

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

***Xylella fastidiosa* de ameixeira: transmissão por cigarrinhas
(Hemiptera: Cicadellidae) e colonização de plantas hospedeiras**

Cristiane Müller

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

**Piracicaba
2013**

Cristiane Müller
Engenheira Agrônoma

***Xylella fastidiosa* de ameixeira: transmissão por cigarrinhas (Hemiptera:
Cicadellidae) e colonização de plantas hospedeiras**
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

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

Piracicaba
2013

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

Müller, Cristiane

Xylella fastidiosa de ameixeira: transmissão por cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae) e colonização de plantas hospedeiras / Cristiane Müller. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2013. 105 p: il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.

1. Ameixa 2. Bactérias fitopatogênicas 3. Cigarrinhas 4. Escaldadura da folha 5. Estirpes 6. Insetos vetores 7. Plantas hospedeiras 8. Transmissão
I. Título

CDD 634.22
M958x

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

*Aos meus pais, **Décio e Olga**, pelos exemplos de vida e pelo amor acima de todas suas possibilidades*

Aos meus irmãos,

Luciano, Michele e Jucieli

Pelo amor, carinho e confiança

OFEREÇO

*Ao meu amado irmão **Rafael** (in memorian)*

Pela presença, força e amor em todos os dias da minha vida

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, força, luz e presença constante em meu caminho, por me mostrar a verdade e o amor.

Ao professor João Spotti Lopes, pela orientação, ensinamentos, conselhos, exemplos, pelo incentivo e amizade.

Ao Dr. Marcos Botton da Embrapa Uva e Vinho, Dr. Rodrigo Almeida e Dr. Helvécio Della Coletta Filho agradeço pelas sugestões, pelos conselhos, incentivos e amizade.

Ao Dr. Marco Dalbó, Dr. Cristiano Arioli, Fernando Mascaro, Edir Bruske, Paulo Simonetto, à Associação de produtores de Jarinú-SP e à Cooperativa de Cotia-MG pela colaboração em estudos, apoio e incentivo no desenvolvimento do trabalho.

Ao Departamento de Entomologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz”. Aos professores pelo incentivo, pela valorização e, acima de tudo, pela paciência em relação aos questionamentos frequentes. Aos funcionários, pela atenção e amizade.

À equipe do Laboratório de Insetos Vetores: Anderson, Arthur, Clederson, Daniela, Fernanda, Fernando, Flávio, Gerane, Joyce, Juliana, Karina, Maíra, Marcelo, Matê, Nicolý, Patrick, Rodrigo, Rudiney, Salas e Simone pela ajuda e momentos de profissionalismo e amizade.

A Juliana, Rafael, Karina, Maíra, Jucieli e Nathalie meus temporários estagiários que tanto me auxiliaram na execução do projeto.

Aos meus pais e irmãos, pela compreensão durante minha ausência em suas vidas, pelo amor, companheirismo e por acreditarem em mim.

À minha família Choppensá, Andréia, Bel, Juli, Jake, Fer e agregadas Angelina, Ale e Simone, pela amizade e companheirismo. Em especial um agradecimento a Andréia, pela amizade incondicional de tantos anos, pelo apoio, incentivo constante e por ser minha irmã de verdade.

Aos meus amigos da ESALQ, por dividirem parte de suas vidas, pelos momentos de estudo, pelo apoio, compreensão e pela alegria.

Aos produtores e técnicos ligados a cadeia da ameixeira de vários estados e instituições por onde passei durante as viagens ou em participação de eventos, pelo incentivo, apoio e pela confiança depositada em mim.

A CAPES e CNPQ pelas bolsas cedidas para a execução do trabalho.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	15
Referências.....	17
2 PATOSSISTEMA: ESCALDADURA DAS FOLHAS DA AMEIXEIRA.....	19
2.1 A cultura da ameixeira.....	19
2.2 A Escaldadura das Folhas da Ameixeira – EFA.....	20
2.3 Epidemiologia da EFA.....	20
2.4 A bactéria <i>Xylella fastidiosa</i> Wells et al., 1987 - agente causal.....	21
2.5 Vetores da bactéria <i>X. fastidiosa</i>	24
2.6 Aspectos relacionados à transmissão de <i>Xylella fastidiosa</i> por vetores.....	25
2.7 Mecanismos de transmissão	27
Referências	28
3 PRIMEIRAS ESPÉCIES DE CIGARRINHAS COMPROVADAS COMO VETORAS DE <i>Xylella fastidiosa</i> EM AMEIXEIRA E PLANTAS HOSPEDEIRAS ADEQUADAS PARA SUA CRIAÇÃO	37
Resumo.....	37
Abstract.....	37
3.1 Introdução	38
3.2 Material e Métodos.....	39
3.2.1 Espécies de cigarrinhas	39
3.2.2 Plantas hospedeiras.....	40
3.2.3 Isolado de <i>X. fastidiosa</i>	40
3.2.4 Avaliação da capacidade de colonização de <i>X. fastidiosa</i> em plantas hospedeiras das cigarrinhas.....	40
3.2.4.1 Inoculação mecânica.....	41
3.2.4.2 Detecção bacteriana nas plantas	42
3.2.5 Verificação da transmissão de <i>X. fastidiosa</i> por cigarrinhas em ameixeira	43
3.2.5.1 Criação de cigarrinhas sadias	43
3.2.5.2 Obtenção de plantas-fonte e plantas-teste.....	43
3.2.5.3 Testes de transmissão	44

3.3 Resultados e Discussão	45
3.3.1 Identificação de espécies não hospedeiras de <i>X. fastidiosa</i> para manutenção de colônias sadias de cigarrinhas	45
3.3.2 Mortalidade de cigarrinhas durante o período de acesso à aquisição (PAA) e período de acesso a inoculação (PAI) em ameixeira	47
3.3.3 Verificação da transmissão de <i>X. fastidiosa</i> por cigarrinhas em ameixeira	48
3.4 Conclusões	52
Referências.....	52
4 IDENTIFICAÇÃO DE PLANTAS HOSPEDEIRAS DE <i>X. fastidiosa</i> PRESENTES NA VEGETAÇÃO DE COBERTURA DE POMARES DE AMEIXEIRA	55
Resumo	55
Abstract.....	55
4.1 Introdução.....	56
4.2 Material e Métodos	58
4.2.1 Avaliação de infecção natural de <i>X. fastidiosa</i> em plantas da vegetação espontânea de pomares de ameixeira.....	59
4.2.2 Avaliação da capacidade de colonização de espécies vegetais por estirpes de <i>X. fastidiosa</i> de ameixeira	60
4.3 Resultados e Discussão	61
4.3.1 Detecção de <i>X. fastidiosa</i> em plantas coletadas na entrelinha de pomares de ameixeira	61
4.3.2 Capacidade de colonização de plantas por estirpes de <i>X. fastidiosa</i> de ameixeira	66
4.4 Conclusão.....	69
Referências.....	69
5 ASPECTOS BIOLÓGICOS DAS ESTIRPES DE AMEIXEIRA, CITROS E CAFEEIRO DE <i>Xylella fastidiosa</i> EM PLANTAS HOSPEDEIRAS	73
Resumo	73
Abstract.....	73
5.1 Introdução.....	74
5.2 Material e Métodos	75
5.2.1 Plantas e isolados de <i>X. fastidiosa</i> utilizados	75

5.2.2 Inoculação bacteriana	76
5.2.3 Testes e avaliações de isolados de <i>X. fastidiosa</i>	77
5.2.3.1 Inibição de crescimento de <i>X. fastidiosa</i> por macerados vegetais em isolamento primário	77
5.2.3.2 Infecção e colonização de <i>X. fastidiosa</i> em diferentes hospedeiros após inoculação	79
5.3 Resultados e Discussão	80
5.3.1 Inibição de crescimento de <i>X. fastidiosa</i> por macerados vegetais	80
5.3.2 Avaliação da infecção e colonização das estirpes de ameixeira, citros e cafeeiro de <i>X. fastidiosa</i> em inoculações cruzadas	81
5.4 Conclusão	87
Referências	88
6 CAPACIDADE DE INFECÇÃO E COLONIZAÇÃO DE <i>Xylella fastidiosa</i> EM DIFERENTES CULTIVARES DE AMEIXEIRA	91
Resumo	91
Abstract	91
6.1 Introdução	92
6.2 Material e Métodos	95
6.3 Resultados e Discussão	97
6.4 Conclusão	102
Referências	102

RESUMO

***Xylella fastidiosa* de ameixeira: transmissão por cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae) e colonização de plantas hospedeiras**

