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

**Cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae) potenciais vetoras de um
fitoplasma (grupo 16SrIX) associado a sintomas de Huanglongbing
dos citros, suas plantas hospedeiras e quantificação do patógeno**

Rodrigo Neves Marques

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

**Piracicaba
2011**

Rodrigo Neves Marques
Engenheiro Agrônomo

Cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae) potenciais vetoras de um fitoplasma (grupo 16SrIX) associado a sintomas de Huanglongbing dos citros, suas plantas hospedeiras e quantificação do patógeno

Orientador:
Prof. Dr. **JOÃO ROBERTO SPOTTI LOPES**

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

**Piracicaba
2011**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Marques, Rodrigo Neves

Cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae) potenciais vetoras de um fitoplasma (grupo 16SrIX) associado a sintomas de Huanglongbing dos citros, suas plantas hospedeiras e quantificação do patógeno / Rodrigo Neves Marques. - - Piracicaba, 2011.
86 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2011.
Bibliografia.

1. Bactérias fitopatogênicas 2. Cigarrinhas 3. Fitoplasmas - Transmissão - Técnicas moleculares 4. Greening (Doença de planta) 5. Insetos vetores 6. Laranja 7. Plantas hospedeiras 8 . Plantas invasoras I. Título

CDD 634.31
M357c

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

Aos meus pais,

Odair Aparecido Marques e Maria José Neves Marques, por todo o apoio, amor e compreensão durante todos estes anos. Minha dedicação é o espelho do vosso caráter. Ao meu irmão Rogério Neves Marques, grande parceiro e amigo, que muitas vezes colocou sorrisos em meu rosto.

Dedico

À minha namorada,

Flavia de Moura Manoel Bento, por todo amor, carinho, atenção, apoio, compreensão, momentos de descontração e por me dar forças para avançar mais este passo em minha vida.

Ofereço

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. João Roberto Spotti Lopes, pela orientação, confiança, incentivo e amizade durante esses produtivos e agradáveis nove anos, iniciando pela iniciação científica, passando pelo mestrado e finalizando com o doutorado. Deixo aqui o meu sincero e enorme MUITO OBRIGADO.

Ao Prof. Dr. Pedro Takao Yamamoto, por confiar a execução deste trabalho, além de todo apoio, amizade e incentivo durante o desenvolvimento das atividades.

Ao Programa de Pós-graduação em Entomologia, pela oportunidade da realização de mais esse grande passo em minha vida.

À pesquisadora Dra. Diva do Carmo Teixeira por todo o auxílio nos trabalhos de detecção e identificação dos patógenos, além da amizade e abertura para execução dos trabalhos.

Ao Prof. Dr. Domenico Bosco, por me acolher em seu laboratório na Università degli Studi di Torino durante a etapa sanduíche, pelo conhecimento transmitido e por todo o auxílio na execução das atividades em seu laboratório, assim como à sua esposa e também pesquisadora Dra. Cristina Marzachi.

À Dra. Luciana Galetto, pós-doutoranda do Istituto di Virologia Vegetale – CNR (Itália) e Dra. Sabrina Bertin, pós-doutoranda da UNITO, por toda a ajuda, conselhos e paciência durante o desenvolvimento das ferramentas moleculares em seus respectivos laboratórios.

Ao Grupo Fischer, por ceder a área de estudo na Fazenda São João, em Nova Granada – SP, em especial ao Eng. Agrônomo Wagner Sciarra.

Ao Prof. Dr. Sinval Silveira Neto, pela ajuda no início das identificações dos espécimens.

Ao Eng. Agrônomo André Luis Sanches, do Fundecitrus, pela amizade e ajuda durante as viagens e coletas de insetos.

À Prof. Dra. Marluce Gonçalves Cortez pela ajuda no levantamento e identificação das plantas daninhas presentes nas áreas.

À equipe do departamento científico do Fundecitrus, em especial à Elaine Cristina Martins e Ana Paula Russo Leite pelo auxílio nas atividades laboratoriais.

À equipe de trabalho do Laboratório de Insetos Vetores, Arthur Tomaseto, Gerane Celly Silva, Flávio Perina, Daniele Turati, Rudiney Ringenberg, Jean Patrick Bonani, Fernanda Nascimento, Marcelo Miranda, Simone Prado, Clederson Ferreira, Nicole Czank Póvoa, Fernando Carli, Mariana Bossi, Karina Liva, Maria Cristina Rapussi, Cristiane Muller, Juliana Balbinotte, Jean Patrick Bonani pela amizade, companheirismo, auxílio e bons momentos durante toda a jornada no curso de pós-graduação. Os cafezinhos nunca foram tão divertidos!

À equipe do setor de Entomologia, do Dipartimento di Valorizzazione e Protezione delle Risorse Agroforestali (Di.Va.P.R.A) – UNITO e do Istituto di Virologia – CNR, pela ajuda e amizade durante meu estágio na Itália, experiência inesquecível.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela concessão da bolsa de Doutorado Sandwich.(SWE).

Ao Fundo de Defesa da Citricultura – Fundecitrus pelo apoio técnico e financeiro.

Aos professores do PPG-Entomologia da ESALQ/USP pelos ensinamentos transmitidos.

Aos funcionários do Departamento de Entomologia e Acarologia pela convivência e respeito com que sempre vivemos.

Aos colegas do programa de pós-graduação, pela colaboração, harmonia e companheirismo que expressaram.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente contribuíram com mais esta etapa de minha vida.

**Os meus humildes e
sinceros agradecimentos**

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
1 INTRODUÇÃO	15
2 DESENVOLVIMENTO	17
2.1 Revisão Bibliográfica	17
2.1.1 “Huanglongbing”	17
2.1.2 Fitoplasmas como agentes patogênicos	18
2.1.2.1 Fitoplasmas presentes em citros	20
2.1.2.2 Plantas hospedeiras de fitoplasmas identificados no Brasil	20
2.1.3 Vetores de fitoplasmas.....	22
2.1.4 Identificação de vetores de fitoplasmas	23
2.1.5 PCR quantitativo ou qPCR	24
2.2 Material e Métodos.....	26
2.2.1 Levantamento de insetos potenciais vetores do fitoplasma 16SrIX associado ao “Huanglongbing” (HLB) dos citros	26
2.2.2 Coleta e identificação de plantas invasoras das áreas	28
2.2.3 Associação de cigarrinhas com plantas invasoras	28
2.2.4 Detecção do fitoplasma associada ao “Huanglongbing” dos citros nos insetos.....	29
2.2.5 Coleta de plantas visando identificação de potenciais hospedeiros do fitoplasma.....	30
2.2.6 Estudos de transmissão do fitoplasma de citros (16SrIX) por vetores.....	31
2.2.6.1 Criação de insetos	31
2.2.6.2 Plantas-fontes e plantas-testes	32
2.2.6.3 Transmissão por cigarrinhas para plantas hospedeira de fitoplasmas	33
2.2.7 Desenvolvimento da técnica de PCR quantitativo para estudos com o fitoplasma do grupo 16SrIX, associado ao “Huanglongbing” (HLB) dos citros	34

2.2.7.1	“Primers” e sondas para aplicação do PCR quantitativo (qPCR)	34
2.2.7.2	Preparo das curvas padrões	35
2.2.7.3	Condições do PCR quantitativo	35
2.2.8	Utilização do qPCR nos estudos de transmissão do fitoplasma	36
2.2.8.1	Quantificação do DNA bacteriano no inseto ao longo do período de latência.....	36
2.2.8.2	Quantificação do título bacteriano em diferentes partes do corpo do inseto.....	37
2.3	Resultados e discussão	38
2.3.1	Levantamento de insetos potenciais vetores do fitoplasma associado ao “Huanglongbing”	38
2.3.2	Deteção do fitoplasma nos insetos coletados	45
2.3.3	Levantamento de plantas na vegetação espontânea das quadras experimentais	48
2.3.4	Identificação de hospedeiros alternativos do fitoplasma com infecção natural nas áreas	51
2.3.5	Associação de cigarrinhas com plantas hospedeiras	52
2.3.6	Transmissão do fitoplasma associado ao HLB pela cigarrinha <i>Scaphytopius marginelineatus</i>	55
2.3.7	Desenvolvimento da técnica de PCR quantitativo para estudos com o fitoplasma 16SrIX associado ao “Huanglongbing”	57
2.3.8	Utilização do PCR quantitativo nos estudos com potenciais vetores	63
2.3.8.1	“Screening” inicial das amostras	63
2.3.8.2	Quantificação do DNA bacteriano em insetos	65
2.3.8.3	Quantificação do fitoplasma em plantas cítricas	67
2.3.9	Considerações Finais.....	68
3	CONCLUSÕES	71
	REFERÊNCIAS	73

RESUMO

Cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae) potenciais vetoras de um fitoplasma (grupo 16SrIX) associado a sintomas de Huanglongbing dos citros, suas plantas hospedeiras e quantificação do patógeno

O “Huanglongbing” (HLB) é uma das mais temidas doenças da citricultura mundial, associada a bactérias do gênero ‘*Candidatus Liberibacter*’, que foram detectadas no Brasil em 2004. Em 2008, detectou-se outra bactéria associada a sintomas de HLB no Estado de São Paulo, que foi caracterizada como sendo um fitoplasma do grupo 16 SrIX. Fitoplasmas são molículos fitopatógenos restritos ao floema de plantas, disseminados por insetos vetores. O presente trabalho buscou identificar cigarrinhas potencialmente vetoras do fitoplasma associado ao HLB e plantas hospedeiras desses insetos, bem como desenvolver uma técnica de quantificação de DNA desse patógeno em insetos e plantas. Amostragens de cigarrinhas foram realizadas quinzenalmente por 12 meses em dois pomares de laranja com histórico de ocorrência do fitoplasma 16SrIX na região norte do Estado de São Paulo, usando-se armadilhas adesivas amarelas em duas alturas (0,3 e 1,5 m) da copa de árvores cítricas, e rede de varredura na vegetação espontânea. Dados faunísticos identificaram uma espécie de Agalliinae (*Agallia albidula* Uhler) e três de Deltocephalinae, [*Balclutha hebe* (Kirkaldy), *Planicephalus flavicosta* (Stål) e *Scaphytopius (Convelinus) marginelineatus* (Stål)], como os cicadélídeos (Hemiptera: Cicadellidae) mais abundantes e frequentes nas áreas estudadas. Essas espécies predominaram na amostragem com rede de varredura e na menor altura de coleta com armadilhas adesivas, indicando comportamento de alimentação em vegetação rasteira. Com observações visuais, verificou-se associação das espécies com certas plantas invasoras, e influência da composição florística da vegetação rasteira sobre a abundância das cigarrinhas. *S. marginelineatus* e *P. flavicosta* ocorreram com maior frequência em *Sida rhombifolia* L. e *Althernantera tenella* Colla, respectivamente, enquanto que *A. albidula* foi predominante em *Conyza bonariensis* (L.) Cronq., e *B. hebe* ocorreu exclusivamente em gramíneas, principalmente *Panicum maximum* Jacq.. Plantas invasoras amostradas nas áreas foram testadas para a presença do fitoplasma 16SrIX, porém sem resultados positivos. No entanto, amostras de campo da cigarrinha *S. marginelineatus* foram positivas por PCR e sequenciamento para o referido fitoplasma. Indivíduos de *S. marginelineatus* criados em laboratório e mantidos por um período de acesso à aquisição de 72 h em citros infectado com o fitoplasma 16SrIX, foram capazes de transmiti-lo para citros, após 21 dias de latência, porém com baixa eficiência (0,5%). Por meio de PCR quantitativo desenvolvido para esse fitoplasma, verificou-se baixo título do patógeno tanto em *S. marginelineatus*, quanto em plantas cítricas infectadas, o que pode explicar, pelo menos em parte, a baixa eficiência de transmissão pelo inseto tendo citros como fonte. Isto sugere a existência de outros hospedeiros mais adequados como fontes de inóculo para aquisição do fitoplasma por *S. marginelineatus* ou outro vetor ainda desconhecido.

Palavras-chave: Doença dos citros; Molicute fitopatogênico; Transmissão;
Deltoccephalinae; Hospedeiros alternativos; Plantas invasoras; PCR
quantitativo

ABSTRACT

Potential leafhopper vectors (Hemiptera: Cicadellidae) of a phytoplasma (16SrIX group) associated with citrus huanglongbing symptoms, host plants and pathogen quantification

Huanglongbing (HLB) is a severe citrus disease associated to phloem-limited bacteria in the genus '*Candidatus Liberibacter*', which were detected in Brazil in 2004. In 2008, another bacterium was found in association with HLB symptom in the São Paulo State, and characterized as a phytoplasma belonging to 16SrIX group. Phytoplasmas are vector-borne phytopathogenic mollicutes that inhabit plant sieve elements. The goals of this study were to identify potential leafhopper vectors of the HLB-associated phytoplasma and their host plants, as well as to establish a real-time PCR procedure for pathogen quantification in vectors and plants. Leafhoppers were sampled fortnightly for 12 months by yellow sticky cards placed at two heights (0.3 and 1.5 m) on the citrus tree canopy and by sweep net in the ground vegetation of two sweet orange groves with history of infection by the 16SrIX phytoplasma, in the northern region of São Paulo State. Faunistic analyses indicated 1 Agalliinae (*Agallia albidula* Uhler) and 3 Deltocephalinae [*Balclutha hebe* (Kirkaldy), *Planicephalus flavicosta* (Stål) e *Scaphytopius (Convelinus) marginelineatus* (Stål)] species that were the most abundant and frequent leafhoppers (Hemiptera: Cicadellidae) in the experimental areas. These species predominated in sweep net and in sticky traps catches at 0.3 m above soil, showing that they inhabit the ground vegetation. Visual observations indicated a strong association of leafhopper species with some weeds and the influence of weed species composition on leafhopper abundance in the ground vegetation. *S. marginelineatus* and *P. flavicosta* were more frequent on *Sida rhombifolia* L. and *Althernantera tenella* Colla, respectively, while *A. albidula* was observed more often on *Conyza bonariensis* (L.) Cronq., and *B. hebe* occurred solely on grasses, more abundantly on *Panicum maximum* Jacq. Fourteen weed species sampled in the area were PCR tested for infection by the 16SrIX phytoplasma, but none was found infected. Nevertheless, 3 out of 30 field-collected samples (10 adults per sample) of *S. marginelineatus* tested positive for this phytoplasma by PCR and sequencing. Healthy lab-reared adults of *S. marginelineatus* were able to transmit inefficiently (0,5%) the 16SrIX phytoplasma to healthy citrus after a 72-h acquisition access period on infected citrus plants followed by a 21-day latent period on *S. rhombifolia* plants. By using the qPCR method developed for this phytoplasma, a very low pathogen titer was found both in *S. marginelineatus* and in infected citrus plants, which may explain, at least partially, the low transmission efficiency by this vector using citrus as a source plant. It also suggests that existence of alternative hosts that might be more adequate as inoculum sources for phytoplasma acquisition and spread by *S. marginelineatus* or another vector yet to be discovered.

Keywords: Citrus disease; Phytopathogenic mollicute; Vector transmission; Deltocephalinae; Alternative hosts; Weeds; Quantitative PCR

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor de laranja, produzindo cerca de 19 milhões toneladas da fruta (IBGE, 2010). O Estado de São Paulo é detentor da maior parte desta produção (cerca de 80%), com uma área cultivada de aproximadamente 600 mil ha (FNP, 2010). No entanto, devido à sua grandiosidade, a citricultura brasileira é muito vulnerável ao ataque de pragas e doenças.

No ano de 2004, houve uma grande mudança no panorama da citricultura nacional, devido à identificação da presença da bactéria “*Candidatus Liberibacter* sp.” em pomares cítricos do Estado de São Paulo, o que causou grande alarde aos produtores e comunidade científica (COLLETA-FILHO et al., 2004). Bactérias do gênero “*Candidatus Liberibacter*” estão associadas à doença conhecida como “Huanglongbing” (HLB), uma das mais devastadoras da citricultura mundial (HALBERT; MANJUNATH, 2004, BOVÉ, 2006). Testes moleculares em plantas com sintomas de HLB coletadas na região de Araraquara revelaram a presença de “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” (COLLETA-FILHO et al., 2004), e de uma bactéria geneticamente distinta, descrita como uma nova espécie, “*Candidatus Liberibacter americanus*” (TEIXEIRA et al., 2005).

O sintoma de HLB, também conhecida como “Greening”, caracteriza-se pela ocorrência de um mosqueado e/ou amarelecimento nas folhas de um ramo ou setor da planta. Posteriormente as folhas apresentam sintomas semelhantes ao de deficiência nutricional, ocorrendo abscisão foliar, secamento e morte dos ponteiros. Os frutos apresentam-se menores e assimétricos, com um mosqueado característico, sementes abortadas e gosto amargo, sendo frequente a observação da queda dos mesmos (DA GRAÇA, 1991).

Recentemente, um novo patógeno foi identificado em laranjeiras com sintomas semelhantes aos observados para ‘*Ca. Liberibacter* spp.’ Trata-se de uma nova espécie de fitoplasma, que ainda não havia sido relatada em plantas cítricas (TEIXEIRA et al., 2008). Utilizando “primers” específicos para fitoplasmas, Teixeira et al. (2008) detectaram, pela técnica de “Polymerase Chain Reaction” (PCR), a presença de um patógeno caracterizado como um fitoplasma do grupo 16SrIX sendo confirmada por microscopia eletrônica de transmissão. O fitoplasma associado ao HLB foi inicialmente

detectado em 18 municípios produtores de laranja do Estado de São Paulo, principalmente na região norte, sendo observado isoladamente em plantas sintomáticas e também em plantas infectadas por 'Ca. Liberibacter sp.' (TEIXEIRA et al., 2008). Atualmente esse patógeno está amplamente disseminado por todo o parque citrícola paulista.

Comparativamente, existem mais trabalhos focados na identificação e caracterização molecular de fitoplasmas, do que na determinação dos agentes transmissores desse grupo de patógenos (WEINTRAUB; BEANLAND, 2006). No Brasil, essa situação não é diferente (MONTANO; BRIOSO; PIMENTEL, 2007). Estudos envolvendo interações vetor-patógeno-hospedeiro devem ser realizados para se conhecer a epidemiologia da doença. Outras informações importantes, como plantas hospedeiras alternativas e características de transmissão, são necessárias para que estratégias de manejo sejam adotadas. A comunidade citrícola necessita dessas informações, não só pela ameaça que esse tipo de patógeno pode representar à citricultura, mas também para o enriquecimento de estudos envolvendo vetores de fitoplasmas.

