proteção de Plantas para
obtenção do Título de Mestre.

**MARINGÁ
PARANÁ - BRASIL
NOVEMBRO - 2006**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

M722e Molina, Rúbia de Oliveira
Estudo populacional das cigarrinhas vetoras de *Xylella fastidiosa* em pomares cítricos da região Noroeste do Paraná. / Rúbia de Oliveira Molina. - Maringá, PR : [s.n.], 2006.
59 f. : il.

Orientador : Prof. Dr. William Mário de Carvalho Nunes.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-graduação em Agronomia, 2006.

1. Cigarrinhas vetoras - Citrus - Região Noroeste do Paraná. 2. Cigarrinhas vetoras - *Xylella fastidiosa* - Clorose variegada dos citros. I. Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-graduação em Agronomia. II. Título.

CDD 21.ed.632.32

Agradeço a Deus.

Ofereço aos meus pais Waldemar & Aparecida.

Dedico ao Luciano,

Carinhosamente.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que é fonte de fé e esperança nos momentos difíceis desta caminhada.

Aos Professores Doutores William Mário de Carvalho Nunes e Maria Júlia Corazza-Nunes, pela orientação, incentivo, confiança e amizade ao longo de todos estes anos.

À Dr^a. Rosangela Cristina Marucci, pelo apoio, colaboração e atenção demonstrados para a realização deste trabalho.

Ao professor Dr. João Roberto Spotti Lopes, Esalq/USP Piracicaba-SP, pelo envio de cigarrinhas controles positivos para realização do teste de PCR.

Ao engenheiro Agrônomo Carlos Alexandre Zanutto e ao técnico José Alcides Remolli, funcionários do Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada (NBA) da Universidade Estadual de Maringá, que muito me ajudou nas viagens a campo e na coleta do material.

À amiga Aline M. O. Gonçalves, pela ajuda essencial na realização deste trabalho.

Aos amigos de todos os dias, membros-estagiários do NBA/UEM: Alessandra Costa, Leonardo Kami, Walter Temporal, Fabio Mulati e Luciana Tezin.

Aos amigos de Pós-graduação: Clara Ueda, Akemi Yamamoto, Rachel Locks, Everton Blainski, Marilda Caixeta e Rosa G. Vargas, que estiveram sempre presentes com muita alegria nos momentos de estudos.

Aos professores, funcionários e colegas da Pós-graduação do Centro de Treinamento de Irrigação (CTI), pela harmoniosa convivência de todos os dias

de trabalhos.

À família Tezin, proprietária do sítio Nossa Senhora Aparecida e à família Pratinha do sítio Laranjeiras I, por permitirem a realização dos experimentos em suas propriedades.

BIOGRAFIA

RÚBIA DE OLIVEIRA MOLINA, filha de Aparecida de Oliveira Molina e Waldemar Gimenez Molina, nascida na cidade de Cianorte, Estado do Paraná, aos vinte e três dias do mês de dezembro de 1978.

Graduada em Ciências Biológicas Licenciatura, pela Universidade Estadual de Maringá em maio de 2004. Atuou como professora da rede estadual de ensino na cidade de Maringá, Estado do Paraná, em 2004.

Iniciou, em março de 2005, o curso de mestrado no programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Estadual de Maringá, vindo a concluí-lo aos vinte e quatro dias de novembro de 2006.

ÍNDICE

RESUMO-----	x
ABSTRACT-----	xi
INTRODUÇÃO GERAL-----	1
REVISÃO DE LITERATURA-----	4
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	11
CAPÍTULO-I-----	17
ESTUDO POPULACIONAL DAS CIGARRINHAS VETORAS DE <i>Xylella fastidiosa</i> NO MUNICÍPIO DE PARANAÍ, PARANÁ	
INTRODUÇÃO-----	18
MATERIAL E MÉTODOS-----	20
RESULTADOS E DISCUSSÃO-----	22
CONCLUSÕES-----	27
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	28
CAPÍTULO-II-----	30
FLUTUAÇÃO POPULACIONAL DAS CIGARRINHAS (HEMIPTERA CICADELLIDAE) VETORAS DE <i>Xylella fastidiosa</i> NO MUNICÍPIO DE NOVA ESPERANÇA, PARANÁ	
INTRODUÇÃO-----	31
MATERIAL E MÉTODOS-----	32
RESULTADOS E DISCUSSÃO-----	34
CONCLUSÕES-----	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	41
CAPÍTULO-III-----	44
DETECÇÃO DE <i>Xylella fastidiosa</i> EM CIGARRINHAS VETORAS (HEMIPTERA: CICADELLIDAE) POR MEIO DE PCR	
INTRODUÇÃO-----	45
MATERIAL E MÉTODOS-----	46
RESULTADOS E DISCUSSÃO-----	49
CONCLUSÕES-----	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	53

RESUMO

MOLINA, Rúbia Oliveira. M.S., Universidade Estadual de Maringá, novembro de 2006. **Estudo populacional das cigarrinhas vetoras de *Xylella fastidiosa* em pomares cítricos da região noroeste do Paraná.** Professor orientador: Dr. William Mário de Carvalho Nunes. Professora conselheira: Dr^a. Maria Júlia Corazza-Nunes.

A clorose variegada dos citros (CVC) é uma doença do citros, que foi constatada pela primeira vez em 1987, em municípios do noroeste paulista e da região do triângulo mineiro. A CVC é causada pela *Xylella fastidiosa*, uma bactéria endofítica, em forma de bastonete, encontrada nos vasos do xilema das plantas. A disseminação ocorre por meio de insetos vetores pertencentes à ordem Hemiptera, família Cicadellidae, conhecidos como cigarrinhas, que transmitem a bactéria depois de se alimentarem em plantas contaminadas. O objetivo deste trabalho é identificar as espécies de cigarrinhas vetoras e seu comportamento ao longo do tempo em dois pomares comerciais de laranja doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] na região noroeste do Paraná e ainda estabelecer um protocolo eficiente na extração de ácido desoxirribonucléico (DNA) para Cicadélídeos visando detectar a *X. fastidiosa* através de “primers” específicos. O experimento foi realizado em dois talhões comerciais de laranja doce, variedade Pêra, enxertada sobre limão ‘cravo’ (*Citrus limonia*), localizados nas cidades de Nova Esperança e Paranavaí, com idade de 15 e 10 anos, respectivamente. Para a realização das amostragens, foram utilizadas armadilhas adesivas amarelas, distribuídas na área periférica e central dos talhões, sendo amostradas dez ruas em cada talhão. As armadilhas foram renovadas no pomar a cada trinta dias durante o período de avaliação, entre junho de 2005 a setembro de 2006. As principais espécies vetoras capturadas nas duas localidades foram: *Acrogonia citrina* e *Dilobopterus costalimai*, com altos índices populacionais nos meses de junho e dezembro de 2005 e fevereiro e junho de 2006. Os testes moleculares para extração de DNA de cigarrinhas realizados com o protocolo I a base de fenol e clorofórmio apresentaram resultados positivos para detecção de bactéria *X. fastidiosa*.

Palavras chave: *Citrus sinensis*, Clorose variegada dos citros, Cicadellidae.

ABSTRACT

MOLINA, Rúbia Oliveira. M.S., Universidade Estadual de Maringá. November, 2006. **Populational study of sharpshooter vectors of *Xylella fastidiosa* in orchards of the northwest region of Paraná state, Brazil.** Adviser: Dr. William Mário de Carvalho Nunes. Co-adviser: Dr^a. Maria Júlia Corazza-Nunes.

Citrus variegated chlorosis (CVC) is a citrus disease that was first observed in 1987 in counties of northwest of São Paulo State and in the area of the “Triângulo Mineiro”, Minas Gerais State, Brazil. CVC is caused by *Xylella fastidiosa* a endofitic, rod shaped bacteria. The dissemination occurs through xylem feeder sharpshooter vectors belonging to the Hemiptera order, Cicadellidae family that transmit the bacteria after feeding in affected plants. The objective of this work was to identify the species of sharpshooter vectors of the disease and their behavior along the time in two commercial orchards of sweet orange (*Citrus sinensis*) in the northwest region of Paraná State, Brazil, and to establish an efficient protocol in the extraction of desoxirribonucleic acid genomic (DNA) for Cicadellids in order to detect *X. fastidiosa*, through the specific “primers”. The experiment was carried out in two commercial plots of 'Pêra' sweet orange on Rangpur lime (*Citrus limonia* L.), rootstock, located in the cities of Nova Esperança and Paranavaí, 15 and 10 years old, respectively. To fulfill the samplings, yellow adhesive traps were used, distributed in the peripheric and central area of the plots, being sampled ten rows of each plot. The traps were renewed at the orchard every thirty days during the evaluation period that was from June 2005 to September of 2006. The main vector species captured at the two places were: *Acrogonia citrina* and *Dilobopterus costalimai* with high population peaks in the months of June/05, December/05, February/06 and June/06. The molecular tests based on phenol and chloroform extraction protocol for *X. fastidiosa* detection, were positive.

Key words: *Citrus sinensis*, Citrus variegated chlorosis, Cicadellidae.

INTRODUÇÃO GERAL

A citricultura desenvolve um importante papel na economia brasileira, com uma produção estimada em 18.225.209 de toneladas para o ano de 2006, destacando-se como maior produtor mundial (IBGE 2006).

Esta produção poderia ser ainda maior não fossem os problemas fitossanitários que estão associados à baixa produtividade, como por exemplo, a clorose variegada dos citros (CVC), que é uma doença causada pela bactéria *Xylella fastidiosa* (Wells).

A doença foi encontrada pela primeira vez no Brasil em 1987, em pomares de Colina, no Estado de São Paulo, e depois na região do Triângulo Mineiro (Rossetti *et al.* 1990). A doença pode atacar todas as variedades de laranja doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck], afetando, principalmente, a qualidade dos frutos, tornando-os de tamanho reduzido, não apropriado para a comercialização (Palazzo 1993).

Para a sua disseminação natural e penetração em tecido vegetal suscetível, a bactéria *X. fastidiosa* depende obrigatoriamente de insetos vetores (Hemiptera Cicadellidae), conhecidos como cigarrinhas, que são sugadores de seiva do xilema (Purcell 1989). Estes insetos podem alimentar-se da seiva de um grande número de espécies de plantas (Li *et al.* 2003).

Só na citricultura existem mais de 70 espécies de cigarrinhas que podem ser observadas tanto nas plantas cítricas como na vegetação espontânea (Paiva *et al.* 1996). E entre elas encontram-se algumas espécies comprovadamente vetoradas da bactéria: *Dilobopterus costalimai* Young, *Acrogonia citrina* Marucci & Cavichioli, *Oncometopia facialis* (Signoret) e *Macugonalia leucomelas* (Walker), *Bucephalagonia xanthophis* (Berg). A transmissão da bactéria para plantas sadias ocorre após sua aquisição durante a alimentação em plantas doentes (Lopes *et al.* 1996).

A bactéria, além dos vasos do xilema das plantas, consegue sobreviver no aparelho bucal das cigarrinhas transmissoras, aderida às paredes internas do seu aparelho bucal (cibário, sulco apodemal do diafragma e nas áreas da parede do pré-cibário, acima e abaixo da válvula) (Brlansky *et al.* 1983).

Durante todas as fases do seu desenvolvimento, as cigarrinhas podem

transmitir à bactéria (Gravena et al. 1997); entretanto, a fase mais importante para a transmissão é a adulta, devido ao longo período de vida. O fato das ninfas perderem a capacidade de transmissão de *X. fastidiosa* após a ecdise indica que o inóculo da bactéria está todo localizado na parte anterior do tubo digestivo das cigarrinhas (estomodeu) ou nas peças bucais. A perda da infectividade ocorre pela troca do forro cuticular do estomodeu a cada mudança do exoesqueleto. No caso da CVC, os vetores não são muito eficazes na transmissão da *X. fastidiosa*, variando entre 1% (*O. facialis*) e 12% (*B. xanthophis*) (Krugner et al. 2000).

Segundo Roberto e Yamamoto (1998), conhecer o comportamento da população de cigarrinhas em pomares cítricos, ao longo do tempo, é essencial para a adoção de estratégias de manejo. Lopes (1999) sugere que a definição da época mais racional para o controle dos vetores, visando à redução na disseminação da CVC, requer não apenas um 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.

Nunes et al. (2006) observaram na região noroeste do Paraná que a população de cigarrinhas é influenciada pelo clima. Em anos de distribuição normal de chuvas, a população tende a ser maior e a colonização ocorre no início da primavera.

Estudos são necessários nesta região, em função das poucas informações a respeito da dinâmica populacional das cigarrinhas e dos poucos trabalhos que estão sendo desenvolvidos com o intuito de estudar a identificação correta das espécies, biologia, ecologia, transmissão e controle químico e biológico das cigarrinhas de pomares cítricos.

Este trabalho colabora para o entendimento da flutuação populacional das cigarrinhas vetoras de *X. fastidiosa*, analisada em dois pomares comercial de laranja doce, variedade Pêra, na região noroeste do Paraná. As cigarrinhas foram capturadas com a utilização de armadilhas adesivas amarelas, identificadas e devidamente agrupadas para contagem das espécies de acordo com os meses de coleta entre junho de 2005 a setembro de 2006. As espécies *D. costalimai* e *A. citrina* foram as mais capturadas nesta região, seguidas de outras espécies em menor quantidade, como: *Bucephalagonia xanthophis*; *Macugonalia leucomelas*; *Oncometopia facialis*; *Sonesimia grossa*;

Homalodisca ignorata.

O protocolo I a base de fenol clorofórmio (Hung *et al.* 2004) mostrou ser o mais adequado para a extração de DNA de cigarrinhas quando comparado com o protocolo II, utilizado por Ciapina *et al.* (2004), a base de resina Chelex 100.

O produto da amplificação da Reação da polimerase em cadeia (PCR) com o uso de 'primers' específicos para *X. fastidiosa* detectou a presença de bactérias nas espécies *Dilobopterus costalimai* e *Acrogonia citrina*.

A partir deste estudo foi possível elaborar três trabalhos distintos:

-“ESTUDO POPULACIONAL DAS CIGARRINHAS VETORAS DE *Xylella fastidiosa* NO MUNICÍPIO DE PARANAVÁI, PARANÁ;”

-“FLUTUAÇÃO POPULACIONAL DAS CIGARRINHAS VETORAS DE *Xylella fastidiosa* NO MUNICÍPIO DE NOVA ESPERANÇA, PARANÁ;”

-“DETECÇÃO DE *Xylella fastidiosa* EM CIGARRINHAS VETORAS (HEMIPTERA: CICADELLIDAE) ATRAVÉS DE PCR.”

REVISÃO DE LITERATURA

Clorose variegada dos citros

No Brasil, as primeiras observações sobre clorose variegada dos citros (CVC) foram feitas em meados de 1987 no triângulo mineiro e nas regiões norte e noroeste do Estado de São Paulo (Rossetti *et al.* 1990). A doença disseminou-se rapidamente pelas regiões citrícolas do Distrito Federal, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Goiás (Tubelis *et al.* 1993) e inclusive, no Paraná (Leite *et al.* 1993; Nunes *et al.* 2001) em Santa Catarina (Leite Junior *et al.* 1996). No Estado de Sergipe, a CVC foi relatada pela primeira vez em 1996 (Laranjeira *et al.* 1996). Na Argentina, foi observada na década de 1980 (Rossetti *et al.* 1998) recebendo o nome de 'Pecosita'.