A Escaldadura das Folhas da Ameixeira (EFA) é a principal doença da cultura no Brasil, sendo causada pela bactéria *Xylella fastidiosa* e transmitida entre plantas pela ação de insetos vetores, mas há carência de informações sobre a identidade dos vetores e plantas hospedeiras para estirpes de *X. fastidiosa* causando EFA. Objetivando subsidiar uma proposta de manejo da EFA, foram realizados estudos sobre a transmissão de *X. fastidiosa* por vetores em ameixeira, identificação de plantas hospedeiras da bactéria em vegetação de cobertura dos pomares que possam servir como fontes de inóculo, capacidade de colonização de estirpes de ameixeira, cafeeiro e citros em inoculações cruzadas e validação da técnica de inoculação mecânica como método de avaliação de resistência de cultivares a *X. fastidiosa* em programas de melhoramento de ameixeira. Inicialmente, por meio de testes de colonização por *X. fastidiosa* foram identificadas *Ocimum basilicum*, *Vernonia condensata* e *Pentas lanceolata* como plantas não hospedeiras da bactéria, permitindo a criação de cigarrinhas sadias que foram utilizadas nos ensaios de transmissão. As cigarrinhas *Macugonalia cavifrons*, *M. leucomelas* e *Sibovia sagata* (Hemiptera: Cicadellidae: Cicadellinae) foram identificadas como vetoras de *X. fastidiosa* em ameixeira com eficiência de transmissão por indivíduo variando de 12 a 21%. Para identificação de hospedeiros alternativos do patógeno, avaliaram-se 12 espécies herbáceas (folhas e raízes) predominantes na vegetação de cobertura de pomares de ameixeira com elevada incidência de EFA, sendo dois no município de Videira, SC e três no município de Jarinú, SP. Amostras de nove delas (*Bidens pilosa*, *Lepidium ruderale*, *Lolium multiflorum*, *Plantago major*, *Parthenium hysterophorus*, *Raphanus sativus*, *Rumex* sp., *Solanum americanum* e *Vernonia* sp. foram positivas para *X. fastidiosa* em folhas e/ou raízes, pelo teste de reação de polimerase em cadeia (PCR), Testes de inoculação mecânica com um isolado de *X. fastidiosa* de ameixeira comprovaram a capacidade dessa estirpe bacteriana em colonizar plantas de *B. pilosa*, *L. ruderale*, *R. sativus* e *S. americanum*. Estudos de inoculação cruzada demonstraram que isolados de *X. fastidiosa* de citros são capazes de colonizar cafeeiro, embora em menor proporção que isolados de cafeeiro. Um isolado de ameixeira foi capaz de colonizar citros e cafeeiro, sendo que em citros a proporção de plantas infectadas foi maior. Isolados de *X. fastidiosa* de citros e cafeeiro não colonizam plantas de ameixeira, sendo estas colonizadas apenas pelos isolados homólogos. Estudos de inoculação mecânica de dois isolados de *X. fastidiosa* de ameixeira em diferentes cultivares dessa planta hospedeira, expressaram resultados corroborativos com a pré-caracterização da resistência das cultivares, validando a técnica para uso em programas de melhoramento, com melhor precisão nos resultados e ganho de tempo na avaliação de resistência à EFA.

Palavras-chave: Escaldadura das folhas da ameixeira; Bactéria fitopatogênica; Transmissão; Cigarrinhas vetoras; Plantas hospedeiras; Estirpes

ABSTRACT

***Xylella fastidiosa* in plum: transmission by sharpshooters (Hemiptera: Cicadellidae) and colonization in host plants**

The Plum Leaf Scald (PLS) is the main disease of plum crop in Brazil being caused by the bacterium *X. fastidiosa*, which is transmitted among plants by insect vectors. However, additional information is needed about the identity of vectors and host plants of *X. fastidiosa* isolates that cause PLS. In order to subsidize PLS management proposal, studies on *X. fastidiosa* vector transmission in plum, identification of host plants from orchard vegetation cover that can be source of inoculum, bacterial colonization of strains isolated from plum, coffee and citrus in cross inoculations, and validation of mechanical inoculation technique as method for assessing resistance of plum varieties against *X. fastidiosa* in breeding programs, were carried out. Firstly, studies of colonization by *X. fastidiosa* revealed that three plants are non-hosts: *Ocimum basilicum*, *Vernonia condensata* and *Pentas lanceolata*, allowing the maintenance of healthy leafhoppers colonies. The sharpshooters *Macugonalia cavifrons*, *M. leucomelas* and *Sibovia sagata* were confirmed as vectors of *X. fastidiosa* in plum with transmission efficiency per individual ranging from 12 to 21%. In order to identify alternative hosts of the bacterium in plum orchards, 12 plant species (leaves and roots), which are predominant in the vegetation from orchards where PLS incidence is high, two of them being located at Videira - SC and three at Jarinu - SP, were chosen to be tested. Samples of leaves and/or roots from nine plant species (*Bidens pilosa*, *Lepidium ruderale*, *Lolium multiflorum*, *Plantago major*, *Parthenium hysterophorus*, *Raphanus sativus*, *Rumex* sp., *Solanum americanum* and *Vernonia* sp.) were positive for *X. fastidiosa* by Polymerase Chain Reaction (PCR). Mechanical inoculation tests using a plum isolate of *X. fastidiosa* showed the capacity of this strain in colonizing the plants *B. pilosa*, *L. ruderale*, *R. sativus* and *S. americanum*. Studies on cross inoculation demonstrated that citrus *X. fastidiosa* isolates are able to colonize coffee plants, although in lower intensity than strains isolated from coffee. A plum isolate was able to colonize citrus and coffee plants, but the proportion of infected plants was higher in citrus. On the other hand, isolates of *X. fastidiosa* from citrus and coffee do not colonize plum plants and these were only colonized by homologous isolates. Studies on mechanical inoculation of two plum strains of *X. fastidiosa* in different plant cultivars revealed a pre-characterization on the resistance of these cultivars, validating the technique for use in breeding programs with a better precision in results as well as saving time on the assessment of resistance against PLS.

Keywords: Plum leaf scald; Phytopathogenic bacterium; Transmission; Sharpshooter vectors; Host plants; Strains

1 INTRODUÇÃO

A produção de ameixas no Brasil, dentro do setor da fruticultura, apresenta-se inserida no contexto da produção primária como uma atividade de destaque quanto à rentabilidade e geração de empregos no meio rural. Embora o seu cultivo inicialmente tenha se dado em regiões de clima temperado, hoje a cultura se encontra difundida em vários estados do país, exercendo papel fundamental na viabilização da agricultura familiar nestas regiões (CASTRO; NAKASU; PEREIRA, 2008). Além disso, o mercado interno apresenta boas condições para a expansão da cultura, visto que a produção nacional supre apenas 50% do volume anual consumido no país, e segundo o Anuário Brasileiro de Fruticultura (KIST et al., 2012), as importações da fruta têm aumentado (FACHINELLO et al., 2011).

Devido a estes fatores, o apoio a esta atividade têm sido incorporado nas estratégias políticas de desenvolvimento regional, de modo a fortalecer e viabilizar as regiões produtoras. No estado de São Paulo, que se destaca pela produção da fruta, estas ações têm sido coordenadas principalmente por Instituições Técnicas e Científicas como IAC e CATI, em parceria com universidades e associações de produtores. No entanto, a ocorrência generalizada da Escaldadura das Folhas da Ameixeira (EFA), têm se apresentado como principal entrave para o desenvolvimento da cultura, limitando e inviabilizando o cultivo em muitas áreas em todo país (HICKEL; ANDRADE; DUCROQUET, 2001; CASTRO; NAKASU; PEREIRA, 2008).

A doença é causada pela bactéria *Xylella fastidiosa*, que coloniza os vasos do xilema (RAJU et al., 1982). Como resultado da interação entre a bactéria e a planta (ataque-defesa), o fluxo dos vasos colonizados é obstruído diminuindo a disponibilidade de água e nutrientes para a parte aérea; e o padrão hormonal é alterado, tornando a planta debilitada. Em casos severos ocorre a morte da planta (HICKEL; ANDRADE; DUCROQUET, 2001).

Registrada inicialmente em 1978 no estado do Rio Grande do Sul (FRENCH; KITAJIMA, 1978), atualmente a doença encontra-se disseminada em todos os pólos produtores da fruta do país, causando perdas na produção e redução da vida útil dos pomares de aproximadamente 60%, ou até mesmo a dizimação dos pomares, como ocorreu nos últimos três anos no município de Jarinú – SP.

Nos viveiros, a transmissão de *X. fastidiosa* ocorre por meio da propagação de material vegetativo contaminado e em campo, por insetos vetores (cigarrinhas). Diante disso as principais medidas utilizadas no campo para o manejo da doença têm sido a utilização de material propagativo sadio indexado, incremento de fertilizantes de forma a aumentar o vigor da planta e aplicação de inseticidas para o controle de cigarrinhas. Para estas aplicações são utilizados principalmente produtos de contato, mesmo sem registro para a cultura, baseando-se em calendário, pois a despeito da importância da EFA para a cultura, até o momento não foram realizados trabalhos de transmissão em ameixeira no Brasil, e tais informações são necessárias para identificar os vetores envolvidos na disseminação dessa doença e, juntamente com as informações existentes sobre a flutuação populacional desses insetos (MULLER, 2008), definir períodos adequados para o seu controle nos pomares de ameixa.