Em busca de novas informações sobre o referido patógeno, o presente trabalho teve como objetivo conhecer a composição faunística de espécies de cigarrinhas em áreas afetadas pelo fitoplasma do grupo 16SrIX; avaliar a infectividade natural de espécies de cigarrinhas coletadas; associar as espécies de cigarrinhas com as plantas invasoras; verificar a transmissão do fitoplasma do grupo 16SrIX por um potencial vetor que seja predominante e portador natural deste patógeno em pomares de laranja e desenvolver uma nova metodologia de quantificação do fitoplasma 16SrIX em insetos e plantas.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 “Huanglongbing”

Os patógenos associados ao “Huanglongbing” (HLB) são bactérias altamente fastidiosas, pertencentes ao gênero ‘*Ca. Liberibacter*’, encontradas no floema de suas plantas hospedeiras (HALBERT; MANJUNATH, 2004). A associação de microrganismos com o HLB foi primeiramente descrita em 1970, presente no floema de folhas de plantas de laranjas doce (LAFLÈCHE; BOVÉ, 1970). Até o presente momento, foram identificadas 3 espécies de ‘*Ca. Liberibacter*’, sendo: ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’, ‘*Ca. Liberibacter africanus*’ (GARNIER et al., 2000) e ‘*Ca. Liberibacter americanus*’ (TEIXEIRA et al., 2005).

A ausência de técnicas para a manutenção destes procariotos em meios de cultura artificiais era uma das grandes dificuldades nos estudos com este grupo de patógenos. No entanto, em estudos recentes, Sechler et al. (2009) desenvolveram um meio de cultura axênico que possibilita o cultivo de ‘*Ca. Liberibacter spp.*’, abrindo novas perspectivas para estudos mais detalhados.

As bactérias podem ser transmitidas pelos insetos vetores *Trioza erytrae* (Del Guercio) e *Diaphorina citri* Kuwayama. *Trioza erytrae* está associado à forma africana da doença e *D. citri* à forma asiática e americana (MCCLEAN; OBERHOLZER, 1965; CAPOOR; RAO; VISWANATH, 1967; YAMAMOTO et al., 2006). Estudos sobre as interações envolvendo vetores e patógenos estão em andamento, porém trabalhos indicam que a bactéria é capaz de se multiplicar no inseto e que o período entre a aquisição e a habilidade de transmitir a bactéria varia entre as duas espécies (BUITENDAG; VON BROEMBSSEN, 1998, INOUE et al., 2009; NASCIMENTO et al., 2010).

A primeira constatação do HLB nos pomares brasileiros foi em março de 2004, sendo detectada a forma asiática da doença (‘*Ca. L. asiaticus*’) (COLETTA-FILHO et al.,

2004) e também uma forma nunca vista no mundo, denominada 'Ca. L. americanus' (TEIXEIRA et al., 2005).

As bactérias causadoras do HLB também são encontradas na planta ornamental *Murraya paniculata* (L.) Jack (LOPES et al., 2010), conhecida popularmente como murta, falsa murta ou murta de cheiro, também uma planta hospedeira do vetor *D. citri* (NAVA et al., 2007). O inseto vetor é capaz de transmitir o patógeno a partir de plantas de murta para plantas cítricas (GASPAROTO et al., 2010). Sua introdução em uma nova área pode ocorrer por meio de mudas infectadas ou pelos insetos vetores *T. erythrae* (MCCLEAN; OBERHOLZER, 1965) e *D. citri* (CAPOOR; RAO; VISWANATH, 1967). A disseminação no campo depende da ocorrência e eficiência de transmissão dos insetos vetores e também das condições geográficas e ambientais da região.

Como em muitas doenças de sistema vascular, o HLB desenvolve sintomas generalizados de deficiência nutricional, afetando folhas, ramos e frutos. O sintoma inicial se manifesta em um ramo, cujas folhas apresentam cor amarela, contrastando com a coloração verde das folhas de ramos não afetados. O sintoma evolui para um forte mosqueamento, com áreas ou manchas amarelo-pálida, em alguns casos ocorre clorose internerval, sendo comum observar o engrossamento e clareamento das nervuras das folhas, que ficam com aspecto corticoso (BOVÉ, 2006).

O HLB é uma doença da copa que não é afetada ou controlada pela mudança do porta-enxerto. Como não existem variedades resistentes, nos países onde o HLB está presente, o controle é feito mediante manejo dos pomares, baseado em algumas medidas fundamentais: uso de mudas sadias, monitoramento dos vetores e seu controle, além da erradicação de árvores sintomáticas. Plantas infectadas de qualquer idade devem ser eliminadas, uma vez que a poda não é recomendada (LOPES et al., 2007).

2.1.2 Fitoplasmas como agentes patogênicos

Fitoplasmas são procariotos sem parede celular com tamanhos que variam entre 200 e 800 nm, importantes agentes patogênicos transmitidos por insetos, causando cerca de 700 doenças em plantas, das quais muitas são letais (WEINTRAUB;

BEANLAND, 2006; BERTACCINI, 2007; FIRRAO; GARCIA-CHAPA; MARZACHÌ, 2007). Apresentam-se na forma de corpos pleomórficos encontrados no sistema vascular de plantas infectadas (LEE et al., 2000) e são transmitido na natureza por insetos que se alimentam do floema das plantas, como cigarrinhas e psílídeos (WEINTRAUB; BEANLAND, 2006). Historicamente, antes do desenvolvimento de técnicas de detecção moleculares, as doenças causadas por fitoplasma eram consideradas viróticas, devido aos sintomas serem semelhantes àqueles causados por vírus. Posteriormente, os sintomas foram relacionados à presença de procariotos morfológicamente semelhantes à micoplasmas nos vasos de plantas infectadas (DAVIS, 1995; BERTACCINI, 2007).

Devido ao não crescimento em meio de cultura e à ausência de técnicas moleculares, poucos eram os conhecimentos das características de um fitoplasma, sendo classificados no grupo dos Mollicutes, conhecidos como mycoplasma-like organisms (MLOs). Com o advento de tecnologias baseadas no estudo do DNA, esses microrganismos foram diferenciados em grupos por meio de análises filogenéticas. (BERTACCINI, 2007, FIRRAO; GARCIA-CHAPA; MARZACHÌ, 2007).

No ano de 1992, o nome trivial 'fitoplasma' foi adotado para os organismos pertencentes a este grupo pela equipe de estudos de fitoplasmas ("Phytoplasma Working Team") do "International Research Project for Comparative Mycoplasmaology" (IRPCM). No ano de 2004, foi proposta a designação de um gênero '*Candidatus Phytoplasma*', com o intuito de formalizar a classificação desses procariotos (IRPCM, 2004). Bertaccini (2007) relatou 15 grupo diversos de fitoplasmas e 59 subgrupos, descrevendo a diversidade representada por este grupo de fitopatógenos.

Os sintomas apresentados por plantas infectadas por fitoplasmas (amarelecimento, filodia, nanismo, virescência, esterilidade de flores, superbrotamento, alongamento de internódios) sugerem que esses patógenos interferem no sistema hormonal nas plantas (DAVIS, 1995; BERTACCINI, 2007).

2.1.2.1 Fitoplasmas presentes em citros

No mundo todo, existem três relatos de fitoplasmas infectando espécies do gênero *Citrus*. ‘*Candidatus Phytoplasma aurantifolia*’ foi detectado como o agente causal da ‘Witch’s-Broom Lime Disease’ em plantas de limão galego [*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle], fitoplasma este pertencente ao grupo 16SrII (GARNIER et al., 1991; ZREIK et al., 1995), em Oman, Ásia. Esta doença causa grandes perdas de produção em plantas infectadas, sendo facilmente identificada pelo aparecimento do sintoma denominado “vassoura de bruxa” em ramos infectados (BERTACCINI, 2007), sendo considerada uma doença quarentenária e de grande importância para a citricultura mundial. O vetor deste fitoplasma é um cicadelídeo, da subfamília Deltocephalinae, *Hishimonus phycitis* (Distant) (SALEHI et al., 2007). No Brasil, um fitoplasma pertencente ao grupo 16SrIX foi detectado em plantas de laranja-doce [*Citrus sinensis* (Osbeck) L.] nos pomares citrícolas paulistas. O fitoplasma apresentou uma associação constante com plantas doentes apresentando sintomas muito semelhantes aos do HLB. Apenas pelos sintomas visuais em citros, é difícil a distinção de infecção por este fitoplasma e pelas bactérias do gênero “*Candidatus Liberibacter*”. Somente por meio de técnicas moleculares é possível a diferenciação entre os dois patógenos (TEIXEIRA et al., 2008). Recentemente, na China, Chen et al. (2009) reportaram a presença de um fitoplasma do grupo 16SrI-B causando sintomas semelhantes àqueles causados por ‘*Ca. Liberibacter sp.*’ em laranja-doce. Até o presente, este patógeno não possui um inseto vetor conhecido.

Este fitoplasma encontra-se disseminado por todas as regiões citrícolas do estado de São Paulo (TEIXEIRA et al., 2008). Por ser uma descoberta recente, as informações sobre este organismo são escassas, tornando-se necessários estudos mais profundos sobre sua etiologia, epidemiologia, transmissão, danos e controle.

2.1.2.2 Plantas hospedeiras de fitoplasmas identificados no Brasil

Fitoplasmas são encontrados em uma ampla gama de hospedeiros, com grande variação entre os grupos botânicos. No entanto, o advento das técnicas moleculares

trouxeram consideráveis avanços na classificação desses organismos, sendo possível a divisão em grupos filogenéticos distintos (LEE, DAVIS, GUNDERSEN-RINDAL, 2000; BERTACCINI, 2007; MONTANO; BRIOSO; PIMENTEL, 2007).

No Brasil, os trabalhos com fitoplasmas foram iniciados na metade do século passado. Os primeiros registros foram: vassoura de bruxa da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), casca grande do tomate (*Solanum lycopersicon* L.) e a vassoura de bruxa na planta invasora buva [*Coniza bonariensis* (L.) Cronq.] (MONTANO; PIMENTEL; BRIOSO, 2007). Desde então, várias doenças causadas por estes patógenos foram identificadas. Os fitoplasmas já identificados no Brasil pertencem a diversas famílias botânicas, como Amaranthaceae, Arecaceae, Asteraceae, Apocynaceae, Begoniaceae, Bignoniaceae, Brassicaceae, Cucurbitaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Malvaceae, Meliaceae, Nyctaginaceae, Passifloraceae, Poaceae, Rosaceae, Rutaceae e Solanaceae (MONTANO; PIMENTEL; BRIOSO, 2007; MAFIA et al., 2008; RIBEIRO; SILVA; BEDENDO, 2008; TEIXEIRA, et al., 2008; DUARTE et al., 2009; MELO; BEDENDO; YUKI, 2009; SILVA et al., 2009; RAPUSSIDA-SILVA, 2010; ECKSTEIN, 2010; ECKSTEIN; BEDENDO, 2010; ECKSTEIN et al., 2010). Estas informações demonstram a diversidade de hospedeiros que este grupo de patógenos apresenta, aumentando a importância da identificação de novas doenças causadas por estes procariotos.

Porém, a grande variedade de fitoplasmas descritos não reflete nos insetos vetores identificados (MONTANO; BRIOSO; PIMENTEL, 2007). O sistema inseto-patógeno hospedeiro do enfezamento do milho (causado por um fitoplasma do 16Srl-B) é o mais estudado no Brasil, provavelmente devido à importância da cultura no país (MASSOLA JR, et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2002; OLIVEIRA et al. 2004; HAAS, 2006) e também aos estudos já realizados nos Estados Unidos (NAULT, 1980; MADDEN et al., 1984; NAULT, 1990; EBBERT et al., 2001).

A detecção do patógeno no inseto não o identifica como um vetor, mas é uma indicação da sua potencial atividade na disseminação de patógenos vasculares. A identificação de fitoplasmas no Brasil ocorre com maior rapidez do que a identificação de seus vetores, acompanhando uma tendência mundial (WEINTRAUB; BEANLAND, 2006). Informações epidemiológicas importantes são obtidas com a identificação dos

insetos vetores, consolidando a necessidade da realização de mais estudos envolvendo estas interações.

2.1.3 Vetores de fitoplasmas

A ordem Hemiptera é a única em que estão inseridos os vetores de fitoplasma identificados até o presente momento. Esse grupo possui várias características que fazem de seus membros eficientes vetores de fitoplasmas. São hemimetábolos, portanto as fases jovens e adultas alimentam-se do mesmo nicho alimentar. Sendo assim, ambas as fases são capazes de adquirir e de transmitir o fitoplasma. Também, alimentam-se especificamente e seletivamente de certos tecidos da planta que fazem deles vetores de patógenos (WILSON; WEINTRAUB, 2007). Além disso, os fitoplasmas possuem relação persistente e propagativa com os insetos, semelhante aos procariotos simbióticos obrigatórios que são transmitidos de forma transovariana, assim como ocorre para fitoplasmas (WEINTRAUB; BEANLAND, 2006; WEINTRAUB, 2007).

Dentro do grupo de insetos que se alimentam no floema, três grupos taxonômicos foram confirmados como vetores de fitoplasmas. Na superfamília Membracoidea são encontrados o maior número de vetores, sendo restrito à família Cicadellidae. A segunda maior é Fulgoroidea, onde quatro famílias são destacadas como vetoras de fitoplasmas: Derbidae, Flatidae, Cixiidae e Delphacidae. O menor grupo pertence à subordem Sternorrhyncha, onde somente dois gêneros pertencentes à família Psyllidae são confirmados como vetoras de fitoplasma. O envolvimento de cigarrinhas (Hemiptera: Auchenorrhyncha) na disseminação deste grupo de patógenos compreende cerca de 90% dos casos reportados, sendo que a subfamília Deltocephalinae (Cicadellidae) abrange a maior parte dos vetores identificados (NIELSON, 1979, 1985; WEINTRAUB; BEANLAND, 2006; WILSON; WEINTRAUB, 2007).

Estudos sobre as interações envolvendo vetores e fitoplasmas foram realizados nos últimos anos (BRESSAN et al., 2006, BOSCO et al., 2007; GALLETO et al., 2009). A utilização de técnicas, como o PCR quantitativo (qPCR), possibilita quantificar o DNA bacteriano no corpo do inseto, possibilitando a determinação do curso de colonização do patógeno em seu vetor (GALLETO et al., 2009).

Estudos que envolvam vetor e fitoplasma podem acrescentar informações importantes para o entendimento epidemiológico da doença no agrossistema (WEINTRAUB; BEANLAND, 2006).

2.1.4 Identificação de vetores de fitoplasmas

Para a compreensão de um sistema epidemiológico de doenças em plantas é necessário o conhecimento de seus componentes (BERGAMIN FILHO; AMORIN, 1995). No estudo de caso de um fitoplasma, a identificação de seu(s) inseto(s) vetores é fundamental para a adoção de estratégias de manejo, assim como a suposição de modelos epidemiológicos, pois se trata de um patógeno vascular e dependente da ação de um agente disseminador.

A utilização de métodos de amostragem visando à identificação dos potenciais vetores é o primeiro passo na procura pelo agente disseminador. O método mais comum para se monitorar a população de insetos vetores na área afetada é por meio de armadilhas adesivas amarelas (WEINTRAUB; OREINSTEIN, 2004). Métodos como armadilhas de vácuo e rede de varredura são técnicas muito utilizadas para a captura de insetos vivos e intactos. Uma alternativa para a captura de insetos vivos, é a coleta de insetos diretamente no ramo de árvores e em plantas arbustivas (WEINTRAUB; BEANLAND, 2006).

No Brasil, Rappussi (2010) identificou duas espécies de cigarrinhas potenciais vetoras do fitoplasma associado ao enfezamento da couve-flor, *Balclutha hebe* (Kirkaldy) e *Exitianus obscurinervis* (Stål). Eckstein (2010) detectou fitoplasmas em várias espécies de deltocephalíneos, como *B. hebe*, *Planicephalus flavicosta* (Stål), *Atanus nitidus* (Linnavuori) e *Scaphytopius fuliginosis* (Osborn), além de outros dois morfotipos da subfamília Agallinae e um de Typhlocibinae. Estes resultados demonstram que os vetores de fitoplasmas no Brasil podem estar relacionados à cicadelídeos, com atenção especial à subfamília Deltocephalinae.

Em estudos envolvendo “Ca. Phytoplasma aurantifolia”, Salehi et al. (2007) identificaram a cigarrinha *H. phycitis* como o inseto vetor desta bactéria. A realização de estudos visando elucidar o agente transmissor deste fitoplasma foi motivado por

resultados positivos de infectividade natural de cigarrinhas capturadas em levantamentos realizados em áreas infestadas (BOVÉ et al., 1993), e de detecção da bactéria em meio de alimentação artificial (SIAMPOUR et al., 2006).

Como muitos vetores de fitopatógenos são desconhecidos, o levantamento de espécies de cigarrinhas presentes em cultivos comerciais é fundamental para o conhecimento da potencialidade de algumas espécies como transmissoras de agentes patogênicos. Trabalhos com este intuito vêm sendo realizados e as informações obtidas sugerem que a diversidade de cigarrinhas no Brasil garante muitas opções de espécies potenciais vetoras (GIUSTOLIN et al., 2009; MIRANDA et al., 2009; LOPES; OLIVEIRA, 2004; YAMAMOTO; GRAVENA, 2000; RINGENBERG et al., 2010).

2.1.5 PCR quantitativo ou qPCR

Um dos principais métodos para se detectar fitopatógenos vasculares em plantas é o PCR ("Polymerase Chain Reaction"). Baseado na amplificação exponencial da sequência de um DNA por meio de ciclos repetitivos de síntese de DNA, esta reação produz grandes quantidades de um fragmento de tamanho conhecido. Após a reação, esses podem ser visualizados sob luz ultravioleta em gel de agarose corado com brometo de etídio (MILLER; JOAQUIM, 1993).

Uma tecnologia mais recente utilizada nos estudos com microrganismos é o PCR quantitativo (qPCR), também conhecido como Real Time PCR. Esta técnica é muito sensível, o que possibilita a detecção de baixas concentrações do fragmento alvo, além da capacidade de quantificá-lo na amostra testada.

O qPCR é realizado com o uso de um termociclador conectado a um computador, que monitora a reação de amplificação. O computador é equipado com um software que gera gráficos, valores quantitativos para as amostras e analisa a qualidade da reação (HIGUCHI et al., 1993; GIBSON; HEID; WILLIAMS, 1996). Não é necessário o uso de géis de agarose ou poliacrilamida, já que todos os resultados são visualizados na tela do computador (PFAFFL, 2004).

O qPCR baseado na tecnologia TaqMan® utiliza uma sonda específica para a sequência alvo. A sonda, que assemelha-se a um primer adicionado de agente

fluorescente, quando anelado ao DNA alvo libera energia em forma de luz fluorescente de um determinado comprimento de onda. Essa fluorescência é captada pelo aparelho a cada ciclo realizado nas amostras.