Os sintomas da doença são causados pela obstrução nos vasos condutores da seiva para a parte aérea, apresentando, desta forma sintomas de murcha. Como consequência, a planta perde até 60% da capacidade fotossintética em relação às sadias, ocorrendo frutos miúdos e baixa produção das árvores (Garcia Junior *et al.* 1995). Inicialmente ocorrem pequenos pontos amarelos que evoluem para cloroses intensas entre as nervuras na face superior, com correspondência de pústulas de cor amarela na parte inferior, podendo ocorrer por toda a planta (Rossetti & De Negri 1990), clorose variegada das folhas mais desenvolvidas e manchas cloróticas de cor palha na página dorsal. Os frutos podem ficar de tamanho reduzido, endurecido e amarelecido o que os torna imprestáveis para o comércio. Em casos de plantas muito afetadas, nota-se com bastante frequência, galhos salientes na parte superior da copa, com folhas e frutos miúdos e desfolha no ponteiro (Rossetti *et al.* 1990).

Palazzo *et al.* (1992) observaram que os sintomas em folhas começaram a aumentar sua incidência e severidade nos meses da primavera, coincidindo com a elevação da temperatura e o aumento dos índices de pluviosidade. A CVC é causada pela *Xylella fastidiosa* (Wells), uma bactéria presente nos vasos do xilema das plantas (Chang *et al.* 1993).

Até o momento, as variedades de laranja doce [*Citrus sinensis* (L.)

Osbeck], Tangor-‘murcote’ (*Citrus reticulata* Blanco X *Citrus sinensis* L. Osbeck) e sweet (*Citrus limon* X *Citrus aurantiifolia*) são as mais suscetíveis a CVC. Limas ácidas (*Citrus latifolia*), limões verdadeiros (*Citrus lemon*), tangerinas (*Citrus reticulata* Blanco), tangelos (*Citrus reticulata* Blanco X *Citrus paradisi* Macf), híbridos (Tangores |*Citrus reticulata* Blanco X *Citrus sinensis* (L.)), pomelos (*Citrus paradisi*), toranjas (*Citrus grandis*) e limão rugoso (*Citrus jambhiri*) permitem a multiplicação da bactéria; entretanto, não apresentam sintomas que possam ser atribuídos a CVC. Outros citros de interesse, como citranges (*Poncirus trifoliata* x *Citrus sinensis*), citrumelo ‘Swingle’ (*Citrus paradise* x *Poncirus trifoliata*) e limão ‘cravo’ (*Citrus limonia*), não apresentaram sintomas ou reação sorológica positiva para *X. fastidiosa* (Laranjeira *et al.* 1995).

Estudos sobre a *Xylella fastidiosa*

A bactéria *Xylella fastidiosa* é o agente causal da CVC, atualmente considerada membro da subdivisão gamma, ordem Lysobacteriaceae, grupo Xanthomonas, gênero *Xylella*, com uma única espécie (Carlos *et al.* 1997).

Encontrada nos vasos do xilema das plantas, suas características são células em bastonete, gram-negativa, medindo 0,25-0,35 x 0,9-3,5µm, não móveis, aflageladas, oxidase negativa e catalase positiva, aeróbicas estritas, não fermentativas, não halofíticas e não pigmentadas, nutricionalmente fastidiosas, sendo a temperatura ótima para o crescimento ao redor de 26-28°C, e ótimo pH 6,5 6,9 (Wells *et al.* 1987).

Além do citros, essa bactéria causa sintomas de infecção no cafeeiro (*Coffea arabica*), denominada Escaldadura da folha do cafeeiro (Paradela Filho *et al.* 1995), sendo que há muito tempo esses sintomas eram atribuídos ao estresse nutricional devido a altas produções. Segundo Queiroz-Voltam *et al.* (2004; 2005) no Brasil, a bactéria foi disseminada das plantas de cafeeiro para o citros por causa da presença da bactéria em cafeeiros onde não havia plantações de citros e da presença da CVC em lavouras que sucederam a cultura cafeeira, devendo levar em consideração a similaridade entre os vetores transmissores da bactéria.

Existem, ainda, outras doenças de plantas de interesse agrícola, como a 'Pierce's disease', em videira (*Vitis* sp), 'Escaldadura' da amendoeira (*Prunus amygdalus*), 'Peach' pessegueiro (*Prunus persica*), amoreira (*Morus rubra* L.) (Hopkins 1989; Chang *et al.* 1993, Paiva *et al.* 1996). 'Queima das folhas em pecan' (*Carya ellinoensis*) (Sanderlin 1998). Também ocorre em sicamore (*Plantanus occidentalis*) (Hearon *et al.* 1980) e em pereira (*Pyrus pyrifolia*) causando a 'queima das folhas de pereira' (Leu & Su 1993). Uma das últimas plantas que a bactéria foi relatada causando doença é a espirradeira (*Nerium oleander*), na Califórnia (Purcell *et al.* 1999).

O mecanismo de patogenicidade causado pela *X. fastidiosa*, até o momento, é indefinido. Disfunção na condução da seiva, produção de fitotoxinas e desequilíbrio nos reguladores de crescimento são pressupostos do mecanismo de patogenicidade (Hopkins 1989).

Transmissão da bactéria

A bactéria *X. fastidiosa* é transmitida por insetos vetores que se alimentam, preferencialmente, sugando a seiva do xilema. O inseto pode adquirir a bactéria dos vasos colonizados, a qual adere às paredes internas do seu aparelho bucal (cibário), podendo ser liberada em outras plantas cítricas ou em plantas hospedeiras nas futuras alimentações do inseto (Purcell 1994). A transmissão da bactéria da CVC se dá de forma persistente e não circulativa. Somente as cigarrinhas adultas podem transmitir a bactéria, esta, por sua vez, encontra-se restrita a parte anterior do tubo digestivo (estomodeu) das cigarrinhas aderidas ao forro cuticular do pré-cibário, do cibário e da porção anterior do esôfago (Purcell *et al.* 1979; Brlansky *et al.* 1983).

As cigarrinhas que se especializaram evolutivamente em se alimentarem através da seiva do xilema são as mais capazes de transmitir a bactéria de uma planta para outra. Existem mais de vinte espécies de cigarrinhas das famílias Cercopidae e Cicadellidae, que foram observadas se alimentando no agroecossistema citricola (Paiva *et al.* 1996). Estes insetos apresentam câmaras de sucção bem desenvolvidas que lhes possibilitam a ingestão de líquido sob forte pressão negativa do xilema. Para compensar a baixa

concentração de aminoácidos na seiva do xilema das plantas, esses insetos ingerem grande quantidade de líquidos e, por possuírem uma câmara de filtro bastante evoluída, assimilam nutrientes com alta eficiência (Lopes 1996).

A eficiência na transmissão da *X. fastidiosa* da CVC por cigarrinhas é baixa. O caso de maior eficiência é o da *Bucephalagonia xanthophis*, com cerca de 12% (Krugner *et al.* 2000). Provavelmente, a baixa eficiência na transmissão relaciona-se com uma baixa eficiência na aquisição e/ou inoculação da bactéria pelos vetores, ou ainda, a uma baixa taxa de sobrevivência de infecções iniciais de *X. fastidiosa* em citros, após sua inoculação. Existe ainda a possibilidade da bactéria estar em baixa concentração na planta cítrica, o que poderia, indiretamente, reduzir a eficiência de aquisição pelas cigarrinhas (Lopes 1999).

No caso da transmissão de *X. fastidiosa* em uva ('Pierce's Disease'), a cigarrinha *Graphocephala atropunctata* (Signoret) pode adquirir a bactéria de uma planta infectada em menos de uma hora e transferi-la imediatamente para uma planta sadia. Essa cigarrinha apresenta 90% de eficiência na transmissão, não havendo, portanto, um período mensurável da bactéria no vetor (Purcell & Finlay 1979).

Insetos vetores de *Xylella fastidiosa*

Até o momento, são conhecidas onze espécies de cigarrinhas capazes de transmitir a bactéria para citros, sendo que todas pertencem à família Cicadellidae, subfamília Cicadellinae.

Entre as diversas cigarrinhas que ocorrem em citros, as espécies comprovadamente vetoradas são *Dilobopterus costalimai* Young, *Acrogonia citrina* Marucci & Cavichioli, *Oncometopia facialis* (Signoret), *Bucephalagonia xanthophis* (Berg), *Plesiomata corniculata* Young, *Acrogonia virescens* (Metcalf), *Ferrariana trivittata* (Signoret), *Homalodisca ignorata* Melichar, *Macugonalia leuconelas* (Walker), *Parathona gratiosa* (Blanchard) e *Sonesimia grossa* (Signoret) (Roberto *et al.* 1996, Lopes *et al.* 1996).

No Brasil, os estudos com as vetoradas de *X. fastidiosa* tiveram início em pomares cítricos no Estado de São Paulo (Lopes 1996; Yamamoto *et al.* 2002).

Molina *et al.* (2001) descreveram as espécies *D.costalimai* e *Acrogonia* sp. como sendo as mais capturadas na região noroeste do Paraná. Miranda (2003) capturou as principais espécies vetoras de *X. fastidiosa* no Estado da Bahia. Em Minas Gerais, entre as cigarrinhas mais capturadas em pomar estão *B. xanthophis*, *A. citrina* e *D. costalimai* (Santos *et al.* 2005). No Rio Grande do Sul, a espécie *B. xanthophis* está entre as mais capturadas em áreas de campo (Ott & Carvalho 2001).

O conhecimento da dinâmica populacional, das exigências térmicas e hídricas, bem como do seu habitat e hospedeiros alternativos são de fundamental importância para se ter uma previsão da ocorrência de vetores-chaves em pomares e viveiros cítricos (Lopes 1999).

A temperatura é um dos fatores ambientais de maior influência sobre a biologia dos insetos, pois altera seu metabolismo, sua reprodução, sua longevidade e seu comportamento alimentar (Milanez *et al.* 2005). No campo, as diferentes condições climáticas podem influenciar o comportamento, abundância e distribuição dos insetos, sendo a temperatura um dos fatores fundamentais para a distribuição ecológica dos animais (Cividanes & Parra 1994).

Paiva *et al.* (1996) descrevem que, em pomares na região de São Paulo, a população de cigarrinhas geralmente aumenta após o início das chuvas na primavera, atinge picos no verão e outono, decrescendo significativamente no inverno e início da primavera. Nunes *et al.* (2006), constataram que, em pomares do Paraná, a população de cigarrinhas aumenta a partir de novembro ou início do verão e diminuem nos meses mais frios.

PCR (“Polimerase chain reaction”)

A PCR (“Polymerase chain reaction”) é uma técnica que permite amplificação *in vitro* de seqüências específicas de DNA e foi criada em 1983 por Mullis, citado por (Lopes & Damann 1994). Desde 1989, a técnica de PCR e suas diferentes modalidades estão sendo utilizadas como uma ferramenta no estudo de viróides, vírus, nematóides, bactérias, espiroplasma e fungos na fitopatologia (Batista 1993). No Brasil, a técnica foi introduzida em 1992 e é

utilizada para fins taxonômicos ou de diagnose de fitopatógenos. Com bactérias, a PCR foi utilizada pela primeira vez em 1996, nos gêneros *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Ralstonia* e *Xanthomonas* (Lopes & Damann 1996). Para a bactéria *Xylella fastidiosa*, esta técnica foi adaptada em 1997 (Beretta *et al.* 1997).

A técnica de PCR consiste em um processo cíclico, no qual a enzima DNA Polimerase faz cópias de um DNA alvo, para o qual iniciadores (oligonucleotídios, "primers") são fornecidos (Brioso 2000). Pode-se resumir que é a amplificação exponencial *in vitro* de uma determinada seqüência alvo de DNA (Ferreira & Grattapaglia, 1996). A técnica é estritamente qualitativa (ausência ou presença), sendo incapaz de precisar a quantidade da seqüência alvo na amostra (Oliveira *et al.* 2004).

Como amostra para extração do ácido nucléico, pode-se utilizar tecido vegetal (oriundo de qualquer parte da planta), infectada com algum fitopatógeno. No caso da confecção dos iniciadores, podem ser utilizados, ao acaso ("Random Primers"), iniciadores específicos ou em algumas bases degeneradas, desenhadas a partir de seqüências de nucleotídeos ou aminoácidos disponíveis na literatura (Brioso 2000).

A PCR pode ser empregada na identificação de bactérias em muitas doenças de plantas, incluindo espécies de reduzida concentração populacional em materiais propagativos assintomáticos, como é o caso da *X. fastidiosa* em borbulheiras de laranjeiras contaminadas (Nunes 1999).

O uso de técnicas molecular para detectar *X. fastidiosa* nos insetos vetores tem sido prejudicado 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). Associado à imunocaptura pode-se utilizar um teste duplo de PCR (*Nested-PCR*) que aumenta a sensibilidade dos ensaios de PCR em aproximadamente 50-160 vezes (Hartung *et al.* 1996).

A técnica de *Nested-PCR* é um eficiente método para detecção de organismos ou produtos das amostras com presença de baixas concentrações de DNA e altas concentrações de contaminantes que inibem a amplificação de DNA. Outro fato que pode dificultar a detecção de *X. fastidiosa* em amostras de insetos é a pouca quantidade de células bacterianas presente nos insetos

(Ciapina *et al.* 2004).

A PCR é uma técnica promissora no estudo da transmissão de *X. fastidiosa* por cigarrinhas, tendo sido confirmada a sua presença em *O. facialis*, *Acrogonia* sp e *D. costalimai*. Utilizando cigarrinhas transmissoras do patógeno, Miranda *et al.* (2000), Marucci (2003), Por meio da técnica de *nested*-PCR, com oligonucleotídios específicos para amplificação da *X. fastidiosa*, conseguiram resultados satisfatórios com cigarrinhas vetoras da CVC, como *B. xanthophis*, *D. costalimai* e *O. facialis*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BATISTA, M.F. Métodos moleculares para identificação de patógenos de plantas. In: Luz, W.C.; Fernandes, J.M.C.; Prestes, A.M. & Picinini, E.C. (Eds.). **Revisão Annual de Patologia de Plantas**, v.1, p.165-196, 1993.

BERETTA, M.J.G.; BARTHE, G.A.; CECCARDI, T.L.; LEE, R.F. & DERRICK, K.S. A survey for strains of *Xylella fastidiosa* in citrus affected by citrus variegated chlorosis and citrus blight in Brazil. **Plant Disease**, v.81, p.1196-1198, 1997.

BRLANSKY, R.H.; TIMMER, L.W.; FRENCH, W.J. & MCCOY, R.E. Colonization of the sharpshooter vectors, *Oncometopia nigricans* and *Homalodisca coagulata*, by xylem-limited bacteria. **Phytopathology**, v.73, p.530-535, 1983.

BRIOSO, P.S.T. Aplicação da biologia molecular na fitopatologia. **Fitopatologia Brasileira**, v.25 (suplemento), p.251-253, 2000.

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**, p.22-36, 1997.

CHANG, C.J.; GARNIER, M.; ZREIK, L.; ROSSETTI, V.; BOVÉ, J.M. 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.

CIAPINA, L.P.; CARARETO ALVES, L.M.; LEMOS, E.G.M. A nested-PCR assay for detection of *Xylella fastidiosa* in citrus plants and sharpshooter leafhoppers. **Journal of Applied Microbiology**, v.96, p.546-551, 2004.

CIVIDANES, F.J.; PARRA, J.R.P. Biologia em diferentes temperaturas e exigências térmicas de percevejos pragas da soja. I. *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera: Pentatomidae). **Annual Society Entomological Brasil**, v.23, p.243-250, 1994.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Proteção de cultivares pela análise de DNA. **Anuário da ABRASEM** 1996 (Associação Brasileira de Produtores de Sementes), Brasília, v.02, p. 44 - 50, 1996.

