

RÚBIA DE OLIVEIRA MOLINA

DINÂMICA POPULACIONAL DE CIGARRINHAS VETORAS DE *Xylella fastidiosa* EM CITRUS E MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DE INFECTIVIDADE NATURAL

MARINGÁ - PARANÁ - BRASIL

AGOSTO – 2010

RÚBIA DE OLIVEIRA MOLINA

DINÂMICA POPULACIONAL DE CIGARRINHAS VETORAS DE *Xylella fastidiosa* EM CITROS E MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DE INFECTIVIDADE NATURAL

Tese 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 Doutor.

MARINGÁ - PARANÁ - BRASIL

AGOSTO – 2010

RÚBIA DE OLIVEIRA MOLINA

DINÂMICA POPULACIONAL DE CIGARRINHAS VETORAS DE *Xylella fastidiosa* EM CITRUS E MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DE INFECTIVIDADE NATURAL

Tese 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 Doutor.

APROVADA em 31 de agosto de 2010

Dra. Maria Marcelina Millan Rupp

Dra. Marialba A. A. de Castro Prado

Dr. Dauri José Tessmann

Dr. João R. Spotti Lopes

Dr. William Mário de Carvalho Nunes
(Orientador)

AGRADEÇO a Deus

*Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos,
e não tivesse Amor, seria como o metal que soa ou como o sino que
tine.*

*E ainda que tivesse o dom da profecia, e conhecesse todos os mistérios
e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que
transportasse os montes, e não tivesse Amor, nada seria.*

*E ainda que distribuísse toda a minha fortuna para sustento dos
pobres, e ainda que entregasse o meu corpo para ser queimado, se não
tivesse Amor, nada disso me aproveitaria.*

*O Amor é paciente, é benigno; o Amor não é invejoso, não trata com
leviandade, não se ensoberbece, não se porta com indecência, não
busca os seus interesses, não se irrita, não suspeita mal, não folga com
a injustiça, mas folga com a verdade.*

Tudo tolera, tudo crê, tudo espera, tudo suporta.

*O Amor nunca falha. Havendo profecias, serão aniquiladas; havendo
línguas, cessarão; havendo ciência, desaparecerá; porque, em parte
conhecemos, e em parte profetizamos; mas quando vier o que é
perfeito, então o que o é em parte será aniquilado.*

*Quando eu era menino, falava como menino, sentia como menino,
discorria como menino, mas, logo que cheguei a ser homem, acabei
com as coisas de menino. Porque agora vemos por espelho em enigma,
mas então veremos face a face; agora conheço em parte, mas então
conhecerei como também sou conhecido.*

*Agora, pois, permanecem a fé, a esperança e o amor, estes três;
mas o maior destes é o Amor.*

Coríntios 13.

A minha família

*Ao companheiro de todos os momentos
Luciano.*

*Aos meus pais:
Waldemar e Aparecida,*

*Aos meus irmãos:
Rafael e Rayam,*

*A minha irmã:
Renata,*

*A sobrinha:
Luana*

*“grandes mestres da minha vida, a cada dia me ensinam a ser
melhor...”*

Obrigada!

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, fonte inesgotável de luz que ilumina e guia todos os meus passos e sustentação nestes anos de estudo que direcionaram a obtenção deste título.

Ao professor e orientador Dr. William Mário de Carvalho Nunes, (Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada da Universidade Estadual de Maringá-NBA/UEM), por todos os anos de orientação, incentivo, confiança e principalmente, pela grande amizade.

Ao pesquisador do IAPAR, engenheiro agrônomo MSc. Luciano Grillo Gil, pela compreensão e indispensável ajuda nos experimentos de campo.

Ao engenheiro agrônomo Dr. Carlos Alexandre Zanutto (DAG/UEM), cuja ajuda foi fundamental para desenvolvimento dos trabalhos em laboratório.

A grande amiga Aline Maria Orbolato Gonçalves, pois uma grande amizade permanece até mesmo quando se está longe.

Aos colegas de todos os dias de convívio, funcionários e estagiários do NBA/UEM, técnico José Alcides Remolli e Alessandra Tenório Costa e as estagiárias: Inaiara de Souza, Jéssica L. Rodrigues e Andréia Kazumi.

Aos professores, funcionários e colegas do Centro de Treinamento de Irrigação (CTI), pela harmoniosa convivência de todos os dias de trabalho.

Aos Docentes e amigos da Pós-graduação em Agronomia (PGA) da Universidade Estadual de Maringá.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PGA) e a Capes pela concessão da bolsa de estudos.

À família Razende, sítio Nossa Senhora Aparecida, município de Nova Esperança, e à família Codale, em Mandaguaçu, sítio São José, que gentilmente disponibilizaram suas propriedades para realização dos experimentos de campo.

À Universidade Paranaense, campus Paranavaí, pela oportunidade conferida, e aos novos amigos de trabalho, professores, funcionários, alunos do curso de Ciências Biológicas, em especial, ao coordenador professor Msc. Ricardo Germano.

BIOGRAFIA

RÚBIA DE OLIVEIRA MOLINA, filha de Aparecida de Oliveira Molina e Waldemar Gimenez Molina, nascida aos vinte e três dias do mês de dezembro de 1978, na cidade de Cianorte, Estado do Paraná. Casada com Engenheiro Agrônomo Luciano Grillo Gil. Reside atualmente na cidade de Paranavaí, Paraná.

Graduada em Ciências Biológicas Licenciatura, pela Universidade Estadual de Maringá em maio de 2004. Em março de 2005, iniciou o curso de mestrado no programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração Proteção de Plantas da Universidade Estadual de Maringá, vindo a concluí-lo aos vinte e quatro dias de novembro de 2006. No mesmo ano teve início o doutorado pelo Programa de Pós-graduação em Agronomia/UEM área de concentração: Proteção de Plantas, findado em 31 de agosto de 2010.

Atuou como professora de Ciências, Química e Biologia do Núcleo Estadual de Ensino na cidade de Maringá, Estado do Paraná, em 2004. Iniciou a carreira no magistério de ensino superior como professora em 2010, no curso de Ciências Biológicas da Universidade Paranaense-UNIPAR, Paranavaí.

ÍNDICE

RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
INTRODUÇÃO GERAL	1
REVISÃO DE LITERATURA	4
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	13
CAPÍTULO-I	19
DISTRIBUIÇÃO DAS CIGARRINHAS VETORAS DE <i>Xylella fastidiosa</i> EM DOIS POMARES DA REGIÃO NOROESTE DO PARANÁ	
INTRODUÇÃO.....	21
MATERIAL E MÉTODOS.....	22
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
CONCLUSÕES.....	30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31
CAPÍTULO-II	35
DISTRIBUIÇÃO POPULACIONAL DOS VETORES (HEMIPTERA CICADELLIDAE) DA <i>Xylella fastidiosa</i> (WELLS) EM DIFERENTES VARIETADES DE LARANJA DOCE [<i>Citrus sinensis</i> (L.) OSBECK]	
INTRODUÇÃO.....	37
MATERIAL E MÉTODOS.....	39
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
CONCLUSÕES.....	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
CAPÍTULO-III	49
DETECÇÃO DA <i>Xylella fastidiosa</i> EM CIGARRINHAS VETORAS (HEMIPTERA: CICADELLIDAE) POR COMPARAÇÃO DAS TÉCNICAS DE PCR E NESTED-PCR	
INTRODUÇÃO.....	51
MATERIAL E MÉTODOS.....	52
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
CONCLUSÕES.....	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
CAPÍTULO-IV	62
PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE CIGARRINHAS VETORAS (HEMIPTERA: CICADELLIDAE) PARA DETECÇÃO DA <i>Xylella fastidiosa</i>	
INTRODUÇÃO.....	63
MATERIAL E MÉTODOS.....	64
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	68
CONCLUSÕES.....	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

RESUMO

MOLINA, Rúbia Oliveira. D.R., Universidade Estadual de Maringá, Agosto 2010. **DINÂMICA POPULACIONAL DE CIGARRINHAS VETORAS DE *Xylella fastidiosa* EM CITRUS E MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DE INFECTIVIDADE NATURAL.** Professor orientador: Dr. William Mário de Carvalho Nunes.

A citricultura desenvolve um importante papel na economia brasileira, com uma produção estimada em 19.080.755 de toneladas para o ano de 2010, destacando-se como maior produtor mundial. No entanto, é prejudicada por uma doença conhecida como Clorose variegada dos citros (CVC). Essa doença do citros 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 pertencente à ordem Hemiptera, família Cicadellidae, conhecidos como cigarrinhas, que transmite a bactéria depois de se alimentar em plantas contaminadas. Este trabalho teve como objetivo o estudo da dinâmica do comportamento populacional das cigarrinhas vetoras e a determinação de um protocolo eficiente na extração de DNA, das cigarrinhas vetoras, para detecção da bactéria através da técnica de nested-PCR. O experimento foi realizado em dois pomares comerciais de laranja doce (*Citrus sinensis*), variedades Pêra, Valência e Folha Murcha, enxertada sobre limão cravo (*Citrus limonia*), localizada nas cidades de Nova Esperança e Mandaguaçu, Paraná. Para a realização das amostragens, foram utilizadas armadilhas adesivas amarelas, distribuídas na área periférica e central dos talhões, sendo amostradas cinco ruas em cada talhão. As armadilhas foram renovadas no pomar a cada trinta dias durante o período de avaliação, entre janeiro de 2008 a abril de 2010. No estudo de comportamento, as principais espécies vetoras capturadas foram: *Acrogonia citrina* e *Dilobopterus costalimai*, no município de Nova Esperança e *Acrogonia citrina* e *Oncometopia facialis* no município de Mandaguaçu. O resultado para extração de DNA de cigarrinhas foi melhor quando utilizado a base de fenol/clorofórmio. Assim como o teste de nested-PCR foi o mais eficiente para a detecção da bactéria.

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

ABSTRACT

MOLINA, Rúbia Oliveira. D.R., Universidade Estadual de Maringá. August, 2010. **POPULATION DYNAMICS OF SHARPSHOOTERS VECTORS *Xylella fastidiosa* IN CITRUS AND ASSESSMENT METHODS INFECTED NATURALLY** Adviser: Dr. William Mário de Carvalho Nunes.

The citrus crops develop an important role in the Brazilian economy, with an estimated production of 19,080,755 tons for 2010, especially as world's largest producer. However, the citrus crop is undermined by a disease known as citrus variegated chlorosis (CVC). This disease of citrus is caused by *Xylella fastidiosa* bacterial endophytes, rod-shaped, found in xylem vessels of plants. The dissemination occurs through insect vectors belonging to the Hemiptera order, Cicadellidae family, known as leafhoppers, which transmit the bacteria after feeding on infected plants. This study aimed to investigate the dynamics of the insect vector population, and the determination of an efficient protocol for DNA extraction, the leafhopper vectors to detect the bacteria through the technique of nested-PCR. The experiment was conducted in two commercial orchards of sweet orange (*Citrus sinensis*) varieties Pêra, Valência and Folha murcha, grafted on Rangpur lime (*Citrus limonia*), placed in Nova Esperança and Mandaguaçu cities, Paraná. To carry out the sampling was used yellow sticky traps, distributed in the peripheral and central plot, five rows were sampled in each plot. The traps were renewed in the orchard every thirty days during the evaluation period, from January 2008 to April 2010. In the study of behavior the main vector species captured were: *Acrogonia citrina* and *Dilobopterus costalimai* in Nova Esperança and *Acrogonia citrina* and *Oncometopia facialis* in Mandaguaçu. The results for DNA extraction from sharpshooter were best when used the phenol/chloroform. As the test nested-PCR was more efficient for the detection of bacteria.

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

INTRODUÇÃO GERAL

A citricultura desenvolve um importante papel na economia brasileira, com uma produção estimada em 19.080.755 de toneladas para o ano de 2010, destacando-se como maior produtor mundial (IBGE, 2010).

A produção citrícola no Paraná poderia ser ainda maior, não fossem os problemas fitossanitários que estão associados à baixa produtividade. Como por exemplo, a doença clorose variegada dos citros (CVC), que é causada pela bactéria *Xylella fastidiosa* Wells et al. (LEE et al., 1993).

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. A transmissão da bactéria para plantas saudáveis ocorre após sua aquisição durante a alimentação em plantas doentes (LOPES et al., 1996).

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). *X. fastidiosa* é transmitida ao citros por insetos vetores, conhecidos como *Dilobopterus costalimai* Young, *Oncometopia facialis* (Signoret), *Acrogonia virescens* Metcalf, *Bucephalagonia xanthophis* (Berg) e *Plesiommata corniculata* Young, *Homalodisca ignorata* Melichar *Ferrariana trivittata* (Signoret), *Macugonalia leucomelas* (Walker), *Parathona gratiosa* (Branchard), *Sonesimia grossa* (Signoret) e *Fingeriana dubia* (Cavichioli) (Lopes et al., 1996; Roberto et al., 1996; Yamamoto et al., 2000; Krüger et al., 2000).

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; PURCELL et al 1979).

Durante todas as fases do seu desenvolvimento, as cigarrinhas podem transmitir a bactéria (GRAVENA et al., 1997); entretanto, a fase mais importante para a transmissão é a adulta, devido ao longo período de vida e maior mobilidade. O fato das ninfas perder 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 PURCELL e FINLAY, 1979; PURCELL et al., 1979). 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).

A bactéria *X. fastidiosa* pode ser detectada em cigarrinhas vetoras a partir da extração de DNA genômico dos insetos. Existem diversos protocolos para a extração, sendo mais utilizado o método com fenol-clorofórmio, seguido do uso da técnica da reação da polimerase em cadeia (PCR) (HILL & PURCELL, 1995), que é baseada no uso de iniciadores (“primers”) específicos (POOLER & HARTUNG, 1995). Essa técnica vem sendo utilizada amplamente para detecção da bactéria em insetos vetores da CVC, (FRANCIS et al., 2006; CIAPINA et al., 2004; MARUCCI, 2003).

Roberto e Yamamoto (1998) defendem que conhecer a flutuação populacional 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 conhecer a dinâmica populacional das espécies chaves, mas, também, analisar a probabilidade de transmissão e infecção das plantas cítricas em diferentes épocas do ano.

Nunes et al. (2007) 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.

No entanto, são necessários mais estudos nesta região, em função das poucas informações a respeito da dinâmica populacional das cigarrinhas e dos poucos trabalhos desenvolvidos para a identificação correta das espécies, biologia, ecologia, transmissão e controle químico e biológico em pomares cítricos.

Portanto, como o número de espécies de cigarrinhas com capacidade de transmitir o fitopatógeno tem aumentado ao longo dos anos, trabalhos sistemáticos mais abrangentes tornam-se cada vez mais necessários para identificação precisa desses insetos.

As informações sobre cicadelídeos são de fundamental importância para o Paraná, uma vez que a citricultura tem papel relevante na economia deste Estado. Problemas que possam ser causados por esses insetos, mesmo que em pequenas propriedades, podem ocasionar prejuízos relevantes. Para determinar épocas de maior ocorrência das espécies nos pomares do noroeste do Paraná assim como períodos de maior infectividade natural na população dos vetores, ou seja, informações ecológicas que permitam um manejo mais eficiente da doença. Assim, contribui para um levantamento de informações relevantes para o estudo dos vetores da CVC na região noroeste do Paraná.

Este trabalho tem por objetivo o estudo da flutuação populacional das cigarrinhas vetoras e a determinação de um protocolo eficiente para detecção da bactéria através da técnica de nested-PCR.