O qPCR pode ser empregado em testes diagnósticos simples ou em estudos mais aprofundados para quantificação de fragmentos de DNA de interesse. Dividida em quatro fases (expectativa de amplificação exponencial, fase exponencial, amplificação linear e fase de estabilização), o qPCR determina a quantidade de DNA-alvo amplificado. Este é diretamente proporcional à quantidade presente na amostra na fase exponencial da reação. Ao fim da reação, o software valores de Ct (“threshold cycle values”), que representa o número do ciclo em que dada amostra iniciou a geração de fluorescência ao cruzar com a linha do limiar de qualidade da reação. Este valor é inversamente proporcional à quantidade do DNA alvo na amostra (TICHOPAD et al., 2003).

A quantificação pode ser absoluta e relativa. A primeira relaciona o Ct obtido da amostra com uma curva de calibração pré-estabelecida (curva padrão), idealizada com diluições de DNA extraído de colônias puras do agente, ou da diluição da sequência alvo de amplificação clonado em um plasmídeo. Com uma curva padrão bem elaborada é possível obter quantificações sensíveis e precisas (SOUAZE et al., 1996). Para a quantificação relativa é necessário o uso de um controle interno na própria amostra ou um DNA endógeno (18S no caso de eucariotos) em relação ao 16S do patógeno (procarioto) (PFAFFL, 2004). Outra maneira de realizar esta quantificação relativa é por meio de uma reação paralela com o uso de “primers” e sondas específicas para a região 18S do inseto ou da planta hospedeira (GALETTTO; BOSCO; MARZACHÌ, 2005; MARZACHÌ; BOSCO, 2005, BOSCO et al., 2007). Desta maneira, é possível determinar a quantidade de DNA do hospedeiro presente na amostra, o que possibilita o cálculo da relação do DNA do patógeno e DNA do hospedeiro, ou calcular o número de unidades genômicas do patógeno por DNA do hospedeiro.

Esta metodologia vem sendo empregada na determinação de potenciais vetores de alguns patógenos. Galetto et al. (2009) determinaram diferenças de concentrações de ‘*Ca. Phytoplasma asteris*’ em diferentes partes do corpo do vetor *Euscelidius variegatus* Kirschbaum. Insetos que apresentavam alta concentração de bactérias na

cabeça eram capazes de inocular o fitoplasma para plantas com menor período de latência. Esta concentração bacteriana também diferenciou indivíduos da mesma espécie em transmissores e não-transmissores. Bosco et al. (2007) utilizaram qPCR para determinar a concentração bacteriana em insetos com diferentes níveis de eficiência de transmissão. Quantidades significativamente diferentes foram encontradas no corpo da cigarrinha *Macrostelus quadripunctulatus* Kirschbaum, mais eficiente na transmissão de ‘Ca. P. asteris’, em relação à *E. variegatus*.

Informações como estas podem sugerir o potencial de importância de uma determinada espécie de inseto na disseminação de fitoplasmas na natureza.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Levantamento de insetos potenciais vetores do fitoplasma 16SrIX associado ao “Huanglongbing” (HLB) dos citros

Os levantamentos foram conduzidos na Fazenda São João, de propriedade da empresa Fisher S.A., na cidade de Nova Granada, localizada na região norte do parque citrícola paulista. A área foi selecionada por apresentar plantas infectadas pelo fitoplasma do grupo 16SrIX, associado a sintomas de HLB. Foram amostrados dois talhões de laranja-doce (*C. sinensis*), um composto de plantas da variedade ‘Valência’, enxertada sobre limão-cravo (*Citrus limonia* Osbeck), com 14 anos de idade (quadra 7, 20°31’48”S e 49°12’36”), e o outro com plantas da variedade ‘Pêra’, enxertada sobre limão cravo, com 8 anos de idade (quadra 316, 20°33’27”S e 49°18’02”W). A quadra 7, com 1,5 ha de área, possui formato triangular, fazendo limites com uma área de floresta arbustiva tipo estacional em um dos lados e com outras quadras de laranja nos demais. A quadra 316, medindo 1 ha, também com formato triangular, fazia limites com um seringal em um dos lados e com outras quadras de laranja nos demais. Ambos os talhões apresentavam espaçamento entre plantas de 6 x 7 m.

A metodologia de levantamento de espécies potencialmente vetoras foi delineada para a coleta de cigarrinhas, especialmente cadelídeos (Hemiptera: Cicadellidae), que constituem o principal grupo de vetores de fitoplasmas

(WEINTRAUB; BEANLAND, 2006). Um dos métodos utilizados foi a amostragem com rede de varredura, realizando-se coletas quinzenais de cigarrinhas no período de abril/2008 a maio/2009, nos dois talhões estudados. As coletas foram realizadas no período da manhã, entre 9:00 e 11:00 h. Para cada amostragem, foram tomados 20 pontos aleatórios nos talhões, nas entrelinhas do pomar e sobre a vegetação rasteira, sendo cada ponto composto por 50 batidas com a rede de varredura.

Os insetos coletados com rede de varredura foram armazenados em sacos confeccionados com tecido tipo *voil*, e transportados até o Laboratório de Insetos Vetores de Fitopatógenos, no Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ/USP, Piracicaba-SP. Os insetos foram mantidos em freezer (-20°C) por cerca de 24 h, realizando-se, em seguida, a triagem do material para separação dos morfotipos coletados. Alguns exemplares dos insetos coletados foram depositados em uma coleção de referência no Museu de Entomologia do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ/USP, e o restante utilizado para extração de DNA e teste de PCR. O teste de PCR foi realizado para detecção do referido fitoplasma (grupo 16SrIX), avaliando-se a infectividade natural das espécies de cigarrinhas.

Paralelamente, foram utilizadas nas duas áreas em estudo, cartelas adesivas amarelas (dupla face, com dimensões de 8,5 x 11 cm) para avaliação da atividade das espécies de cigarrinhas no pomar. Tais armadilhas foram dispostas em 20 pontos dentro de cada talhão, sendo cada ponto constituído por 1 planta cítrica com 2 armadilhas presas a ramos da periferia da copa, nas alturas de 0,3 m e 1,5 m do solo. Essas duas alturas foram avaliadas com o intuito de examinar a atividade das cigarrinhas na copa das laranjeiras (altura de 1,5 m) ou em trânsito no pomar, e também na vegetação rasteira (0,3 m).

As cigarrinhas capturadas foram retiradas das cartelas adesivas utilizando um solvente (querosene) para dissolução da cola, e montadas em alfinete entomológico. A identificação dos insetos foi realizada sob microscópio estereoscópico, com atenção aos caracteres morfológicos, por meio de comparação com espécimes já identificados e depositados na coleção de cigarrinhas do Museu de Entomologia da ESALQ/USP. Indivíduos de identificação duvidosa, de morfoespécies abundantes pertencentes à subfamília Deltoccephalineae, foram enviados para a Profa. Dra. Ketí Zanol

(Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Paraná – UFPR), especialista neste grupo de cigarrinhas.

Com os números de espécimes de cigarrinhas coletados com armadilhas adesivas em cada área no período de abril/2008 a maio/2009 realizou-se uma análise faunística para determinar as espécies que apresentaram os maiores índices faunísticos, tais como constância, frequência, abundância e dominância (SILVEIRA NETO et al., 1995). Os índices foram calculados pelo programa ANAFAU (MORAES et al., 2003). Para comparar as diferentes alturas foi realizado teste t de Student, usando o software R 2.12.1.

2.2.2 Coleta e identificação de plantas invasoras das áreas

Em janeiro/2009 foi realizado levantamento florístico de plantas invasoras nos talhões de laranja utilizados no estudo. Um quadro de 1 x 1 m (1 m²) foi lançado aleatoriamente cinco vezes na entrelinha das plantas de laranja e cinco vezes sob as copas das árvores, totalizando uma área amostrada de 10 m² em cada talhão. Na região delimitada pelo quadro contou-se o número de indivíduos e identificaram-se as espécies com o uso de manuais de identificação (KISSMANN; GROTH, 1999, LORENZI, 2000). Com os resultados obtidos, calcularam-se os parâmetros de Frequência (F), Densidade (D), Abundância (A), Frequência relativa (Fr), Densidade relativa (Dr), Abundância relativa (Ar) e Índice de valor de importância (IVI) (MUELLER-DOMBOIS; ELLENBERG, 1974).

2.2.3 Associação de cigarrinhas com plantas hospedeiras

Por meio de avaliações visuais, as cigarrinhas frequentes e abundantes de acordo com o item 2.2.1 foram associadas às plantas invasoras presentes no pomar de laranja-doce. Plantas invasoras que apresentaram elevado IVI identificadas como importantes (elevado valor do IVI) nas áreas (item 2.2.2) foram observadas por cerca de 30 segundos, registrando-se as espécies e número de indivíduos de cigarrinhas sobre cada planta. Para cada espécie vegetal, foram observados 5 exemplares. A associação

entre as espécies de plantas invasoras e de cigarrinhas foi avaliada por teste de qui-quadrado por meio do software R 2.12.1.

2.2.4 Detecção do fitoplasma associado ao “Huanglongbing” dos citros nos insetos

Os insetos coletados com o uso de rede de varredura no item 2.2.1 foram enviados para o laboratório de diagnósticos do Fundecitrus, para realização de teste de PCR para detecção do fitoplasma dos citros (grupo 16SrIX) nos insetos.

Para a extração do DNA, utilizou-se o protocolo de Murray e Thompson (1980). Grupos de 10 indivíduos de cada morfoespécie foram macerados em 1 mL de tampão (CTAB 2%; NaCl 1,4M; Tris-HCl pH 8,0 100 mM; EDTA 20 mM; β -Mercaptoetanol 1%) em tubos de 1,5 mL, e incubados por 30 min a 65°C. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 5 min a 5000 x g, recuperando-se o sobrenadante, e adicionando-se ao mesmo 600 μ L de CIA (clorofórmio álcool isoamílico 24:1); a mistura foi homogeneizada e centrifugada por 20 min a 16.000 x g. Na sequência, retirou-se o sobrenadante, transferindo-o para outro tubo e adicionando-lhe 60% do volume de isopropanol a -20°C; a mistura foi homogeneizada e mantida à -20°C por, no mínimo, 30 min. Após esse período, a mistura foi centrifugada a 14.000 x g por 20 min. O sobrenadante foi descartado, adicionando-se ao pellet 1000 μ L de etanol 70% e centrifugando-se a 14.000 x g por 10 min. O etanol foi descartado e os tubos mantidos abertos e invertidos sobre papel toalha para a secagem do precipitado. Em seguida o pellet foi ressuspensionado em 50 μ L de água deionizada e armazenada a -20°C.

O DNA total de cada amostra foi utilizado no teste de PCR. Como controle negativo, utilizou-se DNA de plantas de laranja sadias mantidas exclusivamente em viveiros telados e, como controle positivo, DNA de plantas de laranja infectadas pelo fitoplasma de citros do grupo 16SrIX, cuja identidade foi previamente confirmada por sequenciamento genético (TEIXEIRA et al., 2008).

Todas as amostras foram testadas para a presença do patógeno utilizando “nested” PCR, com os pares de “primers” P1 (5' - AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG GAT T - 3') e P7 (5' - CGT CCT TCA TCG GCT CTT - 3') (SCHNEIDER et al., 1995) na

primeira reação e D7r2 (5' - CTA AAG TGC TCA CCA TTA CGT GG - 3') e D7f2 (5' - ATG TGT AGC TGG ACT GAG AGG - 3') na segunda (TEIXEIRA et al., 2008). Cinco microlitros de DNA foi adicionado ao mix de reação contendo 200 µM de dNTP's, 1,5 mM MgCl₂, 500 nM de cada "primer" e 0,5 U de Taq DNA polimerase. Na segunda reação do nested-PCR, adicionou-se 1 µL da primeira reação ao mix, seguindo as mesmas proporções de reagentes descritas anteriormente. A amplificação foi realizada em um termociclador PTC-100 (MJ Research Inc. Watertown, MA 02172, EUA), programado para as seguintes condições: um ciclo inicial de 94°C por 3 min seguido de 35 ciclos de 92°C por 45 s, 62°C por 45 s, 72°C por 45 s seguido por um ciclo final de 72°C por 5 min e posteriormente estabilizando a 4°C por tempo indeterminado. Os produtos de PCR da segunda reação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, tratado com brometo de etídio. A visualização do fragmento foi realizada em transluminador de luz ultravioleta. Para comparação das bandas, utilizou-se marcador molecular 1 Kb Ladder (Life Technologies).

Em caso de resultado positivo, as amostras eram enviadas para sequenciamento, para confirmação da presença do patógeno. Os produtos de PCR foram purificados em coluna (kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, nº catálogo A9281 - Promega) e sequenciados sem clonagem. Em alguns casos, foi utilizado a clonagem para sequenciamento. Os produtos de PCR purificados foram submetidos à clonagem em vetor plasmidial pGEM T Easy (pGEM T Easy Vector System, nº catálogo A1360 - Promega), seguindo-se as recomendações do fabricante. Os plasmídios transformados foram extraídos e enviados para sequenciamento.

2.2.5 Coleta de plantas visando identificação de potenciais hospedeiros do fitoplasma

Para a identificação de hospedeiros alternativos do fitoplasma no pomar de laranja, realizou-se uma coleta de plantas daninhas para testes de PCR visando à detecção do patógeno.

As plantas foram amostradas ao acaso, independentemente da presença de sintomas que poderiam indicar a presença do patógeno, já que plantas podem estar

infectadas sem demonstrar sintomas característicos da presença de fitoplasmas (BERTACCINI, 2007). As plantas coletadas foram identificadas no local, baseando-se nas características do levantamento descrito no item 2.2.2. Coletaram-se amostras foliares de 5 a 10 plantas de cada espécie vegetal. As amostras foram armazenadas em sacos plásticos, acondicionadas em caixa térmica contendo gelo para manutenção de temperatura em torno de 15°C, e transportadas até o laboratório para extração de DNA. Adotou-se o protocolo de extração proposto por Murray e Thompson (1980), conforme descrito no item 2.2.4, utilizando 1 g de material vegetal por amostra. Os procedimentos e condições de PCR foram os mesmos descritos no item 2.2.4, no entanto, utilizou-se 1 µL de DNA total para a primeira reação.

2.2.6 Estudos de transmissão do fitoplasma de citros (grupo 16SrIX) por vetores

Nos estudos de verificação e caracterização da transmissão do fitoplasma de citros (grupo 16SrIX), utilizou-se uma das espécies de cigarrinhas potencialmente vetoras, *Scaphytopius (Convelinus) marginelineatus* (Stål), que foi observada com maior frequência nos levantamentos (item 2.3.1) e na qual foi detectada a infecção natural pelo fitoplasma do grupo 16SrIX (item 2.3.2).

2.2.6.1. Criação de insetos

Para a condução dos experimentos, utilizaram-se insetos adultos recém-emergidos, provenientes de criação em laboratório. Para o início da criação, exemplares de *S. marginelineatus* foram coletados com rede de varredura sobre plantas de guanxuma (*Sida rhombifolia* L.), seguindo informações de associação da cigarrinha com seus hospedeiros (item 2.3.5). Foram coletados cerca de 50 insetos, mantidos em gaiolas e posteriormente confinados sobre plantas de guanxuma. Como a idade desses insetos era desconhecida, inicialmente, foram mantidos sobre as plantas por 7 dias, compreendendo o período de postura. Utilizou-se de gaiolas teladas de dimensões 33 x 33 x 50 cm, contendo plantas de guanxuma de aproximadamente 20 cm de altura (plantas com 30 a 40 dias após semeadura).

Após esse período, os insetos foram retirados e as plantas mantidas por um período de incubação de 7 dias, até a eclosão das ninfas. As gaiolas contendo os insetos foram mantidas em casa de vegetação sem controle de temperatura e umidade durante todo o ciclo do inseto. As plantas das gaiolas foram trocadas semanalmente, garantindo plantas de boa sanidade aos insetos.

Para manutenção da colônia, adultos recém-emergidos foram confinados (em gaiolas descritas anteriormente) sobre plantas de guanxuma por um período de oviposição de 4 dias. Após este período, as plantas foram trocadas, iniciando-se uma nova postura. As plantas que passaram pelo período de postura eram mantidas em novas gaiolas para eclosão das ninfas, dando continuidade à colônia. Não foram avaliados parâmetros biológicos, no entanto foi possível realizar observações indicando o período de duração das fases de ovo (4 a 7 dias), ninfa (20 a 30 dias) e adulto (60 a 80 dias de longevidade).

Todas as plantas de guanxuma utilizadas foram provenientes de sementeiras em bandejas e mantidas em casa de vegetação. Após 7 a 10 dias do semeio, as plântulas emergidas são transferidas para vasos de 0,5 L, contendo substrato Plantmax®, e suplementadas nutricionalmente com 0,5 g de nitrato de cálcio por vaso. De 25 a 40 dias após o transplante, as plantas estavam com altura ideal para utilização na criação.

Para os trabalhos envolvendo os insetos foram utilizadas caixas de manipulação e aspiradores, conforme descrito por Oliveira e Lopes (2004).

Após a estabilização da colônia, esta metodologia de criação garantiu a produção de cerca de 100 insetos semanais para a utilização em testes de transmissão. Os insetos provenientes da criação eram livres do fitoplasma, confirmado por teste de PCR.

2.2.6.2 Plantas-fontes e plantas-testes

Como fontes do referido fitoplasma, utilizaram-se plantas cítricas infectadas e sintomáticas provenientes de campo, transplantadas para vasos de 100 litros, e mantidas em casa de vegetação. A infecção pelo fitoplasma nas plantas-fonte foi confirmada por PCR e sequenciamento, conforme descrito anteriormente (itens 2.2.4 e

2.2.5). Essas plantas também foram indexadas como livres de '*Candidatus Liberibacter* spp.', procurando-se evitar, assim, algum tipo de interação no processo de aquisição do fitoplasma pela cigarrinha.

Espécies vegetais usadas como plantas-teste ou plantas intermediárias (plantas de *S. rhombifolia* utilizadas durante períodos de latência do fitoplasma no inseto) nos experimentos de transmissão foram obtidas a partir de sementes ("seedlings"), portanto livre de agentes patogênicos sistêmicos, e mantidas em casa de vegetação isenta de insetos vetores.