GARCIA JUNIOR, A.; MAGGIONE, C.S.; TEÓFILO, J.S.; POMPEU JUNIOR, J.; DE NEGRI, J.D.; QUAGGIO, J.A.; BERETTA, M.J.; GRAVENA, S.; RODAS, V.C. Como conviver com a (CVC) em São Paulo. **Laranja**, v.16, p.145-154, 1995.

GRAVENA, S.; LOPES, J.R.S.; PAIVA, P.E.B.; YAMAMOTO, P.T.; ROBERTO S.R. Os Vetores da *Xylella fastidiosa* In: DONADIO, L.C.; MOREIRA, C.S. (Ed) **Clorose variegada dos citros**, p.37-53, 1997.

HARTUNG, J.S.; PRUVOST, O.P.; VILLEMOT, I. 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.

HEARON, S.S.; SHERALD, J.L.; KOSTKA, S.J. Association of xylem-limited bacteria with elm, sycamore and oak leaf scorch. **Canadian Journal of Botany**, v.58, n.12, p.1986-1993, 1980.

HOPKINS, D.L. *Xylella fastidiosa*: xylem-limited bacterial pathogen of plants. **Annual Review of phytopathology**, v.27, p.271-290, 1989.

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

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA-IBGE. **Levantamento sistemático da produção agrícola**. Disponível em <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 17 out. 2006.

KRÜGNER, R.; LOPES, M.T.V. de C.; SANTOS, J.S.; BERETTA, M.J.G. ; LOPES, J.R.S. Transmission efficiency of *Xylella fastidiosa* by sharpshooters and identification of two new vector species. In: CONFERENCE OF INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 14, 2000. **Proceedings**: IOCV, p.423, 2000.

LARANJEIRA, F.F.; POMPEU JUNIOR, J.; HAKAKAVA, R.; Seleção de variedades e/ou tolerantes á Clorose Variegada dos Citros. (CVC). **Fitopatologia Brasileira**, v. 20, p. 324, 1995.

LARANJEIRA, E.F.; MÜLLER, G. W.; TRINDADE, J. SILVA, L.M.S. Constatação da Clorose Variegada dos Citros (CVC) Estado de Sergipe. **Fitopatologia Brasileira**, v. 21 n.4 p. 521, 1996.

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, J.R.; HUANG, G.F.; UENO, B. Ocorrência da Clorose variegada dos citros causada por *Xylella fastidiosa* no Estado de Santa Catarina. In congresso Brasileiro de Fitopatologia. Campo Grande MS. **Fitopatologia Brasileira**, v.1 (suplemento), p.335, 1996.

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.7, n.7, p.642-646, 1993.

LI, W.B.; PRIA, W.D. JR.; LACAVA, P.M.; QIN, X.; HARTUNG, J. S. Presence of *Xylella fastidiosa* in sweet orange fruit and seeds and its transmission to seedlings. **Phytopathology**, v.23, p.953-958, 2003.

LI, W.; DONADIO, L.C.; HE, C.; SEMPIONATO, O. Métodos de avaliação de resistência à clorose variegada dos citros. **Laranja**, v. 17, p.55-66, 1996.

LOPES, J.R.S. Mecanismo de transmissão de *Xylella fastidiosa* por Cigarrinhas. **Laranja**, v.17, n.1, p. 79-92, 1996.

LOPES, J.R.S. Estudo com vetores de *Xylella fastidiosa* e implicações no manejo da clorose variegada dos citros. **Laranja**, v. 20, n.2, p. 319-328. 1999.

LOPES, S.A.; DAMANN, K.E. Uso da técnica reação polimerase em cadeia na diagnose de doenças causadas por bactérias fitopatogênicas. **Summa Phytopatológica**, v.20, p.89-92, 1994.

LOPES, S.A.; DAMANN, K.E. Immunocapture and PCR detection of *Xanthomonas albilineans* from vascular sap of sugarcane leaves. **Summa Phytopatológica**, v.22, p.244-247, 1996.

MARUCCI, R.C. **Eficiência de transmissão de *Xylella fastidiosa* por cigarrinhas vetoras (Hemiptera, Cicadellidae) em *Citrus sinensis* (L.) Osbeck e *Coffea arabica* L.** Tese Doutorado. Escola superior de agricultura "Luiz de Queiroz" Universidade de São Paulo, Piracicaba, p.139, 2003.

MILANEZ, J.M.; PANDOLFO, C.; HAMMES, L. A. & PARRA, J.R.P. Zoneamento Ecológico de *Dilobopterus costalimai* Young, *Oncometopia facialis* Signoret e *Acrogonia citrina* Marucci & Cavichioli (Hemiptera: Cicadellidae) Para Santa Catarina. **Neotropical entomology**, v.34, n.2, p. 297-302, 2005.

MIRANDA, M.P. **Levantamento de cigarrinhas (Hemiptera: cicadellidae) vetoras de *Xylella fastidiosa* em pomares cítricos do litoral norte da Bahia.** Dissertação de mestrado. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, p.63, 2003.

MIRANDA, V.S.; TEIXEIRA, D.C.; ROBERTO, S.R.; YAMAMOTO, P.T.; PRIA JR., W.D.; AYRES, A.J.; HARTUNG, J. S. Detecção da bactéria *Xylella fastidiosa* dos citros em cigarrinhas de xilema pela técnica da reação da polimerase em cadeia (PCR). **Fitopatologia Brasileira**, v.25, p.326, 2000.

MOLINA, R.O.; RODRIGUES, L.C.; ZANUTTO, C.A.; CORAZZA-NUNES, M.J.; NUNES, W.M.C.; MACHADO, M.A.; BERNARDO, R.; CONTE, H.; TESSMANN, D.J.; ALBUQUERQUE, F.A. Estudo das cigarrinhas vetoras da *Xylella fastidiosa* no noroeste do Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, v.26 (suplemento), p. 291, 2001.

NUNES, W.M.C. **Epidemiologia da Clorose Variegada dos Citros (CVC) Avaliada por Síntomas e Diagnóstico Sexológico e Molecular de *Xylella fastidiosa*.** Tese Doutorado. Faculdade de Ciências Agrônomicas da UNESP Botucatu, p.144, 1999.

NUNES, W.M.C.; MOLINA, R.O.; ALBUQUERQUE, F.A.; CORAZZA-NUNES; M. J; ZANUTO. C.A; MACHADO M.A. Flutuação populacional de cigarrinhas

vetoras de *Xylella fastidiosa* em pomares comerciais de citros no noroeste do Paraná. **Neotropical Entomology**, v.36, n.2, p.254-260, 2007.

NUNES, W.M.C.; MACHADO, M.A.; CORAZZA-NUNES, M.J.; FURTADO, E. Dinâmica espacial de foco da clorose variegada do citros (CVC) avaliada por meio da sintomatologia e serologia. **Acta Scientiarum**, v.23, n.5, p.1215-1219, 2001.

OLIVEIRA, C.A.; GOLDMAN, G.H.; MACHADO, M.A. Detecção e quantificação de bactérias fitopatogênicas por PCR quantitativo em tempo real. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.12, p.287-315, 2004.

OTT, A.; CARVALHO, G. Comunidade de cigarrinhas (hemiptera: Auchenorrhyncha) de uma área de campo do município de viamão, Rio Grande do Sul, Brasil. **Neotropical entomology**, v.30, n.2, p.233-243, 2001.

PAIVA, P.E.B.; SILVA, J.L.; da, GRAVENA, S. Cigarrinhas de xilema em pomares de laranja do Estado de São Paulo. **Laranja**, v.17, n.1, p.41-54, 1996.

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.

PALAZZO, D.A. Estimativas de perdas de laranja Natal por Clorose Variegada dos Citros. **Laranja**, v.14, n.1, p.211-216, 1993.

PARADELA FILHO, O.; SUGIMORI, M.H.; RIBEIRO, I.J.A.; GARCIA, Jr. A.; BERETTA, M.J.G.; HAKAWA, R.; MACHADO, M.A.; LARANJEIRAS, F.F.; RODRIGUES NETO, J.; BERIAM, L.A.S. Primeira constatação em cafeeiro no Brasil da *Xylella fastidiosa* causadora da clorose Variegada dos citros. **Laranja**, v.16, p.135-136, 1995.

POOLER, M.R.; MYUNG, I.S.; BENTZ, J. Detection of *xylella fastidiosa* in potencial insect vectors by immunomagnetic separation and nested polymerase chain reaction. **Letters in Applied Microbiology**, v.25, p.123-126, 1997.

PURCELL, A. H. Homopteran transmission of xylem-inhabiting bactéria. In: HARRIS, K.F. (Ed.) **Advances in disease vector research**, v.6, p.243-266, 1989.

PURCELL, A. H. Cigarrinhas na cultura de citros. In DONADIO, L. C. & Gravena, S., eds. SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE CITROS-MIP, 3 IN: Fundação Cargill Campinas, p.195-209, 1994.

PURCELL, A.H.; FINLAY, A.H.; MELEAN, D.L. Pierce's disease bacterium: mechanism of transmission by leafhopper vectores. **Science**, v.206, p.839-841, 1979.

PURCELL, A.H.; SAUNDERS, S.R.; HENDSON, M.; GREBUS, M.E.; HENRY, M.J. Causal role of *Xylella fastidiosa* in oleander leaf scorch disease.

Phytopathology, v.89, n.1, p.53-58, 1999.

QUEIROZ-VOLTAN, R.B.; CABRAL, L.P.; FAZUOLI, L.C. PARADELA FILHO, O. Avaliação da suscetibilidade à *Xylella fastidiosa* em diferentes espécies de cafeeiro. **Bragantia**, v.64, n.4, p. 615-624, 2005.

QUEIROZ-VOLTAN, R.B.; CABRAL, L.P.; PARADELA FILHO, O. Severidade do sintoma da bactéria *Xylella fastidiosa* em cultivares de cafeeiro. **Bragantia**, v.63, n.3, p.395-404, 2004.

ROBERTO, S.R.; COUTINHO, A.; LIMA, J.E.O. de; MIRANDA, V.S.; CARLOS, E.F. Transmissão de *xylella fastidiosa* pelas cigarrinhas *Dilobopterus costalimai*, *Acrogonia terminalis* e *Oncometopia facialis* (Hemiptera Cicadellidae) em citros. **Fitopatologia Brasileira**, v.21, p.517-518, 1996.

ROBERTO, S.R.; YAMAMOTO, P.T. Flutuação populacional e controle químico de cigarrinhas em citros. **Laranja**, v.19, p.269-284, 1998.

ROSSETTI, V.; DE NEGRI, J. Clorose variegada dos citros: Revisão. **Laranja**, v. 11, p.1-14, 1990.

ROSSETTI, V.; GARNIER, M.; BERETTA, M.J.G.; TEIXEIRA, A.R.R.; QUAGGIO, J.A.; BATTAGLIA, O.C.; GOMES, M.P.; DE NEGRI, J.D. Resultados preliminares de estudos sobre uma nova anormalidade dos citros observada nos Estados de São Paulo e Minas Gerais. **Summa Phytopathologica**, v.16, p.1-13, 1990.

ROSSETTI, V.; GONZALEZ, M.A.; DONADIO, L.C. HYSTORY In: Donadio, L.C.; Moreira, C.S. (Eds). **Citrus Variegated Chlorosis**, p.1-21, 1998.

SANTOS, D.; SIQUEIRA, D.L.; PICANÇO, M.C. Flutuação populacional de espécies de cigarrinhas transmissoras da clorose variegada dos citros (CVC) em Viçosa-MG. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.27, n.2, p.211-214, 2005.

SANDERLIN, R.S. Evidence that *Xylella fastidiosa* is associated with pecan fungal leaf scorch. **Plant Disease**, v.82, p.15-22, 1998.

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.

WELLS, J.M.; RAJU, B.C.; JUNG, H.Y.; WEISBURG, W.G.; MANDELCO-PAUL, L.; BRENNER, D.J. *Xylella fastidiosa* gen nov., sp. Nov. gramnegative, xylem limited fastidious plant bactéria related to *Xanthomonas* spp. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.37, p.136-143, 1987.

YAMAMOTO, P.T.; ROBERTO, S.R.; PRAJÚNIOR, W.D.; FELIPPE, M.R.; MIRANDA, V.S.; TEIXEIRA, D.C.; LOPES, J.R.S. Transmissão de *Xylella fastidiosa* por cigarrinhas *Acrogonia virescens* e *Homalodisca ignorata* (Hemiptera: Cicadellidae) em plantas Cítricas. **Summa Phytopathologica**,

v.28, p.178-181, 2002.

CAPÍTULO-I

RESUMO

ESTUDO POPULACIONAL DAS CIGARRINHAS VETORAS DE *Xylella fastidiosa* NO MUNICÍPIO DE PARANAVÁI, PARANÁ.

A Clorose variegada dos citros (CVC) é hoje uma das mais graves doenças dos citros. Foi constatada pela primeira vez em 1987 nos municípios do noroeste paulista e da região do triângulo mineiro. A CVC é causada por uma bactéria fastidiosa de xilema *Xylella fastidiosa*, em forma de bastonete, Gram-negativa, medindo 0,25-0,35 x 0,9-3,5µm. Sua disseminação ocorre através de borbulhas contaminadas ou de maneira natural no pomar por insetos vetores pertencentes à ordem Hemiptera, família Cicadellidae, que transmitem a bactéria depois de se alimentarem em plantas contaminadas. O objetivo deste trabalho é identificar as espécies de cigarrinhas vetoras e seu comportamento ao longo do tempo em um pomar comercial no município de Paranaíba, Paraná. O experimento foi realizado em um talhão comercial de laranja doce, da variedade Pêra, enxertada sobre limão 'Cravo', com 1.000 plantas de dez anos de idade. Para realização da amostragem, foram utilizadas armadilhas adesivas amarelas, distribuídas na área periférica e central do pomar, com duas repetições por rua amostrada. A primeira etiqueta foi colocada na 5ª planta e a segunda, na 30ª planta de cada rua, totalizando 20 armadilhas, avaliadas em dez ruas do talhão por amostragem. As armadilhas foram renovadas no pomar a cada trinta dias durante o período de avaliação, que se deu entre junho de 2005 e setembro de 2006. As principais espécies vetoras capturadas foram *Acrogonia citrina*, *Dilobopterus costalimai* e *Macugonalia cavifrons*.

Palavras chave: Clorose variegada dos citros, Cicadellinae, *Citrus sinensis*

INTRODUÇÃO

A Clorose variegada dos citros (CVC) ou “amarelinho” trata-se de uma doença causada pela bactéria *Xylella fastidiosa* (Wells), limitada ao xilema, gram-negativa (Hartung *et al.* 1994).

Foi constatada pela primeira no Brasil em 1987, nos municípios do noroeste paulista (Rossetti *et al.* 1990; Rossetti & De Negri 1990) e no triângulo mineiro. Posteriormente, foi relatada sua incidência em outros Estados do Brasil, inclusive em algumas regiões de Minas Gerais. Atualmente, esta doença encontra-se disseminada pelas regiões citrícolas do Distrito Federal, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Paraná, Goiás (Tubelis *et al.* 1993) e Santa Catarina (Leite Junior *et al.* 1996). Na Argentina, foi observada nos anos de 1980 (Rossetti *et al.* 1998) recebendo o nome de ‘Pecosita’.

Gravena *et al.* (1997) relatam que o mais sério dano causado pela bactéria à planta consiste na redução do fornecimento de água, devido ao bloqueio causado pela *X. fastidiosa* nos vasos do xilema, dificultando, desta maneira, a movimentação de água no interior dos vasos. Os sintomas da CVC são manchas necróticas e amarelecimento das folhas. As plantas apresentam galhos salientes na parte superior da copa, com folhas e frutos miúdos e alguma desfolha nos galhos e ponteiros (Malavolta *et al.* 1990).