REVISÃO DE LITERATURA

Clorose variegada dos citros

A clorose variegada dos citros (CVC) é causada pela *Xylella fastidiosa* Wells a bactéria está presente nos vasos do xilema das plantas (CHANG et al., 1993). No Brasil, as primeiras observações 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). No Sergipe, a CVC foi relatada em 1996 (LARANJEIRA et al., 1996). Em Santa Catarina (LEITE JUNIOR et al., 1996) e Paraná (LEITE et al., 1993; NUNES et al., 2001).

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 pequenos e baixa produção das árvores (GARCIA JUNIOR et al., 1995). Inicialmente ocorrem pequenos pontos amarelos nas folhas 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). Os sintomas apresentam-se nas folhas mais desenvolvidas com manchas cloróticas de cor palha na página dorsal. Os frutos podem ficar de tamanho reduzido, endurecido e amarelecido, que os torna impróprios 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 dos índices de pluviosidade.

Até o momento, as variedades de laranja doce (*C. sinensis*), Tangor-‘Murcott’ (*C. reticulata* X *C. sinensis* L.) e lemonimes (*C. limon* X *Citrus aurantiifolia*) são as mais suscetíveis a CVC. Limas ácidas (*C. latifolia*), limões

verdadeiros (*C. lemon*), tangerinas (*C. reticulata* Blanco), tangelos (*C. reticulata* Blanco X *C. paradisi* Macf), pomelos (*C. paradisi*), toranjas (*C. grandis*) e limão rugoso (*C. 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 *C. sinensis*), citrumelo 'Swingle' (*C. paradisi* x *P. trifoliata*) e limão 'cravo' (*C. limonia*), não apresentaram sintomas ou reação sorológica positiva para *X. fastidiosa* (MACHADO et al., 2005; LARANJEIRA et al., 1995).

Estudos sobre a *Xylella fastidiosa*

A bactéria *X. fastidiosa* é o agente causal da CVC, considerada membro do Reino Bactéria, grupo Proteobactéria, subgrupo gammaproteobacteria, classe Xanthomadales, família Xanthomonadaceae, sendo o único representante do Gênero *Xylella* (SHAAD et al., 2004).

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, aflageladas, oxidase negativa e catalase positiva, aeróbicas estritas, não halofíticas e não pigmentadas, nutricionalmente fastidiosas, sendo a temperatura ótima para o crescimento ao redor de 26-28°C, e pH ótimo 6,5-6,9 (WELLS et al., 1987).

Além do citros, essa bactéria infecta cafeeiro (*Coffea arábica* L.), causando sintomas de escaldadura da folha sendo que há muito tempo esses sintomas eram atribuídos ao estresse nutricional devido a altas produções (PARADELA FILHO et al., 1995). Segundo Queiroz-Voltam et al. (2004; 2005), no Brasil, a bactéria teria sido disseminada das plantas de cafeeiro para o citros, devido a 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 responsáveis pela transmissão da bactéria.

Recentemente, Schaad et al. (2004) propuseram a divisão da espécie em três subespécies através da análise dos genes 16S e 23S (ITS) onde a subsp. *piercei* compreende as cepas de videira (*Vitis* spp.), alfafa (*Medicago*

sativa L.) algumas amendoeiras (*Prunus dulcis* [Mill] D.A. Webb) e Acer (*Acer* sp.), com 85% de similaridade entre elas. A subesp. *multiplex* inclui as de pêssigo (*Prunus persicae*), Ulmeiro (*Ulmus* sp), ameixeira (*Prunus* sp.) e plátano (*Platanus* sp), com 84% de similaridade. Na subesp. *pouca* encontram-se apenas os isolados de *X. fastidiosa* de citrus, com 87% de similaridade.

No Brasil, existem outras doenças de plantas de interesse agrícola, causadas pela bactéria *X. fastidiosa*, como a atrofia dos ramos do cafeeiro (PARADELLA FILHO et al., 1995), a escaldadura da folha de ameixeira (KITAJIMA et al., 1981) além de doenças relacionadas em diversas plantas daninhas como guanxuma, capim pé de galinha e braquiária (HARAKAVA et al., 1994, LOPES 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). No entanto, propõe-se que seja através da disfunção do sistema da condução de água ou produção de fitotoxina. Evidências apóiam a hipótese de que o mecanismo de patogenicidade seja a oclusão vascular causada pelo agregamento de bactérias, que resulta em um bloqueio no transporte de água. A propagação sistêmica da bactéria é limitada as membranas *pit* que separam um vaso do xilema de outro adjacente. O patógeno atravessa esta membrana através da digestão de pectina que, adicionalmente, podem ser usadas como fonte de nutrientes que suplementariam a baixa quantidade de nutrientes disponíveis no xilema (CHATTERJEE et al., 2008).

Insetos vetores de *Xylella fastidiosa*

A *X. fastidiosa* é dependente principalmente da ação de insetos vetores para sua disseminação natural e inoculação em plantas hospedeiras.

Sua transmissão ocorre através de várias espécies de cigarrinhas incluídas em cicadellidae (cicadellinae) e Cercopidae. Estes insetos se especializaram em se alimentar no xilema e tem-se mostrado os mais capazes

em transmitir o fitopatógeno de planta a planta (PURCELL, 1989; LOPES, 1996).

Os cicadelíneos (Hemiptera: cicadellidae: cicadellinae) constituem um grupo grande e diversificado, que dificulta a caracterização dos seus integrantes. As espécies apresentam um comprimento variado, desde 3,4 mm até 22 mm, com cores vistosas e contrastantes. Até onde se sabe, todas se alimentam no xilema (YOUNG, 1968).

Os caracteres que diferenciam a subfamília cicadellinae dos demais cicadelídeos são ocelos localizados na parte dorsal da cabeça, frequentemente, mais próximos da margem posterior que do ápice ou da margem antero-lateral; corpo geralmente achatado dorso-ventralmente; asas anteriores com a margem externa da célula apical interna paralela ao eixo longitudinal da asa; tibia posterior com quatro fileiras regulares de macrocerdas; proepisterno exposto; e suturas clipeais laterais (sutura frontogenal) (YOUNG, 1968; MEJDALANI, 1998).

Pertencentes a ordem Hemiptera, Subordem Auchenorrhyncha, Superfamília Cicadelloidea, a maioria das espécies está inseridas em duas grandes famílias, Cicadellidae (Jassidae) (leafhoppers) e Membracidae (treehoppers). Os Cicadelídeos são cosmopolitas (20.000 espécies) com formas em grande escala da subordem homoptera, são encontrados sobre aproximadamente todos os tipos de plantas e causam variadas injúrias (GILLOTT, 2005).

A subfamília Cicadellinae (Família Cicadellidae) compreende duas tribos Proconiini e Cicadellini (YOUNG, 1968). A primeira contendo os maiores exemplares de cicadelíneos está restrita ao hemisfério ocidental (YOUNG, 1968), possui atualmente 56 gêneros e aproximadamente 350 espécies válidas. A segunda, com maior número de espécies, ocorre em todas as regiões zoogeográficas (NIELSON, 1985), sendo a região neotropical (América do Sul) a mais rica em espécies (MELICHAR, 1924; YOUNG, 1997).

Trabalhos no Brasil mostraram que ao longo dos anos houve um aumento significativo no número de cicadelídeos vetores, trazendo preocupações aos produtores extencionistas e pesquisadores. No início das pesquisas, apenas três espécies foram confirmadas e atualmente cerca de 12 são comprovadamente capazes de transmitir a bactéria *X. fastidiosa*, que tem

causado graves prejuízos à cultura de citros (LOPES et al., 1996; ROBERTO et al. 1996; YAMAMOTO & ROBERTO, 1997; LOPES, 1999; YAMAMOTO et al., 2000).

Entre as diversas cigarrinhas que ocorrem em citros, as espécies comprovadamente vetoras são: *Dilobopterus costalimai* Young, *Oncometopia facialis* (Signoret), *Acrogonia terminalis* Young (*sensu*) (LOPES et al., 1996; ROBERTO et al., 1996), *Bucephalogonia xanthophis* (Berg) e *Plesiommata corniculata* Young (KRUGNER et al., 1998). Posteriormente, comprovou-se que também eram vetoras de *X. fastidiosa* as seguintes espécies: *Acrogonia virescens* (Metcalf), *Homalodisca ignorata* Melichar (YAMAMOTO et al., 2000), *Ferrariana trivittata* (Signoret), *Macugonalia leucomelas* (Walker), *Parathona gratiosa* (Blanchard), *Sonesimia grossa* (Signoret) (FUNDECITRUS, 1999) e *Fingeriana dubia* (Cavichioli) (YAMAMOTO et al., 2007).

No Brasil, os estudos com as vetoras 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 (2009) 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).

Ecologia das cigarrinhas vetoras

As cigarrinhas são atraídas pela coloração amarela e, portanto, essa cor tem sido utilizada em armadilhas adesivas (PURCELL, 1994).

Na Flórida, populações de cigarrinhas tendem a aumentar sazonalmente. As plantas jovens são particularmente atrativas para os adultos de cigarrinhas, que podem ser encontrados sobre os galhos verdes. As espécies mais comuns apresentam longevidade do adulto acima de 65 dias, diversas gerações/ano. (BROWNING et al., 1995).

Estes animais movimentam-se rapidamente nas horas mais quentes do dia, sendo mais ágeis. Ao amanhecer, principalmente nos dias mais frios, seus movimentos se tornam mais lentos. Elas têm preferência pela face da planta onde não incidem diretamente os raios solares e pelas brotações do ponteiro, que se sobressaem (GRAVENA et al., 1997).

Molina et al. (2010); Gonçalves et al. (2008) e Molina (2006) relataram estudos no Estado do Paraná, com cigarrinhas Cicadelinae, onde as espécies mais encontradas foram *A. citrina*; *D. costalimai*, *M. leucomelas*, *M. cavifrons* e *O. facialis*, nas cidades de Nova Esperança, Paranavaí e Loanda, região Noroeste.

Estudos de flutuação populacional de cigarrinhas em pomares de citros no Estado de São Paulo indicaram um aumento da população em dezembro, com picos no verão e outono e decréscimo acentuado no período de agosto a novembro (inverno e primavera) (PAIVA et al., 1996; LOPES, 1996; GARCIA et al.; 1997). Nunes et al. (2007) constataram que, em pomares do Paraná, a população de cigarrinhas aumenta a partir de novembro ou início do verão e diminui nos meses mais frios.

Aparentemente, ocorrem condições desfavoráveis para o desenvolvimento das cigarrinhas em citros no final do inverno e início da primavera, acarretando mortalidade desses insetos e ou movimento para plantas hospedeiras alternativas em outros habitats. Além da possível migração, esses insetos têm inimigos naturais eficientes, como himenópteros parasitóides de ovos e predadores de ninfas como aranhas (PAIVA et al., 1996).

O conhecimento da dinâmica populacional, das exigências térmicas e hídricas, bem como do seu habitat e hospedeiros alternativos é 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, reprodução, longevidade e comportamento alimentar (MILANEZ et al., 2005). No campo, as diferentes condições climáticas podem influenciar o comportamento, abundância e distribuição dos insetos, sendo a sazonalidade um dos fatores fundamentais para a distribuição ecológica dos animais (CIVIDANES & PARRA, 1994).

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, podendo ser liberada e inoculada em outras plantas cítricas ou em plantas hospedeiras nas futuras alimentações do inseto (PURCELL, 1994). A transmissão de *X. fastidiosa* se dá de forma persistente e não circulativa, somente as cigarrinhas adultas podem transmitir a bactéria, esta, por sua vez, encontra-se restrita à parte anterior do tubo digestivo (estomodeu) das cigarrinhas, aderida ao forro cuticular do pré-cibário, do cibário e da porção anterior do esôfago (PURCELL et al., 1979; BRLANSKY et al., 1983).

As cigarrinhas das famílias Cercopidae e Cicadellidae (subfamília Cicadellinae), que se especializaram evolutivamente em se alimentarem da seiva do xilema, são a únicas relatadas como vetoras da bactéria. 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 pequena 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 *B. xanthophis*, com cerca de 12% (KRUGNER et al., 2000). Provavelmente, esta ineficiência na transmissão relaciona-se com uma pequena taxa de aquisição e/ou inoculação da bactéria pelos vetores, ou ainda, a uma reduzida taxa de sobrevivência de infecções iniciais de *X. fastidiosa* em citros, após sua inoculação. Existe ainda a possibilidade de a bactéria estar em pouca concentração na planta cítrica, que poderia, indiretamente, reduzir a eficiência de aquisição pelas cigarrinhas (LOPES, 1999).

No caso da transmissão de *X. fastidiosa* em videira ('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 et al., 1979). Mais recentemente, Marucci et al. (2008) relataram eficiência de 30% para *Homalodisca ignorata*.

A capacidade de transmissão de *X. fastidiosa*, pelas cigarrinhas da subfamília Cicadellinae, deve-se ao fato desses insetos se alimentarem única e exclusivamente do xilema. Como a maioria dos representantes da ordem Hemiptera, esses insetos são fitófagos, alimentam-se por sucção da seiva dos brotos, folhas, pecíolos, hastes e mesmo raízes expostas, de acordo com as preferências da cada espécie. As ninfas alimentam-se nas folhas e os adultos utilizam troncos, hastes, pecíolos e pedúnculos das plantas. Eliminam copiosas quantidades diluídas de "honeydew", sendo, por essa razão, chamada frequentemente de "sharpshooters" (WILSON & CLARIDGE, 1991).

A espécie *D. costalimai* se alimenta da haste de brotações dos citros, a *O. facialis* também suga a haste de brotações ou ramos novos, enquanto *A. citrina* alimenta-se principalmente de folhas novas (LOPES, 1996). Uma clara associação tem sido observada entre alimentação no xilema e habitat das cigarrinhas e sua habilidade na transmissão da *X. fastidiosa*.

Reação da polimerase em cadeia (PCR)

A reação da polimerase em cadeia (PCR) é uma técnica que permite amplificação *in vitro* de sequências específicas de DNA e foi criada em 1983 por Mullis, citado por Lopes & Damann 1994. Na fitopatologia desde 1989, a técnica de PCR é utilizada como uma ferramenta no estudo de viróides, vírus, nematóides, bactérias, espiroplasma e fungos (BATISTA 1993). No Brasil, a técnica foi introduzida em 1992 e é utilizada para fins taxonômicos e para diagnose de fitopatógenos. Para estudos 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 (MINSAVAGE et al., 1994; BERETTA et al. 1997 e POOLER e HARTUNG, 1999).

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 (oligonucleotídeos, "primers") são fornecidos (BRIOSO 2000). Pode-se resumir que é a amplificação exponencial *in vitro* de uma determinada sequência alvo de DNA (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1996). A técnica é estritamente qualitativa (ausência ou presença), sendo incapaz de precisar a quantidade da sequência alvo na amostra (OLIVEIRA et al., 2004).

Pode ser utilizado como amostra para extração do ácido nucléico, tecido vegetal (oriundo de qualquer parte da planta), infectada com algum fitopatógeno. Os iniciadores ("primers") são confeccionados a partir de sequências ao acaso de nucleotídeos (BRIOSO, 2000).

Em muitas doenças de plantas, incluindo espécies de reduzida concentração populacional e em materiais propagativos assintomáticos, como é o caso da *X. fastidiosa* e também em borbulheiras de laranjeiras contaminadas, as bactérias podem ser identificadas através do emprego da técnica de PCR (NUNES, 1999).

O uso de técnicas moleculares para detectar *X. fastidiosa* nos insetos vetores tem sido prejudicado pela presença de inibidores da PCR nos extratos de insetos. Outro fato que pode dificultar a detecção da bactéria em amostras de insetos é a pouca quantidade de células bacterianas presente nos insetos (CIAPINA et al., 2004).