2.2.6.3 Transmissão por cigarrinhas para plantas hospedeiras de fitoplasmas

Com o objetivo de avaliar a transmissão do fitoplasma para plantas hospedeiras de cigarrinhas (item 2.3.5) e também do fitoplasma 16SrIX (TEIXEIRA et al., 2008; WULFF et al., 2009), cerca de 1000 adultos de *S. marginelineatus* livres de fitoplasma, provenientes de colônia de laboratório, foram mantidos em plantas-fonte do patógeno por um período de acesso à aquisição (PAA) de 72 h. Posteriormente foram mantidos em plantas intermediárias sadias (*S. rhombifolia*) por um período de latência de 3 a 4 semanas. Em seguida, esses insetos foram confinados em plantas-teste de citros (*C. sinensis* cv. Caipira), vinca [*Catharanthus roseus* (L.) G. Don], guanxuma (*S. rhombifolia*), capim-marmelada [*Brachiaria plantaginea* (Link) Hitchc.], capim-colonião (*Panicum maximum* Jacq.), buva [*Conyza bonariensis* (L.) Cronq.] e crotalária (*Croalaria juncea* L.) por um período de acesso à inoculação (PAI) de 72 h. Após o PAI, as plantas foram mantidas em casa de vegetação com tela antiafídica para posterior avaliação de sintomas e testes de PCR (conforme descrito em 2.2.4 e 2.2.5); os insetos usados nas inoculações também foram submetidos a testes de PCR, para verificar a infecção pelo fitoplasma nos mesmos. Como controle negativo, foram mantidas 5 plantas de cada espécie que não passaram pelo PAA, com excessão de citros (15) mantidas nas mesmas condições das demais.

2.2.7 Desenvolvimento da técnica de PCR quantitativo para estudos com o fitoplasma do grupo 16SrIX, associado ao “Huanglongbing” (HLB) dos citros

2.2.7.1 “Primers” e sondas para aplicação do PCR quantitativo (qPCR)

Esta fase de desenvolvimento da técnica de qPCR foi realizada no Dipartimento di Valorizzazione e Protezione delle Risorse Agroforestali (Di.Va.P.R.A) - Università degli Studi di Torino (UNITO), Itália. Para o desenvolvimento dos “primers” e sondas para a quantificação bacteriana, utilizou-se a sequência da região genômica 16S do fitoplasma associado ao HLB dos citros (grupo 16SrIX) (GenBank, acesso número EU266074.1). Para a utilização do qPCR, foi necessário desenvolver um par de “primers” que amplificasse um fragmento menor da sequência do fitoplasma (tabela 1) e uma sonda. Os “primers” foram desenhados sobre a sequência específica de 857 pb, amplificada com os “primers” D7r2/D7f2 (TEIXEIRA et al., 2008), usando-se o software DNAMAN (versão 4.02, Lynnon Biosoft). Os “primers” amplificam um fragmento de 91 pb, sendo realizado teste de gradiente para determinação da temperatura de anelamento. A sonda anela entre a sequência dos “primers”, utilizando o fluoróforo FAM e o “quencher” BHQ-1. No intuito de verificar a especificidade destes “primers”, foi realizada uma prova virtual (com o uso do mesmo software) do alinhamento dos mesmos sobre sequências do mesmo gene de outras bactérias encontradas em citros, como *Bacillus pumilus* e *Methylobacterium extorquens* (ARAÚJO et al., 2002), e alguns simbiossomas que possam estar presentes em cigarrinhas (GALETTO et al., 2009; PURCELL et al., 1986).

Para quantificação relativa de DNA de bactéria em relação ao DNA do inseto ou planta, utilizaram-se “primers” e sondas que amplificam a região 18S das amostras. Para a quantificação do DNA dos insetos, utilizaram-se os “primers” MqFw e MqRw e a sonda Mq, desenvolvidos para a espécie de cigarrinha *Macrostelus quadripunctulatus* Kirschbaum (Cicadellidae: Deltocephalinae). Para a quantificação do DNA de plantas, utilizaram-se os “primers” Vitis 18SR1 e Vitis 18SF1 (GALETTO; BOSCO; MARZACHÌ, 2005) e desenvolveu-se uma sonda baseando-se na sequência da região 18S do RNA ribossomal de *Citrus aurantium* L. (número de acesso U38312.1)

(tabela 1). As sondas de amplificação da região 18S dos procariotos também utilizavam fluoróforo FAM e o “quencher” BHQ-1.

Amostras previamente positivas em “nested” PCR para o fitoplasma associado ao HLB dos citros foram utilizadas para a quantificação, utilizando o protocolo descrito por Marzachi e Bosco (2005). As amostras de DNA foram diluídas em água destilada para uma concentração final de 1 ng/μL, adicionando-se 5 μL ao mix de reação.

2.2.7.2 Preparo das curvas padrões

Para preparar a curva padrão de quantificação do fitoplasma-HLB, o fragmento amplificado pelos “primers” D7r2/D7f2 foi clonado com o plasmídio EasyVector (Easy Vector PGEM, nº catálogo A1360 - Promega®) e diluído nas concentrações de 1 ng/μL, 100 pg/μL, 10 pg/μL, 1 pg/μL, 100 fg/μL, 10 fg/μL, 1 fg/μL e 0,1 fg/μL.

Para a curva padrão de DNA de plantas, realizou-se diluição em série de uma amostra sadia de *C. sinensis* nas seguintes concentrações: 10 ng/μL; 1 ng/μL; 100 pg/μL e 1 pg/μL. Para curva de insetos, utilizou-se uma amostra sadia de DNA de *S. marginelineatus* nas seguintes diluições: 10 ng/μL, 1 ng/μL, 100 pg/μL e 20 pg/μL

2.2.7.3 Condições do PCR quantitativo

Os testes foram realizados em placas de 96 poços em um termociclador Chromo4 Real-Time PCR (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), seguindo os procedimentos descritos por Marzachi e Bosco (2005). O DNA da bactéria foi quantificado em fentogramas de DNA de fitoplasma por nanograma de DNA de inseto e transformado em unidades genômicas (GU) por nanograma do vetor de DNA. O DNA dos insetos e do fitoplasma da mesma amostra foram quantificados separadamente em cada placa. “Primers” e sondas foram adicionadas ao Platinum Quantitative Supermix UDG (Invitrogen, UK, nº catálogo 11730-017) a uma concentração final de 300 e 200 nM, respectivamente, junto com 5 μL da amostra correspondente, em um volume final

de 25 µL. As condições do ciclo foram: 1 ciclo a 50°C por 3 min, 95°C por 5 min e 45 ciclos a 95°C por 15 s, 60°C por 1 min.

Tabela 1 - “Primers” e sondas utilizados na quantificação do fitoplasma dos citros em plantas e insetos

Oligonucleotídeo	Sequência
“Primer” HLB2 Rw ^{1,a}	5'-TGG TCG CAA CTA ACG ACA AG-3'
“Primer” HLB2 Fw ^{1,a}	5'-TAC AGG TGG TGC ATG GTT GT-3'
“Primer” Vitis18SF1 ^{2,b}	5'-ATG ATT AAC AGG GAC AGT CG-3'
“Primer” Vitis18SR1 ^{2,b}	5'-GGT ATC TGA TCG TCT TCG AG-3'
“Primer” MqFw ^{3,c}	5'-AAC GGC TAC CAC ATC CAA GG-3'
“Primer” MqRv ^{3,c}	5'-GCC TCG GAT GAG TCC CG-3'
Sonda 18S Cit ^{2,a}	5'-CAT TTG CCA AGG ATG TTT TC-3'
Sonda HLB ^{1,a}	5'-AAG TCC TAA AAC GAG CGC AA-3'
Sonda Mq ^{3,c}	5'-AGG CAG CAG GCA CGC AAA TTA CCC-3'

¹ Amplificação da região 16Sr do fitoplasma associado ao HLB;

² Amplificação da região 18Sr de plantas de citros;

³ Amplificação da região 18Sr de cigarrinhas;

^a Determinado no presente trabalho;

^b Galetto e Marzachi (2009);

^c Bosco et al. (2007).

2.2.8 Utilização do qPCR nos estudos de transmissão do fitoplasma

2.2.8.1 Quantificação do DNA bacteriano no inseto ao longo do período de latência

Com o objetivo de avaliar a multiplicação do fitoplasma no corpo do inseto após a aquisição, adultos sadios de *S. marginelineatus* foram confinados em planta-fonte do patógeno por um período de acesso à aquisição (PAA) de 72 h, sendo mantidos em seguida sobre plantas intermediárias sadias de *S. rhombifolia* (hospedeiro natural do inseto; item 2.3.5) por 7, 14 e 21 dias (períodos de latência - PL). Como controles negativo, adultos do mesmo lote da criação e de mesma idade foram

transferidos diretamente para plantas saudas de *S. rhombifolia*, sem PAA na planta-fonte.

Após cada PL, os insetos foram retirados de *S. rhombifolia*, separados em cabeça+protorax e tórax+abdome, sendo o DNA total de cada parte extraído de acordo com o protocolo descrito por Marzachi, Veratti e Bosco (1998). As partes do corpo dos insetos foram maceradas individualmente em tubos tipo “eppendorf” contendo 500 µL tampão de extração CTAB 2% (1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, pH 8,0; 100mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,2% β-mercaptoethanol) e colocadas em banho-maria (60°C) por 30 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (5000 x g), o sobrenadante recuperado e adicionado 600 µL de CIA (24 parte de clorofórmio:1 parte de álcool isoamílico). Após homogeneização, as amostras foram centrifugadas por 5 min a 14.000 x g, e ao sobrenadante adicionado igual volume de álcool isopropílico gelado, centrifugado (20 min em 14.000 x g a 4°C), e lavado com álcool 70% (centrifugação de 8 min a 14.000 x g, 4°C) para retirada de sais. Em seguida as amostras foram secas em “speed vacuum” e o pellet ressuscitado em 50 µL de tampão TE.

O DNA extraído foi quantificado com um fluorímetro Hoefer DyNA Quant 200. Em seguida, as amostras foram diluídas em água destilada para uma concentração final de 1 ng/µL, utilizando-se 5 µL da diluição final nas placas do equipamento de PCR. Os testes foram realizados em um termociclador Chromo4 Real-Time PCR, seguindo o procedimento descrito por Marzachi e Bosco (2005), utilizando “primers” e sondas obtidas de acordo com o item 2.2.8.

Ao término de cada PL (7, 14 e 21 dias), as plantas de *S. rhombifolia* foram trocadas por plantas novas e aquelas expostas aos insetos foram mantidas em casa de vegetação para acompanhamento da manifestação de sintomas e testes de detecção do fitoplasma de citros por nested-PCR, conforme descrito em 2.2.4 e 2.2.5.

2.2.8.2 Quantificação do título bacteriano em diferentes partes do corpo do inseto

Com o objetivo de avaliar o curso da colonização de diferentes órgãos do inseto pelo patógeno, assim como a concentração de DNA bacteriano, adultos saudas de *S. marginelineatus* foram confinados em planta-fonte do fitoplasma por um PAA de

72 h, sendo mantidos em seguida sobre plantas de *S. rhombifolia* por 7, 14 e 21 dias de PL.

Ao término de cada PL, cerca de 5-10 insetos foram anestesiados em CO₂ e dissecados em meio fisiológico (SACCHI et al., 2008), separando-se as glândulas salivares, ovários e aparelho digestivo. Em seguida, o DNA foi extraído desses órgãos e testados por PCR para detecção do DNA bacteriano, conforme descrito anteriormente (itens 2.2.9.1 e 2.2.4).

2.3 Resultados e discussão

2.3.1 Levantamento de insetos potenciais vetores do fitoplasma associado ao “Huanglongbing”

Nas amostragens com rede de varredura na vegetação rasteira das entrelinhas dos pomares, aproximadamente 90% das cigarrinhas coletadas pertencem à subfamília Deltocephalinae (Hemiptera: Cicadellidae), sendo a espécie *Balclutha hebe* (Kirkaldy) a mais encontrada, seguida de *Planicephalus flavicosta* (Stål) e *S. marginelineatus* (tabela 2). A espécie *A. albidula* também se destacou em número de indivíduos presentes nas coletas. Cicadélídeos pertencentes às subfamílias Gyponinae e Typhlocibinae também foram encontradas, porém em menor número. Espécimens de *Tagosodes orizicola* (Muir) (Hemiptera: Delphacidae) foram os únicos representantes de uma família diferente de Cicadellidae (pertencentes à família Delphacidae).

Cicadélídeos da subfamília Cicadellinae foram coletadas com rede de varredura e armadilhas adesivas amarelas, porém este grupo taxonômico não foi considerado no presente estudo por se alimentar no xilema das plantas (MIRANDA et al., 2009a), sendo, portanto, pouco provável a sua participação na disseminação de patógenos restritos ao floema, como é o caso de fitoplasmas. A ocorrência de espécies de Cicadellinae em pomares de laranja já foi pesquisada em vários levantamentos anteriores, principalmente na procura por vetores da bactéria *X. fastidiosa* (YAMAMOTO; GRAVENA, 2000; GIUSTOLIN et al., 2009, MIRANDA et al., 2009b; PAIVA et al., 1996; OTT et al., 2006; NUNES et al., 2007).

Tabela 2 - Cigarrinhas coletadas com rede de varredura na vegetação rasteira das entrelinhas de talhões de laranja doce com 14 (quadra 7) e 8 (quadra 316) anos de idade. Fazenda São João, Nova Granada - SP

Espécie	Quadra 7		Quadra 316	
	Quantidade ¹	%	Quantidade ¹	%
Cicadellidae, Agalliinae				
<i>Agallia albidula</i> Uhler	110	5,6	23	4,8
Cicadellidae, Deltocephalinae				
<i>Balclutha hebe</i> (Kirkaldy)	793	40,6	112	23,3
<i>Chlorotettix minimus</i> Baker	82	4,2	25	5,2
<i>Planicephalus flavicosta</i> (Stål)	436	22,3	135	28,1
<i>Scaphytopius marginelineatus</i> (Stål)	425	21,8	126	26,3
Cicadellidae, Typhlocibinae				
<i>Protalebrela brasiliensis</i> Baker	29	1,5	22	4,6
Cicadellidae, Gyponinae				
<i>Curtara samera</i> DeLong & Freytag	31	1,6	15	3,1
Delphacidae				
<i>Tagosodes orizicola</i> (Muir)	45	2,3	22	4,6
Total	1951	100,0	480	100,0

¹ Somatória de 22 amostragens, cada qual composta por 50 redadas em 20 pontos aleatórios em cada talhão, no período de 20/4/08 a 20/5/2009.

O número de espécies de cigarrinhas coletadas com armadilhas adesivas amarelas nos dois talhões de laranja doce foi semelhante ao método de rede de varredura (figuras 1 e 2; tabela 2). A exceção foi a espécie *Bahita infusata* Osborn (Deltocephalinae), coletada apenas com armadilhas adesivas amarelas.

Os dados de coleta de cigarrinhas com cartões adesivos posicionados em alturas diferentes na copa das laranjeiras indicam que cicadélídeos das subfamílias Deltocephalinae e Agalliinae foram capturados predominantemente na altura de 0,3 m, em ambas as quadras (figuras 1 e 2). Na quadra 7, a espécie *Agallia albidula* Uhler foi coletada em sua maioria na parte baixa das árvores cítricas ($t=7,2$; $GL=25$; $p<0,05$), assim como *B. hebe* ($t=6,3$; $GL=24,6$; $p<0,05$), *Chlorotettix minimus* Baker ($t=2,1$; $GL=41,5$; $p<0,05$), *P. flavicosta* ($t=3,1$; $GL=34$; $p<0,05$), *S. marginelineatus* ($t=5,6$; $GL=39,3$; $p<0,05$) e *Protalebrela brasiliensis* Baker ($t=3,5$; $GL=33,2$; $p<0,05$) (figura 1). *Bahita infusata* ($t=-1,3$; $GL=35,8$; $p=0,19$), *Curtara samera* DeLong & Freytag ($t=-$

0,7; GL=35,6; $p=0,5$) e *T. orizicola* ($t=0,7$; GL=36,9; $p=0,5$) não diferiram quanto à altura de coleta. Na quadra 316 foram observados resultados um pouco diferentes, mas com tendências semelhantes. As cigarrinhas *B. hebe* ($t=3,6$; GL=33,1; $p<0,05$), *S. marginelineatus* ($t=4,5$; GL=30,9; $p<0,05$) e *P. brasiliensis* ($t=3,2$; GL=27,9; $p<0,05$) mantiveram-se predominantes nas partes baixas da planta e *B. infusata* ($t=-1,7$; GL=33,4; $p=0,09$), *C. samera* ($t=-0,2$; GL=40,9; $p=0,88$) e *T. orizicola* ($t=0,9$; GL=41,8; $p=0,37$) mantiveram sua distribuição homogênea nas duas alturas de coleta. Já as espécies *A. albidula* ($t=1,9$; GL=34,9; $p=0,07$), *C. minimus* ($t=1,3$; GL=31,8; $p=0,21$) e *P. flavicosta* ($t=1,7$; GL=32,8; $p=0,09$), embora tenham apresentado captura numericamente maior na região baixa da copa, não diferiram estatisticamente entre as alturas de coleta.

Segundo informações de funcionários da Fazenda São João, plantas com sintomas de mosqueado e clorose em ramos baixos semelhantes aos de “Huanglongbing”, na maioria das vezes mostraram-se infectadas pelo fitoplasma, e não por ‘*C. Liberibacter* sp.’, pelo teste de PCR. No entanto, essas observações são preliminares, sendo somente uma indicação para eventuais suposições. Se confirmada uma maior distribuição do fitoplasma em ramos da parte de baixo da copa, cigarrinhas potenciais vetoras capturadas predominantemente na altura de 0,3 m e/ou abundantes na vegetação rasteira dos pomares, tais como *A. albidula*, *B. hebe*, *C. minimus*, *P. flavicosta*, *P. brasiliensis* e *S. marginelineatus*, poderiam ter um papel relevante na disseminação desse patógeno.