A *X. fastidiosa* é transmitida ao citros através de onze espécies de insetos vetores conhecidos como cigarrinhas (Hemiptera Cicadellidae), da subfamília Cicadellinae, comprovadamente capazes de transmitir a doença ao se alimentarem em plantas contaminadas. As principais espécies vetoras são *Dilobopterus costalimai* Young, *Acrogonia citrina*, Marucci & Cavichioli, *Oncometopia facialis* (Signoret), *Bucephalogonia xanthophis* (Berg), *Plesiommata corniculata* Young, *Macugonalia leucomelas* (Walker), *Homalodisca ignorata* Melichar, *Parathona gratiosa* (Blanchard), *Ferrariana trivittata* (Signoret), *Acrogonia virencens* (Metcalf) e *Sonesimia grossa* (Signoret) (Lopes 1996; Paiva *et al.* 1996; Yamamoto *et al.* 2002a).

Para Maruyama *et al.* (2006), são importantes estudos da variabilidade espacial das populações de insetos, uma vez que as atuais recomendações sobre amostragem de cigarrinhas para a tomada de decisão, visando o controle

destes insetos, não estão sustentadas pelo conhecimento adequado.

Lopes (1999) considera que, apesar do avanço na identificação de cigarrinhas vetoras de *X. fastidiosa* em citros e nos estudos de sua flutuação populacional, alguns aspectos sobre a transmissão da bactéria e da bioecologia dos vetores ainda necessitam ser conhecidos para que se possa aprimorar o atual programa de manejo da clorose variegada dos citros.

No Paraná, estudos com doenças de citros e com as cigarrinhas vetoras da *X. fastidiosa* estão sendo desenvolvidos com o objetivo de melhor entender a ecologia e biologia destes insetos em pomares comerciais de citros (Nunes *et al.* 2006; 2007).

O objetivo deste trabalho é identificar a população de cigarrinhas vetoras da *X. fastidiosa*, em um talhão de laranja doce [*C. cinensis* (L.) Osbeck], variedade Pêra, em pomar comercial no município de Paranavaí, PR.

MATERIAL E MÉTODOS

A amostragem das cigarrinhas foi realizada em um pomar comercial no sítio Nossa Senhora Aparecida, no município de Paranavaí-PR. O período de realização da amostragem foi de junho de 2005 a setembro de 2006. O experimento foi instalado em um talhão de laranja doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck], variedade Pêra, enxertada sobre limão cravo (*Citrus limonia* Osbeck), com cerca de 1.000 plantas com 10 anos de idade, localizados a latitude Sul 23° 03'26.336", longitude Oeste 52° 23'33.672".

A obtenção das amostras procedeu-se com auxílio de armadilhas adesivas amarelas (Biocontrole®), que foram cortadas em retângulos medindo 9,0cm x 12,0cm, fixadas na face Norte das laranjeiras da copa das plantas a uma altura de 1,70 m do solo (Roberto *et al.* 1997).

As armadilhas foram distribuídas na área periférica e central do pomar, com duas repetições por rua amostrada. A primeira armadilha foi colocada na 5ª planta e a segunda na 30ª planta de cada rua. Foram avaliadas dez ruas do talhão, totalizando 20 armadilhas por amostragem. As armadilhas foram renovadas no pomar a cada trinta dias durante o período de avaliação.

As armadilhas coletadas foram levadas para laboratório do Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada (NBA), na Universidade Estadual de Maringá. Os exemplares de insetos adultos foram retirados e separados das armadilhas com auxílio de querosene, usado como solvente para a cola das armadilhas. A identificação das espécies de cigarrinhas foi realizada por meio de microscópio estereoscópio, com auxílio de chave visual de identificação e literatura específica (Marucci 1998; Marucci *et al.* 1999). Os exemplares de cigarrinhas com algumas dificuldades para a identificação foram enviados para identificação ao professor Dr. Rodney Ramiro Cavichioli, da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Após identificação do material, as cigarrinhas foram armazenados em frascos de acrílico contendo álcool 70%, devidamente etiquetados. Estes materiais encontram-se armazenados no laboratório do NBA.

Para calcular a frequência e a constância das espécies de cigarrinhas capturadas, adotaram-se os seguintes procedimentos 1) a frequência, que

corresponde a porcentagem de indivíduos de cada espécie em relação ao total de indivíduos coletados; 2) a constância, que foi calculada com a utilização de $C(\%)=P/N$, onde C= constância das espécies, expressa em porcentagem; P= número de coletas contendo a espécie; e N= número de coletas realizadas (Silveira Neto *et al.* 1976, citado por Santos *et al.* 2005).

Para estudar a flutuação populacional das cigarrinhas vetoras, foram utilizados os números totais de cigarrinhas das médias de cigarrinhas capturadas mensalmente. Através do Programa SAS 8.0, foi calculada a normalidade dos dados com teste Shapiro-Wilk e o módulo das variâncias através do teste de Levene. A partir dos resultados, os dados foram transformados em $\sqrt{x+1,0}$ para a homogeneização de variâncias e normalidades dos erros, sendo submetidos à análise de variância considerando o delineamento inteiramente casualizado. Os dados foram processados utilizando o Software SISVAR, versão 4.3, desenvolvido pelo Departamento de Ciências Exatas, Universidade Federal de Lavras (UFLA). O teste utilizado para a comparação das médias do número de espécies foi o de Scott-Knott ao nível de 5% de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante as avaliações foram capturadas sete espécies de cigarrinhas, vetoras de *X. fastidiosa*, (Auchenorrhyncha), membros da família Cicadellidae, subfamília Cicadellinae: *A. citrina*, *D. costalimai*, *M. leucomelas*, *B. xanthophis*, *O. facialis*, *H. ignorata* e *S. grossa*. Da mesma família, foram também capturadas as cigarrinhas *Macugonalia cavifrons* que é considerada uma vetora potencial para os citros (Fundecitrus 2006). A espécie *Diedrocephala variegada* menos comum em citros, mas pode vir a tornar-se de grande importância, pois já foi vista se alimentando em plantas cítricas. As outras espécies capturadas foram divididas como 'outras cigarrinhas', entre elas *Scaphytopius* sp., *Bahita infuscata*, ambas da subfamília Deltocephalinae, e *Gyponinae* sp., da subfamília Gyponinae. Todas foram encontradas facilmente e em quantidades até maiores que as vetoras, porém, membros destas subfamílias não se alimentam primariamente no xilema como os membros da subfamília Cicadellinae (Paiva *et al.* 1996) (Tabela 1).

As espécies *A. citrina*, *D. costalimai* e *M. leucomelas*, de acordo com a classificação, foram de ocorrência constantes, ou seja, capturadas na maioria das avaliações realizadas no pomar. A cigarrinha *O. facialis* foi acessória e *B. xanthophis*, *S. grossa* e *H. ignorata*, classificadas como outras cigarrinhas, foram acidentais na captura através de armadilhas adesivas amarelas. Santos *et al.* (2005), através do mesmo método de captura, relatam que as espécies *A. citrina* e *D. costalimai* como sendo constantes e *M. leucomelas* acessórias em viveiros de produção de mudas a céu aberto no estado de Minas Gerais (Tabela 1).

As espécies de cigarrinhas vetoras mais capturadas foram *A. citrina*, *D. costalimai* e *M. leucomelas*, com 3,97%, 4,02% e 1,45% de frequência, respectivamente, representando 9,42% do total capturado de insetos. As outras vetoras representaram 1,12% das cigarrinhas, e *M. cavifrons* representam 13,0% do total capturado (Tabela 1). Yamamoto *et al.* (2002b) classificaram a espécie *A. citrina* como constante, representando 26,7%, enquanto as espécies *D. costalimai* e *M. leucomelas* ocorreram de forma acidental, representando 1,3% e 2,0% dos insetos capturados em viveiros de citros. Nunes *et al.* (2006a)

citam as espécies *D. costalimai* e *A. citrina* como sendo de maiores incidências e ocorrência constante em talhões no noroeste do Paraná.

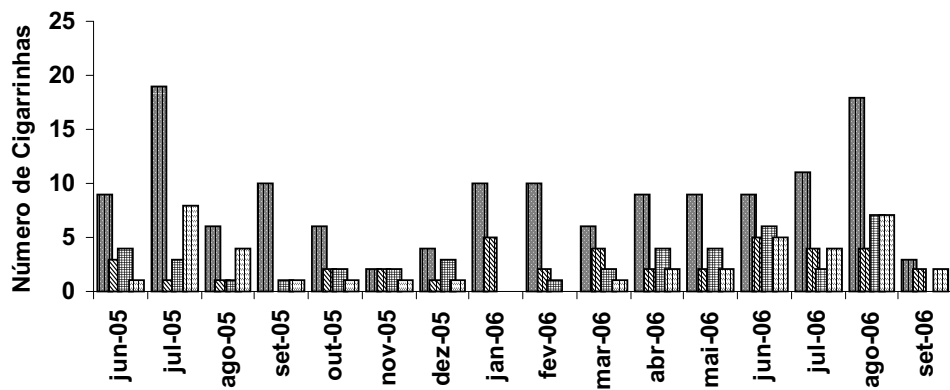
Tabela 1 Número, frequência e constância das cigarrinhas coletadas nas armadilhas amarelas no período de junho de 2005 a setembro de 2006 no município de Paranaíba, PR.

Cicadellini & Proconini	Cigarrinhas		Constância das Espécies
(Vetores)	N	F(%)	
<i>Acrogonia citrina</i>	49	3,97	Constante
<i>Dilobopterus costalimai</i>	50	4,02	Constante
<i>Macugonalia leucomelas</i>	18	1,45	Constante
<i>Oncometopia facialis</i>	06	0,48	Acessória
<i>Bucephalagonia. xanthophis</i>	06	0,48	Acidental
<i>Sonesimia Grossa</i>	01	0,08	Acidental
<i>Homalodisca ignorata</i>	01	0,08	Acidental
* <i>Macugonalia cavifrons</i>	161	13,00	Constante
Outras Cigarrinhas	949	76,40	Constante
Total	1.241	100	

N= número total de espécimes capturadas no período; F(%)= porcentagem de indivíduos de determinada espécie em relação ao total de indivíduos capturados; Constante: espécies capturadas em mais de 50% das coletas; Acessória: espécies capturadas entre 25-50% das coletas; Acidental: espécies capturada em menos de 25% das coletas; *cigarrinha vetor potencial para transmissão de *X. fastidiosa*.

A espécie de cigarrinha mais capturada foi *M. cavifrons*, com picos populacionais nos meses de junho e julho 2005 e agosto de 2006. A espécie vetora, como *D. costalimai*, ocorreu em maior quantidade nos meses de junho de 2005 e março de 2006. Já a espécie *A. citrina* teve picos em junho de 2005 e agosto de 2006 (Figura 1).

Os meses que ocorreram as maiores incidências foram também os meses de maiores médias termiais, seguida de ligeiras diminuições na temperatura nos meses seguintes. No entanto, é importante salientar que o clima na região noroeste do Paraná, vem se comportando nos dois últimos anos de maneira atípica, com médias elevadas para meses de inverno (dados obtidos através da Estação Meteorológica da Universidade Estadual de Maringá). Este fato pode ter contribuído para as maiores incidências de cigarrinhas observadas no inverno, contrariando o que já foi observado nesta região em anos anteriores (Nunes *et al.* 2006a).



■ *Macugonalia cavifrons* ▨ *Dilobopterus costalimai* ▩ *Acrogonia citrina* ▤ Outras vetoras

Figura 1 Número total de cigarrinhas capturadas mensalmente em laranja doce (*C. sinensis*), variedade Pêra, através de armadilhas amarelas no período de junho de 2005 a setembro de 2006, em Paranavaí, Paraná.

Em relação ao número total de vetores capturados no período de avaliação, observa-se que a distribuição das espécies ocorreu de maneira uniforme, não havendo grandes variações no decorrer das avaliações. Isso se deve ao fato de não ter ocorrido grandes oscilações de temperatura. Nos dois últimos anos, as condições se mantiveram quentes e com chuvas irregulares na região noroeste do Paraná. É certo que as condições climáticas (altas temperaturas) tornam possíveis grandes populações de insetos (Figura 3) o que geralmente ocorre no início da primavera e início de verão, normalmente seguidos de condições de alimentação favoráveis (brotações). Contrariamente, as 'outras cigarrinhas' (*Scaphytopius* sp., *Bahita infuscata* e *Gyponinae* sp.) tiveram picos em novembro de 2005 e março de 2006, provavelmente, pelo fato de serem encontradas em outras plantas no pomar e possuírem outras fontes de alimentação além dos citros (Figura 2).

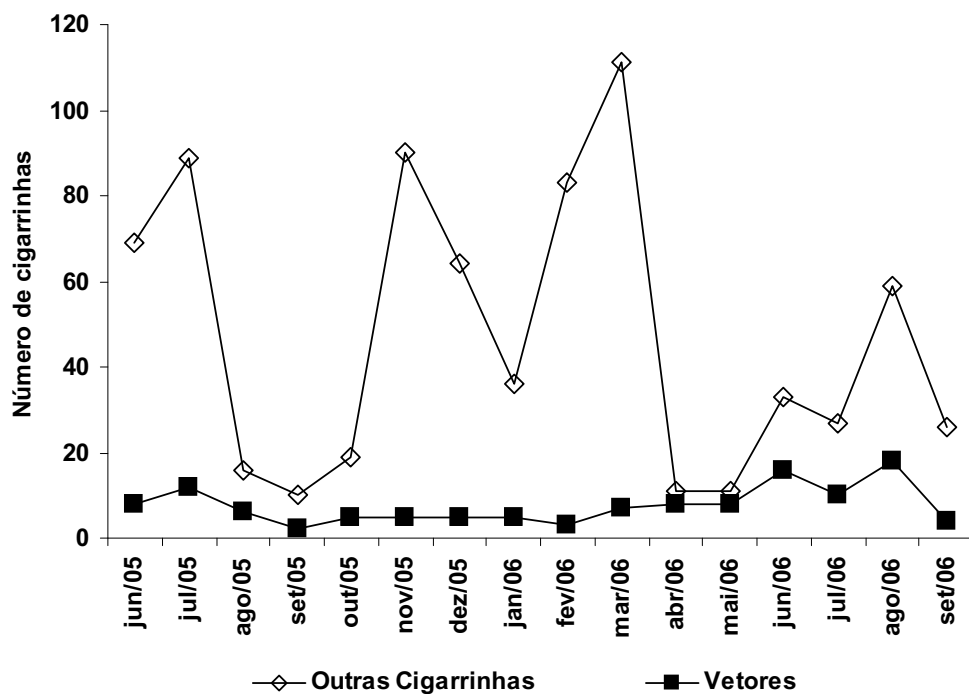


Figura 2 Número total de cigarrinhas vetoras e de outras cigarrinhas capturadas em laranja doce (*C. sinensis*), variedade Pêra, de junho 2005 a setembro de 2006, em Paranavaí, Paraná.