A técnica de imunocaptura remove 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 *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.

A PCR é uma técnica promissora no estudo da detecção de *X. fastidiosa* por cigarrinhas, tendo sido confirmada a sua presença em *O. facialis*,

Acrogonia sp e *D. costalimai*. Miranda et al. (2000) e Marucci (2003), por meio da técnica de *nested*-PCR, com oligonucleotídeos específicos para amplificação da *X. fastidiosa* em cigarrinhas vetoras, conseguiram resultados satisfatórios para *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.
- 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.
- CHATTERJEE, S.; ALMEIDA, R.P.; LINDOW, S. Living in two worlds: the plant and insect lifestyles of *Xylella fastidiosa*, **Annual Review Phytopathology**, v. 46, p.243-71, 2008.
- 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), 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.
- GONÇALVES, A.M.O.; MOLINA, R.O.; NUNES, W.M.C.; CORAZZA-NUNES, M.J., ZANUTTO, C.A. Incidência de *Dilobopterus costalimai* Young e *Acrogonia citrina* Marucci & Cavichioli no noroeste do Paraná. **Acta Scientiarum**, v.30, n.3, p.321-324, 2008.

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.

GILLOT, C. **Entomology**. 3. ed. Netherlands: Springer, p. 2005.

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.

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.

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

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA-IBGE. **Levantamento sistemático da produção agrícola**. Disponível em < <http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 02 março 2010.

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 phatogenicity of *Xylella fastodiosa*, 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.

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

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 arábica* L.** Tese Doutorado. Escola superior de agricultura "Luiz de Queiroz" Universidade de São Paulo, Piracicaba, p.139, 2003.

MEJDALANI, G.L. Scopogomalia Paula Young, 1977: Morphology of the female genitalia and comparative notes on the *Juliaca* generic group (Homoptera, Cicadellidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 39, n.1, p.193-202, 1995.

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.; LOPES, J.R.S.; NASCIMENTO, A.S.; Santos, J.L.; CAVICHIOLI, R.R. Levantamento populacional de cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae) associadas à transmissão de *Xylella fastidiosa* em pomares cítricos do Litoral Norte da Bahia. **Neotropical Entomology** (Impresso), v. 38, p. 827-833, 2009.

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.; NUNES W.M.C.; GONÇALVES A.M.O.; ZANUTTO C.A. Populational fluctuation of vectors of *Xylella fastidiosa*, Wells in sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] varieties of northwest Paraná State, Brazil. **Brazilian Archives Biology and Technology** v. 53, p. 549-554, 2010.

MOLINA, R.O.; NUNES, W.M.C.; SUZUKAWA, A.K. Estudo Populacional de cigarrinhas vetoras de *Xylella fastidiosa*, na região noroeste do Paraná. **Summa Phytopatologica**, v.35, (suplemento) p.131, 2009.

MOLINA, R.O. **Estudo populacional das cigarrinhas vetoras de *Xylella fastidiosa* em pomares cítricos da região Noroeste do Paraná.** Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Maringá, 2006, 59 p.

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.

NIELSON, M. W. Leafhoppers systematics. In: NAULT, L.R.; RODRIGUEZ, J.G. (Ed.) The leafhoppers and Planthoppers. New York: John Wiley, p.11-39, 1985.

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.

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 Agrônômicas da UNESP Botucatu, 1999, 144p.

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.; HARAKAWA, 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.; 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.

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

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.

SCHAAD, W.; POSTNIKOVA, E.; LACY, G.; FATMI, M.; CHANG, C.J. *Xylella fastidiosa* subspecies: *X. fastidiosa* subsp. [correction] *fastidiosa* [correction] subsp. nov., *X. fastidiosa* subsp. multiplex subsp. nov., and *X. fastidiosa* subsp. pauca subsp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**. v.27, n.6, p.763, 2004.

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 bacteria related to *Xanthomonas* spp. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.37, p.136-143, 1987.

WILSON, M.R.; CLARIDGE, M.F. Handbook for identification of leafhoppers and planthopper. Wallingford: CAB International, Natural Resources Institute, **Nymphal Identification**. p.121-128, 1991.

YOUNG, D.A. taxonomic study of the Cicadellinae. Part 1, Proconiini. Washington: United States national Museum. p.267, 1968.

YOUNG, D.A. Taxonomic study of the Cicadellinae (Homoptera: Cicadellidae) Part2, New Word Cicadellini and genus Cicadella. Washington: North Carolina Agricultural Experiment Station, p.1135, 1997.

YAMAMOTO, P.T.; ROBERTO, S.R.; PRIA-JÚNIOR, W.D.; FELIPPE, M.R.; MIRANDA, V.S.; TEIXEIRA, D.C.; LOPES, J.R.S. Espécies e flutuação populacional de cigarrinhas em viveiro de citros, no município de Mogui-Guaçu-SP. **Revista brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.24, n.2, p.389-394, 2002.

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, 2000.

CAPÍTULO-I

RESUMO

DISTRIBUIÇÃO DAS CIGARRINHAS VETORAS DE *XYLELLA FASTIDIOSA* EM POMARES DA REGIÃO NOROESTE DO PARANÁ

A Clorose Variegada dos Citros (CVC) é uma das mais graves doenças na cultura dos citros no Brasil. Relatada em 1987, nos municípios do Noroeste paulista e da região do Triângulo Mineiro. A CVC é causada pela bactéria *Xylella fastidiosa*, que vive limitada ao xilema e é transmitida por insetos vetores (Hemiptera: Cicadellidae). Estes vetores podem inocular a bactéria em plantas sadias, após se alimentarem em plantas contaminadas. O objetivo deste trabalho foi identificar as espécies de cigarrinhas vetoras e sua flutuação populacional em pomares comerciais da região noroeste do Paraná. Os experimentos foram realizados em dois pomares comerciais de laranja doce (*Citrus sinensis*), enxertadas sobre limão 'Cravo' (*Citrus limonia*) variedades 'Pêra', 'Valência' e 'Folha Murcha'. Para realização da amostragem foram utilizadas armadilhas adesivas amarelas, distribuídas em cinco ruas de cada talhão com duas repetições por rua, sendo uma na 5ª planta e outra na 50ª planta de cada rua, as mesmas foram coletadas e renovadas no pomar a cada trinta dias. O período de coleta foi de janeiro de 2008 a fevereiro de 2010. As espécies mais capturadas foram *Acrogonia citrina*, *Dilobopterus costalimai*, *Oncometopia facialis*.

Palavras chave: Clorose Variegada dos Citros, Cicadellinae, *Citrus sinensis*

SUMMARY

Distribution of the sharpshooter vectors of *Xylella fastidiosa* in orchards in the Paraná northwest.

The Citrus Variegated Chlorosis (CVC), in Brazil, is one of the most serious citrus disease. Discovered in 1987 in São Paulo and Minas Gerais State, the CVC is caused by a fastidious bacterium *Xylella fastidiosa* that inhabits the xylem and transmitted by insect vectors (Hemiptera: Cicadellidae), these vectors may inoculate bacteria on healthy plants after feeding on infected plants. The objective of this study was to identify the species of sharpshooters and their population fluctuation in commercial orchards in the northwestern of Paraná State. The experiments were conducted in two commercial orchards of Pêra, Valência and Folha Murcha sweet orange (*Citrus sinensis*) grafted on Rangpur lime (*Citrus limonia*). To perform the sampling yellow sticky traps were used, distributed in five row of each orchard, with two repetitions per row. The first trap was placed on the 5th tree and the second trap was placed on the 50th tree of each row. The traps were collected and exchanged in the orchard every thirty days. The assessment period was from January 2008 to February 2010. The main species caught were *Acrogonia citrine*, *Dilobopterus costalimai* and *Oncometopia facialis*.

Keywords: Citrus Variegated Chlorosis, Cicadellinae, *Citrus sinensis*

INTRODUÇÃO

A Clorose variegada dos citros (CVC) ou “amarelinho” é uma doença causada pela bactéria *Xylella fastiosa* (WELLS et al., 1987), limitada ao xilema e gram-negativa (HARTUNG et al., 1994).

Foi constatada pela primeira vez no Brasil em 1987, nos municípios do noroeste paulista (ROSSETTI et al., 1990; ROSSETTI & De NEGRI, 1990) e no triângulo mineiro. Posteriormente, a sua incidência foi relatada 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’.

Machado et al. (1994) relatam que plantas afetadas pelo CVC apresentam sintomas de deficiência hídrica associada à diminuição na fotossíntese, na transpiração, na condutividade estomática e no potencial hídrico, provavelmente os sintomas de déficit hídrico apresentado pelas plantas são causados pelo aumento na resistência ao fluxo de água nos vasos do xilema. Os sintomas da CVC são manchas necróticas e amarelecimento das folhas. Em plantas muito afetadas, notam-se, com bastante frequência, galhos salientes na parte superior da copa, com folhas e frutos miúdos e algumas desfolha nos galhos ponteiros (ROSSETTI & De NEGRI, 1990).

X. fastidiosa é transmitida ao citros por insetos vetores, conhecidos como cigarrinhas (Hemiptera Cicadellidae), da subfamília Cicadellinae, capazes de transmitir a bactéria ao se alimentarem em plantas contaminadas, *Dilobopterus costalimai* Young, *Oncometopia facialis* (Signoret), *Acrogonia virescens* Metcalf, *Bucephalogonia xanthophis* (Berg) e *Plesiommata corniculata* Young, *Homalodisca ignorata* Melichar *Ferrariana trivittata* (Signoret), *Macugonalia leucomelas* (Walker), *Parathona gratiosa* (Branchard), *Sonesimia grossa* (Signoret), e *Fingeriana dubia* (Cavichioli) (LOPES et al., 1996; ROBERTO et al., 1996; YAMAMOTO et al., 2000; KRUGNER et al., 2000).

Para Maruyama et al. (2006), os estudos da distribuição espacial das populações de insetos são importantes, uma vez que as atuais recomendações, sobre amostragem de cigarrinhas para a tomada de decisão, visando o controle desses insetos, não estão sustentadas por um 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 do comportamento de doenças de citros e da população de 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), tendo em vista que as informações sobre cicadelídeos são de fundamental importância para o Paraná, uma vez que a citricultura tem papel relevante na economia deste Estado. Problemas que possam ser causados por esses insetos, mesmo que em pequenas propriedades, podem ocasionar prejuízos relevantes.

O objetivo deste trabalho foi identificar as espécies de cigarrinhas vetores da *X. fastidiosa* e sua flutuação populacional em pomares comerciais de laranja doce [*C. cinensis* (L.) Osbeck], na região noroeste do Paraná.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram instalados em dois pomares comerciais de laranja doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck], variedades 'Pêra', 'Valência' e 'Folha Murcha', enxertada sobre limoeiro 'Cravo' (*Citrus limonia* Osbeck), localizados em duas propriedades na região noroeste do Paraná, municípios de Mandaguaçu e Nova Esperança, sendo avaliados um talhão de cada variedade e cada talhão com aproximadamente 1000 plantas de 10 anos de idade. O levantamento de cigarrinhas foi realizado entre janeiro de 2008 a fevereiro de 2010.

Durante o experimento, os tratamentos culturais nos talhões das duas propriedades foram realizados de acordo com as recomendações agronômicas, sendo aplicado para o controle químico de cigarrinhas inseticidas à base de dimetoato (100 mL/100 litros de água) e imidacloprid (20 mL/100 litros de água). As pulverizações foram realizadas levando em consideração a recomendação, ou seja, a inspeção de 2% das plantas do talhão e o controle químico é indicada quando for constatada presença de cigarrinhas em 10% das plantas (FUNDECITRUS 2008).

Para a captura das cigarrinhas foi utilizada armadilhas adesivas amarelas (Biocontrole®) retangulares (9,0cm x 12,0cm). As armadilhas foram instaladas na face norte das laranjeiras a uma altura de 1,70 m do solo (ROBERTO et al., 1997).

Para a amostragem empregou-se uma armadilha por planta avaliada, sendo avaliadas duas plantas por rua amostrada. As armadilhas foram instaladas na (5ª planta e na 50ª) de cada rua. Em cada talão foram avaliadas cinco ruas (1º, 5º, 10º, 15º e 20º), respectivamente.

Mensalmente, as armadilhas foram substituídas por novas e as retiradas foram levadas ao Laboratório do Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada (NBA), na Universidade Estadual de Maringá. Os exemplares de cigarrinhas adultos foram retirados das armadilhas, identificados e armazenados, no NBA, em frascos de acrílico contendo álcool 70%, devidamente etiquetados. As espécies de cigarrinhas foram identificadas sob microscópio estereoscópio, com base em literatura específica (MARUCCI 1998; MARUCCI et al., 1999; MARUCCI et al., 2002). Para a identificação de alguns exemplares, contou-se com a colaboração do Prof. D. Sc. Rodney Ramiro Cavichioli, Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Para a análise faunística das cigarrinhas coletadas, foram calculados os índices de frequência e constância (SILVEIRA NETO et al., 1976, citado por RINGENBERG, 2008).

Frequência: representa a porcentagem de espécimes de uma espécie, em relação ao total de espécimes coletados na família Cicadellidae. Este índice foi calculado utilizando-se a fórmula: $F = I/T \times 100$, onde:

F= frequência (%);

I= Número de espécimes da espécie na área amostrada;

T= número total de espécimes de Cicadellidae coletados na área amostrada.

Constância: é a distribuição das espécies nas coletas, ou seja, a porcentagem de vezes que uma espécie de Cicadellidae está presente em relação ao total de coletas realizadas. Esta foi calculada pela fórmula: $C(\%)=P/N$ onde:

C= constância das espécies;

P= número de coletas contendo a espécie;

N= número total de coletas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As cigarrinhas vetores da *X. fastidiosa*, capturadas nos dois pomares da região noroeste (Nova Esperança e Mandaguaçu), foram: *A. citrina*, *D. costalimai*, *M. leucomelas*, *B. xanthophis*, *O. facialis*, *P. corniculata*, *S. grossa*, *F. trivittata* (Tabela 1 e 2).

No pomar localizado no município de Nova Esperança, foram capturadas e identificadas as espécies *A. citrina* e *D. costalimai*, que foram as mais capturadas em número de 82 e 30 espécimes, e mais freqüentes, com 15% e 6%, respectivamente, sendo que a espécie *A. citrina* foi constante, presente em 74% das coletas. *D. costalimai* foi de ocorrência acessória no pomar, estando presente em apenas 26% das coletas. Isto se deve, provavelmente, pelo fato da captura ter sido de muitos espécimes em poucas coletas. (Tabela 1).

As cigarrinhas *O. facialis*, *B. xanthophis*, *S. grossa* e *P. corniculata* foram espécies capturadas em menores números e de forma acidental no pomar (Tabela 1).

Em Mandaguaçu, os resultados foram semelhantes para as espécies mais capturadas. A espécie *A. citrina* mais capturada com 102 exemplares e 26% de frequência, presente em 82% das coletas. Em seguida, estão as espécies *O. facialis* com 35 espécimes capturados 9% de frequência e presente em 70% das coletas. A espécie *D. costalimai* foi capturada em número de 23 espécimes, 6,0% de frequência e capturada em 58% das coletas. Estas

espécies foram classificadas de acordo com a incidência em constante no pomar durante as avaliações (Tabela 2).

Coelho et al. (2008) citaram as espécies *A. citrina*; *B. xanthophis* e *O. facialis* como as mais capturadas e frequentes por meio de armadilhas adesivas amarelas em pomares comerciais de laranja localizados na cidade de Gavião Peixoto, SP. Estas espécies foram as mais abundantes, frequentes, constantes e dominantes em Chapecó, SC (MENEGATTI et al., 2008).