Figura 1 - Distribuição de espécies de cigarrinhas em duas alturas da copa de árvores de laranja doce na quadra 7, Fazenda São João, Nova Granada - SP. Números sobre as barras representam a somatória de espécimes capturados em 22 coletas quinzenais com cartelas adesivas amarelas (20 cartelas/altura/coleta) no período de 20/4/08 a 20/5/2009. Valores percentuais (barras) para uma mesma espécie e com a mesma letra não diferem pelo teste t de Student ($p < 0,05$)

Figura 2 – Distribuição de espécies de cigarrinhas em duas alturas da copa de árvores de laranja doce na quadra 316, Fazenda São João, Nova Granada - SP. Números sobre as barras representam a somatória de espécimes capturados em 22 coletas quinzenais com cartelas adesivas amarelas (20 cartelas/altura/coleta) no período de 20/4/08 a 20/5/2009. Valores percentuais (barras) para uma mesma espécie e com a mesma letra não diferem pelo teste t de Student ($p < 0,05$)

Após análise faunística das espécies coletadas por armadilhas adesivas foi possível determinar quais eram predominantes nas áreas (tabela 3). Espécies predominantes são aquelas que apresentam os maiores índices de dominância, abundância, frequência e constância (SILVEIRA NETO et al., 1995). Na quadra 7, as espécies *A. albidula*, *B. hebe* e *S. marginelineatus* foram as espécies predominantes, sendo que somente *B. hebe* e *A. albidula* apresentaram esta característica na quadra 316. A espécie *S. marginelineatus* foi classificada como muito abundante e muito frequente na quadra 7, mas apenas como comum e frequente na quadra 316. Já *P. brasiliensis* foi comum e frequente na quadra 316, porém dispersa e pouco frequente na quadra 7. Apesar das variações em abundância e frequência, todas as espécies de cigarrinhas em análise foram constantes e dominantes nos dois talhões de laranja doce (tabela 3). Diferenças na idade dos pomares e na composição florística da vegetação nas entrelinhas ou em áreas adjacentes podem ter influenciado as pequenas variações

observadas nos resultados da análise faunística (tabela 3) e de distribuição relativa de cigarrinhas nas duas alturas de coleta (figuras 1 e 2).

Tabela 3 - Análise faunística das espécies de cigarrinhas capturadas com armadilha adesiva amarela em pomares de laranja doce com 14 e 8 anos de idade (quadras 7 e 316, respectivamente) da fazenda São João – Nova Granada, SP, de 20/4/08 a 20/5/2009

Família, Subfamília	Quadra 7				Quadra 316			
	D ¹	A ²	F ³	C ⁴	D	A	F	C
Cicadellidae, Agallinae								
<i>Agallia albidula</i>	D	ma	mf	w	D	ma	mf	w
Cicadellidae, Deltocephalinae								
<i>Balclutha hebe</i>	D	ma	mf	w	D	ma	mf	w
<i>Bahita infusca</i>	D	r	pf	w	D	r	pf	w
<i>Chlorotettix minimus</i>	D	c	f	w	D	c	f	w
<i>Planicephalus flavicosta</i>	D	c	f	w	D	c	f	w
<i>Scaphytopius marginellatus</i>	D	ma	mf	w	D	c	f	w
Cicadellidae, Typhlocibinae								
<i>Protalebrea brasiliensis</i>	D	d	pf	w	D	c	f	w
Cicadellidae, Gyponinae								
<i>Curtara samera</i>	D	c	f	w	D	c	f	w
Delphacidae								
<i>Tagosodes orizicola</i>	D	r	pf	w	D	r	pf	w

¹ Dominância: (D) dominante, (ND) não dominante;

² Abundância: (r) rara, (d) dispersa, (c) comum, (ma) muito abundante

³ Frequência: (pf) pouco frequente, (f) frequente, (mf) muito frequente

⁴ Constância: (w) constante, (y) acessória, (z) acidental

Tanto nas amostragens com rede de varredura quanto nas de armadilha adesiva amarela, a quadra 7 apresentou maior quantidade numérica de espécimes capturados. Com rede de varredura foram coletados quatro vezes mais insetos na quadra 7 (1951: 480) e com armadilha adesiva o número foi quase duas vezes maior (1125 : 756). A quadra 7 possui composição florística com maior participação de plantas daninhas de hábito perene, como guanxuma (*S. rhombifolia*), capim-colonião (*P. maximum*) e apaga-

fogo (*Althernantera tenella*) (item 2.3.3), que podem conferir abrigo e/ou alimento às cigarrinhas nas épocas de seca na região.

Uma observação adicional que deve ser considerada é a respeito das áreas vizinhas de cada talhão amostrado. O talhão 7 se encontrava nos limites de uma pequena floresta arbustiva tipo estacional, além de outros pomares, já o talhão 316 era circundado por outros pomares de laranja e também de um seringal. A localização topográfica das áreas também eram diferentes, pois a quadra 7 encontrava-se em uma região de baixada, o que pode conferir maior crescimento das plantas invasoras, e a quadra 316 em uma região mais alta. Giustolin et al. (2009) comprovaram que as florestas arbustivas podem atuar como um reservatório de cigarrinhas encontradas em pomares de laranja-doce.

Em levantamentos anteriores realizados em pomares de laranja, foram detectados que espécies de *Scaphytopius* foram predominantes (MIRANDA et al., 2009b; YAMAMOTO; GRAVENA, 2000). Giustolin et al. (2009) detectaram que a própria espécie *S. marginelineatus* apresentou altos índices faunísticos, sendo considerada importante em pomares cítricos. Miranda et al. (2009b) também comprovaram que insetos pertencentes à este gênero são predominantes nas áreas de cultivo de laranja. Em um trabalho pioneiro, Paiva et al. (1996) coletaram números elevados de deltocefalíneos em pomares cítricos, principalmente *B. infuscata* e *Scaphytopius* sp., realizando coletas nas plantas de laranja e também na comunidade de plantas infestantes. Levantamentos realizados em pomares cítricos na Argentina indicaram que a espécie *Scaphytopius bolivianus* Oman foi muito abundante, considerando esta espécie de importância no caso de surgimento de novos patógenos floemáticos na cultura da laranja (COLL et al., 1993).

Comparando-se com um levantamento detalhado realizado por Giustolin et al. (2009), nota-se que algumas espécies não foram encontradas no presente trabalho, principalmente exemplares da subfamília Coelidinae. Outras espécies de Deltocephalinae também não foram encontradas, como *Chlorotettix giganteus* (Baker), *Copididonus hialiniipennis* (Stål). No entanto, essas espécies apresentaram baixos valores faunísticos, sendo consideradas acidentais nas áreas de levantamento.

Associado à isto, os locais diferentes de amostragem entre o trabalho de Giustolin et al. e o presente, podem explicar a ausência de similaridades.

Em levantamentos realizados com succionador sobre plantas invasoras em pomares, Yamamoto e Gravena (2000) observaram que a espécie *P. brasiliensis* foi capturada em grandes números, e muito pouco nas plantas de laranja. Os dados de coleta em diferentes alturas corroboram com estas informações, já que esta espécie de cigarrinha foi muito capturada na altura de 0,3 m.

A ausência de *B. infuscata* na amostragem com rede de varredura sugere que essa espécie de Deltocephalinae não apresenta plantas hospedeiras na vegetação rasteira dos pomares avaliados. Entretanto, *B. infuscata* foi uma das cigarrinhas mais frequentes em armadilhas adesivas na altura de 1,5 m, indicando uma maior atividade dessa espécie na copa das laranjeiras, possivelmente se alimentando da planta cítrica ou apenas de passagem pelo pomar em movimentos de dispersão. Yamamoto e Gravena (2000) capturaram poucos exemplares desta espécie na vegetação invasora, sendo que em algumas áreas foram encontradas somente em plantas de laranja.

2.3.2 Detecção do fitoplasma nos insetos coletados

Amostras de espécimes de todas as cigarrinhas coletadas com rede de varredura na vegetação rasteira das entrelinhas dos pomares de laranja doce (quadras 7 e 316) foram avaliadas por nested-PCR quanto à presença do fitoplasma de citros (grupo 16SrIX). Do total de amostras testadas (grupos de 10 espécimes/amostra), 7 foram PCR (+) para a presença de fitoplasmas, relativas às espécies *B. hebe* (1), *S. marginelineatus* (3) e *P. flavicosta* (3) (Tabela 4). Para confirmar a identidade do fitoplasma detectado nas cigarrinhas, os produtos de PCR das amostras positivas foram purificados e sequenciados sem clonagem. A análise da sequência *consensus* (793 pares de base) revelou 98 % de identidade com o fitoplasma associado ao HLB dos citros (acesso EU266074.1), apenas para amostras da espécie *S. marginelineatus*. Para confirmação do resultado obtido, os produtos de PCR das amplificações das três amostras positivas de *S. marginelineatus* foram purificados em coluna e submetidos à clonagem em vetor plasmidial. Do processo de transformação, colônias recombinantes

foram selecionadas a partir de duas das amostras. Da análise das sequências, obteve-se a sequência *consensus* final de 856 pares de base. A análise por meio de BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) desta sequência revelou 98% de identidade com o fitoplasma associado ao HLB dos citros.

Relatos da literatura classificam cigarrinhas do gênero *Scaphytopius* como vetores de mais de 10 fitopatógenos (NIELSON, 1979; 1985). Uma doença presente em plantas de mandioca na Colômbia, (“Cassava Frogskin Disease”), associada a um fitoplasma do grupo 16SrIII (ALVAREZ et al., 2009) tem como suspeita na transmissão do fitoplasma, a espécie *S. marginelineatus*. Isto deve-se à detecção do fitoplasma em indivíduos desta cigarrinha após alimentação em plantas infectadas e à abundância da espécie em plantios de mandioca com altos índices de infestação da doença, apesar da transmissão não ser comprovada (CIAT, 2004). A doença conhecida como “Stubborn” dos citros, causada pela bactéria *Spiroplasma citri* também é transmitida por cigarrinhas deste gênero, as espécies *Scaphytopius nitridus* DeLong e *Scaphytopius acutus delongi* Young, além do também deltocefalíneo *Circulifer tenellus* (Baker) (KALOOSTIAN et al., 1979). Esta doença é encontrada nos Estados Unidos da América e ainda não foi relatada nos pomares brasileiros. Eckstein (2010) identificou um fitoplasma do grupo 16SrIII em cigarrinhas da espécie *Scaphytopius fuliginosus* (Osborn), presentes em áreas afetadas pelo fitoplasma associado ao enfezamento do brócolis. Essas informações reforçam a possível atuação destes insetos na disseminação de fitoplasmas.

Após a confirmação da presença do patógeno na espécie *S. marginelineatus*, foram iniciados os trabalhos de transmissão testando-se essa espécie como vetora (item 2.3.6). A presença da bactéria no corpo do inseto pode indicá-lo como um potencial vetor do fitoplasma (WEINTRAUB; BEANLAND, 2006; ALHUDAIB et al., 2009), porém a sua confirmação como agente de disseminação depende da comprovação do completo processo de transmissão do patógeno entre plantas hospedeiras.

Tabela 4 - Proporção de amostras de espécimes PCR (+) para o fitoplasma associado ao “Huanglongbing” dos citros (grupo 16SrIX) e confirmação dos resultados por sequenciamento do DNA

Espécie de cigarrinha	PCR (+) / nº de amostras¹	Confirmação por sequenciamento
<i>Agallia albidula</i>	0/12	0/0
<i>Balclutha hebe</i>	1/36	0/1
<i>Chlorotettix minimus</i>	0/10	0/0
<i>Curtara samera</i>	0/4	0/0
<i>Planicephalus flavicosta</i>	3/46	0/3
<i>Protalebrella brasiliensis</i>	0/10	0/0
<i>Scaphytopius marginelineatus</i>	3/30	3/3
<i>Tagosodes orizicola</i>	0/6	0/0

¹ Amostra composta por 10 insetos cada.

A participação de outros insetos envolvidos na disseminação do fitoplasma não pode ser descartada. Outras espécies de cicadelídeos identificadas como comuns ou muito abundantes no presente estudo devem ser investigadas, especialmente aquelas pertencentes à subfamília Deltocephalinae, que concentra o maior número de espécies vetoras de fitoplasmas (NIELSON, 1985; WEINTRAUB; BEANLAND, 2006).

A não identificação do fitoplasma em outras espécies de cigarrinhas não significa essas não participem do processo de disseminação do patógeno. A taxa de indivíduos infectivos em uma população natural pode ser muito baixa (<1%) e não detectável quando são avaliados por PCR. A presença de fitoplasmas já foi detectada em algumas espécies de Deltocephalinae em cultivos de brássicas no Brasil, como *B. hebe*, *P. flavicosta* e *Atanus nitidus* (Linnavuori) (ECKSTEIN, 2010; RAPUSSI-DASILVA, 2010). A espécie *P. flavicosta* também foi identificada como vetora de um mollicute causador do amarelecimento letal do coqueiro (NIELSON, 1985)

2.3.3 Levantamento de plantas na vegetação espontânea das quadras experimentais

Em um levantamento preliminar, foram detectadas 14 espécies de plantas pertencentes a 8 famílias botânicas na vegetação espontânea presente nas entrelinhas e sob a copa das árvores cítricas nas duas áreas amostradas (tabela 5). Neste levantamento foram consideradas todas as espécies presentes, independente da quantidade. As famílias Asteraceae e Poaceae foram as que apresentaram o maior número de espécies nas duas áreas. O levantamento florístico determinou as espécies importantes, em cada área. Algumas plantas detectadas no levantamento preliminar não foram consideradas no levantamento florístico devido ao reduzido número de indivíduos nas áreas.

Na quadra 7 foram encontradas plantas daninhas de 5 famílias botânicas distintas (tabela 6). As espécies que apresentaram maior importância foram *S. rhombifolia* (guaxuma), *A. tenella* (apaga-fogo) e *B. plantaginea* (capim-marmelada), apresentando um Índice de Valor de Importância (IVI) maior que 40%. Destas três espécies, duas possuem ciclo de vida perene (*S. rhombifolia* e *A. tenella*), característica importante para o agroecossistema local, principalmente nas épocas de inverno, quando a maioria das espécies de plantas daninhas anuais está indisponível. No entanto, a presença de outras plantas garante maior diversidade de alimento para a comunidade de cigarrinhas, que geralmente possui espécies oligófagas e polífagas (WEINTRAUB; BEANLAND, 2006).

Tabela 5 - Espécies de plantas invasoras encontradas na vegetação rasteira das entrelinhas dos talhões 7 e 316 de laranja doce, na fazenda São João, Nova Granada-SP, dezembro/2008

Família Espécie de planta	Nome comum¹	Ciclo de Vida¹
Amarantaceae		
<i>Amaranthus</i> sp.	Caruru	Anual
<i>Alternanthera tenella</i> Colla	Apaga-fogo	Perene
Asteraceae		
<i>Bidens pilosa</i> L.	Picão-preto	Anual
<i>Conyza bonariensis</i> (L.) Cronq.	Buva	Anual
<i>Tridax procumbens</i> L.	Erva-de-touro	Anual ou bienal
Commelinaceae		
<i>Commelina</i> sp.	Trapoeiraba	Anual ou perene
Euphorbiaceae		
<i>Chamaesyce hirta</i> (L.) Milisp.	Erva-de-santa luzia	Anual
Malvaceae		
<i>Sida rhombifolia</i> L.	Guanxuma	Perene
Poaceae		
<i>Brachiaria plantaginea</i> (Link) Hitchc.	Capim-marmelada	Anual
<i>Cenchrus echinatus</i> L.	Capim-carrapicho	Anual
<i>Digitaria horizontalis</i> Willd.	Capim-colchão	Anual
<i>Panicum maximum</i> Jacq.	Capim-colonião	Perene
Portulacaceae		
<i>Portulaca oleracea</i> L.	Beldroega	Anual
Rubiaceae		
<i>Spermacoce latifolia</i> Aubl.	Erva-quente	Anual

¹ Kissmann (1997), Kissmann e Groth (1999), Kissmann e Groth (2000)

No talhão 316 a participação individual das espécies encontradas foi menor (tabela 7), havendo uma distribuição mais regular. Nesta área houve maior diversidade de plantas daninhas, com presença de 10 espécies de plantas, pertencentes a 6 famílias botânicas. No entanto, a participação das plantas perenes nesta área foi muito menor do que na quadra 7, principalmente em relação às espécies *S. rhombifolia* e *A. tenella*. Na quadra 7 o alto valor do IVI (102,3) de *S. rhombifolia* demonstra o quanto esta espécie é importante na composição desta área, diferentemente da quadra 316, onde a espécie apresentou um dos mais baixos valores de IVI (apenas 6,4).

A maioria das espécies de plantas invasoras encontradas no levantamento florístico são consideradas importantes na cultura da laranja (VICTORIA FILHO, 1998), com exceção de *A. tenella*, *T. procumbens* e *C. hirta*. Esta similaridade de plantas infestantes encontradas nas áreas amostradas, com aquelas frequentemente relatadas na cultura da laranja, garante que a ocorrência dessas plantas não foi um caso isolado, e que essa mesma situação pode ser encontrada em outras áreas.

Tabela 6 - Lista de espécies e parâmetros florísticos de plantas invasoras presentes na vegetação rasteira de pomar de laranja doce com 14 anos (quadra 7), Fazenda São João, Nova Granada-SP, fevereiro/2009

Espécie	F¹	Fr²	D³	Dr⁴	AB⁵	ABr⁶	IVI⁷
<i>Alternanthera tenella</i>	0,5	16,7	43,5	36,1	87,0	41,0	93,8
<i>Brachiaria plantaginea</i>	0,7	23,3	13,6	11,3	19,4	9,2	43,8
<i>Commelina</i> sp.	0,1	3,3	1,6	1,3	16,0	7,5	12,2
<i>Conyza bonariensis</i>	0,5	16,7	5,2	4,3	10,4	4,9	25,9
<i>Digitaria horizontalis</i>	0,1	3,3	0,9	0,7	9,0	4,2	8,3
<i>Panicum maximum</i>	0,2	6,7	2,2	1,8	11,0	5,2	13,7
<i>Sida rhombifolia</i>	0,9	30,0	53,4	44,4	59,3	28,0	102,3

¹F: frequência; ²Fr: Frequência relativa; ³D: Densidade; ⁴Dr: Densidade relativa

⁵AB: Abundância; ⁶ABr: Abundância relativa; ⁷IVI: Índice de valor de importância

Tabela 7 - Lista de espécies e parâmetros florísticos de plantas invasoras presentes na vegetação rasteira de pomar de laranja doce com 8 anos (quadra 316), Fazenda São João, Nova Granada-SP, fevereiro/2009

Espécie	F ¹	Fr ²	D ³	Dr ⁴	AB ⁵	ABr ⁶	IVI ⁶
<i>Alternanthera tenella</i>	0,5	14,7	67,4	30,7	134,8	23,6	69,0
<i>Brachiaria plantaginea</i>	0,3	8,8	34,4	15,7	114,7	20,0	44,6
<i>Cenchrus echinatus</i>	0,2	5,9	3,9	1,8	19,5	3,4	11,1
<i>Chamaesyce hirta</i>	0,5	14,7	7,1	3,2	14,2	2,5	20,4
<i>Commelina</i> sp.	0,4	11,8	12,9	5,9	32,3	5,6	23,3
<i>Digitaria horizontalis</i>	0,2	5,9	12,2	5,6	61,0	10,7	22,1
<i>Panicum maximum</i>	0,4	11,8	52,4	23,9	131,0	22,9	58,6
<i>Portulaca oleracea</i>	0,2	5,9	1,8	0,8	9,0	1,6	8,3
<i>Sida rhombifolia</i>	0,2	5,9	0,4	0,2	2,0	0,3	6,4
<i>Tridax procumbens</i>	0,5	14,7	26,8	12,2	53,6	9,4	36,3

¹F: frequência; ² Fr: Frequência relativa; ³ D: Densidade; ⁴ Dr: Densidade relativa

⁵ AB: Abundância; ⁶ ABr: Abundância relativa; ⁷ IVI: Índice de valor de importância

2.3.4 Identificação de hospedeiros alternativos do fitoplasma com infecção natural nas áreas

Não foram obtidas plantas PCR (+) para o fitoplasma associado ao HLB em espécies vegetais presentes na vegetação espontânea das entrelinhas dos pomares nas duas áreas em estudo. No total foram amostradas 14 espécies invasoras, coletando-se plantas com ou sem presença de possíveis sintomas de infecção por fitoplasmas. As espécies (e número de plantas) avaliadas por nested-PCR quanto à presença do referido fitoplasma foram: *A. tenella* (5), *P. maximum* (5), *B. plantaginea* (5), *Commelina* sp. (6), *T. procumbens* (5), *C. hirta* (5), *C. echinatus* (5), *P. oleracea* (5), *S. rhombifolia* (10), *D. horizontalis* (5), *C. bonariensis* (5), *B. pilosa* (4), *S. latifolia* (3) e *Amaranthus* sp. (4).