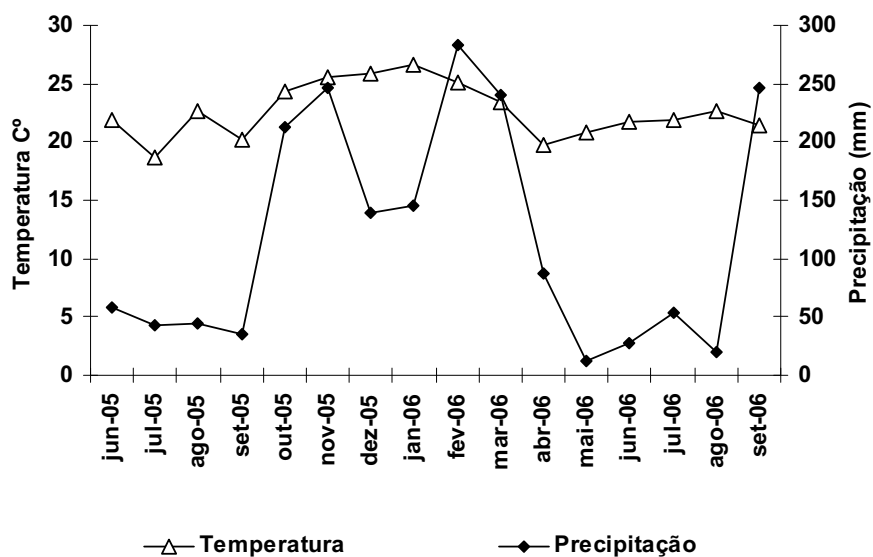


Figura 3 Médias mensais de temperatura (°C) e precipitação (mm) no período de junho de 2005 a setembro de 2006, no município de Paranavaí, Paraná.

Com a realização do teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade ($W_0 = 0,970525$, $F = 0,32$), foram encontradas as médias das espécies vetoras *D. costalimai*, (1,9158), *A. citrina*, (1,7341) e as outras vetoras (1,7342). Comparadas entre si não apresentaram diferenças estatísticas significativas; diferindo-se apenas da espécie *M. cavifrons*, cuja média foi a maior apresentada, com (3,0317) cigarrinhas capturadas em relação às outras espécies capturadas no mesmo período (Figura 4).

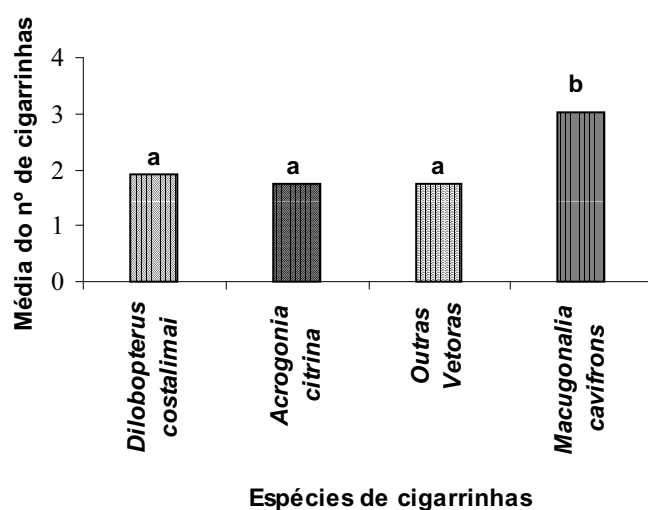


Figura 4 Número médio mensal de cigarrinhas capturadas com armadilhas adesivas amarelas no período de junho de 2005 a setembro de 2006, no município de Paranaíba, Paraná.

Levando-se em consideração as altas temperaturas da região noroeste do Paraná, de acordo com o observado através da captura das cigarrinhas, foi elevado o número de insetos capturados durante todo o ano, com poucas oscilações da população de vetoras no talhão avaliado. Desta forma, deve-se reavaliar as medidas de controle, pois é um local propício ao desenvolvimento dos vetores e das cigarrinhas que ainda podem vir a se tornar vetoras, levando-se em consideração as altas temperaturas desta região.

CONCLUSÕES

Na região de Paranaíba, é constante a presença das principais espécies de cigarrinhas vetoras da CVC: *Dilobopterus costalimai*, *Acrogonia citrina* e *Macugonalia leucomelas*. Não há diferenças significativas em relação às médias do número de cigarrinhas vetoras capturadas no período entre junho de 2005 e setembro de 2006.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FUNDECITRUS. **Departamento científico: apresenta informações sobre cigarrinhas. Disponível em** <<http://fundecitrus.com.br/cigar.html>>, Acesso em 10 out. 2006.

GRAVENA, S.; LOPES, J.R.S.; PAIVA, P.E.B.; YAMAMOTO, P.T.; ROBERTO S.R. Os Vetores da *Xylella fastidiosa* In: DONADIO, L.C.; MOREIRA, C.S. (Ed) **Clorose Variegada dos Citros**, Piracicaba, p.37-53, 1997.

HARTUNG, H.S.; BERETTA, M.J.G.; BRLANSKY, R.H.; SPISSO, J.; LEE, R.F. Citrus variegated chlorosis bacterium: Axenic culture, pathogenicity, and serological relationships with other strains of *Xylella fastidiosa*. **Phytopathology**, v.84, p.591-597, 1994.

LEITE JÚNIOR, R.P.; SANTOS FILHO, H.P.; BARBOSA, C.J.; UENO, B.; MEISSNER, P.E. Constatação da clorose variegada dos citros (CVC) causada por *Xylella fastidiosa* no Estado de Sergipe. **Summa Phytopathologica**, v.22, p.65, 1996.

LOPES, J.R.S. Mecanismo 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, p.329-344, 1999.

MALAVOLTA, E. Nova anomalia dos citros: estudos preliminares. **Laranja**, v.11, n.1, p.15-18, 1990.

MARUCCI, R.C. **Espécies de cigarrinhas (Hemiptera:Cicadellidae:Cicadellinae) em pomares de citros da região de Bebedoro (SP)**. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, p.95, 1998.

MARUCCI, R.C.; CAVICHIOLI R.R.; ZUCCHI, R.A. Chave para as espécies de cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae: Cicadellinae) vetoras da clorose variegada dos citros (CVC). **Anais. Sociedade Entomologia Brasileira**, v.28, p.439-446, 1999.

MARUYAMA, W.I.; BARBOSA, J.C.; TOSCANO, L.C. Distribuição espacial de *Oncometopia facialis* (Signoret) (Hemiptera:Cicadellidae) em pomar cítrico. **Neotropical Entomology**, v.35, n.1, p.93-100, 2006.

NUNES, W.M.C; MOLINA, R.O; ALBUQUERQUE, F.A; CORAZZA-NUNES; M. J; ZANUTO. C.A; MACHADO M.A. Flutuação Populacional de Cigarrinhas Vetoras de *Xylella fastidiosa* em Pomares Comerciais de Citros no Noroeste do Paraná. **Neotropical Entomology**, v.36, n.2, p254-260, 2007.

NUNES, W.M.C.; ZANUTTO, C.A.; CORAZZA-NUNES, M.J.; MOLINA, R.O.

Análise espaço-temporal da clorose variegada dos citros no Noroeste do Paraná, com o uso de PCR para detecção de *Xylella fastidiosa*. **Acta Scientiarum**, v.28, n.3, p.423-427, 2006.

PAIVA, P.E.B.; SILVA, J. L. da; GRAVENA, S. Cigarrinhas de xilema em pomares de laranja do Estado de São Paulo. **Laranja**, v.17, n.1, p.41-54. 1996.

ROBERTO, S.R.; LIMA, J.E.O.; COUTINHO, A.; MIRANDA, V.S.; CARLOS, E.F. Avaliação de métodos de monitoramento de cigarrinhas transmissoras de Clorose Variegada dos Citros. **Revista Brasileira de Fruticultura** v.19, p.227-233, 1997.

ROSSETTI, V.; DE NEGRI, J. Clorose variegada dos citros: Revisão. **Laranja**, v.11, n.1, p.1-14, 1990.

ROSSETTI, V.; GARNIER, M.; BERETTA, M.J.G.; TEIXEIRA, A.R.R.; QUAGGIO, J.A.; BATTAGLIA, O.C.; GOMES, M.P.; DE NEGRI, J.D. Resultados preliminares de estudos sobre uma nova anormalidade dos citros observada nos Estados de São Paulo e Minas Gerais. **Summa Phytopathologica**, v.16, p.1-13, 1990.

ROSSETTI, V.; GONZALEZ, M.A.; DONADIO, L.C. Hystory In: Donadio, L.C. Moreira, C.S. (Eds). **Citrus Variegated Chlorosis**, 1^a ed. Bebedouro: Fundecitrus, p.1-21, 1998.

SANTOS, D.; SIQUEIRA, D. L.; PICANCO, M. C.; Flutuação populacional de espécies de cigarrinhas transmissoras da clorose variegada dos citros (CVC) em Viçosa-MG. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.27, n.2, p.211-214, 2005.

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.

YAMAMOTO, P.T.; ROBERTO, S.R.; PRIA-JÚNIOR, W.D.; FELIPPE, M.R.; MIRANDA, V.S.; TEIXEIRA, D.C.; LOPES, J.R.S. Transmissão de *Xylella fastidiosa* por cigarrinhas *Acrogonia virescens* e *Homalodisca ignorata* (Hemiptera: Cicadellidae) em plantas Cítricas. **Summa Phytopathologica**, v.28, p.178-181, 2002a.

YAMAMOTO, P.T.; ROBERTO, S.R.; PRIA JÚNIOR, W.D.; FELIPPE, M.R.; FREITAS, E.P. Espécies e flutuação populacional de cigarrinhas em viveiro de citros, no município de Mogi-Guaçu-SP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, n.1, p.389-394, 2002b.

CAPÍTULO-II

RESUMO

FLUTUAÇÃO POPULACIONAL DAS CIGARRINHAS (HEMIPTERA CICADELLIDAE) VETORAS DE *Xylella fastidiosa* NO MUNICÍPIO DE NOVA ESPERANÇA, PARANÁ.

Desde 1987, a citricultura brasileira vem sendo prejudicada por uma doença conhecida como Clorose variegada dos citros (CVC) ou amarelinho. Esta enfermidade foi constatada pela primeira vez nos municípios do noroeste paulista e da região do triângulo mineiro. A CVC é causada por uma bactéria fastidiosa de xilema *Xylella fastidiosa*, em forma de bastonete, gram-negativa, medindo 0,25-0,35 x 0,9-3,5µm. Sua disseminação ocorre através de borbulhas contaminadas ou de maneira natural no pomar por meio de insetos vetores pertencentes à ordem Hemiptera, família Cicadellidae, que transmitem a bactéria depois de se alimentarem em plantas contaminadas. O objetivo deste trabalho é identificar as espécies de cigarrinhas vetoras e seu comportamento ao longo do tempo em um pomar comercial no município de Nova Esperança, Paraná. O experimento foi realizado em um talhão comercial de laranja doce, variedade Pêra, enxertada sobre limão 'Cravo', com 2.000 plantas de quinze anos de idade. Para a realização da amostragem, foram utilizadas armadilhas adesivas amarelas, distribuídas na área periférica e central do pomar com quatro repetições por rua amostrada (5ª, 30ª, 55ª e 80ª Planta), sendo que cada planta foi considerada uma unidade amostral. Foram avaliadas dez ruas do talhão, totalizando 40 armadilhas por amostragem. As armadilhas foram renovadas no pomar a cada trinta dias durante o período de avaliação, que foi de junho de 2005 até setembro de 2006. As principais espécies capturadas foram *Acrogonia citrina* e *Dilobopterus costalimai*. As maiores incidências ocorreram entre os meses de junho a dezembro de 2005 e de fevereiro a junho de 2006.

Palavras chave: Clorose variegada dos citros, Cicadellinae, Citros.

INTRODUÇÃO

A clorose variegada dos citros (CVC) é uma doença que afeta o desenvolvimento e a produtividade de variedades de laranja doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck.] e foi relatada no Brasil em 1987, na região de Colina e triângulo mineiro (Rossetti *et al.* 1990).

As plantas afetadas pela CVC apresentam sintomas iniciais de pequenos pontos amarelos nas folhas, avançando para manchas necróticas, galhos salientes na parte superior da copa com folhas e frutos miúdos. Os frutos dispostos em pencas se tornam duros e amarelos precocemente, tornando-se imprestáveis tanto para o mercado de frutas frescas como para a indústria de suco concentrado.

Chang *et al.* (1993) e Lee *et al.* (1993) conseguiram comprovar, com o postulado de Koch, que o agente causal da CVC é a bactéria de xilema denominada *Xylella fastidiosa* Wells.

Essa bactéria pode ser transmitida de duas maneiras para as plantas: À primeira é por meio de borbulhas contaminadas (Coletta Filho *et al.* 2000) e À segunda de forma natural por cigarrinhas vetoras (Hemiptera Cicadellidae). Estes insetos transmitem a bactéria quando se alimentam, sugando a seiva do xilema das plantas (Lopes 1996). Até o momento, 11 espécies de cigarrinhas foram comprovadas como vetoras da CVC: *Dilobopterus costalimai* Young, *Acrogonia citrina* Marucci & Cavichioli, *Oncometopia facialis* (Signoret), *Bucephalagonia xanthophis* (Berg), *Plesiommata corniculata* Young, *Macugonalia leucomelas* (Walker), *Homalodisca ignorata* Melichar, *Parathona gratiosa* (Blanchard), *Ferrariana trivittata* (Signoret), *Acrogonia virencens* (Metcalf) e *Sonesimia grossa* (Signoret), (Paiva *et al.* 1996; Yamamoto *et al.* 2002a).

Roberto *et al.* 1997 e Maruyama *et al.* (2002 e 2006) utilizaram, para amostragem de cigarrinhas, armadilhas adesivas amarelas em pomares comerciais como método para captura de cigarrinhas. O emprego deste tipo de armadilha tem sido utilizado por ser um método eficiente no monitoramento dos insetos vetores.

Embora estudos atuais sobre a doença tenham evoluído, o seu manejo

ainda baseia-se no plantio de mudas sadias, na poda dos ramos afetados e eliminação de plantas com sintomas severos, principalmente, no controle dos insetos vetores (Yamamoto *et al.* 2000).

Ainda se faz necessário um maior estudo dos insetos vetores, que é um componente do patossistema, e suas relações com a bactéria e a planta hospedeira, importante para entender as relações inseto-vetor-patógeno (Purcell & Hopkins, 1996), o que trará uma melhor compreensão da doença, criando, desta forma, uma estratégia de manejo adequado para os pomares com CVC.

Nunes *et al.* (2007) vêm estudando, na região noroeste do Paraná, a incidência da doença e as melhores metodologias para um diagnóstico precoce dessa doença. Juntamente com estas informações, estão as de coleta dos insetos da área (Nunes *et al.* 2006), visando compreender o mecanismo de ação do vetor e área de abrangência dele dentro do pomar.

O objetivo deste trabalho é identificar as espécies e avaliar a distribuição espacial das cigarrinhas vetoras de *Xylella fastidiosa* em laranja doce [*C. sinensis* (L.) Osbeck], 'Pêra', em um pomar comercial no município de Nova Esperança, Paraná.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no sítio Laranjeiras I, no município de Nova Esperança, Paraná. O período de realização foi de junho de 2005 a setembro de 2006, em um plantio comercial de laranja doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. O talhão, onde ocorreram as amostragens, possui aproximadamente 2.000 plantas da variedade Pêra, enxertada sobre limão 'Cravo' (*Citrus limonia* Osbeck), com 10 anos de idade, localizado na latitude Sul 23° 12'47.013" e longitude Oeste 52° 17'59.391" .

A população de insetos foi monitorada através de avaliações mensais a campo com armadilhas adesivas amarelas (Biocontrole®). As armadilhas foram cortadas em retângulos, medindo 9,0cm x 12,0cm, fixadas na face norte das laranjeiras e colocadas na parte externa da copa das plantas a uma altura de 1,70 m do solo. Elas foram distribuídas na área periférica e central do pomar

em quatro repetições por rua amostrada (5^a, 30^a, 55^a e 80^a). Cada planta foi considerada uma unidade amostral, sendo que foram avaliadas dez ruas por talhão, totalizando 40 armadilhas por amostragem.