Nunes et al. (2007) estudaram a população de insetos vetores da *X. fastidiosa* de novembro de 1999 a março de 2004 e concluíram ser as espécies mais capturadas na região noroeste Paraná: *D. costalimai* e *A. citrina*. Molina (2006), trabalhando com levantamento populacional de cigarrinhas vetoras, também na região noroeste do Paraná, constatou a maior incidência da espécie *A. citrina* e *D. costalimai* e de ocorrência constante no período de junho de 2005 a setembro de 2006.

Santos et al. (2005) relatam que as espécies *A. citrina* e *D. costalimai* são constantes em viveiros de produção de mudas a céu aberto no Estado de Minas Gerais. Yamamoto et al. (2002) classificaram a espécie *A. citrina* como constante, representando 26,7% dos insetos capturados em viveiros de citros, enquanto a espécie *D. costalimai* ocorreu de forma acidental, representando 1,3%.

Também foram identificadas as cigarrinhas *Macugonalia cavifrons* Stal e *Hortensia similis* Walker, que são potenciais vetores da bactéria, no pomar em Mandaguaçu (Tabela 2). Ringenberg (2008) capturou a espécie *M. cavifrons* em levantamento populacional de vetores potenciais da *X. fastidiosa*, no Rio Grande do Sul.

Em Mandaguaçu, também foi capturada a espécie *Diedrocephala variegada* Fabricius, menos comum em citros (Tabela 2). Ott et al. (2006) constataram a presença desta espécie de forma acessória em pomares de Monte Negro, RS.

Em ambos os pomares foram capturadas e identificadas cigarrinhas das subfamílias Deltocephalinae e Gyponinae descritas como 'outras cigarrinhas'. Entre elas estão: *Scaphytopius* sp., *Bahita infuscata*, *Gyponinae* sp 1. Estas espécies foram capturadas de forma constante nas armadilhas, totalizando 75% das cigarrinhas capturadas em Nova Esperança e 58% das cigarrinhas

em Mandaguaçu, porém membros dessas subfamílias não se alimentam predominantemente no xilema como os membros da subfamília Cicadellinae (PAIVA et al., 1996), desta forma, não oferecem risco de transmissão da bactéria (Tabela 1 e 2).

Tabela 1 Número, frequência e constância das cigarrinhas coletadas em armadilhas adesivas amarelas, no período de janeiro de 2008 a março de 2010, no município de Nova Esperança, PR.

Cigarrinhas			
(subfamília Cicadellinae)	Nº	F%	Constância
<i>Acrogonia citrina</i>	82	15,00	Constante
<i>Dilobopterus costalimai</i>	30	6,00	Acessória
<i>Bucephalagonia xanthophis</i>	3	0,50	Acidental
<i>Oncometopia facialis</i>	9	1,40	Acidental
<i>Macugonalia cavifrons*</i>	1	0,20	Acidental
<i>Sonesimia grossa</i>	2	0,40	Acidental
<i>Plesiommata corniculata</i>	1	0,20	Acidental
<i>Diedrocephala variegata</i>	2	0,40	Acidental
Outras cigarrinhas			
Deltocephalinae e Gyponinae	419	76	Acessória
Total	549	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*.

Tabela 2 Número, frequência e constância das cigarrinhas coletadas em armadilhas adesivas amarelas, no período de janeiro de 2008 a março de 2010, no município de Mandaguaçu, PR.

Cigarrinhas			
(subfamília Cicadellinae)	Nº	F%	Constância
<i>Acrogonia citrina</i>	102	26,00	Constante
<i>Dilobopterus costalimai</i>	23	6,0	Constante
<i>Bucephalagonia xanthophis</i>	6	0,15	Acessória
<i>Macugonalia leucomelas</i>	2	0,50	Acidental
<i>Oncometopia facialis</i>	35	9,00	Constante
<i>Macugonalia cavifrons*</i>	5	1,40	Acidental
<i>Hortensia similis*</i>	3	0,80	Acidental
<i>Plesiomhata corniculata</i>	1	0,25	Acidental
<i>Ferrariana trivittata</i>	2	0,50	Acidental
<i>Diedrocephala variegata</i>	1	0,25	Acidental
Outras cigarrinhas			
	209	54	Constante
Deltocephalinae e Gyponinae			
Total	389	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 capacidade de transmissão da bactéria pelas cigarrinhas da subfamília Cicadellinae está relacionada ao fato desses insetos se alimentarem da seiva do xilema (Young, 1968). Sendo assim, estudos de incidência e comportamento destas espécies no pomar são de fundamental importância para o entendimento da transmissão da bactéria.

Em Nova Esperança, os meses de maior ocorrência das cigarrinhas foram de fevereiro a abril de 2008, sendo a espécie *D. costalimai* capturada em maior número quando comparado a *A. citrina*. Entre julho e dezembro de 2008, os números de espécies diminuem, voltam a aumentar a partir de Janeiro de 2009 sendo a espécie mais capturada *A. citrina* (Figura 1).

No pomar localizado em Mandaguaçu a captura das espécies vetoras foi diferente em relação à anterior, em Nova Esperança. Sendo irregular durante os meses de avaliação, com maior captura da espécie *A. citrina* nos meses de junho, julho, agosto e outubro de 2008, diminuindo a partir de novembro do mesmo ano. Esta espécie voltou a ser capturada em maior quantidade em maio e julho de 2009, quando comparado com os meses de setembro, outubro e novembro deste ano (Figura 2).

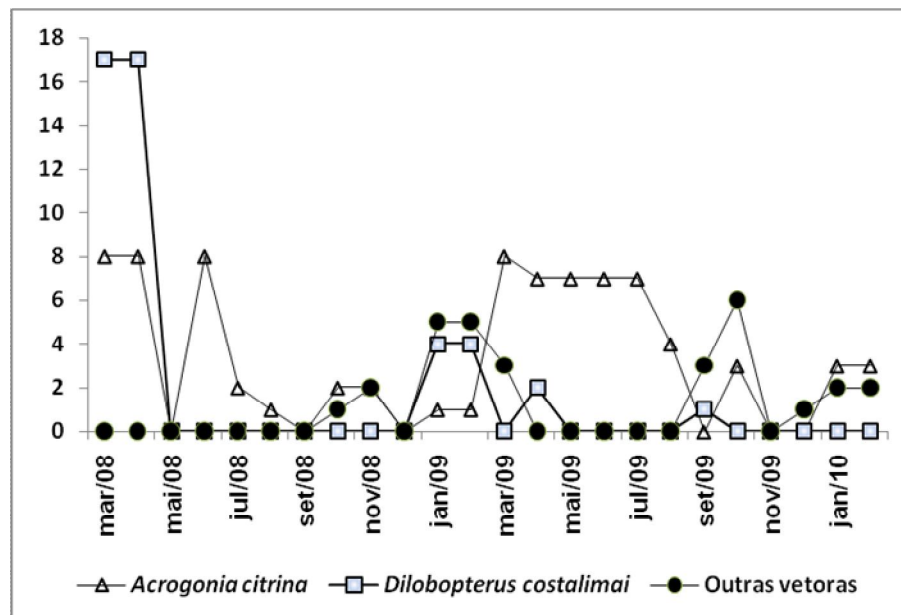


Figura 1 Número total de cigarrinhas capturadas mensalmente em laranja doce (*Citrus sinensis*), por meio de armadilhas amarelas no período de janeiro 2008 a fevereiro de 2010, em Nova Esperança, Paraná.

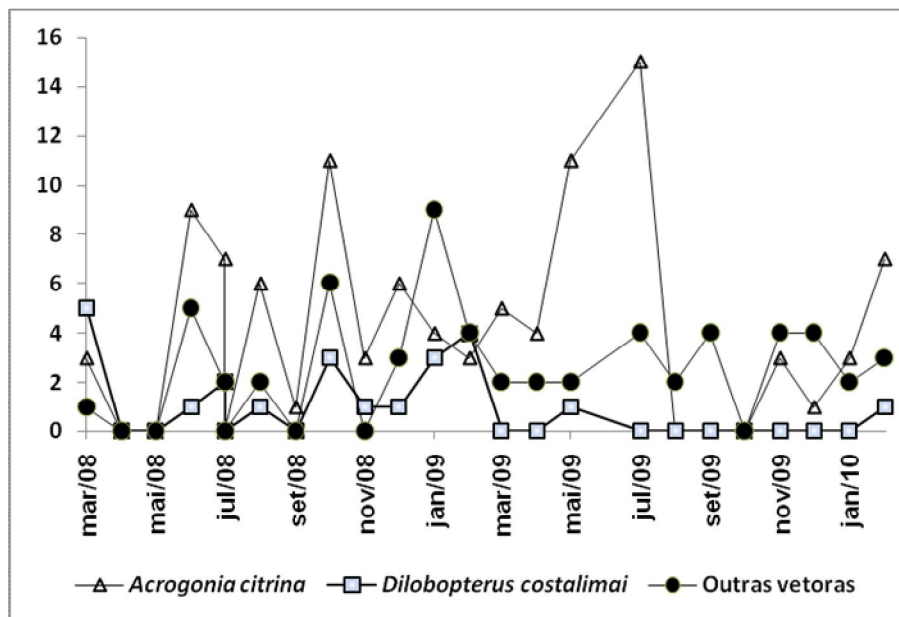


Figura 2 Número total de cigarrinhas capturadas mensalmente em laranja doce (*Citrus sinensis*), por meio de armadilhas amarelas no período de janeiro 2008 a fevereiro de 2010, em Mandaguáçu, Paraná.

Embora as temperaturas nestes meses tenham sido elevadas, a precipitação esteve acima do previsto para o período nesta região, o que se leva a pensar que as condições podem ter influenciado na captura das espécies (Figura 3). Ott et al. (2006) observaram que a comunidade apresentou maior abundância nos períodos de primavera e verão e decréscimo no outono e inverno. Este mesmo autor, Ott (2007), relata que o excesso de chuva, provavelmente, foi a razão da redução no número de indivíduos no mês de abril e seja responsável pela baixa abundância nos meses de primavera. Ott & Carvalho (2001) atribuíram o reduzido número de cigarrinhas coletadas no outono em áreas de campos nativos ao baixo índice pluviométrico registrado no período das amostragens.

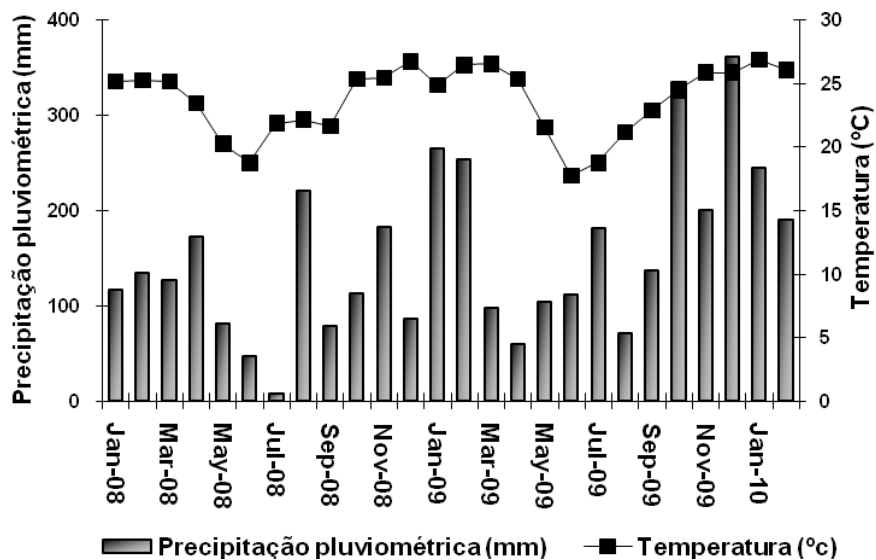


Figura 3 Médias mensais de temperatura (°C) e precipitação (mm) no período de janeiro 2008 a janeiro de 2010, na região noroeste do Paraná.

Desta forma, é correto que haja avaliação de insetos vetores, medidas de manejo de culturas perenes como a do citros, assim como o monitoramento das transformações climáticas que alteram fatores temperatura e precipitação “abióticos” que podem interferir na ecologia dos ecossistemas agrícolas.

CONCLUSÕES

As espécies mais capturadas na avaliação em dois pomares da região noroeste do Paraná são *Acrogonia citrina*, *Dilobopterus costalimai* e *Oncometopia facialis*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

COELHO, J. H.C.; XIMENES, N.L.; FELIPPE, M.R.; MONTESINO, L.H.; GARBIM, L.F.; SANCHES, A.L.; DALLA PRIA, W.JR.; YAMAMOTO, P.T. Faunistic analysis of sharpshooters (Hemiptera: Auchenorrhyncha, Cicadellidae) in a 'Westin' sweet orange Orchard. **Neotropical Entomology**, v.37, n.4, p.449-456. 2008.

HARTUNG HS, BERETTA MJG, BRLANSKY RH, SPISSO J, LEE RF Citrus variegated chlorosis bacterium: Axenic culture, pathogenicity, and serological relationships with other strains of *Xylella fastidiosa*. **Phytopathology** v. 84, p. 591-597, 1994.

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.

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.; M. J. G. BERETTA; R. HAKAKAVA; R. P. P. ALMEIDA; R. KRÜGNER & A. JR. GARCIA. (). A Confirmação da transmissão por cigarrinhas do agente causal da clorose variegada dos citros, *Xylella fastidiosa*. **Fitopatologia Brasileira**, Suplemento v.21, p. 343, 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.

MARUCCI, R.C. Espécies de cigarrinhas (Hemiptera, Cicadellidae, Cicadellinae) em pomares de citros da região de Bebedouro, SP, com descrição de uma espécie nova de *Acrogonia* Stål **Revista Brasileira de Entomologia** v.46, n. 2, p.149-164, 2002.

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.

MENEGATTI, A. C O.; GARCIA, F.R.M.; SAVARIS, M. Análise faunística e flutuação populacional de cigarrinhas (Hemiptera, Cicadellidae) em pomar cítrico no município de chapecó, Santa Catarina. **Revista Biotemas**, v.21 n.1 p.53-58, 2008.

MOLINA, R. O. **Estudo populacional das cigarrinhas vetoras de *Xylella fastidiosa* em pomares cítricos da região Noroeste do Paraná.** Dissertação e Mestrado, Universidade Estadual de Maringá, p.59, 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.

OTT, A.P. e CARVALHO, G.S. Comunidade de cigarrinhas (Hemiptera; Auchenorrhyncha) de uma área de campo do município e Viamão, Rio Grande do Sul, Brasil. **Neotropical Entomology**. v.30 n. 2, p. 233-243, 2001.

OTT, A.P.; AZEVEDO-FILHO, W.S.; FERRARI, A.; CARVALHO, G.S. Abundância e sazonalidade de cigarrinhas (hemiptera, Cicadellidae, Cicadellinae) em vegetação herbácea de pomar de laranja doce, no município de Montenegro, Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia, Série Zoologia**, v.96, n.4 p. 425-429, 2006

OTT, A.P. Constância e dominância de cigarrinhas em pomar de laranja valência com manejo ecológico no município de Montenegro, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 2, n.1, p.811-814, 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.

RINGENBERG, R. **Análise faunística de cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae) e flutuação populacional de potenciais vetores de *X. fastidiosa* em vinhedos do Rio Grande do Sul e Pernambuco, Brasil.** Tese Doutorado. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, p.100, 2008

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.; 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**, 1ª 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.

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 bacteria related to *Xanthomonas* spp. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.37, p.136-143, 1987.

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, 2000.

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, 2002.