Apesar dos resultados negativos, esta amostragem não descarta a existência de hospedeiros do fitoplasma entre as espécies invasoras avaliadas, ou mesmo entre outras espécies vegetais não amostradas no presente estudo. O número de plantas avaliadas por espécie foi bastante reduzido (4-5 espécimes) o que diminui as

chances de amostragem de um exemplar infectado. Além disso, os fitoplasmas apresentam distribuição irregular nas plantas, além da sua detecção ser sazonal (BERTACCINI, 2007), o que dificulta a identificação de hospedeiros infectados. Sabe-se que plantas de *Crotalaria juncea* L. são hospedeiras do fitoplasma associado ao HLB (WULFF et al., 2009), no entanto não haviam exemplares desta espécie nas duas áreas estudadas.

Fitoplasmas possuem diversos hospedeiros, não havendo uma especificidade obrigatória em relação às plantas colonizadas. Eckstein (2010) encontrou diversos fitoplasmas em plantas invasoras presentes na cultura do brócolis, incluindo infecções múltiplas de diferentes grupos. Exemplares de *S. rhombifolia* (guanxuma) e *C. bonariensis* (buva), amostradas no presente trabalho, foram identificadas como hospedeiras de um fitoplasma do grupo 16SrIII, sendo que em buva foi detectada infecção mista com um fitoplasma do grupo 16SrVII. Plantas de guanxuma também foram reportadas como hospedeiras de “*Candidatus Phytoplasma brasiliense*” (ECKSTEIN et al., 2010). No complexo do enfezamento das brássicas (repolho, couve-flor e brócolis) grupos distintos de fitoplasmas foram detectados, indicando a reforçando a inespecificidade e a ocorrência de infecções múltiplas associadas à este grupo de patógenos (MELLO, 2007; ECKSTEIN, 2010; RAPUSSI-DA-SILVA, 2010).

2.3.5 Associação de cigarrinhas com plantas hospedeiras

De acordo com a análise de associação pelo teste de X^2 , as cigarrinhas estão fortemente associadas a determinadas espécies vegetais presentes nas vegetação espontânea das entrelinhas dos pomares de laranja doce ($X^2=778,1$; GL=42; $p<0,01$). A cigarrinha *S. marginelineatus* está associada a plantas de *S. rhombifolia*, *A. tenella*, *P. maximum* e *Commelina* sp., sendo mais abundante na primeira espécie (figura 3). *Balchluta hebe* está associada as plantas de *A. tenella*, *B. plantaginea*, *Commelina* sp. e, principalmente, de *P. maximum*, na qual se destacou pelo alto número de espécimes encontrados. A espécie *P. flavicosta* foi associada a plantas de *A. tenella*, *S. rhombifolia*, *T. procumbens* e *Commelina* sp, ocorrendo em maior número na primeira espécie. Outro deltocefalíneo, *C. minimus*, foi observado somente sobre uma das

plantas avaliadas, *A. tenella*. A cigarrinha *A. albidula* foi associada às espécies *S. rhombifolia*, *T. procumbens* e *C. bonariensis*, com grande destaque para esta última. A única cigarrinha não pertencente à família Cicadellidae, *T. orizicola* (Hemiptera: Delphacidae), foi encontrada somente em plantas da família Poaceae, como *P. maximum*, *B. plantaginea* e *C. echnatus*.

Esses dados corroboram os de coleta de insetos nas diferentes áreas (2.3.1), juntamente com os dados de composição florística da vegetação espontânea dos pomares (2.3.3). A cigarrinha *S. marginelineatus* foi mais abundante e frequente na quadra 7 (tabelas 2 e 3), onde a espécie de planta *S. rhombifolia* apresenta maior importância (tabela 6). Essa informação foi reforçada com os dados de associação entre cigarrinhas e plantas hospedeiras, constatando-se que *S. rhombifolia* é a principal hospedeira de *S. marginelineatus* entre as plantas amostradas. O mesmo pode-se dizer de *A. albidula*, que teve maior captura na quadra 7, com alto IVI da planta invasora *C. bonariensis*, principal hospedeiro da referida cigarrinha nas condições do presente estudo.

As cigarrinhas apresentam grande variedade de hospedeiros (NIELSON, 1985). Levantamentos realizados em pomares cítricos demonstram que a quantidade e diversidade de espécies são afetadas de acordo com o direcionamento da coleta (GIUSTOLIN et al., 2009; PAIVA et al., 1996; YAMAMOTO; GRAVENA, 2000). Geralmente, os deltocefalíneos e agalíneos são encontrados nas plantas invasoras dos cultivos e o tipo de espécies vegetais nas áreas pode alterar a quantidade de insetos coletados. Yamamoto e Gravena (2000) coletaram muito mais exemplares de cigarrinhas de *P. brasiliensis*, *P. flavicosta* e *C. minimus* quando realizaram levantamento direcionado às plantas infestantes do local. Lopes e Oliveira (2004) coletaram espécimens de *B. hebe* em vegetação adjacente à área de cultivo de milho. Porém os autores dos referidos trabalhos não realizaram levantamento florístico das plantas invasoras para determinar as espécies mais importantes em cada área. Cigarrinhas deste gênero se alimentam de gramíneas, porém poucos são os relatos das espécies de plantas mais importantes para o seu desenvolvimento (WILSON; CLARIDGE, 1991).

O delfacídeo *T. orizicola* é relatado como inseto praga de gramíneas de importância agrícola, como o arroz (*Oryza sativa* L.), além de se desenvolver também em gramíneas infestantes da referida cultura, como o capim-arroz (*Echinochloa* sp.) (WILSON; CLARIDGE, 1991).

A cigarrinha *A. albidulla* apresenta vários hospedeiros, com grande divergência de grupos taxonômicos. Além de ser uma espécie vetora de um vírus em tomateiro, apresenta outros hospedeiros como alface, algodoeiro, batata-inglesa, beterraba, chicória, espinafre, feijoeiro, fumo, girassol, linho, mamoneiro, pimentão e trigo (SILVA et al., 1968).

Figura 3 - Número total de indivíduos de diferentes espécies de cigarrinhas observados sobre espécies vegetais da vegetação espontânea das entrelinhas dos pomares de laranja doce (quadras 7 e 316), na fazenda São João, Nova Granada – SP. Amostragem realizada em janeiro/2009, representada pela observação visual de cinco plantas por espécie vegetal (30 segundos/planta)

2.3.6 Transmissão do fitoplasma associado ao HLB pela cigarrinha *Scaphytopius marginelineatus*

As plantas-teste utilizadas nos estudos de transmissão foram testadas quanto à infecção pelo patógeno por nested-PCR um ano após a exposição aos insetos durante o PAI. No total, foram avaliadas no ensaio 81 plantas-teste de *C. sinensis*, sendo detectadas 2 plantas PCR (+) para o fitoplasma associado ao HLB. As demais espécies vegetais avaliadas não foram infectadas (tabela 8).

A imagem do gel de agarose, corado com brometo de etídio e visualizado em luz ultravioleta (figura 4), demonstra a amplificação do DNA do referido fitoplasma em duas amostras de plantas de laranja doce que foram submetidas a um PAI de 72 h, após 21 dias de latência, pela cigarrinha *S. marginelineatus*. Não se constatou amplificação de DNA de fitoplasma em nenhuma das 15 plantas-teste de citros que não foram expostas a insetos, mantidas como controle-negativo. Considerando-se, ainda, que os insetos usados no experimento foram criados em “seedlings” de *S. rhombifolia* (supostamente livres de fitoplasmas, que não são transmitidos via semente), e que as plantas-teste de laranja doce foram “seedlings” (também livres de fitoplasmas) mantidos permanentemente em estufas teladas livres de insetos vetores, esses resultados demonstram a transmissão de um fitoplasma por *S. marginelineatus* da planta-fonte para as plantas-teste de citros. Como as plantas-fonte utilizadas foram indexadas para o referido patógeno, as chances da existência de um fitoplasma diferentes em plantas de laranja são remotas. No entanto, seria interessante o sequenciamento do fragmento de DNA amplificado nas duas amostras de plantas-teste PCR(+) para confirmação de que o fitoplasma transmitido é de fato aquele associado ao HLB (grupo 16SrIX).

Calculando-se a probabilidade de transmissão por um único inseto [variável P , obtida pela fórmula de Swallow (1985): $P = 1 - (1-I)^{1/k}$, onde I é a proporção de plantas-teste infectadas e k o número de insetos utilizados por planta-teste (igual a 5, no presente estudo)], obtém-se o valor de 0,005, que indica uma eficiência de transmissão do fitoplasma bastante baixa, de 0,5%, para essa espécie de cigarrinha..

Tabela 8 - Proporção de plantas PCR (+) para o fitoplasma associado ao Huanglongbing dos citros (grupo 16SrIX), inoculadas com a cigarrinha *Scaphytopius marginatus*

Espécie vegetal	Plantas PCR (+) ¹ / total de plantas
	inoculadas ²
<i>Citrus sinensis</i>	2/81
<i>Catharanthus roseus</i>	0/28
<i>Sida rhombifolia</i>	0/57
<i>Coniza bonariensis</i>	0/5
<i>Crotalaria juncea</i>	0/5
<i>Brachiaria plantaginea</i>	0/5
<i>Panicum maximum</i>	0/5

¹ Plantas positivas pelo teste Nested-PCR (TEIXEIRA et al., 2008)

² Utilizaram-se 5 insetos por planta-teste, durante um período de acesso á inoculação de 72 h. Previamente, as cigarrinhas foram submetidas a um período de acesso à aquisição de 72 h em planta cítrica infectada com o fitoplasma, seguido de um período latente de 3 semanas.

Figura 4 - Gel de eletroforese mostrando o produto do nested-PCR (fragmento de 857 bp) amplificado em amostras de plantas-teste infectadas pelo fitoplasma associado ao “Huanglongbing” dos citros (grupo 16SrIX). Amostras 1 a 4, 6 a 13 e 15 são plantas de *Citrus sinensis* expostas a insetos, porém não infectadas. Amostras 5 e 14 são PCR-positivas para o fitoplasma após 1 ano da exposição às cigarrinhas. C+: amostra de planta-fonte previamente infectada com o fitoplasma; C-: amostra de planta cítrica sadia, nunca exposta a insetos vetores. Gel de agarose a 1%

2.3.7 Desenvolvimento da técnica de PCR quantitativo para estudos com o fitoplasma 16SrIX associado ao “Huanglongbing”

O teste de gradiente indicou a temperatura de 63°C como ideal para a etapa de anelamento em qPCR usando os primers (HLB2Rw/HLB2Fw, tabela 1) desenvolvidos *in silico* para amplificação de um fragmento de 91 bp, interno à sequência específica de 857 pb amplificada pelos primers D7r2/D7f2 (TEIXEIRA et al., 2008).

A curva padrão obtida para quantificação do fitoplasma-HLB apresentou bons índices de eficiência e correlação linear. A eficiência da curva apresentou-se dentro dos padrões aceitáveis (114,9%), além de apresentar um alto índice de correlação linear ($r^2=0,981$) (figuras 5 e 6) (MARZACHI; BOSCO, 2005)

Figura 5 - Perfil da amplificação do qPCR de uma diluição em série (da esquerda para a direita: 1 ng/μL, 100 pg/μL, 10 pg/μL, 1 pg/μL, 100 fg/μL, 10 fg/μL, 1 fg/μL e 0,1 fg/μL) do plasmídeo contendo a sequência da região 16S rDNA do fitoplasma-HLB, amplificada pelos primers D7r2/D7f2

Figura 6 - Curva padrão utilizada para quantificação de DNA do fitoplasma-HLB, com as diluições de, da esquerda para a direita, 0,1 fg/μL, 1 fg/μL, 10 fg/μL, 100 fg/μL, 1 pg/μL, 10 pg/μL, 100 pg/μL e 1 ng/μL

As curvas padrões para quantificação do DNA do inseto (figuras 7 e 8) e da planta (figura 9 e 10), também produziram bons índices. Para a curva do DNA de insetos, a eficiência foi de 77,3%, com um r^2 de 0,981. Para a curva padrão de planta, obteve-se uma eficiência de 70% e r^2 de 0,981.

Figura 7 - Perfil da amplificação do qPCR de uma diluição em série do DNA da cigarrinha *Scaphytopius marginelineatus* (da esquerda para a direita: 10 ng/μL, 1 ng/μL, 100 pg/μL e 20 pg/μL)

Figura 8 - Curva padrão utilizada para quantificação de DNA de *Scaphytopius marginatus*, com as diluições de, da esquerda para a direita, 20 pg/μL, 100 pg/μL, 1 ng/μL e 10 ng/μL

Figura 9 - Perfil da amplificação do qPCR de uma diluição em série do DNA de plantas de laranja-doce (*Citrus sinensis*). Da esquerda para a direita: 10 ng/μL; 1 ng/μL; 100 pg/μL e 1 pg/μL

Figura 10 - Curva padrão utilizada para quantificação de DNA de plantas de laranja-doce (*Citrus sinensis*), com as diluições de 1 pg/μL, 100 pg/μL, 1 ng/μL e 10 ng/μL

2.3.8 Utilização do PCR quantitativo nos estudos com potenciais vetores

2.3.8.1 “Screening” inicial das amostras

Inicialmente, todas as amostras de partes do corpo da cigarrinha *S. marginelineatus*, coletadas em diferentes períodos de latência após o PAA de 72 h em planta-fonte do fitoplasma de citros (grupo 16SrIX), foram testadas por “nested” PCR quanto à presença do patógeno. De 258 insetos testados nos diferentes períodos, somente 4 insetos apresentaram resultado positivo. Três dessas amostras de DNA de insetos positivos passaram pelo maior período de latência (21 dias), enquanto um deles passou por 14 dias de latência, porém a bactéria foi detectada somente no abdome do

inseto (tabela 9). Estes resultados mostram que o inseto foi capaz de adquirir a bactéria. O baixo número de insetos positivos pode estar relacionado à baixa eficiência de aquisição do patógeno em plantas de laranja pelo vetor, o que evidencia a possível existência de um hospedeiro alternativo do fitoplasma que seria mais adequado à aquisição pelo vetor e que participaria do processo epidemiológico da doença (WEINTRAUB; BEANLAND, 2006; GALETTO et al., 2009).

Teixeira et al. (2008) observaram uma concentração muito baixa do fitoplasma em citros, e isso pode ser um fator determinante da baixa eficiência de aquisição pelas cigarrinhas, observada no presente estudo.

Não foi possível detectar a bactéria nos diferentes órgãos do inseto. A baixa concentração de DNA nessas amostras podem ter influenciado nos resultados negativos.

Tabela 9 - Proporção de amostras de partes do corpo de *Scaphytopius marginelineatus* que foram positivas para o fitoplasma de citros (grupo 16SrIX) por “nested” PCR (pares de “primers” D7R2/D7F2 e P1/P7) em diferentes períodos de tempo (latência) após o período de acesso à aquisição do patógeno pela cigarrinha

Parte do corpo	Latência	No. amostras PCR (+) / total de amostras avaliadas
Abdome	21 dias	3/77
	14 dias	1/56
	7 dias	0/50
Cabeça	21 dias	3/77
	14 dias	0/56
	7 dias	0/50
Glândula salivar	21 dias	0/15
	14 dias	0/20
	7 dias	0/20
Intestino	21 dias	0/15
	14 dias	0/20
	7 dias	0/20
Aparelho reprodutor	21 dias	0/15
	14 dias	0/20
	7 dias	0/20

2.3.8.2 Quantificação do DNA bacteriano em insetos

Por meio do teste de PCR quantitativo, verificou-se uma baixa concentração do fitoplasma do grupo 16SrIX nas amostras de partes do corpo da cigarrinha *S. marginelineatus* que foram anteriormente positivas por nested-PCR. Mesmo depois de 21 dias de latência, nota-se que a concentração do patógeno nos insetos variou entre 3 a 20 GU (“genomic units”) em um volume de 5 µL de DNA (tabela 10). Quando se considera a proporção de GU/ng de DNA do hospedeiro, esses valores variam de 0,70 a 2,22, sendo que em um vetor competente de fitoplasma (*M. quadripunctulatus* x ‘Ca. Phytoplasma asteri’) é possível encontrar valores de até 120.000 GU/ng de DNA do hospedeiro (BOSCO et al., 2007; GALETTO et al., 2009). Com 14 dias pós-aquisição foi possível detectar o fitoplasma somente em um inseto e também em uma baixa concentração (tabela 10). Porém, a bactéria foi detectada somente no abdome do inseto, o que evidencia o pouco tempo para a movimentação do patógeno do aparelho digestivo para as glândulas salivares.

Com esses resultados, pode-se dizer que o inseto possui baixa eficiência de aquisição do fitoplasma em plantas cítricas. Outra hipótese plausível, baseando-se nos dados de baixa concentração no vetor, é que esta espécie de cigarrinha não seja um hospedeiro adequado para multiplicação do fitoplasma. Alguns estudos mostram que patógenos propagativos multiplicam-se mais em tecidos de espécies (ou indivíduos) que são vetores eficientes (BOSCO et al., 2007; D’AMÉLIO; MARZACHÌ; BOSCO, 2007; GALETTO et al., 2009). Outra hipótese é de que citros pode ser um “dead end host”, onde o fitoplasma é somente inoculado e não adquirido (WEINTRAUB; BEANLAND, 2006), evidenciando a presença de uma planta hospedeira alternativa envolvida na epidemiologia da doença. Esses resultados podem ser indicativos de que outro(s) inseto(s) com maior eficiência de transmissão está(ão) envolvido(s) na disseminação do patógeno.