As armadilhas coletadas foram levadas para o laboratório do Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada da Universidade Estadual de Maringá. Em seguida, os exemplares de insetos adultos foram retirados das armadilhas com auxílio de querosene como solvente da cola e separação do material. A identificação das espécies de cigarrinhas foi realizada com o auxílio de microscópio estereoscópio, utilizando-se chave visual de identificação e literatura específica (Marucci, 1998, Marucci *et al.* 1999). Os exemplares de cigarrinhas com algumas dificuldades para a identificação foram enviados para o professor Dr. Rodney Ramiro Cavichioli, da Universidade Federal do Paraná. Após a identificação do material, foram armazenados em frascos de acrílico contendo álcool 70%, devidamente etiquetados.

Para calcular a frequência e a constância das espécies de cigarrinhas capturadas, adotaram-se os seguintes procedimentos: 1) a frequência foi determinada a partir da porcentagem de indivíduos de cada espécie em relação ao total de indivíduos coletados; 2) a constância foi calculada empregando-se a fórmula $C(\%)=P/N$, onde C= constância das espécies, expressa em porcentagem; P= número de coletas contendo a espécie; e N= número de coletas realizadas (Silveira Neto *et al.* 1976 citado por Santos *et al.* 2005).

Para a avaliação da distribuição espacial das cigarrinhas *D. costalimai* e *A. citrina* no pomar, foram criados mapas de contorno no aplicativo SURFER, versão 6.04 (Golden Software 1996). A análise geoestatística foi realizada a partir de aplicativo Variowin em função do número de insetos capturados e da posição de cada armadilha no espaço.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram identificadas oito espécies de cigarrinhas vetoras de *X. fastidiosa*, pertencentes à família Cicadellidae, subfamília Cicadellinae. Entre elas, estão as espécies: *A. citrina*, *D. costalimai*, *B. xanthophis*, *O. facialis*, *S. grossa*, *M. leucomelas*, *P. corniculata* e *P. gratiosa*. Da mesma família, foram capturadas as espécies *H. simillis* e *M. cavifrons*, que são consideradas vetores potenciais dos citros (Fundecitrus 2006). Outras espécies de cigarrinhas capturadas foram divididas como “outras cigarrinhas”, entre elas estão as espécies *Scaphytopius* sp., *Bahita infuscata*, ambas da subfamília Deltocephalinae e *Gyponinae* sp., da subfamília Gyponinae. Todas estas foram encontradas em quantidades maiores que as das vetoras, porém não são consideradas ameaçadoras para o citros, pois elas não se alimentam primariamente no xilema, como os membros da subfamília Cicadellinae (Paiva *et al.* 1996) (Tabela 1).

Tabela 1 Número, frequência e constância das cigarrinhas coletadas através de armadilhas adesivas amarelas, no período de junho de 2005 a setembro de 2006, no município de Nova Esperança, Paraná.

Cicadellini & Proconini	Cigarrinhas		
(Vetores)	N	F(%)	Constância
<i>Acrogonia citrina</i>	267	13,00	Constante
<i>Dilobopterus costalimai</i>	514	24,80	Constante
<i>Bucephalagonia xanthophis</i>	013	0,63	Acidental
<i>Oncometopia facialis</i>	05	0,30	Acessória
<i>Sonesimia grossa</i>	04	0,20	Acessória
<i>Macugonalia leucomelas</i>	04	0,20	Acessória
<i>Plesiomata corniculata</i>	01	0,04	Acidental
<i>Parathona gratiosa</i>	01	0,04	Acidental
* <i>Hortencia simillis</i>	01	0,04	Acidental
* <i>Macugonalia cavifrons</i>	08	0,40	Acessória
Cicadelideos	1.247	60,40	Constante
Total	2.065	100	

N= número total de espécimes capturadas no período; F(%)= porcentagem de indivíduos de determinada espécie em relação ao total de indivíduos capturados; Constante: espécies capturadas em mais de 50% das coletas; Acessória: espécies capturadas entre 25-50% das coletas; Acidental: espécies capturada em menos de 25% das coletas; *cigarrinha vetora potencial para transmissão de *X. fastidiosa*.

Entre as espécies vetoras, as de maior incidência foram *D. costalimai* e *A. citrina* de ocorrência constante no pomar, com frequência de 24,8% e

13,0%, respectivamente. A terceira espécie mais capturada foi *B. xanthophis*, de ocorrência acidental e frequência de 0,63% no pomar. Todas as outras vetoras juntas apresentaram uma frequência de 0,78%. Estas três espécies também foram capturadas em maior quantidade e frequência em relação às outras espécies vetoras em pomares de Viçosa-MG (Santos *et al.* 2005).

Paiva *et al* (1996) e Roberto & Yamamoto (1998) constataram que, em pomares em produção, as espécies *A. citrina* e *D. costalimai* foram de ocorrência constante em pomares da região norte, noroeste e centro do Estado de São Paulo, sendo que na região sul as espécies apresentaram-se como acessórias. Segundo Yamamoto *et al.* 2002 *B. xanthophis* e *A. citrina* foram as mais frequentes e de ocorrência constante, enquanto que *D. costalimai* foi de ocorrência acidental em viveiros de citros.

A espécie *D. costalimai*, que foi a mais capturada, apresenta suas maiores incidências nos meses de dezembro de 2005, fevereiro e junho de 2006, com uma acentuada diminuição a partir de julho de 2006, mas voltando a crescer em agosto e setembro de 2006. Em relação à espécie *A. citrina*, foi observada sua incidência durante todo o período, mas com uma distribuição bastante irregular (Figura 1). Provavelmente, os altos valores das espécies vetoras nas avaliações devem-se as altas temperaturas dos períodos de coleta (Figura 3), pois o número de indivíduos da população está na dependência direta dos fatores do ambiente (Roberto & Yamamoto 1998).

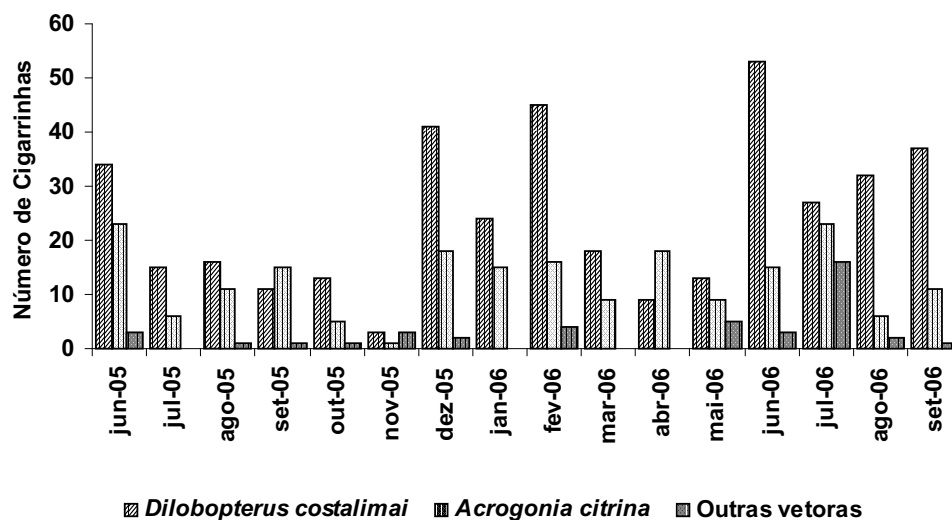


Figura 1 Número total de cigarrinhas capturadas mensalmente em laranja doce (*C.sinensis*), variedade Pêra, através de armadilhas amarelas, no período de junho de 2005 a setembro de 2006, em Nova Esperança, Paraná.

Os picos de população foram também registrados no mês de junho de 2006 (Figura 1), contrariando alguns resultados obtidos anteriormente nesta mesma região por outros autores, que relatam os picos populacionais no início da primavera, mantendo-se até final do verão (Nunes *et al.* 2007). Isso se deve pelas altas temperaturas e pela distribuição pluviométrica irregular, com chuvas abaixo da média em alguns períodos de estiagem para a região.

Paiva *et al.* (1996), em três anos de avaliação, constataram a presença das espécies *D. costalimai*, *Acrogonia* sp e *O. facialis* no primeiro ano de avaliação, sendo que a maior incidência se deu entre os meses de dezembro e janeiro; entretanto, as cigarrinhas tornaram-se mais abundantes a partir do segundo e terceiro ano de avaliação, entre os meses de março a agosto (outono e inverno). Pereira *et al.* (2005) e Roberto & Yamamoto (1998) relacionaram a flutuação populacional das cigarrinhas com a precipitação pluviométrica, atribuindo um atraso na ocorrência desses insetos na primavera a uma estiagem prolongada. Como as cigarrinhas preferem alimentar-se de plantas novas e pontas tenras das plantas (Marucci *et al.* 2004), elas aparentam ser indiretamente influenciadas por fatores edafoclimáticos, que determinam aspectos fenológicos e fisiológicos da planta hospedeira.

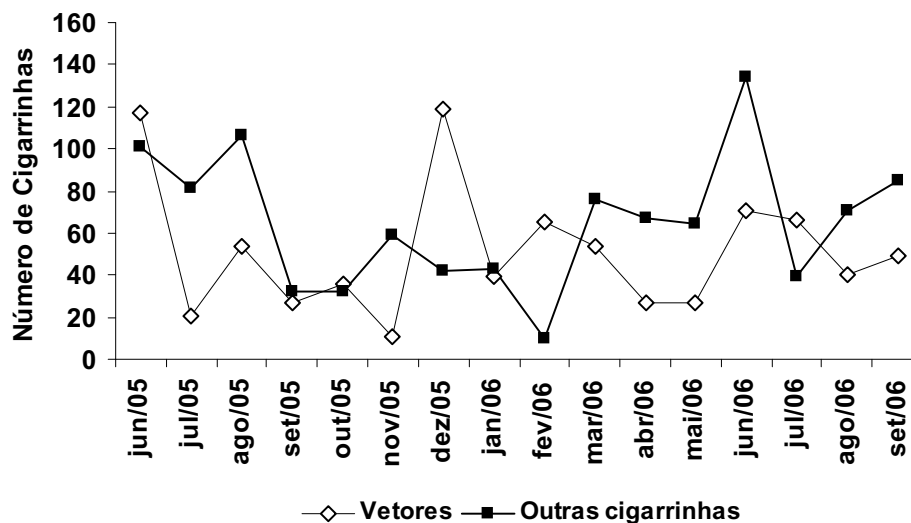


Figura 2. Número de vetores e de outras cigarrinhas capturadas em laranja doce (*C. sinensis*), variedade Pêra, no período de junho 2005 a setembro de 2006, em Nova Esperança, Paraná.

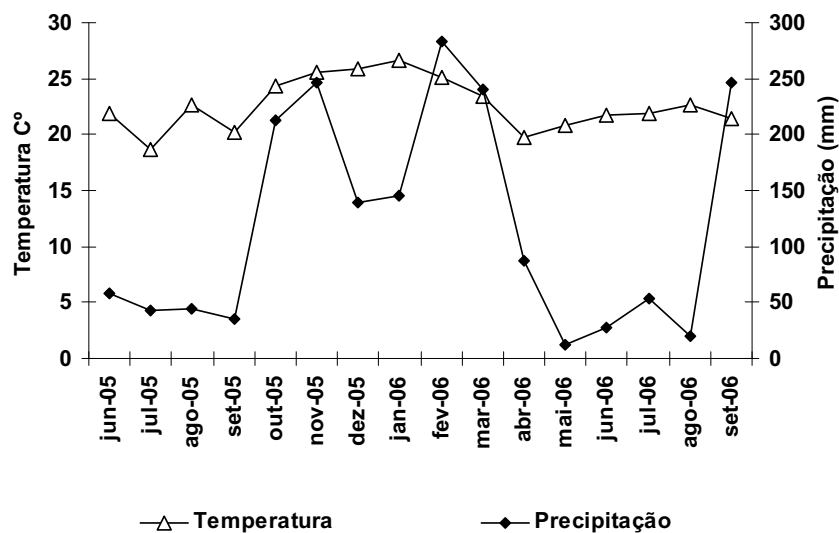


Figura 3 Médias mensais de temperatura (°C) e precipitação (mm), coletadas na estação Climatológica Principal de Maringá, no período de junho de 2005 a setembro de 2006, no município de Nova Esperança, Paraná.

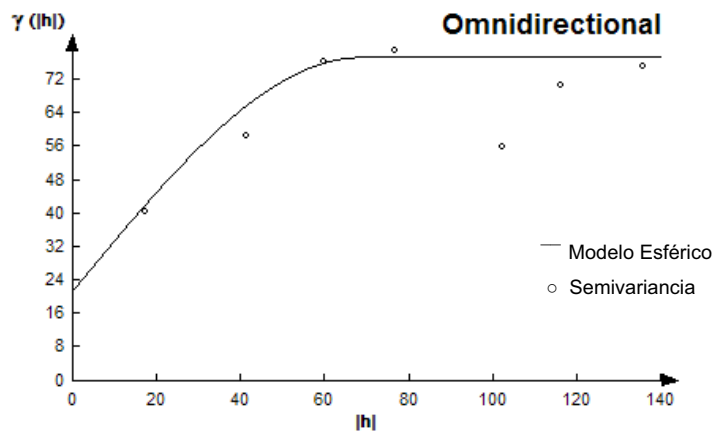
De acordo com o semivariograma (figura 5) obtido por meio dos dados da tabela 2, foram construídos os mapas de contorno das espécies *D. costalimai* e *A. citrina*. Estas espécies tiveram preferência por locais próximos à

periferia das ruas do talhão, sendo que, nestas áreas, ocorreu o maior número de insetos capturados por área. Farias *et al.* (2004), utilizando geoestatística, constaram número de agregação para *D. costalimai* de 10,980m² e *A. citrina* 15,760m² em pomares cítricos com pontos de maiores índices de incidências também na região periférica da área amostrada.

Murayama *et al.* (2002) confirmaram em seus estudos a agregação populacional de *D. costalimai*, enquanto Laranjeira *et al.* (1998), em levantamento de plantas com CVC, também encontraram distribuição em blocos da doença, inferindo que a transmissão ocorre entre plantas vizinhas dentro das linhas de plantio.

Tabela 2 Modelos de semivariograma para distribuição espacial das cigarrinhas *Acrogonia citrina* e *Dilobopterus costalimai* em laranja doce 'Pêra', no período de junho de 2005 a setembro de 2006, no município de Nova Esperança, Paraná.

Cigarrinhas	Parâmetros do Semivariograma			Modelo
	C ₀	C ₁	a (m)	
<i>Dilobopterus costalimai</i>	21,5357	56	68,6	Spherical
<i>Acrogonia citrina</i>	17,5845	45	67,4	Gaussiano



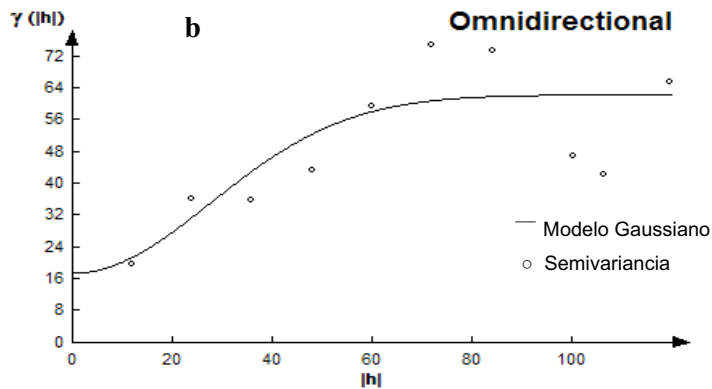


Figura 5 Semivariograma das cigarrinhas vetoras *Dilobopterus costalimai* (a) e *Acrogonia citrina* (b), coletadas através de armadilhas adesivas amarelas em laranja doce 'Pêra', de junho de 2005 a setembro de 2006.