As aplicações sistemáticas de inseticidas têm contribuído para o desequilíbrio biológico nos pomares e aumento do custo de produção. Além disso, considerando que a quase totalidade das ameixas produzidas são comercializadas para consumo *in natura*, há riscos de resíduos de agrotóxicos nos frutos que chegam ao consumidor. Outros aspectos a serem considerados são os danos ao meio ambiente, tais como possíveis contaminações do solo e de lençóis freáticos, mortalidade de inimigos naturais e seleção de populações de pragas resistentes. Por final, este sistema de controle da doença coloca em risco a vida do produtor, aumentando sua exposição aos agrotóxicos, devido às intensas aplicações e às práticas culturais realizadas em plantas freqüentemente pulverizadas.

Diante disso, é necessária a obtenção de informações epidemiológicas sobre a EFA que permitam a definição de estratégias mais eficientes e seguras para o manejo racional da doença nos pomares. Embora algumas cultivares melhoradas apresentem certa resistência à doença (DALBÓ et al., 2002), as exigências climáticas e a preferência do mercado consumidor restringem seu uso (CASTRO; CAMPOS, 2003; CASTRO; NAKASU; PEREIRA, 2008). Além disso, o desenvolvimento de novas cultivares com resistência a doença esbarra na falta de informações genéticas sobre a bactéria e de técnicas de experimentação, especialmente de inoculação e quantificação do patógeno nas plantas, que acelerem o processo.

Informações sobre o desenvolvimento do patógeno em diferentes cultivares de ameixeira, e possível colonização e patogenicidade em outras culturas ou plantas invasoras, podem também contribuir significativamente para o manejo deste patossistema, orientando o planejamento de novos plantios, visto que, em regiões produtoras de ameixas também são cultivadas outras frutíferas potenciais hospedeiras da bactéria, tais como citros, pessegueiro e videira, além de várias espécies vegetais na entrelinha dos pomares, que podem servir como fontes de inóculo. Finalmente, a identificação das espécies vetoras do patógeno em ameixeira viabilizaria a aplicação de medidas de controle de forma mais eficiente e segura.

Assim, a presente pesquisa buscou obter informações biológicas sobre a *X. fastidiosa* de ameixeira, tais como sua transmissão por cigarrinhas vetoras e capacidade de colonização de algumas plantas cultivadas e não cultivadas, comumente associadas ao cultivo de ameixa no estados do Rio Grande do Sul e São Paulo, para melhor compreender a epidemiologia da EFA e fundamentar um programa de manejo mais eficaz para essa doença. Avaliou-se, também, a aplicabilidade da técnica de inoculação mecânica de *X. fastidiosa* como método de avaliação de resistência de cultivares ao patógeno, em programas de melhoramento de ameixeira.

Referências

CASTRO, L.A.S.; CAMPOS, A.D. Introdução. In: CASTRO, L.A.S. (Coord.). **Ameixa: produção**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. p. 9-12. (Embrapa. Série Frutas do Brasil; 43).

CASTRO, L.A.S.; NAKASU, B.H.; PEREIRA, J.F.M. **Ameixeira: histórico e perspectivas do cultivo**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2008. 10 p. (Circular Técnica, 70).

DALBÓ, M.A.; DUCROQUET, J.P.; VIEIRA, E.A.; NODARI, R. Avaliação da resistência à escaldadura das folhas (*Xylella fastidiosa*) da ameixeira em progênies resultantes de cruzamentos entre cultivares resistentes e suscetíveis. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 17., 2002, Pelotas. **Resumo...** Belém: SBF, 2002. p. 511.

DUCROQUET, J-P.H.J; ANDRADE, E.R.; HICKEL, E.R. **A escaldadura das folhas da ameixeira em Santa Catarina**. Florianópolis: EPAGRI, 2001. 55 p. (EPAGRI. Boletim Técnico, 118).

FRENCH, W.J.; KITAJIMA, E.W. Occurrence of plum leaf scald in Brazil and Paraguay. **Plant Disease**, Washington, v. 62, p. 1035-1038, 1978.

KIST, B.B.; VENCATO; A.C.; SANTOS; C.; CARVALHO, C.; REETZ, E.R.; POLL, H.; BELING, B.R. **Anuário brasileiro da fruticultura 2012**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2012. 128 p.

MÜLLER, C. **Análise faunística e flutuação populacional de cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae) potenciais vetoras de *Xylella fastidiosa* em pomares de ameixeira nos estados do Rio Grande do Sul e São Paulo**. 2008. 67 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2008.

RAJU, B.C.; WELLS, J.M.; NYLAND, G.; BRLANSKY, R.H.; LOWE, S.K. Plum leaf scald isolation culture and pathogenicity of the causal agent. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 72, p. 1460-1466, 1982.

2 PATOSSISTEMA: ESCALDADURA DAS FOLHAS DA AMEIXEIRA

2.1 A cultura da ameixeira

A ameixeira é uma das frutíferas de cultivo mais antigo no Brasil, não havendo informações precisas sobre quando foi introduzida (CASTRO; CAMPOS, 2003; FACHINELLO et al., 2011). Pertence à família das Rosáceas (subfamília Prunoideae) e ao gênero *Prunus* (L.) (SIMÃO, 1971), sendo *Prunus salicina* Lindl. e *Prunus domestica* L. as espécies de maior importância econômica (GRELLMANN; SIMONETTO, 1996; DALBÓ et al., 2010).

A maioria das cultivares cultivadas no país é oriunda de *P. salicina* destacando-se a Amarelinha, América, Irati, Gulf Blaze, Letícia, Reubennel e Picktone (MARODIN; ZANINI, 2005).

A produção mundial de ameixa é de aproximadamente seis milhões de toneladas, destinadas ao consumo *in natura*, passa e à elaboração de destilados (MADAIL, 2003; MADAIL; MARTINS, 2003; FACHINELLO et al., 2011). O mercado brasileiro é de cerca de 65 mil toneladas anuais, das quais aproximadamente 50% são importadas da Argentina (47,3 %), Espanha (25 %), Chile (21,3 %), USA (3,3 %), Itália (2,2 %) e Portugal (0,9 %) (FAO, 2011). No entanto, estima-se que estes valores sejam maiores, pois uma parcela significativa da produção é comercializada diretamente pelos produtores, sem haver o registro pela Companhia de Entrepostos e Armazéns Gerais de São Paulo - CEAGESP.

Além da relevância para a economia do país, a cultura proporciona uma elevada rentabilidade por área, a partir do quinto ano a receita é de aproximadamente 5.200 dólares por hectare (CASTRO; CAMPOS, 2003; BUAINAIN; BATALHA, 2007), demandando intensa mão-de-obra para o seu cultivo. Estas características tornam a cultura uma importante alternativa para viabilizar a agricultura familiar e manter empregos no campo (DUCROQUET; ANDRADE; HICKEL, 2001).

Os principais pólos produtores de ameixa no Brasil são Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo, Paraná e Minas Gerais, regiões com características de clima bem definidas (CASTRO; CAMPOS, 2003; CASTRO; NAKASU; PEREIRA, 2008).

2.2 A Escaldadura das Folhas da Ameixeira - EFA

Embora o Brasil apresente condições edafoclimáticas adequadas para o cultivo da ameixeira, dificuldades tecnológicas têm reduzido a expansão da cultura. Entre estas, destaca-se a ocorrência de forma generalizada da doença conhecida como Escaldadura das Folhas da Ameixeira (EFA), causada pela bactéria *Xylella fastidiosa* (WELLS et al., 1987), que limita e até mesmo inviabiliza o cultivo da fruta em locais de alta incidência (CASTRO; CAMPOS, 2003; CASTRO; NAKASU; PEREIRA, 2008).

A EFA foi detectada inicialmente na Região do Delta do Rio Paraná, na Argentina em 1935 (FERNANDEZ-VALIELA; BAKARCIC, 1954) e posteriormente constatada nos Estados Unidos (“Plum leaf scald”, PLS), Brasil e Paraguai (FRENCH; LATHAN; STASSI, 1977; KITAJIMA et al., 1981). No Brasil, a doença foi detectada pela primeira vez em ameixeiras da coleção do Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado da EMBRAPA em Pelotas-RS (KITAJIMA et al., 1981). Atualmente, a EFA é uma doença endêmica na maioria das regiões produtoras do país (DUCROQUET; ANDRADE; HICKEL, 2001; CASTRO; NAKASU; PEREIRA, 2008) e tem sido o principal fator responsável pela redução na área cultivada desde a década de 70 (MOHAN; LEITE; TSUNETI; HAUAGGE, 1980; KITAJIMA et al., 1981; FRENCH; KITAJIMA, 1982; ANDRADE, 1995; LEITE; LEITE JUNIOR; CERESINI, 1997; HICKEL et al., 2001; CASTRO, 2008).