Para aumentar a eficiência de aquisição de certos patógenos por insetos vetores seriam necessários dias de confinamento sobre a planta-fonte (PURCELL, 1982), no entanto, a necessidade de plantas alternativas a citros para alimentação da cigarrinha *S. marginelineatus* pode dificultar este confinamento em citros. Em testes

prévios não descritos no presente trabalho, adultos de *S. marginelineatus* não sobreviveram mais do que 4 dias sobre plantas cítricas, sendo que com 72 h de período de acesso à aquisição já houve uma mortalidade de cerca de 30% dos insetos. Essas observações indicam a não adequação de plantas de citros à cigarrinha *S. marginelineatus*, o que pode reduzir as chances de aquisição do patógeno.

Tabela 10 - Quantificação de DNA do fitoplasma-HLB 16SrIX em relação ao DNA da cigarrinha *Scaphytopius marginelineatus*

Amostra (dias de latência)	DNA fitoplasma		DNA de Inseto		DNA fitoplasma/ DNA inseto
	Ct ± DP	GU ⁵ ± DP	Ct ± DP	ng ± DP	GU / ng
1 A ¹ (21)	36,7 ± 0,30	10,52 ± 0,13	22,4 ± 0,05	14,95 ± 0,42	0,70
2 A (21)	38,5 ± 1,09	3,66 ± 0,20	21,1 ± 0,07	30,46 ± 1,25	0,12
3 A (21)	37,5 ± 0,32	7,88 ± 0,15	23,7 ± 0,12	7,62 ± 0,51	1,03
4 C ² (21)	36,5 ± 0,50	17,10 ± 0,23	22,9 ± 0,06	11,59 ± 0,41	1,48
5 C (21)	36,0 ± 0,22	20,00 ± 0,35	23,4 ± 0,11	9,01 ± 0,56	2,22
6 C (21)	36,4 ± 1,00	18,75 ± 1,34	22,3 ± 0,08	16,12 ± 0,71	1,16
7 A (14)	38,3 ± 0,20	4,17 ± 0,82	25,7 ± 0,11	2,45 ± 0,14	1,71
C + ³	32,2 ± 0,27	809,62 ± 5,23	20,2 ± 0,33	2,22 ± 0,27	365,52
C - ⁴	N.A. ⁶		24,6 ± 0,11	4,51 ± 0,62	-

¹ A: Abdome; ² C: Cabeça;

³ C+: controle positivo de amostra de espécimes de *S. marginelineatus* coletados no campo;

⁴ C-: controle negativo de amostra de indivíduos de *S. marginelineatus* provenientes de colônias de laboratório;

⁵ GU: Unidades Genômicas ("genomic units"); número de células do fitoplasma presente na amostra;

⁶ NA: Não Amplificado.

2.3.8.3 Quantificação do fitoplasma em plantas cítricas

Em análise por PCR quantitativo de amostras de plantas cítricas de campo, a concentração do fitoplasma associado ao HLB foi muito baixa (tabela 11). Em outros patossistemas envolvendo fitoplasmas, a quantidade de bactéria em GU/ng DNA do hospedeiro pode chegar a 20.000 (D'AMÉLIO; MARZACHÌ; BOSCO, 2007; MARTINI et al., 2007; MARZACHÌ; GALETTO, 2010), sendo que as amostras de plantas cítricas aqui analisadas atingiram no máximo 82,46 GU/ng de DNA de planta. Essas amostras de DNA foram extraídas de folhas sintomáticas de plantas com 6 a 7 anos, coletadas em pomares cítricos da região noroeste do Estado de São Paulo e todas foram indexadas para a presença do fitoplasma 16SrIX por PCR e sequenciamento.

A baixa concentração do fitoplasma observada em plantas cítricas explicaria, pelo menos em parte, a baixa eficiência do inseto em adquirir o patógeno. A necessidade de utilizar uma metodologia de PCR duplo para detectar este patógeno em citros já era um indicativo desta baixa concentração (TEIXEIRA et al., 2008).

De acordo com trabalhos envolvendo fitoplasmas em plantas e insetos, a concentração nos insetos vetores é cerca de 10 a 100 vezes maior do que na planta (D'AMÉLIO; MARZACHÌ; BOSCO, 2007; MARTINI et al., 2007), o que não ocorreu no presente trabalho. O fato de as amostras de plantas testadas no presente trabalho serem coletadas no campo faz com que se desconheça o tempo real de incubação do fitoplasma. Esse período pode ser de anos, ou simplesmente meses, já que não se conhece a marcha de multiplicação desses microrganismos em plantas de laranja. Muitos fitoplasmas são conhecidos como fastidiosos (BERTACCINI, 2007), e o tempo necessário para que a população bacteriana se eleve pode ser de anos.

A baixa concentração bacteriana na planta pode ter influenciado na eficiência de aquisição de *S. marginelineatus*, que consequentemente resultou em baixa concentração do patógeno no inseto e também na ineficiência da cigarrinha em inocular o fitoplasma.

Tabela 11 - Quantificação de DNA do fitoplasma-HLB 16SrIX em relação ao DNA de planta de laranja-doce (*Citrus sinensis*)

Amostra	DNA do fitoplasma		DNA de Planta		DNA fitoplasma/ DNA planta
	Ct ±DP	GU±DP	Ct ±DP	ng±DP	GU / ng
A	30,79 ±0,54	721,188±2,45	21,26 ±0,09	8,75±0,01	82,46
B	33,00 ±0,23	184,644±3,61	22,52 ±0,40	4,85±0,01	38,09
C	35,54 ±0,19	38,722±0,45	23,83 ±0,04	2,62±0,02	14,79
D	36,99 ±0,21	15,883±1,23	20,80 ±0,27	10,87±0,01	1,46
E	35,87 ±0,08	31,684±0,32	22,56 ±0,43	4,75±0,02	6,67
C- ¹	NA ²		23,89 ±0,21	2,55±0,002	-

¹ C-: amostras de DNA de “seedlings” de plantas de laranja mantidas em casa de vegetação isenta de vetores;

² NA: Não Amplificado.

2.3.9 Considerações Finais

O presente trabalho apresentou uma abordagem ampla dos fatores envolvendo o sistema de uma nova doença de citros associada a um fitoplasma, desde a identificação de cigarrinhas potenciais vetoras em áreas afetadas, seus hospedeiros alternativos e também a quantificação do patógeno em amostras de plantas e insetos.

Novos microrganismos fitopatogênicos vêm sendo descobertos nos últimos anos. O grupo dos fitoplasmas é um dos que mais tem contribuído a essas novas descobertas. No entanto, a identificação destes microrganismos é apenas um vértice do tetraedro que representa o sistema epidemiológico da doença associada a um agente infeccioso, que depende de agentes externos para sua disseminação.

A busca por vetores de fitopatógenos é uma atividade multidisciplinar. Perante o número de fitoplasmas descritos, a proporção de vetores identificados é

muito menor, já que em alguns casos esta multidisciplinaridade é esquecida. Durante o processo de busca é necessário conhecer as espécies de insetos presentes nas áreas com plantas afetadas pelo patógeno, assim como das demais plantas que são fontes de alimento para estes insetos e constituem possíveis hospedeiros alternativos dos patógenos.

Essa multidisciplinaridade deve envolver todos os níveis, inclusive quanto à aplicação de tecnologias de detecção de fitopatógenos. A utilização da técnica de PCR quantitativo para a identificação de insetos potenciais vetores de fitoplasmas vem sendo utilizada, já que trabalhos científicos comprovam maior multiplicação da bactéria nas cigarrinhas vetoras do que nas plantas hospedeiras desses patógenos. É possível a categorização de espécies de cigarrinhas em vetoras eficientes e ineficientes em função da concentração que o fitoplasma atinge no corpo do inseto.

No presente trabalho foi possível detectar a influência de plantas invasoras presentes nas entrelinhas de pomares de laranja sobre a abundância de espécies de cigarrinhas potenciais vetoras de um fitoplasma (grupo 16SrIX) associado a sintomas do “Huanglongbing” dos citros. Estas informações foram fundamentais no estabelecimento de um método de criação desses insetos em laboratório para estudos de transmissão do fitoplasma. Informações sobre a identidade dos insetos vetores, suas plantas hospedeiras e característica da relação patógeno-vetor serão extremamente importantes na adoção de táticas para o manejo da doença.

A composição de plantas infestantes nos pomares pode indicar o potencial de colonização da área por algumas espécies de cigarrinhas, sendo possível determinar o risco da incidência de doenças de plantas. O controle de certas espécies de plantas invasoras será uma nova estratégia de manejo adotada, juntamente com aquelas já empregadas pelos produtores.

A utilização de técnicas que possibilitem a quantificação do fitoplasma trazem perspectivas para novas descobertas. A utilização do PCR quantitativo será útil na determinação de alguns aspectos que envolvam bactéria e hospedeiro. Fontes de resistência de plantas podem ser estudadas, assim como o envolvimento de outras plantas hospedeiras mais apropriadas para o desenvolvimento da bactéria.

A quantidade de informações obtidas do complexo sistema epidemiológico de uma doença está diretamente ligada à diversidade de estratégias de manejo para a mesma. Quanto mais informações forem obtidas, mais opções de estratégias de manejo de doenças existirão para os produtores.

3 CONCLUSÕES

- Cigarrinhas das subfamílias Deltocephalinae e Agalliinae (Hemiptera: Cicadellidae), potenciais vetoras de fitoplasmas, ocorrem predominantemente na vegetação espontânea das entrelinhas, em pomares de laranja.
- Os deltacefalíneos *Balclutha hebe* (Kirkaldy), *Planicephalus flavicosta* (Stål) e *Scaphytopius marginelineatus* (Stål) e o agaliíneo *Agallia albidula* Uhler são as espécies mais abundantes e frequentes nesse tipo de vegetação, em pomares de laranja do município de Nova Granada, região norte do Estado de São Paulo.
- A composição florística da vegetação espontânea nas entrelinhas de pomares de laranja influencia a abundância de cigarrinhas naquela vegetação, havendo uma associação desses insetos com determinadas plantas invasoras;
- A cigarrinha *S. marginelineatus* é um hospedeiro natural do fitoplasma (grupo 16SrIX) associado ao Huanglongbing (HLB);
- *S. marginelineatus* é um vetor ineficiente do fitoplasma associado ao HLB entre plantas cítricas;
- A técnica de PCR em tempo real é aplicável para a quantificação do fitoplasma associado ao HLB, sendo este encontrado em baixa concentração tanto em plantas de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, quanto em cigarrinhas da espécie *S. marginelineatus*.

REFERÊNCIAS

- ALHUDAIB, K.; AROCHA, Y.; WILSON, M.; JONES, P. Molecular identification, potential vectors and alternative hosts of the phytoplasma associated with a lime decline disease in Saudi Arabia. **Crop Protection**, Guildford, v. 28, p. 13-18, 2009.
- ALVAREZ, E.; MEJÍA, J.F.; LLANO, G.A.; LOKE, J.B.; CALARI, A.; DUDUK, B.; BERTACCINI, A. Characterization of a phytoplasma associated with Frogskin Disease in cassava. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 93, p. 1139-1145, 2009.
- ARAÚJO, W.L.; MARCON, J.; MACCHERONI JR, W.; VAN ELSAS, J.D.; VAN VUURDE, J.W.L.; AZEVEDO, J.L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 4906-4914, 2002.
- BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. **Doenças de plantas tropicais**: epidemiologia e controle econômico. São Paulo: Ceres, 1996. 299 p.
- BERTACCINI, A. Phytoplasmas: diversity, taxonomy, and epidemiology. **Frontiers in Bioscience**, Alberston, v. 12, p. 673-689, 2007.
- BOSCO, D.; GALETTO, L.; LEONCINI, P.; SARACCO, P.; RACCAH, B.; MARZACHÌ, C. Interrelationships between "*Candidatus Phytoplasma asteris*" and its leafhopper vectors (Homoptera: Cicadellidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 100, p. 1504-1511, 2007.
- BOVÉ, J.M. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. **Journal of Plant Pathology**, Pisa, v. 88, p. 7-37, 2006.
- BOVÉ, J.M.; ZREIK, L.; DANET, J.L.; BONFILS, J.; MJENI, A.M.M.; GARNIER, M. Witches' broom disease of lime trees: monoclonal antibody and DNA probes for the detection of the associated MLO and the identification of a possible vector. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGIST, 12., 1993. Riverside. **Proceedings...** University of California, Riverside, 1993. p.342-348.

BRESSAN, A.; CLAIR, D.; SÉMÉTEY, O.; BOUDON-PADIEU, E. Insect injection and artificial feeding bioassays to test the vector specificity of Flavescence Dorée Phytoplasma. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 96, p. 790-796, 2006.

BUITENDAG, C. H.; VON BROEMBSSEN, L. A. Living with citrus greening in South Africa. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGIST, 12., 1993. Riverside. **Proceedings...** Riverside: University of California: 1993. p. 269-273.

CAPOOR, S.P.; RAO, D.G.; VISWANATH, S.M. *Diaphorina citri* Kuwayama, a vector of the greening disease of citrus in India. **Indian Journal of Agriculture and Science**, New Delhi, v. 37, p. 572-576, 1967.

CHEN, J.; PU, X.; DENG, X.; LIU, S.; LI, H.; CIVEROLO, E. A phytoplasma related to "*Candidatus* Phytoplasma asteri" detected in citrus showing Huanglongbing (Yellow shoot disease) symptoms in Guangdong, P. R. China. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 99, p. 236-242, 2009.

CIAT-CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL. **Annual report project PE-1: integrated pest and disease management in major agroecosystems.** Disponível em: http://ciat-library.ciat.cgiar.org/Articulos/Ciat/report_2004/ipm_2004_1a.pdf Acesso em: 10 dez. 2010.

COLETTA-FILHO H.D.; TARGON, M.L.P.N.; TAKITA, M.A.; DE NEGRI, J.D.; POMPEU JUNIOR, J.; MACHADO, M.A.; AMARAL A.M. MULLER, G.W. First report of the causal agent of Huanglongbing ("*Candidatus* Liberibacter asiaticus") in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 88, p. 1382, 2004

COLL, O.R.; AGOSTINI, J.P.; TIMMER, L.W.; BRLANSKY, R.H. Survey of sharpshooters with decline diseases in Misiones, Argentina. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGIST, 12., 1993. Riverside. **Proceedings...** Riverside: University of California: 1993. p. 320-326.

D'AMELIO, R.; MARZACHI, C.; BOSCO, D. Double infection of '*Candidatus* Phytoplasma asteris' and 'flavescence doree' phytoplasma in the vector *Euscelidius variegatus*. **Bulletin of Insectology**, Bologna, v. 60, p. 223-224, 2007.

DA GRAÇA, J.V. Citrus greening disease. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 29, p. 109-136, 1991.

DAVIS, R.E. Fitoplasmas: Fitopatógenos procarióticos sem parede celular, habitantes de floema e transmitidos por artrópodes. In: LUZ, W.C.; FERNANDES, J.M.C.; PRESTES, A.M.; PICININI, E.C. (Ed.). **Revisão anual de patologia de plantas**. Passo Fundo: RAPP, 1995. v. 3, p. 1-27.

DUARTE, V.; SILVA, E.G.; HAAS, I.C.R.; BEDENDO, I.P.; KITAJIMA, E.W. First report of a group 16SrIII-B phytoplasma associated with decline of chine tree in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 93, p. 666, 2009.

EBBERT, M.A.; JEFFERS, D.P.; HARRISON, H.A.; NAULT, L.R. 2001. Lack of specificity in the interaction between two maize stunting pathogens and field collected *Dalbulus* leafhoppers. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 101, p. 49-57, 2001.

ECKSTEIN, B. **Enfezamento do brócolis: identificação molecular de fitoplasmas, potenciais insetos vetores e hospedeiros alternativos, e análise epidemiológica da doença**. 2010. 103 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

ECKSTEIN, B.; BEDENDO, I.P. Detecção molecular de fitoplasmas em plantas do gênero *Celosia* com malformação das folhas. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 36, p. 89, 2010.

ECKSTEIN, B.; BARBOSA, J.C.; REZENDE, J.A.M.; BEDENDO, I.P. *Sida* sp. a new host for ‘*Candidatus* Phytoplasma brasiliense’ in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, 2011. In press.

FIRRAO, G.; GARCIA-CHAPA, M.; MARZACHI, C. Phytoplasmas: genetics, diagnosis and relationships with the plant and insect host. **Frontiers in Bioscience**, Alberston, v. 12, p. 1353-1375, 2007.

FNP CONSULTORIA & COMERCIO. Citrus. In: **Agrianual 2010**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2010. p 267-300.

GALETTO, L.; MARZACHÌ, C. Real-time PCR diagnosis and quantification of phytoplasmas. In: WEINTRAUB, P.G.; JONES, P. (Ed.). **Phytoplasmas, genome, plant hosts and vectors**. Oxon: CABI, 2009. chap. 1, p. 1-18.

GALETTO, L.; BOSCO, D.; MARZACHÌ, C. Universal and group-specific real-time PCR diagnosis of flavescence dorée (16Sr-V), bois noir (16Sr-XII) and apple proliferation (16Sr-X) phytoplasmas from field-collected plant hosts and insect vectors. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 147, p. 191-201, 2005.

GALETTO, L.; NARDI, M.; SARACCO, P.; BRESSAN, A.; MARZACHÌ C.; BOSCO, D. Variation in vector competency depends on chrysanthemum yellows phytoplasma distribution within *Euscelidius variegatus*. **Entomologia experimentalis et applicata**, Dordrecht, v. 131, p. 200-207, 2009.

GARNIER, M.; ZREIK, I.; BOVÉ, J.M. Witches' broom, a lethal micoplasmal disease of lime trees in the sultanate of Oman and the United Arab Emirates. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 75, p. 546-551, 1991.

GASPAROTO, M.C.G.; BASSANEZI, R.B.; AMORIM, L.; MONTESINO, L.H.; LOURENÇO, S.A.; WULFF, N.A.; TEIXEIRA, D.C.; MARIANO, A.G.; MARTINS, E.C.; LEITE, A.P.R.; BERGAMIN FILHO, A. First report of '*Candidatus Liberibacter americanus*' transmission from *Murraya paniculata* to sweet orange by *Diaphorina citri*. **Journal of Plant Pathology**, Pisa, v. 92, p. 546-546, 2010.

GIBSON, U.E.; HEID, C.A.; WILLIAMS, P.M. A novel method for real-time quantitative RT-PCR. **Genetical Research**, Cambridge, v. 6, p. 1095-2001, 1996.