YOUNG, D. A. Taxonomic study of the Cicadellinae (Homoptera:Cicadellidae).
Part 1. Proconiini. **United States National Museum Bulletin**, v.261, p.1-287,
1968.

CAPÍTULO-II

RESUMO

DISTRIBUIÇÃO POPULACIONAL DOS VETORES (HEMIPTERA CICADELLIDAE) DA *XYLELLA FASTIDIOSA* WELLS. EM DIFERENTES VARIEDADES DE LARANJA DOCE [*CITRUS SINENSIS* (L.) OSBECK] ‘

Desde 1987 a citricultura brasileira vem sendo prejudicada por uma doença conhecida como clorose variegada dos citros (CVC). Esta enfermidade foi constatada pela primeira vez nos municípios do noroeste paulista e da região do triângulo mineiro. Sua causa é determinada pela bactéria *Xylella fastidiosa* (Wells). Sua disseminação ocorre através de borbulhas contaminadas ou de maneira natural no pomar por meio de insetos vetores que pertencem à ordem Hemiptera, família Cicadellidae, e transmitem a bactéria depois de se alimentarem em plantas contaminadas. O objetivo deste trabalho foi identificar as espécies e avaliar a frequência e flutuação populacional das cigarrinhas vetoras de *Xylella fastidiosa* em diferentes variedades de laranja doce [*C. sinensis* (L.) Osbeck], na região noroeste do Paraná. O experimento foi realizado em um talhão comercial de laranja doce com as variedades Pêra, Valência e Folha Murcha, enxertadas sobre limão ‘Cravo’ (*C. limonia* Osbeck). A população de insetos foi monitorada através de avaliações mensais a campo, com armadilhas adesivas amarelas (Biocontrole®). Foram avaliadas sete ruas de cada variedade, em dois talhões, e foram amostradas duas plantas por rua. As armadilhas foram renovadas no pomar a cada trinta dias no período de fevereiro de 2008 a maio de 2010. As principais espécies capturadas foram *Acrogonia citrina* e *Dilobopterus costalimai*. As maiores incidências de insetos vetores capturados foram na variedade Pêra, no período de abril a julho.

Palavras chave: Clorose variegada dos citros, cicadellinae, citros.

ABSTRACT

POPULATION DISTRIBUTION OF VECTORS (HEMIPTERA CICADELLIDAE) *Xylella fastidiosa* Wells. IN DIFFERENT VARIETIES OF SWEET ORANGE [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]

Since 1987 the Brazilian citriculture has been affected by a disease known as citrus variegated chlorosis (CVC). This disease was first recorded in the northeastern São Paulo and Minas Gerais states. The CVC is caused by the bacterium *Xylella fastidiosa* Wells, and the dissemination is through contaminated bubbles or in the orchard through insect vectors that belong to the Hemiptera order, Cicadellidae family, and transmit the bacterium after feeding on infected plants. The objective of this study was to identify the species and evaluate the frequency and population fluctuation of the leafhopper vectors of *Xylella fastidiosa* on different sweet orange varieties [*C. sinensis* (L.) Osbeck] in Northwest State Paraná. The experiment was conducted in a commercial orchard of sweet orange varieties 'Pêra', 'Valência' and 'folha Murcha' grafted on Rangpur lime (*C. limonia* Osbeck). The insect population was monitored through monthly evaluations in the field, with yellow sticky traps (Biocontrol®). Seven rows were sampled on two plots of every variety, per row. The traps were renewed in the orchard every thirty days from February 2008 to May 2010. The main leafhopper species caught were *Acrogonia citrina* and *Dilobopterus costalimai*. The highest incidences of these vectors were observed on the 'Pêra' variety in the period from April to July.

Keywords: citrus variegated chlorosis, Cicadellinae, citrus.

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 no triângulo mineiro (ROSSETTI et al., 1990).

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 em penca, duros e amarelos precocemente, inadequados tanto para o mercado de frutas frescas quanto para a indústria de suco concentrado, e também galhos com desfolha nos ponteiros (MALAVOLTA et al., 1990).

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 et al., 1987) Essa bactéria pode ser transmitida de duas maneiras para as plantas: por meio de borbulhas contaminadas (COLETTA FILHO et al., 2000) e de forma natural por cigarrinhas vetoras (Hemiptera Cicadellidae). Estes insetos infestados pela bactéria a transmitem quando se alimentam, sugando a seiva do xilema das plantas (LOPES, 1996).

Onze espécies de cigarrinhas foram comprovadas como vetoras da CVC: *Dilobopterus costalimai* Young, *Oncometopia facialis* (Signoret), *Acrogonia terminalis* Young (*sensu* LOPES et al., 1996; ROBERTO et al., 1996), *Bucephalagonia xanthophis* (Berg) e *Plesiommata corniculata* Young (Krugner et al., 1998); *Acrogonia virescens* (Metcalf) e *Homalodisca ignorata* Melichar (YAMAMOTO et al., 2000), *Ferrariana trivittata* (Signoret), *Macugonalia leucomelas* (Walker), *Parathona gratiosa* (Blanchard) e *Sonesimia grossa* (Signoret) (FUNDECITRUS, 2006).

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

visando ao controle desses insetos, não estão sustentadas por um 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.

A utilização de armadilhas adesivas amarelas para amostragem de cigarrinhas, em pomares comerciais, tem sido utilizada por ser um método eficiente no monitoramento dos insetos vetores da família Cicadellidae (ROBERTO et al., 1997; MARUYAMA et al., 2002; 2006).

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 e, 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), 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 monitoramento dos insetos, com a intenção de compreender o mecanismo de ação do vetor e área de abrangência no pomar (MOLINA et al., 2010; 2006; NUNES et al., 2006).

O objetivo deste trabalho foi identificar as espécies e avaliar a distribuição espacial das cigarrinhas vetoras de *X. fastidiosa* em laranja doce [*C. sinensis* (L.) Osbeck] nas variedades Pêra, Folha Murcha e Valência, na região noroeste do Paraná.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em dois plantios comerciais de laranja doce (*C. sinensis*) variedades Pêra, Folha Murcha e Valência, enxertadas sobre limão “cravo” (*Citrus limonia* Osbeck), nos municípios de Nova Esperança e Mandaguaçu, região noroeste do Paraná. O monitoramento dos insetos foi realizado no período de fevereiro de 2008 a maio de 2010,

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 da copa das laranjeiras a uma altura de 1,70 m do solo (ROBERTO et al., 1997). Foram distribuídas na área periférica e central do pomar com duas repetições por rua amostrada (5ª e 50ª planta). Cada planta foi considerada uma unidade amostral, sendo que foram avaliados dois talhões (sete ruas) de cada variedade, totalizando 42 armadilhas por amostragem mensal. As armadilhas foram avaliadas e renovadas no pomar a cada trinta dias durante o período de avaliação.

As amostras coletadas foram levadas para o laboratório do Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada da Universidade Estadual de Maringá, onde se procedeu a retirada dos exemplares de insetos adultos das armadilhas adesivas. 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 a análise faunística das cigarrinhas coletadas, foram calculados os índices de frequência e constância (SILVEIRA NETO et al., 1976, citado por RINGENBERG, 2008).

Frequência: Representou a porcentagem de espécimes de uma espécie, em relação ao total de espécimes coletados na família Cicadellidae. Este índice foi calculado através da fórmula: $F=I/T \times 100$, onde: F= frequência (%); I=

Número de espécimes da espécie na área amostrada; T= número total de espécimes de Cicadellidae coletados na área amostrada.

A constância representou a distribuição das espécies nas coletas, ou seja, a porcentagem de vezes que uma espécie de Cicadellidae esteve presente em relação ao total de coletas realizadas. Calculada pela fórmula: $C(\%)=P/N$ onde: C= constância das espécies; P= número de coletas contendo a espécie; N= número total de coletas.

Para a análise dos dados populacionais de cigarrinhas vetoras e não vetoras nas três variedades avaliadas foi utilizado o teste de análise de correlação linear simples (Pearson, 1896), o nível de significância escolhido foi de $p= 0,05\%$, utilizando o programa SAS Institute (1996).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram identificadas sete espécies de cigarrinhas vetoras de *X. fastidiosa*, pertencentes à família Cicadellidae, subfamília Cicadellinae. Entre elas, estão as espécies: *Acrogonia citrina*, *Dilobopterus costalimai*, *Bucephalagonia xanthophis*, *Oncometopia facialis*, *Sonesimia grossa*, *Macugonalia leucomelas*, *Plesiommata corniculata*.

Desta mesma família, também foi capturada a espécie *Macugonalia cavifrons*, que é considerada vetor potencial em citros (FUNDECITRUS, 2006). E também a espécie *Diedrocephala variegata*, considerada uma espécie menos comum em citros. O estudo destas espécies é importante, visto que pertencem à subfamília cicadellinae e sua principal característica é a alimentação através do xilema (YOUNG, 1968).

Outras espécies de cicadélideos capturadas foram identificadas como “outras cigarrinhas”, entre elas as espécies *Scaphytopius* sp., *Bahita infuscata*, ambas da subfamília Deltocephalinae e *Gyponinae* sp., da subfamília Gyponinae (Tabela 1). Essas espécies foram capturadas em maior número que as vetoras, nas três variedades de laranja doce avaliadas. Porém, não são consideradas vetoras de *X. fastidiosa* para o citros, pois elas não se alimentam primariamente no xilema, como os membros da subfamília Cicadellinae (PAIVA et al., 1996).

A variedade Folha Murcha apresentou o maior número de espécies vetoras capturadas. A espécie de cicadelineo cuja maior ocorrência foi *A. citrina*, com frequência foi de 24,62% de incidência constante, seguida de *O. facialis* com 4,1% de frequência e ocorrência acidental (Tabela 1). Resultado semelhante foi obtido com a variedade Valência. A espécie mais capturada também foi *A. citrina*, com frequência de 37,9% com incidência constante. A segunda espécie mais capturada foi *O. facialis* com 4,9% de frequência e ocorrência acidental (Tabela 1).

Na variedade Pêra, os resultados demonstram que a espécie mais capturada foi *A. citrina*, com frequência de 22,4% e incidência constante. A segunda espécie mais capturada foi *D. costalimai*, com 15,7% de frequência e ocorrência constante. A espécie *O. facialis* foi a terceira em quantidade de captura com frequência de 3,2% e incidência acidental (Tabela 1).

Molina (2006), em estudo na região noroeste do Paraná, em plantios comerciais na cidade de Nova Esperança, constatou as espécies *A. citrina*, *D. costalimai* e *B. xanthophis* como as mais frequentes.

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. Igualmente, Santos (2005) descreve essas espécies em pomares de Viçosa, MG; com maior número de representantes das espécies *B. xanthophis*, *A. citrina* e *D. costalimai*.

Segundo Yamamoto et al. (2002) em viveiros de citros, na cidade de Mogi Guaçu, SP; as cigarrinhas *B. xanthophis* e *A. citrina* foram as mais frequentes e de ocorrência constante, enquanto que *D. costalimai* foi de ocorrência acidental.

Neste estudo, as outras espécies vetoras identificadas foram capturadas com menor frequência e ocorreram de forma acidental nas três variedades de laranja doce avaliada (Tabela 1).

Comparando-se as três variedades de laranjas doces avaliadas, observa-se que os números totais de insetos capturados foram maiores na variedade Pêra para cigarrinhas vetoras, assim como para as outras cigarrinhas, em comparação com as variedades Valência e Folha Murcha (Figura 1).

Tabela 1 Número, frequência e constância das cigarrinhas coletadas em pomares de laranja doce das variedades Folha murcha, Valência e Pêra por meio de armadilha adesiva amarela, nas cidades de Mandaguaçu e Nova Esperança, Paraná, no período de fevereiro 2008 a maio de 2010.

	Folha Murcha			Valência			Pêra		
Cigarrinhas vetoras									
(subfamília Cicadellinae)	Nº	F%	Constância	Nº	F%	Constância	Nº	F%	Constância
<i>Acrogonia citrina</i>	66	24,62	Constante	85	37,90	Constante	97	22,40	Constante
<i>Dilobopterus costalimai</i>	3	1,11	Acidental	5	2,1	Acidental	68	15,70	Constante
<i>Oncometopia facialis</i>	11	4,10	Acidental	11	4,90	Acidental	14	3,23	Acidental
<i>Bucephalagonia xanthopis</i>	4	1,49	Acidental	2	0,89	Acidental	5	1,15	Acidental
* <i>Macugonalia cavifrons</i>	1	0,37	Acidental	2	0,89	Acidental	3	0,69	Acidental
<i>Plesiomata corniculata</i>	1	0,37	Acidental	1	0,44	Acidental	1	0,23	Acidental
<i>Sonesimia grossa</i>	2	0,74	Acidental	3	1,33	Acidental	0	0,00	–
<i>Diedrocephala variegata</i>	1	0,37	Acidental	2	0,89	Acidental	0	0,00	–
<i>Macugonalia leucomelas</i>	2	0,74	Acidental	0	0,00	–	0	0,00	–
Outras cigarrinhas									
Deltocephalinae e Gyponinae	177	66,00%	Constante	113	50,40%	Constante	245	56,50%	Constante
Total	268	100%		224	100%		433	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 capturadas em menos de 25% das coletas; *cigarrinha vetor potencial para transmissão de *X. fastidiosa*.

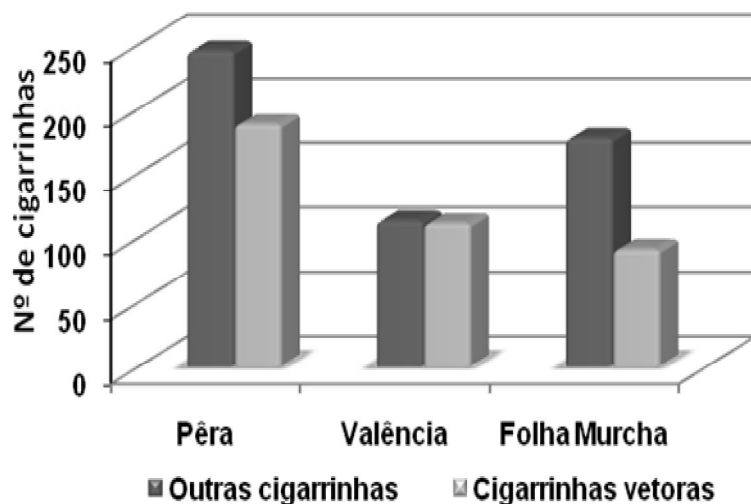


Figura 1 Número de cigarrinhas vetoras e de outras cigarrinhas coletadas em pomares de laranja doce das variedades Folha murcha, Valência e Pêra por meio de armadilha adesiva amarela, nas cidades de Mandaguaçu e Nova Esperança, Paraná, no período de fevereiro 2008 a maio de 2010.

A espécie *A. citrina* teve seu maior pico populacional na variedade Pêra nos meses de março e abril de 2008, aumentando novamente em maio e junho

de 2009. Para a espécie *D. costalimai*, o período de maior incidência foi entre março e abril de 2008 (Figura 3).

Na variedade Valência, as maiores ocorrências da espécie *A. citrina*, foram em junho e julho de 2008 e de abril a julho de 2009. *D. costalimai* e as outras espécies ocorreram em número muito baixo ou não foram capturadas (Figura 4).

A Variedade Folha Murcha apresentou um pico populacional para a espécie *A. citrina* no mês de junho de 2008, voltando a aumentar a partir de março com pico em junho de 2009. *D. costalimai* foi pouco capturada durante toda a avaliação, assim como as demais espécies vetoras (Figura 5).