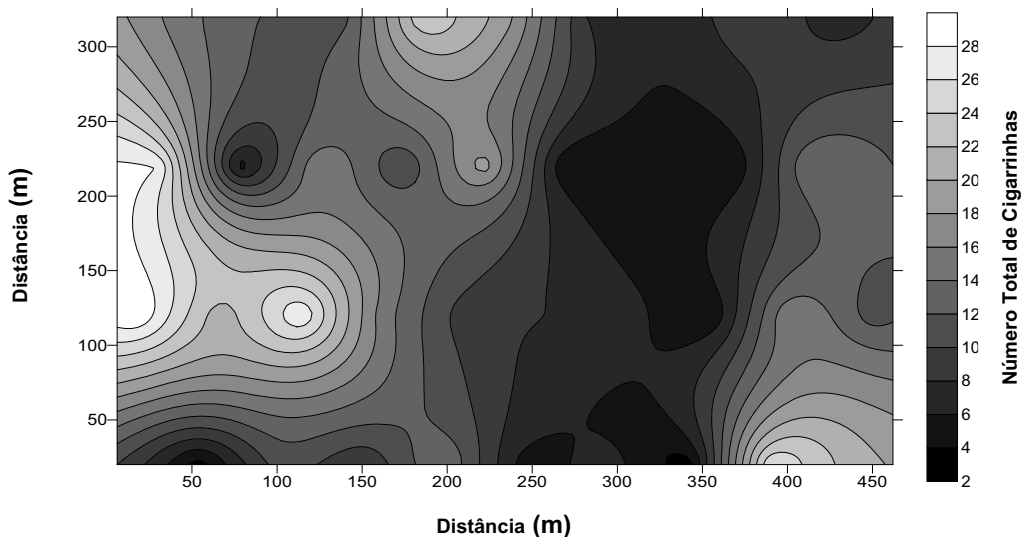


Figura 6 Número total da espécie *D. costalimai* capturadas em um pomar de laranja doce (*C. sinensis*), variedade Pêra, entre junho 2005 a setembro de 2006, em Nova Esperança, Paraná.

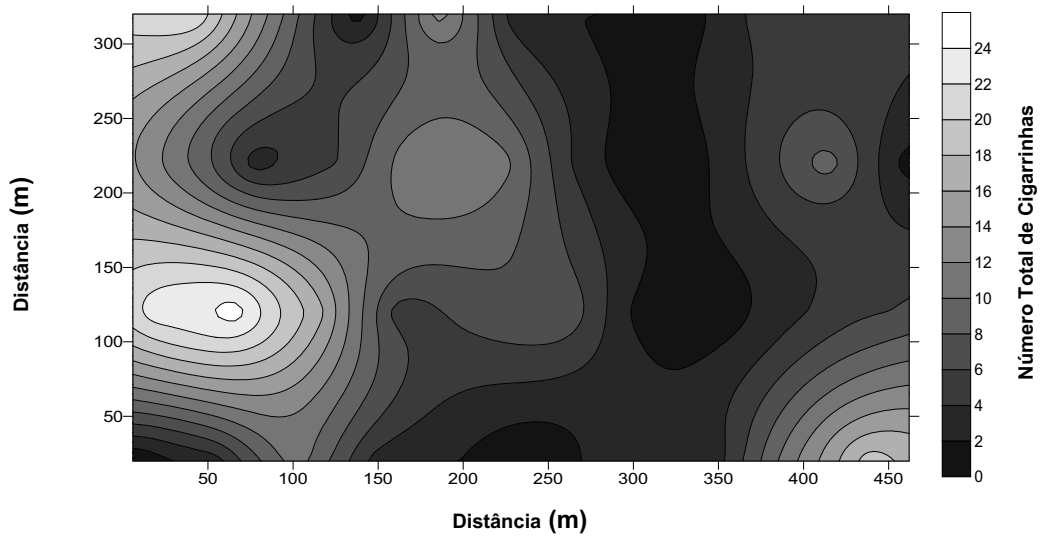


Figura 7 Número total da espécie *A. citrina* capturadas em um pomar de laranja doce (*C. sinensis*), variedade Pêra, entre junho 2005 a setembro de 2006, em Nova Esperança, Paraná.

CONCLUSÕES

As espécies de cigarrinhas mais abundantes no pomar de laranja 'Pêra' foram *Acrogonia citrina*, *Dilobopterus costalimai* e *Bucephalagonia xanthophis*. Nas áreas de periferia do pomar, foram encontradas as maiores concentrações de insetos vetores por meio da análise de distribuição espacial das mesmas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHANG, C.J.; GARNIER, M.; ZREIK, L.; ROSSETTI, V.; BOVÉ, J. M. 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.

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, n.1, p.327-334. 2000.

FARIAS, P.R.S.; ROBERTO, S.R.; LOPES, J.R.S.; PERECIN, D. Geostatistical characterization of the spatial distribution of *Xylella fastidiosa* sharpshooter vectors on citrus. **Neotropical Entomology**, v.33 n.1, p.13-20, 2004.

FUNDECITRUS. **Departamento científico: apresenta informações sobre cigarrinhas. Disponível em <<http://fundecitrus.com.br/cigar.html>>**, Acesso em 10 out. 2006.

LARANJEIRA, F.F.; BERGAMIM FILHO, A.; AMORIM, L.; BERGER, R.D. Aspectos práticos da epidemiologia da Clorose Variegada dos Citros. **Laranja**, v.19, n.1, p.79-90, 1998.

LEE, R.F.; BERETTA, M.J.G.; HARTUNG, J.H.; HOOKER, M. E.; DERRICK, K.S. *Xylella fastidiosa*: Agente Causal da clorose variegada dos citros. **Laranja**, v.14, n.1, p.157-166, 1993.

LOPES, J.R.S. Mecanismo de transmissão de *Xylella fastidiosa* por Cigarrinhas. **Laranja**, v.17, n.1, p. 79-92, 1996.

MARUCCI, R.C. **Espécies de cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae: Cicadellinae) em pomares de citros da região de Bebedoro (SP)**. Dissertação de Mestrado Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, p.95, 1998.

MARUCCI, R.C.; CAVICHIOLI R.R.; ZUCCHI, R.A. Chave para as espécies de cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae: Cicadellinae) vetoras da clorose variegada dos citros (CVC). **Anais. Sociedade Entomologia Brasileira**, v.28, p. 439-446, 1999.

MARUCCI, C.R.; LOPES, J.R.S; VENDRAMIM, J.D.; CORRENTE, J.C. Feeding Site Preference of *Dilobopterus costalimai* Young and *Oncometopia facialis* (Signoret) (Hemiptera: Cicadellidae) on Citrus Plants. **Neotropical Entomology**, v.33, n.6, p.759-768, 2004.

MARUYAMA, W.I.; BARBOSA, J.C.; TOSCANO, L.C. Distribuição espacial de *Oncometopia facialis* (Signoret) (Hemiptera: Cicadellidae) em pomar cítrico. **Neotropical Entomology**, v.35, n.1, p.93-100, 2006.

MARUYAMA, W.I.; BARBOSA, J.C.; FERNANDES, M.G.; YAMAMOTO, P.T. Distribuição espacial de *Dilobopterus costalimai* Young (Hemiptera: Cicadellidae) em Citros na Região de Taquaritinga, SP. **Neotropical Entomology**, v.31, n.1, p.35-40, 2002.

NUNES, W.M.C.; ZANUTTO, C.A.; CORAZZA-NUNES, M.J.; MOLINA, R.O. Análise espaço-temporal da clorose variegada dos citros no Noroeste do Paraná, com o uso de PCR para detecção de *Xylella fastidiosa*. **Acta Scientiarum**, v.28, n.3, p.423-427, 2006.

NUNES, W.M.C.; MOLINA, R.O.; ALBUQUERQUE, F.A.; CORAZZA-NUNES; M. J.; ZANUTO.; C.A.; MACHADO M.A. Flutuação Populacional de Cigarrinhas Vetoras de *Xylella fastidiosa* em Pomares Comerciais de Citros no Noroeste do Paraná. **Neotropical Entomology**, (Prelo), 2007.

PAIVA, P.E.B.; SILVA, J. L. da; GRAVENA, S. Cigarrinhas de xilema em pomares de laranja do Estado de São Paulo. **Laranja**, v.17, n.1, p.41-54. 1996.

PEREIRA, É.F.; LOPES, J.R.S.; TURATI, D.T.; MUNHOZ, C.; CORRENTE, J.E. Influência das condições hídricas do solo e da temperatura na sobrevivência e alimentação de *Oncometopia facialis* (Hemiptera: Cicadellidae) em "seedlings" de citros. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.72, p.343-351, 2005.

PURCELL, A.A.; HOPKINS, D.L. Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogen. **Annual phytopathol**, v. 34, p.131-151, 1996.

ROSSETTI, V.; GARNIER, M.; BERETTA, M.J.G.; TEIXEIRA, A.R.R.; QUAGGIO, J.A.; BATTAGLIA, O.C.; GOMES, M.P.; DE NEGRI, J.D. Resultados preliminares de estudos sobre uma nova anormalidade dos citros observada nos Estados de São Paulo e Minas Gerais. **Summa Phitopathologica**, v.16, p.1-13, 1990.

ROBERTO, S.R.; LIMA, J.E.O.; COUTINHO, A.; MIRANDA,V.S.; CARLOS, E.F. Avaliação de métodos de monitoramento de cigarrinhas transmissoras de Clorose Variegada dos Citros. **Revista Brasileira de Fruticultura** v.19, n.2, p.227-233, 1997.

ROBERTO, S.R. & YAMAMOTO, P.T. Flutuação populacional e controle químico de cigarrinhas em citros. **Laranja**, v.19, n.2, p.269-284, 1998.

SANTOS, D., SIQUEIRA, D. L., PICANCO, M. C. Flutuação Populacional de Espécies de Cigarrinhas Transmissoras da Clorose Variegada dos Citros (CVC) em Viçosa-MG. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.27, n.2, p.211-214, 2005.

YAMAMOTO, P.T.; ROBERTO, S.R.; DALLA PRIA JR., W. Inseticida sistêmico aplicados via tronco para controle de *Oncometopia facialis*, *Phyllocnistis citrella* e *Toxoptera citricida* em citros. **Scientia Agricola**, v.57, n.3, p.415-420, 2000.

YAMAMOTO, P.T.; ROBERTO, S.R.; PRAJÚNIOR, W.D.; FELIPPE, M.R.; MIRANDA, V.S.; TEIXEIRA, D.C.; LOPES, J.R.S. Transmissão de *Xylella fastidiosa* por cigarrinhas *Acrogonia virescens* e *Homalodisca ignorata* (Hemiptera: Cicadellidae) em plantas Cítricas. **Summa Phytopathologica**, v.28, p.178-181, 2002a.

YAMAMOTO, P.T.; ROBERTO, S.R.; PRAJÚNIOR, W.D.; FELIPPE, M.R.; FREITAS, E.P. Espécies e flutuação populacional de cigarrinhas em viveiro de citros, no município de Mogui-Guaçu-SP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, n.1, p.389-394, 2002b.

CAPÍTULO-III

RESUMO

DETECÇÃO DE *Xylella fastidiosa* EM CIGARRINHAS VETORAS (HEMIPTERA: CICADELLIDAE) POR MEIO DE PCR.

A Clorose variegada dos citros (CVC) é uma doença de importância econômica que foi constatada pela primeira vez em 1987 nos municípios do noroeste paulista e da região do triângulo mineiro. A CVC é causada pela *Xylella fastidiosa*, uma bactéria endofítica, em forma de bastonete, encontrada nos vasos do xilema das plantas. A disseminação de uma planta a outra ocorre através de insetos vetores, pertencentes à ordem Hemiptera, família Cicadellidae, conhecidos como cigarrinhas, que transmitem a bactéria depois de se alimentarem em plantas contaminadas. O objetivo deste trabalho é comparar as técnicas de extração de DNA genômico de cigarrinhas vetoras e desta maneira, estabelecer um protocolo eficiente que possibilite a detecção da bactéria *X. fastidiosa*, por meio da técnica de PCR. Foram comparados dois protocolos de extração de DNA: protocolo I, a base de fenol e clorofórmio, (Hung *et al.* 2004) testado para 162 cabeças de espécies de cigarrinhas e o protocolo II, a base da resina Chelex 100 (Ciapina *et al.* 2004), utilizadas 155 cabeças de espécies de cigarrinhas. Os resultados obtidos em relação aos testes moleculares apontaram para extração com protocolo I como sendo a melhor forma para a detecção de bactéria *X. fastidiosa* nas cigarrinhas *Dilobopterus costalimai* e *Acrogonia citrina*.

Palavras Chave: DNA, Clorose variegada dos citros, Insetos.

INTRODUÇÃO

A Clorose variegada dos citros está presente no Brasil desde 1987, sendo os principais relatos de sua ocorrência na região norte do Estado de São Paulo (Rosetti *et al.* 1990). Desde então, a doença vem trazendo sérios prejuízos para a citricultura brasileira. Causada pela bactéria *Xylella fastidiosa* (Wells), é transmitida para plantas suscetíveis de laranja doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] por meio de insetos vetores (Hemiptera: Cicadellidae), conhecidos como cigarrinhas, que se alimentam da seiva do xilema das plantas. As cigarrinhas podem transmitir a bactéria durante todo o período de vida; entretanto, ninfas perdem sua capacidade de transmissão com as ecdises, quando mudam de instar ou passam para a fase adulta (Lopes 1996).

Estudos de microscopia eletrônica de varredura têm mostrado que as células de *X. fastidiosa* se encontram concentradas em placas aderidas a alguns locais específicos (Lopes 1996). Na espécie vetora *Graphocephala atropunctata*, a bactéria multiplica-se e liga-se ao canal de alimentação (precibário) e câmara de sucção (cibário) (Hopkins 1983).

O uso da técnica da reação da polimerase em cadeia (PCR) para detectar *X. fastidiosa* em amostras de tecido de plantas infectadas, baseado na especificidade dos “primers”, teoricamente, permite a detecção de 10 a 100 bactérias por reação de PCR (Pooler & Hartung 1995). A utilização desta técnica para detecção da bactéria em insetos vetores da CVC vem sendo utilizada amplamente por diversos autores (Hill & Purcell 1995; Ciapina *et al.* 2004; Marucci *et al.* 2003).

O teste de PCR duplo, chamado *nested* PCR é um eficiente método para detecção de organismos ou produtos das amostras com presença de baixas concentrações de DNA e altas concentrações de contaminantes que inibem a amplificação do DNA. A detecção da *X. fastidiosa* em amostras de insetos pode ser dificultada devido ao número de células bacterianas presentes nos insetos vetores ser baixo (Ciapina *et al.* 2004).

Diversas dificuldades ainda são encontradas para extração de DNA de insetos e para a detecção de *X. fastidiosa* nestes vetores. Por isso, estudos para a comparação e estabelecimento de um protocolo eficiente são

necessários para melhor entendimento do mecanismo de transmissão e da capacidade de infecção das cigarrinhas vetoras de *X. fastidiosa*.