Até o momento, não existe uma proposta de manejo da EFA fundamentada em trabalhos científicos que seja eficiente para o controle da doença. No entanto, algumas práticas como a utilização de mudas certificadas e a eliminação de plantas sintomáticas são preconizadas (WELLS et al., 1981; CASTRO, 2008).

Embora algumas cultivares apresentem certa resistência à doença (DALBÓ et al., 2002; DALBÓ et al., 2010), as exigências climáticas e a preferência do mercado consumidor restringem seu uso (CASTRO et al., 2008).

2.3 Epidemiologia da EFA

Os sintomas da doença somente aparecem após vários meses de incubação da bactéria, quando a mesma aumenta sua população e se distribui sistemicamente na planta (RAJU et al., 1982; MCGAHA et al., 2007). Quando as

mudas vêm contaminadas do viveiro, cultivares mais suscetíveis podem apresentar sintomas já no segundo ano após o plantio (DUCROQUET; ANDRADE; HICKEL, 2001; CASTRO; CAMPOS, 2003; CASTRO, 2008).

Os primeiros sintomas se manifestam nas folhas, geralmente final da colheita até a queda das mesmas, e, normalmente, em plantas com três anos de idade ou mais. Caracteriza-se como uma clorose na região apical das folhas prolongando-se pelas bordas das mesmas. As áreas foliares afetadas tornam-se necróticas e os sintomas avançam para o interior do limbo foliar, ocorrendo a formação de uma estria amarela característica na faixa de transição com a parte sadia do limbo. As áreas necróticas assumem uma cor acinzentada ou marrom-escuro conferindo aos ramos atingidos o aspecto de escaldadura. Com o passar do tempo, as folhas sintomáticas secam totalmente e caem (RAJU et al., 1982; DUCROQUET; ANDRADE; HICKEL, 2001; CASTRO; CAMPOS, 2003; CASTRO, 2008).

Os sintomas aparecem aleatoriamente em qualquer ramo com mais de um ano. Conforme a doença evolui, o ramo onde se observa folhas com necrose começa a secar de cima para baixo, ocorrendo a morte do mesmo com o passar do tempo. A doença se dissemina no hospedeiro, causando declínio no vigor e na produção, culminando com o secamento de toda a planta. Quando a infecção ocorre por insetos vetores, os focos da doença no pomar aparecem em plantas ao acaso e algumas podem permanecer sadias entre outras já doentes (MOHAN et al., 1980; WELLS et al., 1981; DUCROQUET; ANDRADE; HICKEL, 2001).

O tempo de desenvolvimento da doença na planta pode ser variável sendo resultado de uma relação entre a estirpe e a planta hospedeira (PURCELL; HOPKINS, 1996; PRADO et al., 2008). Além disso, a manifestação dos sintomas está associada não só com a quantidade de vasos infectados, mas também com a concentração de células bacterianas nos vasos (NEWMAN et al., 2003).

2.4 A bactéria *Xylella fastidiosa* Wells et al., 1987 - agente causal

Os trabalhos com doenças causadas pela bactéria *X. fastidiosa* tiveram seu início nos Estados Unidos, devido à presença da doença conhecida como “Mal de Pierce” na videira. No entanto, até a década de 70, o agente causal era considerado equivocadamente como sendo uma riquetsia (RAJU; WELLS, 1986).

Em 1987, Wells e colaboradores identificaram este microorganismo como uma bactéria gram-negativa e propuseram este nome (WELLS et al., 1987). A espécie inclui várias estirpes, e caracteriza-se por um crescimento lento (fastidioso) em meios de cultura (WELLS et al., 1987). A bactéria mede 1 a 3,5 µm x 0,3 a 0,5 µm, possui formato de bastonetes, crescimento ótimo em temperaturas entre 26 - 28° e pH entre 6,5 - 6,9. Sua ocorrência é restrita ao xilema das plantas onde se multiplica (WELLS et al., 1987; DE NEGRÍ; GARCIA JUNIOR, 1993; HARTUNG; BERETTA; BRLANSKY, 1994; NEWMAN et al., 2003).

A presença da bactéria em sistemas produtivos tem causado perdas econômicas significativas em culturas como a videira, pessegueiro, ameixeira, alfafa, amendoeira, cafeeiro, pereira, citros, mirtilo e diversas plantas ornamentais (BRLANSKY et al., 1983; RAJU; WELLS, 1986; HILL; PURCELL, 1997; COLETTA-FILHO; MACHADO, 2001; BLUA et al., 2001).

No Brasil, além da EFA, *X. fastidiosa* também causa outras duas doenças: “Clorose Variegada dos Citros” (CVC) (ROSSETI et al., 1990), considerada uma das mais graves doenças da citricultura (ROSSETTI et al., 1990) e a “Atrofia dos Ramos do Cafeeiro” ou “Requeima do Cafeeiro” (PARADELA-FILHO; SUGIMORI; RIBEIRO, 1995) cujo impacto ainda não é bem conhecido.

A espécie *X. fastidiosa* possui uma ampla gama de hospedeiros que inclui espécies de mais de 30 famílias entre mono e dicotiledôneas (HOPKINS, 1989; PURCELL; HOPKINS, 1996; ALMEIDA; PURCELL, 2003a; PURCELL, 2011). Muitas dessas plantas não apresentam sintomas quando infectadas, mas podem servir como hospedeiros alternativos para a bactéria, constituindo-se em fontes de inóculo para infecção de outras plantas (HOPKINS, 1989; LEITE; LEITE JUNIOR; CERESINI, 1997; LOPES et al., 2003). Em pomares de ameixeira, plantas constituintes da vegetação rasteira como azevém (*Lolium multiflorum*), macela (*Facelis retusa*), capim-estrada (*Paspalum urvillei*), entre outras, podem exercer esta função (LEITE; LEITE JUNIOR; CERESINI, 1997; LOPES; DAUGHERTY; ALMEIDA, 2010).

De acordo com trabalhos de sorologia e tipagem genética, esta bactéria teve suas estirpes divididas em quatro subespécies: *X. fastidiosa* subsp. *piercei* (que inclui estirpes de videira), *X. fastidiosa* subsp. *sandyi* (“oleander” ou espiiradeira), *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* (vários hospedeiros) e *X. fastidiosa* subsp. *pauca* (que inclui ameixa, café e citros) (SCHAAD et al., 2004; SCHUENZEL et al.,

2005). No entanto, trabalhos mais recentes de variabilidade genética evidenciam separações entre isolados de hospedeiros anteriormente considerados do mesmo grupo, o que pode ser resultado da evolução de estirpes em determinadas regiões, principalmente devido à recombinação gênica (CHEN et al., 2002; WENDLAND et al., 2003; HUANG; SHERALD, 2004; SCHUENZEL et al., 2005; KISHI; WICKERT; LEMOS, 2008; ALMEIDA et al., 2008; COLETTA-FILHO; BITTLESTON; ALMEIDA, 2011; KUNG; ALMEIDA, 2011; YUAN et al., 2010).

As variações genéticas também podem ser identificadas dentro da estirpe que coloniza determinado hospedeiro, como é o caso da estirpe que coloniza café no Brasil que apresenta cinco haplótipos diferentes (ALMEIDA et al., 2008).

Mais recentemente trabalhos têm procurado caracterizar biologicamente diferentes isolados já caracterizados geneticamente (PRADO et al., 2008; LOPES; DAUGHERTY; ALMEIDA, 2010), na tentativa de elucidar os principais mecanismos de ação da bactéria. Daugherty et al. (2010) demonstraram experimentalmente que em videira o stresse hídrico provocado pela oclusão dos vasos colonizados pela bactéria provoca sintomas severos, explicando este como um dos principais mecanismos responsáveis pela manifestação e severidade de sintomas, o que não ocorre em castanha, onde foi observada baixa correlação entre sintomas e stresse hídrico. No entanto, para outras culturas estes aspectos ainda são desconhecidos.

O desenvolvimento da doença na planta depende principalmente da habilidade da bactéria em deslocar-se do ponto de inoculação e de desenvolver uma população sistêmica na planta infectada (CHATTERJEE; ALMEIDA; LINDOW, 2008). Depois de inoculadas, as células bacterianas prendem-se a parede dos vasos e multiplicam-se, formando um biofilme de colônias aderidas polarmente, podendo ocluir completamente os vasos do xilema, bloqueando o transporte de água (TYSON et al., 1985; NEWMANN et al., 2003; 2004). Este deslocamento sistêmico do patógeno pode ser limitado pelas membranas pontuadas que separam os vasos do xilema dos demais, e talvez pela produção de tiloses e gomas ricas em polissacarídeos pela própria planta, bloqueando os locais dos vasos onde se encontram as células infecciosas (CHATTERJEE; ALMEIDA; LINDOW, 2008; ALMEIDA et al., 2012). Embora as bactérias não se localizem em células ou tecidos específicos, elas tendem a se acumular em algumas partes da planta, que pode variar com o hospedeiro e está diretamente

relacionado ao tipo de sintoma expresso (PURCELL; HOPKINS, 1996; NEWMANN et al., 2003).