Molina (2006) relatou picos populacionais das espécies vetoras no mês de junho de 2006, contrariando alguns resultados obtidos anteriormente na mesma região, que apresentaram maiores incidências populacionais no início da primavera, mantendo-se até final do verão (NUNES et al., 2007).

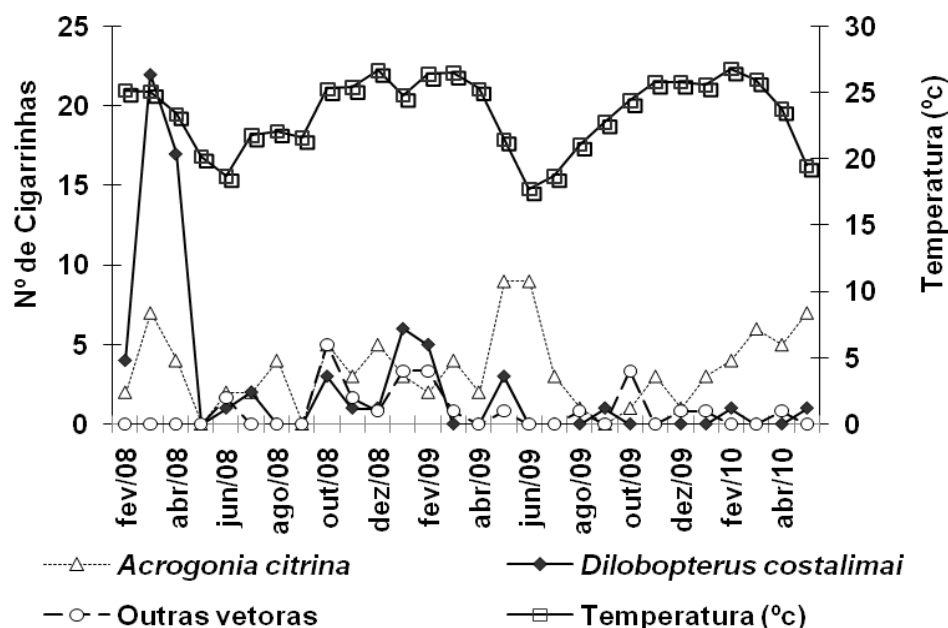


Figura 3 Espécies de cigarrinhas capturadas mensalmente em laranja doce variedade Pêra, por meio de armadilha adesiva amarela, nas cidades de Mandaguaçu e Nova Esperança, Paraná. No período de fevereiro 2008 a maio de 2010.

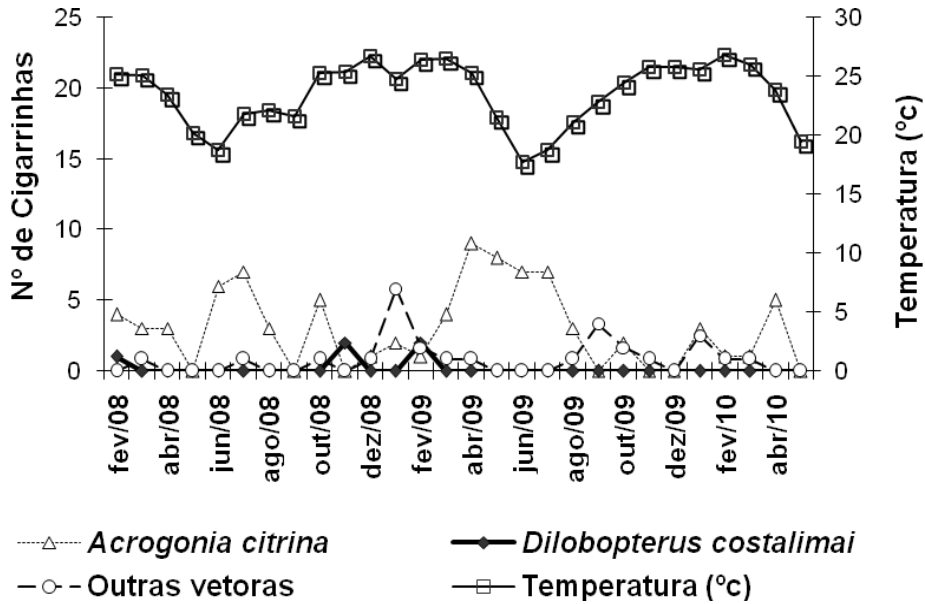


Figura 4 Espécies de cigarrinhas capturadas mensalmente em laranja doce variedade Valência, por meio de armadilha adesiva amarela, nas cidades de Mandaguaçu e Nova Esperança, Paraná, no período de fevereiro 2008 a maio de 2010.

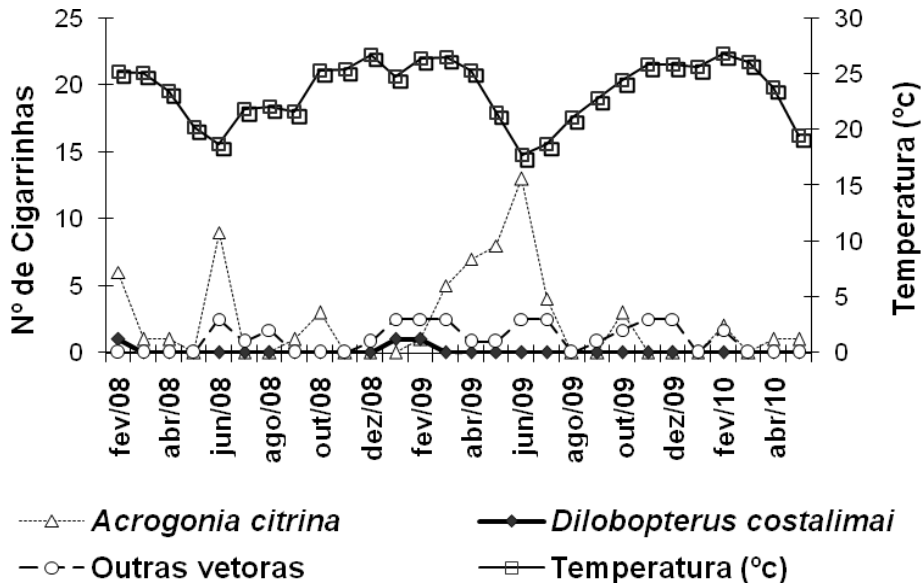


Figura 5 Espécies de cigarrinhas capturadas mensalmente em laranja doce variedade Folha Murcha, por meio de armadilha adesiva amarela, nas cidades de Mandaguaçu e Nova Esperança, Paraná, no período de fevereiro 2008 a maio de 2010.

Paiva et al. (1996), em três anos de avaliação, em pomar comercial no Estado de São Paulo, constataram a presença das espécies vetoras *D. costalimai*, *Acrogonia* sp e *O. facialis* entre os meses de dezembro a janeiro no primeiro ano de avaliação e nos anos posteriores os picos populacionais foram entre os meses de junho e julho.

CONCLUSÕES

A. citrina foi a espécie de cigarrinha vetora mais frequente e constante em laranjas doce, variedades Pêra, Valência e Folha Murcha, no Noroeste do Paraná.

A variedade Pêra apresentou os maiores índices de população de cigarrinhas vetoras e de outras cigarrinhas (Deltoccephalinae e Gyponinae).

Os períodos de maior ocorrência das espécies vetoras foram aos meses de março a julho de cada ano.

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.

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.

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.

LOPES, J. R. S.; M. J. G. BERETTA; R. HAKAKAVA; R. P. P. ALMEIDA; R. KRÜGNER & A. JR. GARCIA. 1996. A Confirmação da transmissão por cigarrinhas do agente causal da clorose variegada dos citros, *Xylella fastidiosa*. **Fitopatologia Brasileira**, Suplemento. v.21, p.343, 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.

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.

MOLINA, R. O.; NUNES W. M. C.; GONÇALVES A. M. O.; ZANUTTO C. A. Populational fluctuation of vectors of *Xylella fastidiosa*, Wells in sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] varieties of northwest Paraná State, Brazil. **Brazilian Archives Biology and Technology** v. 53, p. 2010.

MOLINA, R. O. Estudo populacional das cigarrinhas vetoras de *Xylella fastidiosa* em pomares cítricos da região Noroeste do Paraná. Dissertação e Mestrado, Universidade Estadual de Maringá, p.59, 2006.

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**, v.36, n.2, p254-260, 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.

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

RINGENBERG, R. **Análise faunística de cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae) e flutuação populacional de potenciais vetores de *X. fastidiosa* em vinhedos do Rio Grande do Sul e Pernambuco, Brasil.** Tese Doutorado. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, p.100, 2008

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.; 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.; 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.

SAS INSTITUTE. Guia do usuário SAS/STAT: Versão 6. Cary, p. 1028, 1996.

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.; 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.; PRIAJÚNIOR, 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, 2002.

YOUNG, D. A. Taxonomic study of the Cicadellinae (Homoptera:Cicadellidae). Part 1. Proconiini. **United States National Museum Bulletin**, v.261, p.1-287, 1968.

CAPÍTULO-III

RESUMO

COMPARAÇÃO DAS TÉCNICAS DE PCR CONVENCIONAL E NESTED-PCR NA DETECÇÃO DE *Xylella fastidiosa* EM CIGARRINHAS VETORAS (HEMIPTERA: CICADELLIDAE).

A clorose variegada dos citros (CVC) é uma doença que afeta a cultura de citros e 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* Wells, uma bactéria endofítica, em forma de bastonete, encontrada nos vasos do xilema das plantas. A disseminação 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 foi comparar as técnicas de Reação da polimerase em cadeia (PCR), para a detecção da bactéria *X. fastidiosa*, em cigarrinhas vetoras. Foram comparados protocolos de extração de DNA, e métodos da PCR simples, utilizando um par de iniciador (CVC-1 e 272-int), e a nested-PCR, utilizando dois pares de iniciadores (272-1 e 272-2 para a primeira reação e cvc-1 e 272-int para a segunda reação), sendo que os resultados obtidos apontaram a nested-PCR como melhor método de detecção de bactéria *X. fastidiosa* nas cigarrinhas vetoras.

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

ABSTRACT

COMPARISON OF PCR AND nested-PCR TECHNIQUES FOR DETECTION OF *Xylella fastidiosa* IN SHARPSHOOTERS (Hemiptera: Cicadellidae).

The citrus variegated chlorosis (CVC) is a disease that affect the citrus crop and was first recorded in 1987 in northeastern São Paulo and in Minas Gerais state. The CVC is caused by *Xylella fastidiosa* Wells, an endophytic bacterium, rod-shaped, found in xylem vessels of plants. The dissemination occurs by insect vectors, belonging to the Hemiptera order, Cicadellidae family, known as leafhoppers that transmit the bacterium after feeding on infected plants. The aim of this study was to compare two techniques of polymerase chain reaction (PCR) for detection of the bacterium *X. fastidiosa* in insect vector. The study Was compared protocols for DNA extraction and PCR methods using a single primer pair (CVC-1 and 272-int), and nested-PCR using two pairs of primers (272-1 and 272-2 for the first reaction and CVC-1 and 272-int for the second reaction). The results indicated that the nested-PCR was the best method for detection of bacteria *X. fastidiosa* in insect vector.

Keywords: DNA, Citrus variegated chlorosis, Vectors.

INTRODUÇÃO

A clorose variegada dos citros está presente no Brasil desde 1987, sendo os primeiros relatos de sua ocorrência na região norte do Estado de São Paulo (ROSSETTI 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 infectividade com as ecdises, quando mudam de ínstar ou passam para a fase adulta (PURCELL, 1979).

Estudos de microscopia eletrônica de varredura têm mostrado que as células de *X. fastidiosa* se encontram concentradas em placas aderidas a alguns locais específicos. Na espécie vetora *Graphocephala atropunctata*, a bactéria multiplica-se e liga-se ao canal de alimentação (precibário) e câmara de sucção (cibário) (BRLANSKY, 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 iniciadores, 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 (CIAPINA et al., 2004; MARUCCI et al., 2003; HILL & PURCELL, 1995).

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 baixo número de células bacterianas presentes nos insetos vetores (CIAPINA et al., 2004).

Em relação à extração de DNA genômico de cigarrinhas, algumas metodologias devem ser mudadas e/ou melhoradas, a fim de que os resultados obtidos tenham um maior grau de confiabilidade, para as técnicas e

metodologias empregadas na detecção da bactéria fitopatogênica *Xylella fastidiosa*, presente nas cigarrinhas.

Assim, 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 infectividade das cigarrinhas vetoras de *X. fastidiosa*.

Neste trabalho, foram avaliadas duas técnicas para a detecção da *Xylella fastidiosa*, com uso da reação da polimerase em cadeia (PCR) e de "nested-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, latitude Sul 23° 12' 47,013", longitude Oeste 52° 17' 59,391"; e sítio Nossa Senhora Aparecida, Paranavaí, 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 da copa das plantas a uma altura de 1,70m do solo. As mesmas foram distribuídas em cinco ruas dos talhões de cada pomar, em número de duas armadilhas em cada rua, totalizando 10 armadilhas em 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. Em seguida, as amostras foram armazenadas em freezer a (-4°C), para posterior extração de DNA, no laboratório de Biologia Molecular do Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada (NBA), na Universidade Estadual de Maringá (UEM).

Para a extração de DNA, foram utilizadas 55 amostras, sendo que cada amostra utilizada era composta de 1 a 2 “cabeças” de espécies de cigarrinhas (Tabela 1). Para a avaliação da eficiência dos resultados no método de extração de DNA, utilizou-se dois protocolos diferentes: Protocolo I (HUNG et al., 2004) que testou 24 amostras de cigarrinhas; Protocolo II (CIAPINA et al., 2004) que utilizou 16 amostras de cigarrinhas.

Protocolo I (HUNG et al., 2004): foi utilizada a extração de DNA total de cigarrinhas. As amostras foram agrupadas em microtubos de centrífuga de 1,5 mL contendo de 1 a 2 duas cabeças de cigarrinhas da mesma espécie, coletadas da mesma etiqueta. Foram adicionados 300 µL de tampão de extração, contendo 0,1 M Tris-HCl pH 8,0, 0,05 M NaCl; 1% de *N*-laurylsarcosyl, maceradas com auxílio de uma ponteira de micropipeta esterilizada e incubadas a 55°C por 1h. Em seguida, foram acrescentados as amostras 500 µL de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:2 mL) e centrifugadas por 10 min, 4 °C a 8.000 rpm. Foram retirados aproximadamente 500 µL de sobrenadante, transferidos para microtubos esterilizados de 1,5 mL, em seguida acrescentando-se clorofórmio/álcool isoamílico e, novamente, centrifugadas por 10 min a 4 °C a 8.000 rpm. Em seguida, foram retirados 300 µL das amostras de sobrenadante cuidadosamente e transferidos para microtubos novos e estéreis de 1,5 mL e acrescentados 800 µL de etanol 100 % e mantidas “overnight”. Após este período, as amostras foram centrifugadas por 10 min 4 °C a 12.000 rpm para a precipitação de DNA e a formação do pellet, o sobrenadante foi descartado. Foram acrescentados 500 µL de etanol 70% nas amostras e, novamente, centrifugadas por 10min, 4° a 8.000 rpm e o sobrenadante descartado. Em seguida, foi acrescentado 800 µL de etanol absoluto gelado. Estas foram centrifugadas e o sobrenadante descartado, os tubos foram invertidos em uma superfície asséptica para completa secagem do DNA, em seguida, foi adicionado 25 µL de 1/10 TE (1,0 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,1 mM EDTA) e armazenados a -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 200 µL de solução de Polyvinilpolipirrolidona (PVPP) a 0,25 % com ajuda de ponteiros esterilizados de micropipetas. E depois centrifugadas a 12.000 rpm (temperatura ambiente) por 20 min. descartando-se o sobrenadante. Na sequência, foi adicionado 100 µL de Chelex 100 (ativado) e as amostras foram incubadas a 56 °C por 30 min. Posteriormente, foram agitadas em vortex por 10 segundos, para homogeneização seguindo-se nova centrifugação a 12.000 rpm (temperatura ambiente) por 3 min., sendo as amostras fervidas durante 8 min. e, novamente, agitadas por 10 segundos. Finalmente, foram centrifugadas por 3 min. a 12.000 rpm e o sobrenadante transferido para microtubos novos de 0,5 mL armazenadas a -4 °C para posterior realização do teste de PCR.