GIUSTOLIN, T.A.; LOPES, J.R.S.; QUERINO, R.B.; CAVICHIOLI, R.; ZANOL, K.; AZEVEDO FILHO, W.S.; MENDES, M.A. Diversidade de Hemiptera Auchenorrhyncha em citros, café e fragmento de floresta nativa do estado de São Paulo. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 38, p. 834-841, 2009.

HAAS, I.C.R. **Gramíneas forrageiras como potenciais hospedeiros alternativos para o fitoplasma do enfezamento vermelho do milho**. 2006. 38 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

HALBERT, S.E.; MANJUNATH, K. L. Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: a literature review and assessment of risk in Florida. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 87, p. 3330-3353, 2004.

HIGUCHI, R.; FOCKLER, C.; DOLLINGER, G.; WATSON, R. Kinetic PCR analysis: Real-Time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology**, Weinheim, v.11, n. 9, p.1026-1030, 1993.

INOUE, H.; OHNISHI, J.; ITO, T.; TOMIMURA, K.; MYIATA, S.; IWANAMIZ, T.; ASHIHARA, W. Enhanced proliferation and efficient transmission of *Candidatus Liberibacter asiaticus* by adult *Diaphorina citri* after acquisition feeding in the nymphal stage. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 155, p. 29-36, 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento sistemático da produção agrícola**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201011_5.shtm>. Acesso em: 15 dez. 2010.

IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team - Phytoplasma taxonomy group: Description of the genus '*Candidatus Phytoplasma*', a taxon for the wall-less nonhelical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p. 1243-1255, 2004.

KALOOSTIAN, G.H.; OLDFIELD, G.N.; PIERCE, H.D.; CALAVAN, E.C. *Spiroplasma citri* and its transmission to citrus and other plants by leafhoppers. In: MARAMOROSCH, K; HARRIS, K.F. (Ed.). **Leafhopper vectors and plant disease agents**. New York: Academic Press, 1985. chap. 12, p. 447-450.

KISSMANN, K.G. **Plantas infestantes e nocivas**. 2.ed. São Paulo: BASF. v. I, 1997. 825p.

KISSMANN, K.G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. 2.ed. São Paulo: BASF. v.2 1999. 978p.

KISSMANN, K.G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. 2.ed. São Paulo: BASF, 2000. v.2 725p.

LAFLECHE, D.; BOVÉ, J.M. Mycoplasmes dans les argumes attentis de “greening”, de stubborn, ou des maladies similaires. **Fruits**, Paris, v. 25, p. 455-465, 1970.

LEE, I.M.; DAVIS, R.E.; GUNDERSEN-RINDAL, D.E. Phytoplasma: phytopatogenic mollicutes. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 54, p. 221-255, 2000.

LOPES, J.R.S.; OLIVEIRA, C.M. Vetores de vírus e mollicutes em milho. In: OLIVEIRA, E.; OLIVEIRA, C.M. (Ed.). **Doenças em Milho: mollicutes, vírus, vetores, mancha por Phaeosphaeria**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. cap 2, p. 36-60.

LOPES, S.A.; FRARE, G.F.; CAMARGO, L.E.A.; WULFF, N.A.; TEIXEIRA, D.C.; BASSANEZI, R.B.; BEATTIE, G.A.C.; AYRES, A. J. Liberibacters associated with orange jasmine in Brazil: incidence in urban areas and relatedness to citrus liberibacters. **Plant Pathology**, Saint Paul, v. 59, p. 1044-1053, 2010.

LOPES, S.A.; FRARE, G.F.; YAMAMOTO, P.T.; AYRES, A.J.; BARBOSA, J.C. Ineffectiveness of pruning to control citrus huanglongbing caused by *Candidatus Liberibacter americanus*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 119, p. 463-468, 2007.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais**. 3. ed. Nova Odessa: Plantarum, 2000. 608 p.

MADDEN, L.V.; NAULT, L.R.; HEADY, S.E.; STYER, W.E. Effect of maize stunting mollicutes on survival and fecundity of *Dalbulus* leafhopper vectors. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 105, p. 431-441, 1984.

MAFIA, R.G.; BARRETO, R.W.; VANETTI, C.A.; HODGETTS, J.; DICKINSON, M.; ALFENAS, A.C. A phytoplasma associated with witches' broom disease of *Tabebuia pentaphylla* in Brazil. **Plant Pathology**, Saint Paul, v. 57, p. 365, 2007.

MARTINI, M.; LOI, N.; ERMACORA, P.; CARRARO, L.; PASTORE, M. A real-time PCR method for detection and quantification of '*Candidatus Phytoplasma prunorum*' in its natural hosts. **Bulletin of Insectology**, Bologna, v. 60, p. 251-252, 2007.

MARZACHÌ, C.; BOSCO, D. Relative quantification of chrysanthemum yellows (16Sr I) phytoplasma in its plant and insect host using Real Time PCR. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v. 30, p. 117-127, 2005.

MARZACHÌ, C.; VERATTI, E.; BOSCO, D. Direct PCR detection of phytoplasmas in experimentally infected insects. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 133, p. 45-54, 1998.

MASSOLA JR, N.S.; BEDENDO, I.P.; AMORIM, L.; LOPES, J.R.S. Fitoplasma e espiroplasma em milho: multiplicação e efeito na produção de genótipos resistente e suscetível. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 25, p. 356-359, 1999.

McCLEAN, A.P.D.; OBERHOLZER, P.C.J. Greening disease of the sweet orange: evidence that it is caused by a transmissible virus. **South African Journal of Agricultural Science**, Pretoria, v.8, p. 253-276, 1965.

MELLO, A.P.O.A. **Identificação molecular de fitoplasmas associados ao enfezamento do repolho e análise epidemiológica da doença**. 2007. 64 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

MELO, L.A.; BEDENDO, I.P.; YUKI, V. Abobrinha-de-moita: um novo hospedeiro de fitoplasma do grupo 16SrIII. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 34, p. 114-117, 2009.

MILLER, S.A.; JOAQUIM, T.R. Diagnostic techniques for plant pathogens. In: CHET, I. (Ed.). **Biotechnology in plant disease control**. New York: Wiley-Liss, 1993. p. 321-339.

MIRANDA, M.P.; FERERES, A.; APEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; LOPES, J.R.S. Characterization of electrical penetration graphs of *Bucephalogonia xanthophis*, a vector of *Xylella fastidiosa*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 130, p. 35-46, 2009a.

MIRANDA, M.P.; LOPES, J.R.S.; NASCIMENTO, A.S.; SANTOS, J.L.; CAVICHIOLI, R. Levantamento populacional de cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae) associadas à transmissão de *Xylella fastidiosa* em pomares cítricos do litoral norte da Bahia. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 38, p. 827-822, 2009b.

MONTANO, H.G.; BRIOSO, P.S.T.; PIMENTEL, J.P. List of phytoplasma hosts in Brazil. **Bulletin of Insectology**, Bologna, v. 60, p. 129-130, 2007.

MORAES, R.C.B.; HADDAD, M.L.; SILVEIRA NETO, S.; REYES, A.E.L. Software para análise faunística – Anafau. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 8., 2003. São Pedro, **Resumos...** Piracicaba: ESALQ, 2003. p. 195.

MUELLER-DOMBOIS, D.; ELLENBERG, H.A. **Aims and methods of vegetation ecology**. New York: John Wiley, 1974. 574 p.

MURRAY, M.G.; THOMPSON, W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, Standford, v. 8, p. 4321-4325, 1980.

NAULT, L.R. Maize bushy stunt and corn stunt: a comparison of disease symptoms, pathogen host ranges, and vectors. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 70, p. 659-662, 1980.

NAULT, L.R. Evolution of an insect pest: maize and the corn leafhopper, a case study. **Maydica**, Bergamo, v. 35, p.165-175, 1990.

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

NIELSON, M.W. Taxonomic relationships of leafhopper vectors of plant pathogens. In: MARAMOROSCH, K; HARRIS, K. F. (Ed.). **Leafhopper vectors and plant disease agents**. New York: Academic Press, 1979. chap. 1, p. 3-28.

NIELSON, M.W. Leafhopper systematics. In: NAULT, L.R.; RODRIGUEZ, J.G. (Ed.). **The Leafhopper and Planthoppers**. New York: John Wiley, 1985. chap. 2, p. 11-40.

NUNES, W.M.C.; MOLINA, R.O.; DE ALBUQUERQUE, F.A.; NUNES, M.J.C; ZANUTTO, C.A.; MACHADO, M.A. Flutuação populacional de cigarrinhas vetoras de *Xylella fastidiosa* Wells et al. em pomares comerciais de citros no noroeste do Paraná. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 36, p. 254-260, 2007.

OLIVEIRA, C.M.; LOPES, J.R.S. Técnicas para criação da cigarrinha-do-milho e inoculação de mollicutes e vírus em plantas. In: OLIVEIRA, E.; OLIVEIRA, C.M. (Ed.). **Doenças em Milho: mollicutes, vírus, vetores, mancha por Phaeosphaeria**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. cap 4, p. 89-116.

OLIVEIRA, C.M.; MOLINA, R.M.; ALBRES, R.S.; LOPES, J.R.S. Disseminação de mollicutes do milho a longas distâncias por *Dalbulus maidis* (Hemiptera:Cicadellidae). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 1, p. 91-95, 2002.

OLIVEIRA, E.; DUARTE, A.P.; CARVALHO, R.V.; OLIVEIRA, A.C. Mollicutes e vírus na cultura do milho na Brasil: caracterização e fatores que afetam sua incidência. In: OLIVEIRA, E.; OLIVEIRA, C.M. (Ed.). **Doenças em Milho: mollicutes, vírus, vetores, mancha por Phaeosphaeria**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. cap 1, p. 17-34.

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**, Porto Alegre, v. 96, p. 425-429, 2006.

PAIVA, P.E.B.; SILVA, J.L.; GRAVENA, S.; YAMAMOTO, P.T. Cigarrinhas de xilema em pomares de laranja no Estado de São Paulo. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 17, p. 41-54, 1996.

PFAFFL, M.W. Quantification strategies in real-time PCR. In: BUSTIN, S.A. (Ed.). **A-Z of quantitative PCR**. La Jolla: University Line (IUL), 2004. chap 3, p 87-112.

PURCELL, A.H. Insect vector relationships with prokaryotic plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 20, p 397-417, 1982.

PURCELL, A.H. Increased survival of *Dalbulus maidis*, a specialist on maize, on non-host plants infected with mollicute plant pathogens. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 46, p. 187-96, 1988.

PURCELL, A.H.; STEINER, T.; MEGRAUD, F.; BOVE, J. *In vitro* isolation of a transovarially transmitted bacterium from the leafhopper *Euscelidius variegatus* (Hemiptera: Cicadellidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 48, p. 66 - 73, 1986.

RAPPUSSI-DA-SILVA, M.C.C. **Enfezamento da couve-flor: identificação molecular de fitoplasmas, evidência de potencial vetor e análise epidemiológica da doença.** 2010. 106 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

RIBEIRO, L.F.C.; SILVA, E.G.; BEDENDO, I.P. Evidência molecular da ocorrência de fitoplasma associado ao superbrotamento do maracujazeiro em cinco estados brasileiros. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 33, p. 323-325, 2008.

RINGENBERG, R.; LOPES, J.R.S.; BOTTON, M.; AZEVEDO FILHO, W.S.; CAVICHIOLI, R. Análise faunística de cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae) na cultura da videira no Rio Grande do Sul. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 39, p. 187-193, 2010.

SACCHI, L.; GENCHI, M.; CLEMENTI, E.; BIGLIARDI, E.; AVANZATI, A.M.; PAJORO, M.; NEGRI, I.; MARZORATI, M.; GONELLA, E.; ALMA, A.; DAFFONCHIO, D.; BANDI, C. Multiple symbiosis in the leafhopper *Scaphoideus titanus* (Hemiptera: Cicadellidae): Details of transovarial transmission of *Cardinium* sp. and yeastlike endosymbionts. **Tissue and Cell**, Dordrecht, v. 40, p. 231-242, 2008.

SALEHI, M.; IZADPANAH, K.; SIAMPOUR, M.; BAGHERI, A.; FAGHIHI, S.M. Transmission of ‘*Candidatus* Phytoplasma aurantifolia’ to Bakraee (*Citrus reticulata* Hybrid) by Feral *Hishimonus phycitis* Leafhoppers in Iran. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 91, p. 466, 2007.

SCHNEIDER, B.; SEEMÜLLER, E.; SMART, C.D.; KIRKPATRICK, B.C. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organism or phytoplasmas. In: RAZIN, S.; TULLY, J.G. (Ed.). **Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology**, San Diego: Academic Press, 1995. v. 1, p. 369-380.

SECHLER, A.; SCHUENZEL, E.L.; COOKE, P.; DONNUA, S.; THAVEECHAI, POSTNIKOVA, E.; STONE, A.L.; SCHNEIDER, W.L.; DAMSTEEGT, V.D.; SCHAAD, N.W. Cultivation of ‘*Candidatus* Liberibacter asiaticus’, ‘*Ca. L. africanus*’, and ‘*Ca. L. americanus*’ associated with huanglongbing. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 99, p. 480-486, 2009.

SIAMPOUR, M.; IZADPANAH, K.A.; AFSHARIFAR, A.R.; SALEHI, M.; TAGHIZADEH, M. Detection of phytoplasma in insects collected in witches' broom affected lime groves. **Iranian Journal of Plant Pathology**, Tehran, v. 42, p. 139-158, 2006.

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

SILVA, E.G.; BEDENDO, I.P.; CASAGRANDE, M.V.; MORAES, V.A. Molecular identification and phylogenetic analysis of a group 16Srl-B phytoplasma associated with sugarcane yellow leaf syndrome in Brazil. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 157, p. 771-774, 2009.

SILVEIRA NETO, S.; MONTEIRO, R.C.; ZUCCI, R.A.; MORAES, R.C.B. Uso da análise faunística de insetos na avaliação do impacto ambiental. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 52, p. 9-15, 1995.

SOUAZE, F.; NTODOU-THOME, A.; TRAN, C.Y.; ROSTENE, W.; FORGEZ, P. Quantitative RT-PCR: limits and accuracy. **Biotechniques**, New York, v.21, n.2, p.280-285, 1996.

SWALLOW, W.H. Group testing for estimating infection rates and probabilities of disease transmission. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 75, 882-889, 1985.

TANNE, E.; BOUDON-PADIEU, E.; CLAIR, D.; DAVIDOVICH, M.; MELAMED, S.; KLEIN, M. Detection of phytoplasma by polymerase chain reaction of insect feeding medium and its use in determining vectoring ability. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 91, p.741-746, 2001.

TEIXEIRA, D.C.; AYRES, A.J.; KITAJIMA, E.W.; TANAKA, F.A.O.; DANIEL, L.; JAGOUEIX, S.; SAILLARD, C.; BOVÉ, J. First report of a Huanglongbing-like disease of citrus in Sao Paulo State, Brazil and association of a new *Liberibacter* species, "*Candidatus Liberibacter americanus*", with the disease. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 89, p. 107, 2005.

TEIXEIRA, D.C.; WULFF, N.A.; MARTINS, E.C.; KITAJIMA, E.W.; BASSANEZI, R.; AYRES, A.J.; EVEILLARD, S.; SAILLARD, C.; BOVÉ, J.M. A phytoplasma closely related to the Pigeon Pea Witches'-Broom Phytoplasma (16Sr IX) is associated with citrus Huanglongbing symptoms in the State of São Paulo, Brazil. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 98, p. 977-984, 2008.

TICHOPAD, A.; DILGER, M.; SCHWARZ, G.; PFAFFL, M.W. Standardised determination of real-time PCR efficiency from a single reaction setup. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 31, n. 21, p.122, 2003.

VITÓRIA FILHO, R. Manejo de plantas daninhas em citros no Brasil. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE CITROS – TRATOS CULTURAIS, 5., 1998, Bebedouro. **Anais...** Bebedouro: Fundação Cargill, 1998. p. 357-376.

WEINTRAUB, P.G. Insect vectors of phytoplasmas and their control – an update. **Bulletin of Insectology**, Bologna, v. 60, p. 169-173, 2007.

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

WEINTRAUB, P.G.; ORENSTEIN S. Potential leafhopper vectors of phytoplasma in carrots. **International Journal of Tropical Insect Science**, Wallingford, v. 24, p. 228-235, 2004.

WILSON, M.R.; CLARIDGE, M.F. **Handbook for the identification of leafhoppers and planthoppers of Rice**. Oxon: CAB International. 1991. 142p.

WILSON, M.R.; WEINTRAUB, P.G. An introduction to Auchenorrhyncha phytoplasma vectors, **Bulletin of Insectology**, Bologna, v. 60, p. 177-178, 2007.

WULFF, N.A.; TEIXEIRA, D.C.; MARTINS, E. C.; MARTINS, E.C.; LEITE, A.P.R.; MARIANO, A.G.; DA SILVA, A.C.B.; AUGUSTO, M.L.V.; AYRES, A.J.; BOVE, J.M. The 16Sr group IX phytoplasma associated with citrus huanglongbing symptoms in São Paulo state, Brazil, has been detected in crotalaria plants (*Crotalaria juncea*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 42., 2009. Rio de Janeiro. **Resumos...** Rio de Janeiro: Tropical Plant Pathology. 2009. p. 115

YAMAMOTO, P.T.; FELIPPE, M.R.; GARBIM, L.F.; COELHO, J.H.; XIMENES, N.L.; MARTINS, E.C.; LEITE, A.P.R.; SOUSA, M.C.; ABRAHÃO, D.P.; BRAZ, J.D. *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera: Psyllidae): vector of the bacterium *Candidatus Liberibacter americanus*. In: HUANGLONGBING – GREENING INTERNATIONAL WORKSHOP, 2006, Ribeirão Preto. **Proceedings...** Ribeirão Preto: Fundecitrus. 2006. p. 96.

YAMAMOTO, P.T.; GRAVENA, S. Espécies e abundância de cigarrinhas e psilídios (Homoptera) em pomares cítricos. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**. Londrina, v.29, p.155-162, 2000.

ZHANG, J.; MILLER, S.; HOY, C.; ZHOU, X.; NAULT, L. A rapid method for detection and differentiation of aster-yellows phytoplasma-infected and inoculative leafhoppers. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 88, S84, 1998.

ZREIK, L.; CARLE, P.; BOVÉ, J.M.; GARNIER, M. Characterization of the mycoplasma-like organism associated with witches'-broom disease of lime and proposition of a *Candidatus* taxon for the organism, '*Candidatus* Phytoplasma aurantifolia'. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 45, p. 449-453, 1995.