Porém, a colonização da planta pela bactéria depende da interação entre a estirpe infectante e a fisiologia do hospedeiro. Em ensaios com inoculação mecânica estirpes de citros foram hábeis em colonizar plantas de café, enquanto o inverso não ocorreu (PRADO et al., 2008; ALMEIDA et al., 2008). Lopes et al. (2010) em inoculações de isolados de alfafa e videira, demonstraram que ocorre maior virulência de estirpes da própria cultura quando comparado com inoculações cruzadas. Além disso, os autores verificaram correlação positiva entre concentração de inóculo inicial e persistência na planta. Estes dados demonstram a especificidade entre estirpes e hospedeiros, que em hipótese pode ser resultante do processo de coevolução entre estes organismos.

Killing e Almeida (2009b) apresentaram em hipótese o modelo de como ocorre o processo de adesão e posteriormente formação de biofilme, sendo essa formação vital para o sucesso na colonização. Os mesmo autores também identificaram alguns carboidratos específicos para que ocorra a adesão da bactéria no inseto (KILLING; ALMEIDA, 2009a). A maioria dos genes expressos na condição de biofilme podem ser associados à produção e detoxificação de toxinas e adaptação para crescimento em condições atípicas; e está indiretamente relacionada com a capacidade de virulência do patógeno (SOUZA et al., 2004; CHATTERJEE; ALMEIDA; LINDOW; 2008).

2.5 Vetores da bactéria *X. fastidiosa*

A transmissão de *X. fastidiosa* pode ocorrer por meio de mudas e borbulhas contaminadas (LIMA et al., 1996; SEMPIONATO; STUCHI; DONADIO, 1997); enxertia natural de raízes (HE et al., 2000); enxertia de pecíolos (SALIBE; 2001); garfagem lateral de ramos (SALIBE; 2001), inoculação com agulha (ALMEIDA et al., 2001), além de insetos vetores. Porém, no campo, em pomares implantados ela ocorre basicamente pela ação de insetos vetores.

Os insetos relacionados como vetores de *X. fastidiosa* nas diversas culturas hospedeiras são cigarrinhas pertencentes às famílias Cicadellidae (subfamília Cicadellinae), Cercopidae e Cicadidae (LOPES, 1996; ROBERTO et al., 1996; HICKEL et al., 2001; PAIÃO et al., 2002). A subfamília Cicadellinae, que

compreende as tribos Proconiini e Cicadellini, engloba o maior número de espécies comprovadas vetoras do patógeno.

As espécies pertencentes a esta subfamília são numerosas e diversificadas, com comprimento bastante variado e cores vistosas, mas com comportamento alimentar semelhante, alimentando-se apenas em vasos do xilema (YOUNG, 1968; MEJDALANI, 1998). A baixa concentração de aminoácidos na seiva do xilema é compensada por estes insetos através da ingestão de grandes quantidades de líquido, e como possuem uma câmara-filtro bastante potente, assimilam nutrientes com grande eficiência (LOPES, 1996).

Trabalhos de transmissão não foram realizados na cultura até o momento. Porém, a bactéria já foi constatada por meio de teste ELISA em *Plesiommata corniculata* Young, *Hortensia similis* (Walker), *Haldorus* sp., *Exitianus obscurinervis* (Stal), *Balclutha hebe* (Klirk) capturados em pomares de ameixa no Brasil (HICKEL et al., 2001) e em *Homalodisca coagulata* (Say), *Oncometopia orbona* (F.) e *Paralucizes irrorata* (F.) em outros países (HOPKINS, 1977; YOUNCE; CHANG 1987). No Brasil, são conhecidas 12 espécies vetoras para as culturas de citros e/ou café (LOPES, 1996; ROBERTO et al., 1996; FUNDECITRUS, 1999; KRUGNER et al., 2000; YAMAMOTO et al., 2002; 2007).

2.6 Aspectos relacionados à transmissão de *Xylella fastidiosa* por vetores

Um dos principais aspectos relacionados à transmissão é a eficiência apresentada pelo vetor em adquirir e inocular a bactéria (REDAK et al., 2004). Esta eficiência varia entre as espécies, e também para uma mesma espécie em diferentes culturas (REDAK et al., 2004; PURCELL, 1980, 1989). De forma geral, espécies com alta eficiência são consideradas chaves para a epidemiologia da doença.

Em videira, *Graphocephala atropunctata* (Signoret) pode apresentar eficiência de transmissão de até 91% (HILL; PURCELL, 1995). No Brasil os trabalhos de transmissão realizados até o momento foram conduzidos nas culturas de citrus e café. Para estas culturas as espécies vetoras de *X. fastidiosa* comprovadas até o momento apresentam eficiências de transmissão variando de 0,3 a 30% (YAMAMOTO et al., 2002; MARUCCI; CAVICHIOLI; ZUCCHI, 2002).

A eficiência de transmissão varia dependendo da espécie vetora, da planta hospedeira, da estirpe da bactéria e do clima do local, entre outros fatores (PURCELL, 1980, 1989; REDAK et al., 2004; RASHED; DAUGHERTY; ALMEIDA; 2001; DAUGHERTY et al., 2011). *Homalodisca ignorata* Germar apresenta eficiência de transmissão de 30% para *X. fastidiosa* em citrus, enquanto que em café este percentual é de 2,2%; já *Bucephalagonia xanthophis* Berg, 1879, *Dilobopterus costamimai* Young e *Oncometopia facialis* (Signoret, 1854) apresentam eficiências similares para a transmissão nas duas culturas (MARUCCI et al., 2008). A combinação vetor/hospedeiro pode ser considerada mais relevante para a eficiência de transmissão do que divisões taxonômicas de tribos (MARUCCI et al., 2005).

Além da eficiência de transmissão, aspectos ecológicos como abundância e distribuição espacial e temporal em relação à cultura suscetível e fontes de inóculo podem influenciar na importância de uma espécie como vetora (WISTROM; PURCELL, 2005; ALMEIDA et al., 2005; DAUGHERTY; BOSCO; ALMEIDA, 2009). Da mesma forma que uma espécie vetora eficiente, com altos índices de infectividade natural e pouco abundante, espécies com baixa eficiência e alta abundância devem ser consideradas relevantes.

Outro aspecto a ser considerado é o hábito do inseto na planta, sendo que, espécies arborícolas, encontradas na copa da árvore ou próximo do cultivo de interesse merecem maior atenção quando comparadas com espécies que possuem preferência por vegetação rasteira (PURCELL, 1994; LOPES, 1996, 1999; DAUGHERTY et al., 2011). *Homalodisca vitripennis*, por exemplo, devido ao seu hábito de alimentação, é capaz de inocular *X. fastidiosa* em plantas dormentes de videira e castanha, período em que não há brotações (ALMEIDA et al. 2005; ALMEIDA; PURCELL, 2003). Considerando que a remoção de partes inoculadas ocorre por ocasião da poda, e esta inoculação ocorre em partes mais lenhosas onde não se procede poda, este aspecto ressalta a importância da espécie para a epidemiologia da doença pois o patógeno é inoculado em local permanente da planta.

Segundo Almeida et al. (2001), uma alta concentração da bactéria nos vasos dos hospedeiros pode colaborar para o sucesso da transmissão, pois é provável que um maior número de células infectadas sejam adquiridas, aumentando as chances de sobrevivência e colonização no inseto. Neste caso, um maior número

de células estaria disponível para ser inoculado durante a alimentação na planta sadia. Hill e Purcell (1997) demonstraram que a taxa de aquisição de *X. fastidiosa* por cigarrinhas em videira e outras plantas hospedeiras é correlacionada positivamente com a concentração de bactéria na planta e que populações menores que 10^6 a 10^7 UFC/g de tecido de planta resultam na diminuição da eficiência.

Como a temperatura interfere no desempenho do vetor e no desenvolvimento da bactéria no hospedeiro, estudo de Feil e Purcell (2001) sugere que a eficiência de transmissão seja temperatura-dependente. Este aspecto é comprovado por Daugherty e Almeida (2009) em estudo onde os autores demonstraram o efeito positivo de temperatura elevada na eficiência de transmissão de *X. fastidiosa* por *G. atropunctata* e *H. vitripennis* em videira e também na taxa de infecção das plantas.

2.7 Mecanismos de transmissão

A maior parte das informações sobre mecanismos de transmissão de *X. fastidiosa* por seus vetores foi obtida de estudos associados a doença de Pierce na cultura da videira nos Estados Unidos. No entanto, acredita-se que o mecanismo de transmissão seja semelhante para as demais culturas (LOPES, 1999). A transmissão é caracterizada como propagativa e não circulativa (PURCELL, 1989). A aquisição de células bacterianas ocorre durante a alimentação do inseto nos vasos do xilema (MIRANDA et al., 2008). Estas células se desprendem da parede dos vasos e juntamente com o conteúdo alimentar, são succionadas pelos insetos, prendendo-se à cutícula do estomodeu (BRLANSKY et al., 1983; PURCELL; HOPKINS, 1996; LOPES, 1996, 1999; KILLING; ALMEIDA, 2009).