Amplificação

Para a reação de amplificação de DNA, utilizaram-se amostras dos dois métodos de extração, sendo testados os iniciadores específicos para *Xylella fastidiosa*, CVC-1 (5'-AGATGAAAACAATCATGCAAAA-3') e 272-2-int (5'-GCCGCTTCGGAGAGCATTCT-3') com produto da amplificação de 500 bp desenvolvidos por POOLER & HARTUNG (1995).

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

A amplificação ocorreu na condição de um ciclo inicial a 94 °C, por 2 min.; 35 ciclos de desnaturação a 94 °C, por 2 min.; anelando a 62 °C, por 1 min.; e extensão a 72°C, por 1,5 min., com um ciclo final de extensão a 72 °C, por 5 min., e estabilizando a 6 °C por tempo indeterminado (MARUCCI, 2003). O aparelho utilizado foi o Máster Cyler Gradient (Eppendorf).

Para a comparação da eficiência dos iniciadores, foi realizado a reação de amplificação de DNA, com a técnica do nested-PCR, utilizando-se para a

primeira reação um par de oligonucleotídeos externos 272-1(5'-AGCGGGCCAATATTCAATTGC-3') e 272-2 (5'-AGCGGGCCAAAACGATGCGTG3').

A segunda reação de amplificação foi conduzida com volumes iguais ao usado na primeira reação e foram testados os iniciadores específicos para *Xylella fastidiosa*, CVC-P1 (5'-AGATGAAAACAATCATGCAAAA-3') e 272-2-int (5'-GCCGCTTCGGAGAGCATTCT-3') com produto da amplificação de 500 bp desenvolvidos por (POOLER & HARTUNG, 1995).

Em todos os testes de PCR, foram utilizadas como controles positivos amostras de cigarrinhas infestadas, ou seja, que se alimentaram em plantas-fonte infectadas por *X. fastidiosa*. Para o controle negativo, utilizou-se cigarrinhas livres da bactéria criadas em condições controladas e uma amostra com água mili-Q (branco). O produto da reação de amplificação foi analisado através de eletroforese em gel de agarose a 1 %, sendo utilizado brometo de etídio como contraste para visualização das bandas no gel. Os géis foram fotografados sob luz ultravioleta em equipamento de fotodocumentação (UVP GDS-8000 System).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram extraídos DNA de 55 amostras de cigarrinhas através de dois métodos diferentes de extração. Comparando o protocolo I e o protocolo II (Tabela 1).

Para as amostras extraídas através do protocolo I, obtiveram-se resultados positivos para a detecção da *X. fastidiosa*, em duas amostras: a partir da "PCR" com os iniciadores CVC-P1 e 272-2-int (Figura 1). Quando testadas as amostras através do "nested-PCR", utilizando dois pares de iniciadores: 2721 e 272-2, para a primeira reação e CVC-P1 , 272-2-int, para a segunda reação, o resultado foi positivo em 22 amostras de um total de 41 amostras (53,7 %) (Figura 2).

Em relação ao protocolo II, não houve detecção da bactéria a partir das amostras extraídas das cigarrinhas vetoras. Utilizando-se a PCR convencional, não ocorreu à amplificação do fragmento esperado de *X. fastidiosa* com uso dos iniciadores específicos CVC-PI e 272-int. em nenhuma das 14 amostras

realizadas. Porém, quando testado a reação do nested-PCR, os resultados foram positivos para 8 de um total de 14 amostras (57,1 %) (Tabela 1).

Huang et al. (2006) demonstraram que a nested-PCR foi a melhor técnica de detecção da *X. fastidiosa* nas cigarrinhas vetoras *Graphocephala versuta* e *G. coccinea*, através da comparação de métodos para detecção para bactéria.

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.

Pooler et al. (1997), utilizando a técnica de “nested-PCR” para amostras de cigarrinhas *Graphocephala versuta*, conseguiram 15 resultados positivos de 60 exemplares capturados em espécies de *Ulmus americana* (L.). Marucci (2003) conseguiu, de 450 cigarrinhas testadas, 34 resultados positivos com o teste de “nested-PCR” para *X. fastidiosa*, sendo que 06 amostras positivas eram da espécie *D. costalimai*. Hill & Purcell (1995), sugerem que, 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*.

Bextine et al. (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.

Diante dos resultados obtidos, a técnica do “nested-PCR”, empregando dois pares de iniciadores, pode ser considerada como segura e eficiente na detecção da *X. fastidiosa* em insetos potencialmente vetores.

Tabela 1 Comparação de extração de DNA e métodos de PCR para detecção da *Xylella fastidiosa* em cigarrinhas capturadas na região Noroeste do PR., entre junho de 2005 a setembro de 2006.

Cigarrinhas (Hemiptera:Cicadellidae)	Extração de DNA			
	Protocolo I*		Protocolo II**	
	PCR Convencional	Nested- PCR	PCR Convencional	Nested-PCR
<i>Dilobopterus costalimai</i>	25/01***	25/09	09/00	09/05
<i>Acrogonia citrina</i>	14/01	14/11	01/00	01/01
<i>Bucephalogonia xanthophis</i>	01/00	01/01	01/00	01/01
<i>Macugonalia leucomelas</i>	-	-	02/00	02/01
<i>Homalodisca ignorata</i>	-	-	01/00	01/00
<i>Macugonalia cavifrons</i>	01/00	01/01	-	-
Total	41/02	41/22	14/00	14/08

*Protocolo I= Hung *et al.* (2004); **Protocolo II= Ciapina & Lemos (2004); ***Número de espécimes testado/e número de espécimes positivo.

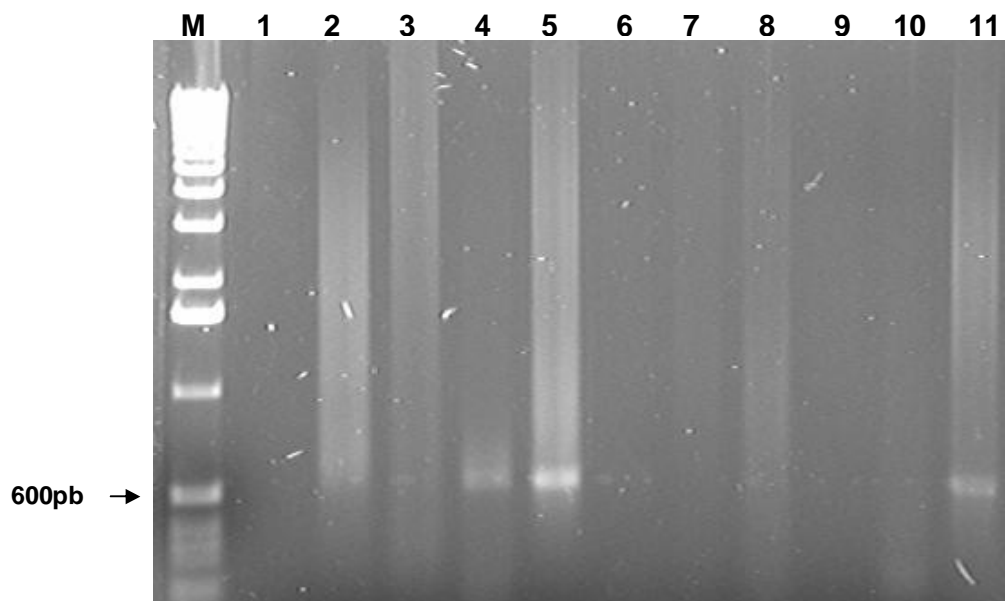


Figura 1 Produtos de PCR, obtidos da amplificação do DNA das amostras de cigarrinhas capturadas em Nova Esperança PR., entre junho de 2005 a setembro 2006. M= marcador peso molecular (1-Kb DNA ladder (Invitrogen®)); 1= controle negativo de cigarrinha; 2= controle positivo de cigarrinha; 3 a 10 amostras de cigarrinhas; e 11=controle positivo de folhas com CVC.

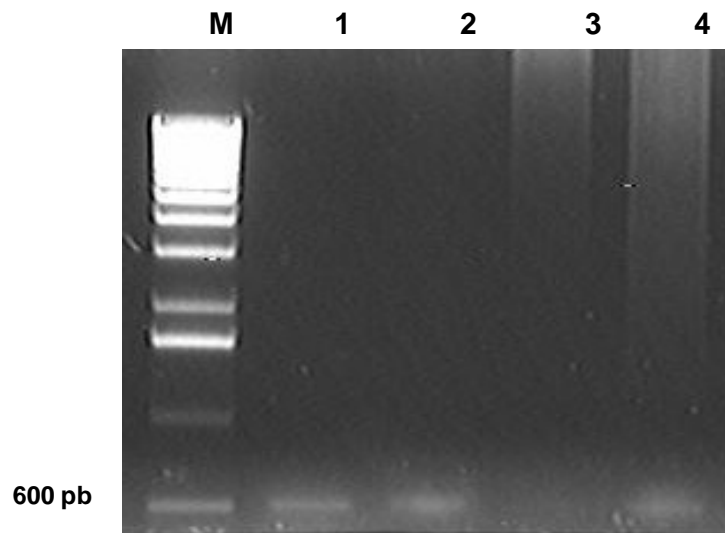


Figura 2 Produtos de nested-PCR, obtido da amplificação de DNA das amostras de cigarrinhas capturadas em Nova Esperança, entre junho de 2005 a setembro 2006. M= marcador peso molecular (1-Kb DNA ladder (Invitrogen®)); 1,2=amostra de cigarrinhas; 3= controle negativo, 4= controle positivo de cigarrinha.

CONCLUSÕES

A técnica do nested-PCR foi mais eficiente, quando comparado com o PCR convencional para detecção da bactéria *X. fastidiosa* nos dois protocolos de extração avaliados.

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. **Entomology Society of America**, v.97, p.757-763, 2004.
- BRLANSKY, R.H.; TIMMER, L.W.; FRENCH, W.J. & MCCOY, R.E. Coloniation of the sharpshooter vectores, *Oncometopia nigricans* and *Homalodisca coagulata*, by xylem-limited bacteria. **Phytopathology**, v.73, p.530-535, 1983.
- 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.
- HUANG, Q.; BENTZ, J.; SHERALD, J.L. Fast, easy and efficient DNA extraction and one-step polymerase chain reaction for the detection of *Xylella fastidiosa* in potential insect vectors. **Journal of Plant Pathology**, v.88, n.1, p.77-81, 2006.
- 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.
- PURCELL, A.H.; FINLAY, A.H.; MEECLEAN, D.L. Pierce's disease bacterium: mechanism of transmission by leafhopper vectores. **Science**, v.206, p.839-841, 1979.
- 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.

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.

CAPITULO-IV

RESUMO

AVALIAÇÃO DE PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO DE DNA GENOMICO DE CIGARRINHAS VETORAS (HEMIPTERA: CICADELLIDAE) PARA DETECÇÃO DA *Xylella fastidiosa*.

A clorose variegada dos citros (CVC) é uma doença que atinge a citricultura no Brasil, causada pela *Xylella fastidiosa*, uma bactéria endofítica, em forma de bastonete, encontrada nos vasos do xilema das plantas. A disseminação no pomar ocorre por meio de insetos vetores (Hemiptera: Cicadellidae), conhecidos como cigarrinhas, que transmitem a bactéria para plantas sadias depois de se alimentarem nas plantas contaminadas. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e comparar protocolos para a extração de DNA genômico de cigarrinhas a fim de detectar *X. fastidiosa*. A extração de DNA dos insetos vetores foi realizada de acordo com protocolo a base de fenol-clorofórmio e também com dois kits comerciais, DNeasy® Plant Mini Kit e DNeasy® blood & tissue Handbook (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA). Para a extração, foram utilizadas cabeças de cigarrinhas, das seguintes espécies: *Dilobopterus costalimai*, *Acrogonia citrina*, *Oncometopia facialis*, *Bucephalogonia xanthophis*, *Macugonalia leucomelas* e *Homalodisca ignorata*. A identificação da bactéria nas amostras foi realizada através do teste de duplo PCR (“nested-PCR”) com iniciadores específicos. O resultado obtido foi satisfatório para detecção da bactéria *X. fastidiosa*, com o emprego de um protocolo que utiliza duas fases de extração com fenol e clorofórmio.

Palavras Chave: DNA, clorose variegada dos citros, insetos.

ABSTRACT

EVALUATION OF PROTOCOL EXTRACTION OF GENOMIC DNA SHARPSHOOTERS (Hemiptera: Cicadellidae) FOR DETECTION OF *Xylella fastidiosa*.

The citrus variegated chlorosis (CVC,) is a disease that affects the citrus crop in Brazil, caused by *Xylella fastidiosa*, a bacterial endophyte, rod-shaped, found in xylem vessels of plants. The dissemination occurs in the orchard through insect vectors (Hemiptera: Cicadellidae), known as leafhoppers that transmit the bacterium to healthy plants after feeding on infected plants. The objective was to develop and compare methods for extracting genomic DNA of sharpshooters to detect *X. fastidiosa*. The DNA extraction from insects was performed according to protocol-based phenol-chloroform and with two commercial kits, Dneasy® Plant Mini Kit and blood & tissue Dneasy® Handbook (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA). For extraction sharpshooter heads were used, the following species: *Dilobopterus costalimai* *Acrogonia citrina*, *Oncometopia facialis*, *Bucephalagonia xanthophis*, *Macugonalia leucomelas* and *Homalodisca ignorata*. The identification of bacteria in the samples was performed by testing double PCR (nested-PCR) with specific primers. The result was satisfactory for detection of the bacterium *X. fastidiosa*, with the use of a protocol that uses two stages of extraction with phenol and chloroform.

Keywords: DNA, citrus variegated chlorosis, insects.

INTRODUÇÃO

A clorose variegada dos citros afeta os pomares de citros no Brasil desde 1987, sendo o primeiro relato de sua ocorrência na região norte do Estado de São Paulo (ROSSETTI et al., 1990). Causada pela bactéria *Xylella fastidiosa* (Wells et al., 1987), que pode ser transmitida para plantas suscetíveis de laranja doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] por meio de insetos vetores (Hemiptera: Cicadellidae), conhecidas como cigarrinhas, que se alimentam da seiva do xilema das plantas. Podem transmitir a bactéria durante todo o período de vida, entretanto, ninfas perdem sua capacidade de transmissão com as ecdises, quando mudam de ínstar ou passam para a fase adulta (LOPES, 1996).

Hopkins (1983), estudando a espécie de cigarrinha vetora *Graphocephala atropunctata*, demonstrou que a bactéria multiplica-se e liga-se ao canal de alimentação (precibário) e câmara de sucção (cibário). Lopes (1996) demonstrou que a bactéria *X. fastidiosa* encontra-se concentrada em placas aderidas a locais específicos no inseto. Alves et al. (2008), através de microscopia eletrônica, visualizaram que existem sítios de retenção da bactéria aderida ao canal do pré-cibário para as espécies *Dilobopterus costalimai*, *Acrogonia citrina* e *Oncometopia facialis*.