O objetivo deste trabalho é comparar técnicas de extração de DNA de cigarrinhas vetoras para o estabelecimento de um protocolo eficiente na extração de DNA genômico, que possibilite a detecção da bactéria *X. fastidiosa* por meio da técnica de PCR.

MATERIAL E MÉTODOS

As cigarrinhas vetoras foram coletadas em dois pomares de laranja doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck.], variedade Pêra, localizados na região noroeste do Paraná: sítio Laranjeiras I, no município de Nova Esperança, PR., latitude Sul 23° 12'47.013", longitude Oeste 52° 17'59.391" e sítio Nossa Senhora Aparecida, Paranaíba-PR, localizado a latitude Sul 23° 03'26.336", longitude Oeste 52° 23'33.672". O experimento foi realizado no período de junho de 2005 a setembro de 2006.

As espécies de cigarrinhas foram capturadas com armadilhas adesivas amarelas (Biocontrole®), cortadas em retângulos, medindo 9,0cm x 12,0cm, fixadas na face Norte das laranjeiras da copa das plantas a uma altura de 1,70m do solo. As armadilhas foram distribuídas na área periférica e central do pomar, com uma repetição a cada 25 plantas amostrada. Foram avaliadas dez ruas de cada talhão. As armadilhas foram renovadas no pomar a cada trinta dias durante o período de avaliação.

Após a coleta, foi realizada a identificação das cigarrinhas sendo que as cabeças foram retiradas e transferidas para microtubos de centrifuga de 1,5 mL, identificados com a data, o local e a planta onde foi coletada. Em seguida, as amostras foram armazenadas em freezer a temperatura de -4°C, para posterior extração de DNA no laboratório de Biologia Molecular do Núcleo de Biotecnologia Aplicada (NBA), na Universidade Estadual de Maringá (UEM).

Para a extração de DNA, foram utilizadas 317 cabeças de espécies de cigarrinhas (Tabela 1), sendo que cada amostra utilizada continha entre 1 e 2 cabeças. Para a avaliação da eficiência dos resultados no método de extração de DNA, foram utilizados dois protocolos diferentes: Protocolo I (Hung *et al.*

2004), foram usadas 162 cabeças de cigarrinhas; Protocolo II, (Ciapina *et al.* 2004), foram utilizadas 155 cabeças.

Protocolo I: Hung *et al.* (2004). Foi utilizado para extração de DNA total de cigarrinhas de citros. Foram agrupadas em microtubos de centrífuga de 1,5 mL de uma a duas de cabeças de cigarrinhas da mesma espécie coletadas da mesma etiqueta. Após este processo, foram adicionados 300µl de tampão de extração, contendo 0,1M Tris-HCl pH 8,0, 0,05 M NaCl, 1% de *N*-laurylsarcosyl nas amostras, que foram maceradas com auxílio de uma ponteira esterilizada de micropipeta e incubadas a 55°C por 1h. Em seguida, foram acrescentados a amostras 500 µl de fenol/clorofórmio/ álcool isoamílico (25:24:2 mL) sendo centrifugadas por 10min, 4°C a 8.000rpm. Foram retirados aproximadamente 500µl de sobrenadante, transferidos para microtubos esterilizados de 1,5 mL, em seguida acrescentando-se clorofórmio/álcool isoamílico e centrifugadas por 10min a (4° a 8.000G) Novamente foi retirado o sobrenadante cuidadosamente e transferidos para microtubos novos e estéreis de 1,5 mL e acrescentados 800 de etanol 100%, mantidas over-night. Após este período, as amostras foram centrifugadas por 10min 4°C a 12.000G para a precipitação de DNA e formação do pellet e o sobrenadante descartado. Logo após foram acrescentados 500µl de etanol 70% nas amostras que foram centrifugadas por 10min, 4° a 8.000G e o sobrenadante descartado. Em seguida, foi repetido o processo com Etanol absoluto gelado. Após serem centrifugadas e o sobrenadante descartado, os tubos foram invertidos em uma superfície acéptica e, após 10min, foi adicionado 25µl de 1/10 TE (1mM Tris-HCl pH 8,0; 0,1mM EDTA) RNase e armazenados a temperatura de -4°C.

Protocolo II: Ciapina *et al.* (2004) o procedimento inicial para separação das cigarrinhas foi o mesmo utilizado para o protocolo I, em seguida, as amostras foram maceradas com 200µl de solução a 0,25% de Polyvinilpolipirrolidona (PVPP) com ajuda de ponteiros esterilizados de microcentrífuga e em seguida, centrifugadas a 12.000G (temperatura ambiente) por 20 min descartando-se o sobrenadante. Adicionaram-se 100µl de Chelex 100 (ativado), segundo Ciapina *et al.* (2004), e, então as amostras foram incubadas a 56°C por 30 min e posteriormente agitadas em agitador de tubos (vortex) por 10s, seguindo-se nova centrifugação a 12.000G (temperatura ambiente) por 3min, sendo as amostras fervidas durante 8min e novamente, agitadas por 10s. Finalmente, as amostras foram centrifugadas por 3 min a 12.000G e o sobrenadante transferido para microtubos novos de 0,5mL, mantidas a -4°C para realização do teste de PCR.

Reação de PCR

Para a reação de amplificação de DNA, utilizaram-se amostras dos dois métodos de extração, sendo testados os “primers” específicos para *Xylella fastidiosa*, CVC-P1 (5'-AGATGAAAACAATCATGCAGAAA-3') e 272-2-int (5'-GCCGCTTCGGAGAGCATTCT-3') com produto da amplificação de 500bp desenvolvidos por Pooler & Hartung 1995.

As reações de amplificação foram conduzidas com volume total de 25µl utilizados do tampão 2,5 µl de 10X (200mM Tris-HCl, pH 8,4; 500mM KCl); e água milli-Q, MgCl₂ (2,5mM), DNTP (10mM) 15ng de primer CVC-p1, e 272-2-int, 40ng da amostra de DNA total; 1 U de *Taq*-DNA-polimerase (Invitrogen®).

A amplificação ocorreu na condição de um ciclo inicial a 94°, por 2min; 35 ciclos de desnaturação a 94°C, por 2min; anelando a 62°C, por 1min; e extensão a 72°C, por 1,5 min, com um ciclo final de extensão a 72°C, por 5min, e estabilizando a 6°C por tempo indeterminado (Marucci 2003). O aparelho utilizado foi o Máster Cyler Gradient (Eppendorf). Após este processo, foi preparada outra reação de PCR, utilizando-se 6µl da primeira reação como molde para os oligonucleotídeos internos “primers” CVC-1 e 272-2 int, sendo a amplificação realizada como anteriormente descrito.

Em todos os testes de PCR, foram utilizados controles positivos amostras de cigarrinhas infestadas, ou seja, que se alimentaram em plantas-fonte infectadas pela CVC. Para o controle negativo utilizou-se cigarrinhas livres da bactéria. O produto da reação de amplificação foi analisado através de eletroforese em gel de 1% de agarose, contendo 2µl de brometo de etídio, visualizadas e fotografadas sob luz ultravioleta em equipamento de fotodocumentação (UVP GDS-8000 System).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram extraídos DNA de 317 amostras de “cabeças” de cigarrinhas através dos dois métodos diferentes de extração. Comparando o protocolo I, onde foram extraídos DNA de 155 cigarrinhas, com o protocolo II (Tabela 1), o primeiro apresentou-se eficiente para extração de DNA total das amostras. Os resultados foram positivos para detecção de *X. fastidiosa* em apenas duas amostras: *Dilobopterus costalimai* e *Acrogonia citrina*, amostra 4 e 5 (Figura 1). Ciapina *et al.* (2004) sugerem que a detecção da *X. fastidiosa* em amostras de insetos pode ser dificultada pelo número de células bacterianas presente nos insetos. Em muitos casos, a metodologia de extração de DNA não é eficiente, podendo liberar agentes que inibem a reação de PCR, gerando um resultado falso-negativo.

Marucci (2003) conseguiu, de 450 cigarrinhas testadas, 34 resultados positivos com o teste de *Nested-PCR*, sendo que seis amostras que deram resultados positivos eram da espécie *D. costalimai*. Talvez, após a aquisição da bactéria pelo inseto vetor, seja preciso um período maior de permanência da mesma dentro do inseto para um aumento da população, melhorando as chances de detecção da *X. fastidiosa* (Hill & Purcell, 1995).

Pooler *et al.* (1997), utilizando a técnica de duplo-PCR para amostras de cigarrinhas *Graphocephala versuta*, conseguiram 15 resultados positivos de 60 exemplares capturados em espécies de *Ulmus americana* (L.).

Em relação ao protocolo II, foram extraídos DNA de 162 amostras; porém, não foi possível a quantificação de DNA a partir das amostras extraídas das cigarrinhas vetoras, como também não ocorreu a amplificação do

fragmento esperado de *X. fastidiosa* utilizando os “Primes” específicos em nenhuma das amostras realizadas.

Bextine & Miller (2004), após analisarem diversos métodos de extração de DNA de *X. fastidiosa* a partir de amostras de insetos vetores, conseguiram melhores resultados utilizando um método com a resina quelante Instagene Matrix (BioRad®), do que com o uso de protocolo com fenol/clorofórmio. Avaliando-se fontes escassas de DNA, os autores determinaram que o tratamento com esta resina quelante pode agir como purificador das amostras de DNA.

Diante dos resultados obtidos com técnicas moleculares para o estudo de DNA da bactéria *Xylella fastidiosa* presente em cigarrinhas, espera-se que algumas metodologias devam ser mudadas e/ou melhoradas para que os resultados obtidos tenham um maior grau de confiabilidade.

Tabela 1 Número de cigarrinhas e cigarrinhas positivas para os testes de PCR, capturadas em pomares contaminados por CVC, na região Noroeste do PR., entre junho de 2005 a setembro de 2006.

Número de Cigarrinhas		
Espécies	Protocolo I	Protocolo II
<i>Dilobopterus costalimai</i>	75/2	83/0
<i>Acrogonia citrina</i>	51/1	52/0
<i>Bucephalogonia xanthophis</i>	9/0	9/0
<i>Oncometopia facialis</i>	2/0	1/0
<i>Sonesimia grossa</i>	2/0	2/0
<i>Macugonália leucomelas</i>	3/0	3/0
<i>Homalodisca ignorata</i>	1/0	0/0
<i>Hortencia similis</i>	1/0	0/0
<i>Macugonália cavifrons</i>	11/0	12/0
Total	155/3	162/0

Protocolo I= Hung *et al.* (2004); Protocolo II= Ciapina & Lemos (2004)

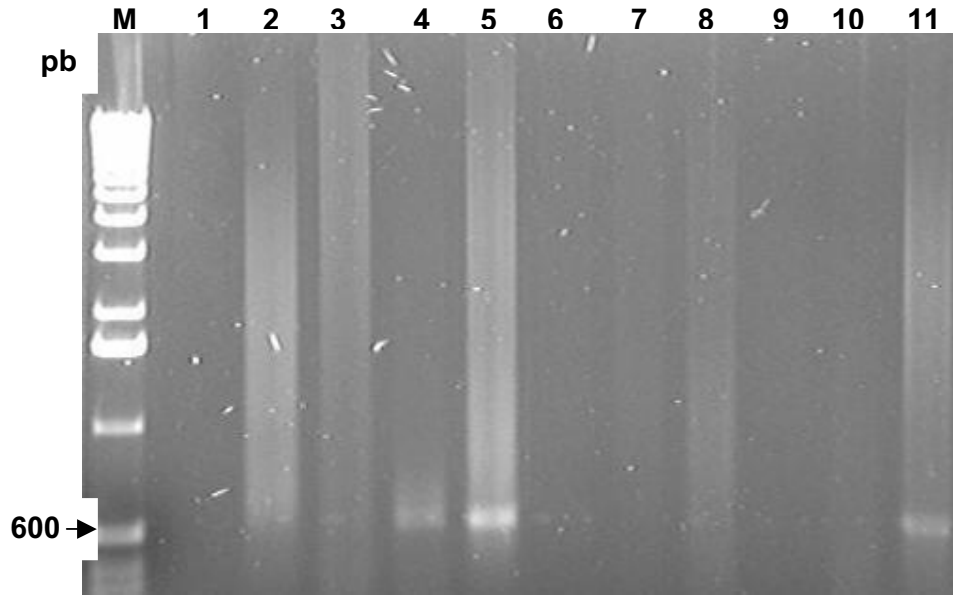


Figura 1 Produtos de *Nested* PCR, obtidos após amplificação do DNA das amostras de cigarrinhas capturadas no sítio Laranjeiras I, Nova Esperança PR., entre junho de 2005 a setembro 2006. M= marcador peso molecular (1-Kb DNA ladder (Invitrogen®)); 1= controle positivo de cigarrinha; 2= controle negativo de cigarrinha; 3 a 10 amostras de cigarrinhas; e 11=controle positivo de folhas com CVC.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos, em relação aos testes moleculares, apontaram para extração com protocolo I, a base de fenol e clorofórmio, como sendo a melhor forma para a detecção de bactéria *X. fastidiosa* nas cigarrinhas *D. costalimai* e *A. citrina*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEXTINE, B.; SHU-JEN, T.; HARRIS, S.; MATTHEW, B.; MILLER, T.A. Evaluation of methods for extracting *Xylella fastidiosa* DNA from the Glassy-Winged Sharpshooter. **Entomological Society of America**, v.97, p757-763, 2004.
- CIAPINA, L.P.; CARARETO ALVES, L.M.; LEMOS, E.G.M. A nested-PCR assay for detection of *Xylella fastidiosa* in citrus plants and sharpshooter leafhoppers. **Journal of Applied Microbiology**, v.96, p.546-551, 2004.
- HILL, B.L.; PURCELL, A.H. Multiplication and movimento of *Xylella fastidiosa* within grape and four other plants. **Phytopathology**, v.85, p.1368-1372, 1995.
- HUNG, T.H.; HUNG, S.C.; CHEN, C.N.; HSU, M.H.; SU, H.J. Detection by PCR of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the bacterium causing citrus Huanglongbing in vector psyllids: application to the study of vector-pathogen relationships. **Plant Pathology**, v.53, p. 96-102, 2004.
- HOPKINS, D.L. Gram-negative, xylem-limited bacteria in plant disease **Phytopathology**, v.73, p.347-350, 1983.
- LOPES, J.R.S. Mecanismo de transmissão de *Xylella fastidiosa* por Cigarrinhas. **Laranja**, v.17, p.79-92, 1996.
- MARUCCI, R.C. **Eficiência de transmissão de *Xylella fastidiosa* por cigarrinhas vetoras (Hemiptera, Cicadellidae) em *Citrus sinensis* (L.) Osbeck e *Coffea arábica* L.** Tese Doutorado Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.
- POOLER, M.R.; HARTUNG, J.S. Specific PCR detection and identification of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chlorosis. **Current Microbiology**, v.31, p.134-137, 1995.
- POOLER, M.R.; MYUNG, I.S.; BENTZ, J.; SHERALD, J.; HARTUNG, J.S. Detection of *Xylella fastidiosa* in potential insect vectors by immunogenetic separation and polymerase chain reaction. **Letters in Applied Microbiology**, v.25, p.123-126, 1997.
- ROSSETTI, V.; GARNIER, M.; BERETTA, M.J.G.; TEIXEIRA, A.R.R.; QUAGGIO, J.A.; BATTAGLIA, O.C.; GOMES, M.P.; DE NEGRI, J.D. Resultados preliminares de estudos sobre uma nova anormalidade dos citros observada nos Estados de São Paulo e Minas Gerais. **Summa Phitopathologica**, v.16, p.1-13, 1990.