As bactérias ficam restritas à parte anterior do tubo digestivo das cigarrinhas (PURCELL; FINLAY, 1979). Trabalhos de microscopia eletrônica de varredura e microscopia de fluorescência utilizando isolados de *X. fastidiosa* expressando constitutivamente a “green fluorescent protein” (GFP) foram realizados, comprovando a presença das células bacterianas aderidas ao forro cuticular do

cibário e na porção anterior do esôfago de espécies de cicadelíneos (NEWMAN et al., 2003, 2004).

Como a cutícula do estomodeu possui origem ectodérmica, a mesma é trocada em cada ecdise (NIJHOUT, 1994). Por isso, as cigarrinhas infectadas pela bactéria perdem a infectividade após a troca de ínstar (PURCELL; FINLAY, 1979). Por outro lado, adultos após a aquisição da bactéria são capazes de transmiti-la durante toda a vida, pois não realizam mais a ecdise, além da população da bactéria aumentar no inseto devido à sua capacidade de multiplicação (HILL; PURCELL, 1995).

Não há um período latente mensurável entre a aquisição e a inoculação pelo vetor sendo que a inoculação pode ocorrer logo após a aquisição (PURCELL; FINLAY, 1979; MIRANDA et al., 2008).

Referências

ALMEIDA, R.P.P.; PURCELL, A.H. Biological traits of *Xylella fastidiosa* strains from grapes and almonds. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 7447–7452, 2003a.

_____. Transmission of *Xylella fastidiosa* to grapevines by *Homalodisca coagulata* (Hemiptera: Cicadellidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 96, p. 264–271, 2003b.

ALMEIDA, R.P.P.; BLUA, M.J.; LOPES, J.R.S.; PURCELL, A.H. Vector transmission of *Xylella fastidiosa*: applying fundamental knowledge to generate disease management strategies. **Annals of the Entomological Society of America**, Lanham, v. 98 p. 775-786, 2005.

ALMEIDA, R.P.P.; PEREIRA, E.F.; PURCELL; A.H.; LOPES, J.R.S. Multiplication and movement of a citrus strain of *Xylella fastidiosa* within sweet orange. **Plant Disease**, Washington, v. 85, n. 45, p. 382-382, 2001.

ALMEIDA, R.P.P.; NASCIMENTO, F.E.; CHAU, J.; PRADO, S.S.; TSAI, C.W.; LOPES, S.A.; LOPES, J.R.S. Genetic structure and biology of *Xylella fastidiosa* causing disease in citrus and coffee in Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, p. 3690-3701, 2008.

ANDRADE, E.R. **Doenças do pessegueiro e da ameixeira e seu controle no Estado de Santa Catarina**. Florianópolis: EPAGRI, 1995. 52 p. (EPAGRI. Boletim Técnico, 71).

- BLUA, M.J.; REDAK, R.A.; MORGAN, J.W.; COSTA, H.S. Seasonal flight activity of two *Homalodisca* species (Homoptera: Cicadellidae) that spread *Xylella fastidiosa* in southern California. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 94, n. 6, p. 1506-1510, 2001.
- BRLANSKY, R.H.; TIMMER, L.W.; FRENCH, W.J.; MCCOY, R.E. Colonization of the sharpshooter vectors *Oncometopia nigricans* and *Homalodisca coagulata* by xylem limited bacteria. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 73, n. 4, p. 530-535, 1983.
- BUAINAIN, A.M.; BATALHA, M.O. **Cadeia produtiva de frutas**. Brasília: IICA; MAPA; SPA, 2007. v. 7, 102 p.
- CASTRO, L.A.S. Perspectivas de cultivo da ameixeira. **Jornal da Fruta**, Lages, p. 24, 2008.
- CASTRO, L.A.S.; CAMPOS, A.D. Introdução. In: CASTRO L.A.S. (Coord.). **Ameixa: produção**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. p. 9-12. (Série Frutas do Brasil, 43).
- CASTRO, L.A.S.; NAKASU, B.H.; PEREIRA, J.F.M. **Ameixeira: histórico e perspectivas do cultivo**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2008. 10 p. (Circular Técnica, 70).
- CHATTERJEE, S.; ALMEIDA, R.P.P.; LINDOW, S.E. Living in two worlds: the plant and insect lifestyles of *Xylella fastidiosa*. **Annual Review of Phytopathology**, Washington, v. 46, p. 243-271, 2008.
- CHEN, J.; HARTUNG, J.S.; CHANG, C.J.; VIDAVER, A.K. An evolutionary perspective of Pierce's disease of grapevine, citrus variegate chlorosis, and mulberry leaf scorch disease. **Current Microbiology**, New York, v. 45, p. 423-428, 2002.
- COLETTA-FILHO, H.D.; MACHADO, M.A. Hospedeiros, transmissão e técnicas de diagnóstico da bactéria *Xylella fastidiosa*. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 22, n. 1, p. 121-132.
- COLETTA-FILHO, H.D.; BITTLESTON, S.; ALMEIDA, R.P.P. Spatial genetic structure of a vector-borne generalist pathogen. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 77, p. 2596-2601, 2011.
- DALBÓ, M.A.; DUCROQUET, J.P.; VIEIRA, E.A.; NODARI, R. Avaliação da resistência à escaldadura das folhas (*Xylella fastidiosa*) da ameixeira em progênies resultantes de cruzamentos entre cultivares resistentes e suscetíveis. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 17., 2002, Pelotas. **Resumo...** Pelotas: SBF, 2002. p. 511.
- DALBÓ, M.A.; KLABUNDE, G.H.F.; NODARI, R.O.; FERNANDES, D.; BASSO, M.F. Evolution of the response of segregating populations of plums and the association with microsatellite markers of leaf scald. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v. 10, p. 337-344, 2010.

DAUGHERTY, M.P.; BOSCO, D.; ALMEIDA, R.P.P. Temperature mediates vector transmission efficiency: inoculum supply and plant infection dynamics. **Annals of Applied Biology**, Malden, v. 155, p. 361-369, 2009.

DAUGHERTY, M.P.; LOPES, J.; ALMEIDA, R.P.P. Vector within-host feeding preference mediates transmission of a heterogeneously distributed pathogen. **Ecological Entomology**, Lanham, v. 35, p. 360-366, 2010.

DAUGHERTY, M.P.; RASHED, A.; ALMEIDA, R.P.P.; PERRING, T.M. Vector preference for hosts differing in infection status: sharpshooter movement and *Xylella fastidiosa* transmission. **Ecological Entomology**, Malden, v. 36, p. 654-662, 2011.

DE NEGRI, J.D.; GARCIA JUNIOR, A. Sugestões para o manejo de pomares com clorose variegada dos citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 14, n. 1, p. 255-268, 1993.

DUCROQUET, J-P.H.J; ANDRADE, E.R.; HICKEL, E.R. **A escaldadura das folhas da ameixeira em Santa Catarina**. Florianópolis: EPAGRI, 2001. 55 p. (EPAGRI. Boletim Técnico, 118).

FACHINELLO, J.C.; PASA, M. S.S.; SCHMTIZ, J.D.; BETEMPS, D.L. Situação e perspectivas da fruticultura de clima temperado no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. esp., E. 109-120, out. 2011.

FAO. **Production-crops**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>>. Acesso em: 10 jan. 2013.

FERNANDEZ-VALIELA, M.V.; BAKARCIC, M. Nuevas enfermedades del ciruelo en el delta del Paraná, Argentina. **Informativo Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria**, Buenos Aires, n. 84, p. 2-6, 1954.

FRENCH, W.J.; KITAJIMA, E.W. Occurrence of plum leaf scald in Brazil and Paraguay. **Plant Disease Reporter**, Washington, v. 62, p. 1035-1038, 1978.

FRENCH, W.J.; LATHAN, A.J.; STASSI, D.L. Phony peach bacterium associated with leaf scald of plum tree. **Proceedings of the American Phytopathology Society**, Saint Paul, v. 4, p. 223, 1977.

FUNDECITRUS. Descobertos mais seis vetores de CVC. **Revista Fundecitrus**, Araraquara, v. 14, p. 8-9, 1999.

GRELLMANN, E.T.; SIMONETTO, P.R. **A cultura da ameixeira**. Porto Alegre: FEPAGRO, 1996. 32 p. (Boletim FEPAGRO, 4).

HARTUNG, J.S.; BERETTA, M.J.G.; BRLANSKY, R.H. Citrus variegated chlorosis bacterium: axenic culture, pathogenicity, and serological relationships with other strains of *Xylella fastidiosa*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 84, n. 6, p. 591-597, 1994.