A bactéria *X. fastidiosa* é detectada em cigarrinhas vetoras a partir da extração de DNA genômico dos insetos. Existem diversos protocolos para a extração, porém o mais utilizado em insetos vetores é a metodologia com fenol-clorofórmio. Sambrook et al. (1989) descrevem a metodologia com protocolos a base de fenol-clorofórmio para vários procedimentos de extração de DNA, utilizando as mais diversas fontes biológicas. Esta metodologia também é usada para extração de proteínas e ácidos nucléicos, utilizando etanol na precipitação.

A técnica da reação PCR (reação em cadeia da polimerase) permite a ampliação exponencial de um fragmento específico de DNA a partir de pequena quantidade de moléculas. Pode ser utilizada para diagnosticar a *X. fastidiosa* em tecidos de plantas infectadas (HILL & PURCELL, 1995). Essa técnica baseia-se no uso de iniciadores que, teoricamente, permite a detecção de 10 a 100 bactérias por reação de amplificação (POOLER & HARTUNG,

1995). A utilização dessa técnica, para detecção da bactéria em insetos vetores da CVC, vem sendo utilizada amplamente por diversos autores (MARUCCI et al., 2003; CIAPINA et al., 2004).

O teste de PCR chamado “nested-PCR” é outro eficiente método para detecção de organismos ou produtos das amostras com baixas concentrações de DNA e altas concentrações de contaminantes que inibem a amplificação. A detecção da *X. fastidiosa* em amostras de insetos pode ser dificultada devido ao baixo número de células bacterianas presentes nos insetos vetores (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 foi testar e comparar protocolos para a extração de DNA genômico de cigarrinhas para a detecção da bactéria *X. fastidiosa*, por meio da técnica de “nested-PCR”.

MATERIAL E MÉTODOS

As cigarrinhas vetoras foram coletadas em pomares comerciais de laranja doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck.], variedades Pêra, Valência e Folha Murcha, nos municípios de Nova Esperança e Mandaguaçu, localizados no noroeste do Paraná. As coletas ocorreram no período de 2006 a 2009.

As espécies de cigarrinhas foram capturadas no pomar através de armadilhas adesivas amarelas (Biocontrole®), distribuídas no pomar em cartões com dimensões de 9,0cm x 12,0cm, fixadas na face norte da copa das plantas a uma altura de 1,70m do solo (ROBERTO et al., 1997). Cada planta foi considerada uma unidade amostral, as armadilhas foram dispostas com duas repetições por rua amostrada (5ª e 50ª plantas). Foram avaliadas cinco ruas por talhão de cada variedade, totalizando dez armadilhas. As etiquetas foram renovadas no pomar mensalmente, durante o período de avaliação.

Após a coleta, foi realizada a identificação das cigarrinhas e as cabeças foram retiradas e transferidas para microtubos de 1,5 mL (em tréplica). As amostras cujo número mínimo de cigarrinhas da mesma espécie foi menor que três foram descartadas. As amostras foram identificadas com a data, o local e a planta onde foram coletadas. Em seguida, essas amostras foram armazenadas em freezer a -4°C, para posterior extração de DNA no laboratório de Biologia Molecular do Núcleo de Biotecnologia Aplicada (NBA), na Universidade Estadual de Maringá (UEM).

Preparo do material:

As espécies coletadas foram classificadas e identificadas para serem utilizadas nos três diferentes métodos de extração de DNA. Dois Kits de extração, com custos semelhantes, DNeasy® blood & tissue Handbook (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA), DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA) e o protocolo a base de fenol/clorofórmio.

Foram escolhidos, aleatoriamente, 150 insetos dos quatros anos de avaliação coletados em armadilhas. Os mesmos foram divididos em três grupos com 50 insetos cada, para a extração de DNA e realização das reações de PCR.

Para a extração de DNA total das 'cabeças' de cigarrinhas foram consideradas como amostras 1 cabeça depositada em 1 microtubo de 1,5 mL. Em seguida, as amostras foram trituradas com adição de nitrogênio líquido e auxílio de um pistilo.

Protocolo I:

Após o processo inicial de trituração foram adicionados 500µL do tampão de extração (50 mM tri-HCl pH8.0; 50 Mm EDTA; 10 Mm de NaCl; 1,5 Mm de sarcosil; 1 mg/mL de proteinase-K). Em seguida, a solução de lise foi incubada a 60°C por três horas, sendo homogeneizada a cada 30 minutos. Após este processo foram acrescentados 500 µL de fenol:clorofórmio:álcool

isoamílico (25:24:1 mL) e centrifugou-se por 20 min, a 4.000 rpm, em temperatura ambiente. Cada sobrenadante foi transferido para novo microtubo e adicionado 500µL de fenol pH 8.0 e centrifugado por 20 min a 4.000 rpm, em temperatura ambiente. Ao sobrenadante foi acrescentado volume igual de clorofórmio : álcool isoamílico (24:1), centrifugado 20 min a 4.000 rpm, em temperatura ambiente. O DNA foi precipitado com 20 µL de NaCl (5M) 0,2 M e 365 µL ou 0,7 volumes de isopropanol. Os microtubos devidamente tampados foram mergulhados em recipiente contendo nitrogênio líquido por aproximadamente 10 minutos. Em seguida, centrifugados a 14.000 rpm por 30 min em temperatura ambiente.

Finalmente, o DNA foi lavado com etanol 70%, centrifugado a 14.000 rpm por 10 min. Em seguida, o sobrenadante descartado, os microtubos foram invertidos em uma superfície asséptica e após 10 min o pellet foi ressuspenso com 100 µL de TE (1 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,1 mM EDTA) mantido “over night”. Após estes procedimentos, foi realizada a purificação do material com uso de 5 µL RNase (20 mg/mL) e mantidos por 1 hora a 37°C.

Todas as amostras extraídas foram verificadas quanto à integridade e qualidade do DNA em corrida no gel de agarose 0,5% por 30 min a 90 volts.

Protocolo II:

O segundo método utilizado no teste para extração de DNA total de cigarrinhas foi com o Kit DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA). Os procedimentos adotados para extração total de DNA foram seguidos de acordo com as orientações do fabricante. As amostras foram colocadas em microtubos de 1,5 mL e trituradas com nitrogênio líquido. Em seguida adicionado 400 µL de Buffer AP1 e 4 µL de RNase A (100 mg/mL) e a solução homogeneizada em vortex e incubada a 65°C durante 10 min.

Em seguida, adicionou-se 130 µL de AP2 e incubou-se por 5 minutos no gelo. Após este período, os microtubos foram centrifugados por 5 min a 14.000 rpm. As amostras foram transferidas para microtubos novos com colunas e centrifugadas por 2 min a 14.000 rpm. As colunas foram transferidas para

microtubos novos e adicionado 1,5 volumes do tampão AP3 e centrifugado a 8000 rpm por 1 min. Por fim, o DNA foi coletado em 100 µl de solução AE.

Protocolo III:

O terceiro protocolo testado foi o Kit específico para tecido animal DNeasy® blood & tissue Handbook (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA). As recomendações para extração de DNA total foram seguidas de acordo com as instruções do fabricante. As mesmas foram colocadas em microtubos de 1,5 mL trituradas com nitrogênio líquido em seguida adicionado 180 µl de tampão ATL e 20 µl de proteinase-K, homogeneizada em vortex e incubada a 56°C, por aproximadamente 3 horas. As amostras foram homogeneizadas a cada 30 min durante o período de incubação.

Após este período, foram adicionados 200 µL de AL tampão de amostra e homogeneizado no vortex. Em seguida, acrescentou-se 200 µL de etanol (96-100%) e novamente homogeneizado no vortex. As amostras foram transferidas para colunas em microtubos de 2,0 mL e centrifugadas a 8000 rpm por 1 min.

O sobrenadante foi desprezado e as colunas transferidas para novos microtubos. O próximo passo foi adicionar 500 µL de tampão AW1, centrifugar durante 1 min em 8.000 rpm, adicionar 500 µL do tampão AW2, centrifugar por 3 min a 14.000 rpm. Por último, o DNA foi coletado da coluna em microtubos de 2 mL, pipetando-se 200 µL de tampão AE, sendo incubado por 1 min e centrifugado a 8.000 rpm.

Reação de PCR

Foi utilizado a técnica do duplo PCR (nested-PCR) para detecção de *X. fastidiosa* nas amostras de DNA total extraído das cigarrinhas vetoras.

Para a primeira reação, utilizou-se um par de oligonucleotídeos externos 272-1(5´AGCGGGCCAATATTCAATTGC-3´) 272-2 (5´AGCGGGCCAAAACGATGCGTG3´), que detecta todas as estirpes de *X. fastidiosa* e amplificando um fragmento de 700 pb. Para segunda reação,

realizada a partir do produto de amplificação da primeira, foram testados os iniciadores específicos para *X. fastidiosa*, CVC-P1 (5'AGATGAAAACAATCATGCAAAA3') e 272-2-int (5'GCCGCTTCGGAGAGCATTCCT3') com produto da amplificação de 500pb desenvolvidos por Pooler & Hartung (1995).

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

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

Em todos os testes de PCR, foram utilizadas, como controles positivos amostras de plantas contaminadas e também de cigarrinhas infectadas, ou seja, que se alimentaram em plantas-fonte infectadas por *X. fastidiosa*. Para o controle negativo, utilizaram-se cigarrinhas livres da bactéria e água estéril. O produto da reação de amplificação foi analisado através de eletroforese em gel de agarose a 1%, coradas com 2 µL de brometo de etídio, visualizadas e fotografadas sob luz ultravioleta em equipamento de fotodocumentação (UVP GDS-8000 System).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras de cigarrinhas testadas pertencem à família Cicadellidae, as espécies: *Acrogonia citrina*, *Dilobopterus costalimai*, *Oncometopia facialis*, *Bucephalagonia xanthofis* e *Macugonalia cavifrons*. Dos métodos utilizados, os protocolos I e II apresentaram melhor resultado para detecção de *X. fastidiosa*.

O resultado para o protocolo a base de fenol/clorofórmio (Protocolo I) em 50 amostras de insetos potencialmente vetores foi positivo para 36 amostras (72%). Destas amostras, 12 eram da espécie *D. costalimai*, 10 eram *A. citrina*, 7 eram *O. facialis*, 4 *B. xanthophis* e 3 *M. cavifrons*. O kit DNeasy® Plant Mini Kit (Protocolo II) apresentou 33 resultados positivos: 11 *D. costalimai*, 10 *A. citrina*, 7 *O. facialis*, 2 *B. xanthophis* e 3 *M. cavifrons*. Nas 50 amostras testadas com DNeasy® blood & tissue Kit (Protocolo III) os resultados foram de 19 amostras positivas: 2 *D. costalimai*, 7 *A. citrina*, 5 *O. facialis*, 2 *B. xanthophis* e 3 *M. cavifrons* (Tabela1).

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.

McElrone et al. (1999) estudaram 27 espécies de plantas (monocotiledoneas e dicotiledoneas) identificadas como possíveis hospedeiros alternativos da *X. fastidiosa*. O estudo foi realizado a partir de três diferentes métodos de extração de DNA, utilizando o “nested-PCR” para detecção da bactéria. Seis plantas foram positivas para detecção da bactéria, sendo que 11 espécies apresentaram resultados não satisfatórios, provavelmente, devido à interferência de compostos das plantas na reação de PCR não identificados neste estudo.

Ciapina et al. (2004), a partir de dois métodos distintos de extração de DNA, resina Chelex 100 e o método do polivinilpirrolidona (PVPP), utilizaram a técnica da “nested-PCR” com eficiência para detecção de *X. fastidiosa* em amostras de plantas e insetos vetores. Marucci (2003) detectou *X. fastidiosa*, por meio de “nested-PCR”, em plantas de *C. sinensis* inoculadas por cigarrinhas, em maior número do que por isolamento primário da bactéria desenvolvido em meio de cultura.

Huang et al. (2006), a fim de encontrarem um processo rápido, fácil e eficiente para a detecção de *X. fastidiosa*, testaram o Kit de extração do DNeasy® Plant Mini Kit para 30 amostras de cigarrinhas vetoras. Neste estudo, os autores detectaram 15 amostras positivas utilizando a técnica de “nested-PCR”. Esses resultados são corroborados no presente estudo, onde a extração

de DNA através do Kit (DNeasy® Plant Mini Kit) foi o segundo melhor método para o diagnóstico de *X. fastidiosa* juntamente com o “nested-PCR”.

Tabela 1. Comparação entre métodos de extração de DNA para detecção da bactéria *X. fastidiosa* por meio de Nested-PCR.

Espécie	Protocolo I *(Fenol/Clorofórmio)		Protocolo II **(Kit 1)		Protocolo III **(Kit 2)	
	nº total amostras	nº amostras (+)	nº total amostras	nº amostras (+)	nº total amostras	nº amostras (+)
<i>Dilobopterus costalimai</i>	15	12	15	11	15	2
<i>Acrogonia citrina</i>	15	10	15	10	15	7
<i>Oncometopia facialis</i>	10	7	10	7	10	5
<i>Bucephalagonia xanthofis</i>	5	4	5	2	5	2
<i>Macugonalia cavifrons</i>	5	3	5	3	5	3
Total	50	36	50	33	50	19

*Protocolo I= Fenol/clorofórmio; **Protocolo II: Kit DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA); ***Protocolo III DNeasy® blood & tissue Handbook (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA).

CONCLUSÃO

De acordo com resultados obtidos neste trabalho, os melhores métodos de extração de DNA para cigarrinhas vetoras de *X. fastidiosa* foram fenol/clorofórmio e o kit comercial DNeasy® Plant Mini Kit, onde se detectou através de nested-PCR, maior amostra infectas com a bactéria.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, E.; LEITE, B.; MARUCCI, R.C.; PASCOLATI, S.F.; LOPES, J.R.S.; ANDERSEN, C.P. Retention Sites for *Xylella fastidiosa* in Four Sharpshooter Vectors (Hemiptera: Cicadellidae) Analyzed by Scanning Electron Microscopy. **Curr Microbiol** v.56, p.531–538, 2008.
- 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.
- HOPKINS, D.L. Gram-negative, xylem-limited bacteria in plant disease **Phytopathology**, v.73, p.347-350, 1983.
- HUANG, Q.; BENTZ, J. e SHERALD, J. L. Fast, e and efficient DNA extraction and one-step polymerase chain reaction for the detection of *Xylella fastidiosa* in potential insect vectors. **Journal of Plant Pathology**, v. 88, p. 77-81, 2006.
- LOPES, J.R.S. Mecanismo de transmissão de *Xylella fastidiosa* por Cigarrinhas. **Laranja**, v.17, n.1, p. 79-92, 1996.
- 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.
- MARUCCI, Rosângela Cristina et al. Identification of a non-host plant of *Xylella fastidiosa* to rear healthy sharpshooter vectors. **Sci. agric. (Piracicaba, Braz.)** [online]. V.60, n.4, p. 669-675, 2003.
- McELRONE, A. J.; SHERALD, L.J.; POOLER, M. R. Identification of alternative hosts of *X. fastidiosa* in the Washington, D. C., area using nested polymerase chain reaction (PCR). **Journal of Arboriculture**. v. 25, p. 258-262, 1999.
- 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.
- 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.

SAMBROOK, J.; MANIATIS, T. e FRITSCH, E.F. Molecular Cloning: A Laboratory M. 2 ed. New York: **Cold Spring Harbor Laboratory**, Cold Spring Harbor. 1989.

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 bacteria related to *Xanthomonas* spp. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.37, p.136-143, 1987.