HE, C.X.; LI, W.B.; AYRES, A.J.; HARTUNG, J.S.; MIRANDA, V.S.; TEIXEIRA, D.C. Distribution of *Xylella fastidiosa* in citrus rootstocks and transmission of citrus variegated chlorosis between sweet orange plants through natural root grafts. **Plant Disease**, Washington, v. 84, n. 6, p. 622-626, 2000.

HICKEL, E.R.; DUCROQUET, J.P.H.J.; LEITE Jr, R.P.; LEITE, R.M.V.B.C. Fauna de Homoptera: Auchenorrhyncha em pomares de ameixeira de Santa Catarina. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, p. 725-729, 2001.

HILL, B.L.; PURCELL, A.H. *Xylella fastidiosa*: xylem-limited bacterial pathogen of plants. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 27, p. 271-290, 1989.

_____. Acquisition and retention of *Xylella fastidiosa* by an efficient vector, *Graphocephala atropunctata*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 85, n. 2, p. 209-212, 1995.

_____. Population of *Xylella fastidiosa* in plants required for transmission by efficient vector. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 87, n. 12, p. 1197-1201, 1997.

HOPKINS, D.L. Diseases caused by leafhopper-borne rickettsia-like bacteria. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v.17, p.277-294, 1977.

HOPKINS, D.L. Physiological and pathological characteristics of virulent and avirulent strains of the bacterium that causes Pierce's disease of grapevine. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 75, p. 713-717, 1985.

_____. *Xylella fastidiosa*: xylem-limited bacterial pathogen of plants. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.27, p.271-290, 1989.

HUANG, Q.; SHERALD, J.L. Isolation and phylogenetic analysis of *Xylella fastidiosa* from its invasive alternative host, porcelain berry. **Current Microbiology**, New York, v. 48, p. 73-76, 2004.

KILLINY, N.; ALMEIDA, R.P.P. Host structural carbohydrate induces vector transmission of a bacterial plant pathogen. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Saint Paul, v. 106, p. 22416-22420, 2009a.

_____. *Xylella fastidiosa* afimbrial adhesins mediate cell transmission to plants by leafhopper vectors. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, p. 521-528, 2009b.

KISHI, L.T.; WICKERT, E.; LEMOS, E.G.M. Evaluation of *Xylella fastidiosa* genetic diversity by fAFLP markers. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 1, p. 202-208, 2008.

KITAJIMA, E.W.; MOHAN, S.K.; TSUNETTA, M.; BLEICHER, J.; FRENCH, W.J.; LEITE JÚNIOR, R.P. Ocorrência da escaldadura das folhas da ameixa nos Estados do Paraná e de Santa Catarina. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 6, n. 2, p. 285-292, 1981.

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

KUNG, S.H. AND ALMEIDA, R.P.P. Natural competence and recombination in the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 77, p. 5278-5284, 2011.

LEITE, R.M.V.B.C.; LEITE JUNIOR, R.P.; CERESINI, P.C. Hospedeiros alternativos de *Xylella fastidiosa* entre plantas invasoras de pomares de ameixeira com escaldadura da folha. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 1, p. 54-57, 1997.

LIMA, J.E.O.; MIRANDA, V.S.; COUTINHO, A.J.; ROBERTO, S.R.; CARLOS, E.F. Distribuição de *Xylella fastidiosa* no cafeeiro, nas regiões cafeeiras e o seu isolamento *in vitro*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 3, p. 392-393, 1996.

LOPES, J.R.S. Estudos com vetores de *Xylella fastidiosa* e implicações no manejo da Clorose Variegada dos Citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 20, n. 2, p. 329-344, 1999.

LOPES, J.R.S.; DAUGHERTY, M.P.; ALMEIDA, R.P.P. Context-dependent transmission of a generalist plant pathogen: host species and pathogen strain mediate insect vector competence. **Entomology Experimentalis at Applicata**, Washington, v. 131, p. 216–224, 2009.

_____. Strain origin drives virulence and persistence of *Xylella fastidiosa* in alfalfa. **Plant Pathology**, Malden, v. 59, p. 963–971, 2010.

LOPES, S.A.; MARCUCCI, S.; TORRES, S.C.Z.; SOUZA, V.; FAGAN, C., FRANÇA, S.C. Weeds as alternative host of the citrus, coffee and plum strains of *Xylella fastidiosa* in Brazil. **Plant Disease**, Washington, v. 87, n. 5, p. 544-549, 2003.

MADAIL, J.C.M. Aspectos socioeconômicos. In: CASTRO, L.A.S. (Coord.). **Ameixa: produção**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. p. 13-15. (Embrapa. Série Frutas do Brasil, 43).

MADAIL, J.C.M.; MARTINS, C.R. Mercado internacional e nacional. In: FLORES-CANTILLANO, F. (Coord.). **Ameixa: pós-colheita**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. p. 10-12. (Embrapa. Série Frutas do Brasil, 45).

MARODIN, G.B.; ZANINI, C.L.D. Situação das frutíferas de caroço no Brasil e no mundo. **Jornal da Fruta**, Lages, v. 13, n. 164, p. 2, 2005.

MARUCCI, R.C. **Eficiência de transmissão de *Xylella fastidiosa* por cigarrinhas (Hemiptera, Cicadellidae) em *Citrus sinensis* (L.) Osbeck e *Coffea arabica* (L.)**. 2003. 158 p. Tese (Doutorado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

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

MARUCCI, R.C.; LOPES, J.R.S.; CAVICHIOLI, R.R. Transmission efficiency of *Xylella fastidiosa* by sharpshooters (Hemiptera: Cicadellidae) in coffee and citrus. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 101, p. 1114-1121, 2008.

MARUCCI, R.C.; LOPES, J.R.S.; VENDRAMIN, J.D.; CORRENTE, J.E. Influence of *Xylella fastidiosa* infection of citrus on host selection by leafhopper vectors. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Midlothian, v. 117, p. 95-103, 2005.

MCGAHA, L.A.; JACKSON, B.; BEXTINE, B.; MCCULLOUGH, D.; MORANO, L. Potential plant reservoirs for *Xylella fastidiosa* in south Texas. **American Journal Enology Viticulture**, Davis, v. 58, n. 3, p. 398-401, 2007.

MEJDALANI, G. Morfologia externa dos Cicadellinae (Homoptera, Cicadellidae): comparação entre *Versigonalia ruficauda* (Walter) (Cicadellini) e *Tretogonia cribrata* Melichar (Proconiini), com notas sobre espécies e análise da terminologia. **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v. 15, p. 451-544, 1998.

MIRANDA, M.P.; VIOLA, D.N.; MARQUES, R.N.; BONANI, J.P.; LOPES, J.R.S. Locais e período de alimentação da cigarrinha vetora de *Xylella fastidiosa*, *Bucephalagonia xanthophis* (Berg) (Hemiptera: cicadellidae), em mudas cítricas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 4, p. 913-918, 2008.

MOHAN, S.K.; LEITE, R.P.; TSUNETTA, M.; HAUAGGE, G. **Problema da escaldadura da folha de ameixeira no Estado do Paraná**. Curitiba: IAPAR, 1980. 5 p. (IAPAR. Informe de Pesquisa, 31).

NEWMAN, K.L.; ALMEIDA, R.P.; PURCELL, A.S.; LINDOW, S.E. Cell-cell signaling controls *Xylella fastidiosa* interactions with both insects and plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washinton, v. 101, n. 6, p. 1737-1742, 2004.

_____. Use of a green fluorescent strain for analysis of *Xylella fastidiosa* colonization of *Vitis vinifera*. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 7319-7327, 2003.

NIJHOUT, H.F. **Insect hormones**. Princeton: Princeton University Press, 1994. 267 p.

PAIÃO, F.G.; MENEGUIM, A.M.; CASAGRANDE, E.C.; LEITE JÚNIOR, R.P. Envolvimento de cigarras (Homoptera, Cicadidae) na transmissão de *Xylella fastidiosa* em cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 67, 2002.

PARADELA-FILHO, O.; SUGIMORI, M.H.; RIBEIRO, I.J.A. Primeira constatação em cafeeiro no Brasil de *Xylella fastidiosa* causadora da clorose variegada dos citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 16, n. 2, p. 135-136, 1995.

PRADO, S.S.; LOPES, J.R.S.; DEMETRIO, C.G.B.; BORGATTO A.F.; ALMEIDA, R.P.P. Host colonization differences between citrus and coffee isolates of *Xylella fastidiosa* in reciprocal inoculation. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 65, p. 251-258, 2008.

PURCELL, A.H. Almond leaf scorch: leafhopper and spittlebug vectors. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 73, n. 6, p. 834-838, 1980.

_____. Homopteran transmission of xylem-inhabiting bacteria. In: HARRIS, K.F. (Ed.). **Advances in disease vector research**. New York: Springer-Verlag, 1989. v. 6, p. 243-266.

_____. Cigarrinhas na cultura do citros. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE CITROS, 3., 1994, Bebedouro. **Anais...** Campinas: Fundação Cargill, 1994. p. 195-209.

_____. **Host list of pierce's diseases strains of *Xylella fastidiosa***. Berkeley: University of California, College of Natural Resources, 2011. Disponível em: <<http://www.enr.berkeley.edu/xylella/control/host.htm>>. Acesso em: 10 jan. 2013.

PURCELL, A.H.; FINLAY, A. Evidence for noncirculative transmission of Pierce's disease bacterium by sharpshooter leafhoppers. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 69, n. 4, p. 393-395, 1979.

PURCELL, A.H.; HOPKINS, D.L. Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 34, p. 131-151, 1996.

RAJU, B.C.; WELLS, J.M. Diseases caused by fastidious xylem-limited bacteria and strategies for management. **Plant Disease**, Washington, v. 70, n. 3, p. 182-186, 1986.

RAJU, B.C.; WELLS, J.M.; NYLAND, G.; BRLANSKY, R.H.; LOWE, S.K. Plum leaf scald isolation culture and pathogenicity of the causal agent. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 72, p. 1460-1466, 1982.

RASHED, A.; DAUGHERTY, M.P.; ALMEIDA, R.P.P. Grapevine genotype susceptibility to *Xylella fastidiosa* does not predict vector transmission success. **Environmental Entomology**, State College, v. 40, p. 1192-1199, 2011.

REDAK, R.A.; PURCELL, A.H.; LOPES, J.R.S.; BLUA, M.J.; MIZELL III, R.F.; ANDERSEN, P.C. The biology of xylem fluid-feeding insect vectors of *Xylella fastidiosa* and their relation to disease epidemiology. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 49, p. 243-270, 2004.

ROBERTO, S.R.; COUTINHO, A.; LIMA, J.E.O.; MIRANDA, V.S.; CARLOS, E.F. Transmissão de *Xylella fastidiosa* pelas cigarrinhas *Dilobopterus costalimai*, *Acrogonia terminalis* e *Oncometopia fascialis* em citros. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 4, p. 517-518, 1996.

ROSSETI, V.; GARNIER, M.; BOVÉ, M.J.; BERETTA, J.M.G.; TEIXEIRA, A.R.R.; QUAGGIO, J.A.; DE NEGRI, J.D. Présence de bactéries dans le xylème d'orangers atteints de chlorose variégée, une nouvelle maladie des agrumes au Brésil. **Compte Rendu Academie des Sciences**, Paris, v. 310, p. 345-349, 1990.

SALIBE, A.B. **Reação de plantas cítricas à bacteria *Xylella fastidiosa* em função de diferentes métodos de inoculação**. 2001. 75 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

SCHAAD, N.W.; POSTNIKOVA, E.; LACY, G.; FATMI, M.; CHANG, C.J. *Xylella fastidiosa* subspecies: *X. fastidiosa* subsp. *piercei*, subsp. nov., *X. fastidiosa* subsp. *multiplex*, subsp. nov., and *X. fastidiosa* subsp. *pauca*, subsp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 27, p. 290-300, 2004.

SCHUENZEL, E.L.; SCALLY, M.; STOUTHAMER, R.; NUNNEY, L. A multigene phylogenetic study of clonal diversity and divergence in North American strains of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 7, p. 3832-3839, 2005.

SEMPIONATO, O.R.; STUCHI, E.S.; DONADIO, L.C. **Viveiro de citros**. Jaboticabal: FUNEP, 1997. 37 p. (Boletim Citrícola, 2).

SEVERIN, H.H.P. Transmission of the virus of Pierce's disease by leafhoppers. **Hilgardia**, Berkley, v. 19, p. 190-202, 1949.

SIMÃO, S. **Manual de fruticultura**. São Paulo: Ceres, 1971. 530 p.

SOUZA, A.A.; TAKITA, M.A.; COLETTA-FILHO, H.D.; CALDANA, C.; YANAI, G.M.; MUTO, N.H.; OLIVEIRA, R.C.; NUNES, L.R.; MACHADO, M.A. Gene expression profile of the plant pathogen *Xylella fastidiosa* during biofilm formation in vitro. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 237, n. 2, p. 341-353, 2004.

TYSON, G.E.; STOJANOVIC, B.J.; KUKLINSKI, R.F.; DIVITTORIO, T.J.; SULLIVAN, M.L. Scanning electron microscopy of Pierce's disease bacterium in petiolar xylem of grape leaves. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 75, n. 3, p. 264-269, 1985.

WELLS, J.M.; RAJU, B.C.; HUNG, H.Y.; WEINSBERG, W.G.; MANDELCO PAUL, L.; BREINNER, D.J. *Xylella fastidiosa* gen. nov. sp. nov.: gram-negative, xylem-limited fastidiosa bacteria related to *Xanthomonas* spp. **International Journal Systematic Bacteriology**, Washington, v. 37, p. 136-143, 1987.

WENDLAND, A.; TRUFFI, D.; LEITE JÚNIOR, R.P.; CAMARGO, L.E.A. Seqüenciamento e variabilidade do fragmento genômico de *Xylella fastidiosa* amplificado pelos iniciadores RST31/33*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 3, p. 298-301, 2003.

WISTROM, C.; PURCELL, A.H. The fate of *Xylella fastidiosa* in Vineyards Weeds and other alternative hosts in California. **Plant Disease**, Washington, v. 89, p. 994-999, 2005.

YAMAMOTO, P.T.; FELIPPE, M.R.; CAETANO, A.C.; SANCHES, A.L.; LOPES, J.R.S. First report of *Fingeriana dubia* Cavichioli transmitting *Xylella fastidiosa* to citrus. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 3, p. 266, 2007.

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

YOUNG, D.A. **Taxonomic study of the Cicadellinae**. Washington: United States National Museum, 1968. pt. 1: Proconiini, 287 p. (Bulletin, 261).

YUAN, X.; MORANO, L.; BROMLEY, R.; SPRING-PEARSON, S.; STOUTHAMER, R.; NUNNEY, L. MULTILOCUS sequence typing of *Xylella fastidiosa* causing pierce's disease and oleander leaf scorch in the United States. **Phytopatology**, Saint Paul, v. 100, n. 6, p. 601-611, 2010.

3 PRIMEIRAS ESPÉCIES DE CIGARRINHAS COMPROVADAS COMO VETORAS DE *Xylella fastidiosa* EM AMEIXEIRA E PLANTAS HOSPEDEIRAS ADEQUADAS PARA SUA CRIAÇÃO

Resumo

A Escaldadura das Folhas é a principal doença da ameixeira no Brasil, sendo causada pela bactéria *Xylella fastidiosa*. Em outras culturas, esta bactéria é transmitida por várias cigarrinhas da subfamília Cicadellinae (Hemiptera: Cicadellidae). Neste estudo foram conduzidos testes para identificar cicadélíneos vetores da bactéria em ameixeira, bem como plantas hospedeiras adequadas para a criação de insetos sadios visando estudos de transmissão. Plantas de alfavaca (*Ocimum basilicum* L.) foram apropriadas para multiplicação dos cicadélíneos *Macugonalia leucomelas* (Walker) e *Sibovia sagata* (Signoret), enquanto que falso-boldo (*Vernonia condensata* Baker) foi adequado para *Macugonalia cavifrons* (Stål). Quando inoculadas mecanicamente com um isolado de *X. fastidiosa* de ameixeira (137amx), *O. basilicum*, *V. condensata* e *Pentas lanceolata* (Forssk.) Deflers não permitiram a colonização bacteriana, mostrando-se adequadas para manutenção de colônias sadias das cigarrinhas. Os testes de transmissão foram realizados confinando-se adultos sadios de *M. cavifrons*, *M. leucomelas* e *S. sagata* para um período de acesso à aquisição de 72 h sobre ameixeiras (*Prunus domestica* L., cv. Reubennel) infectadas com o isolado 137amx, seguido de um período de acesso à inoculação de 96 h sobre ameixeiras sadias, em grupos de quatro cigarrinhas por planta, e inoculando-se 10-20 plantas-teste para cada espécie de cigarrinha. A infecção da bactéria em plantas-teste foi verificada por 'polymerase chain reaction' (PCR) e isolamento primário após 7 meses da inoculação. As três espécies de cigarrinhas transmitiram a bactéria para ameixeira, com eficiência de transmissão por indivíduo variando de 12 a 21%. Este é o primeiro relato de cigarrinhas vetoras de *X. fastidiosa* em ameixeira desde a constatação da Escaldadura das Folhas em 1934.

Palavras-chave: Escaldadura das folhas da ameixa; Bactéria fitopatogênica; Transmissão; Cigarrinhas vetoras; Plantas hospedeiras

Abstract

Plum Leaf Scald (PLS) is the major disease of plum in Brazil and it is caused by the vector-borne bacterium *Xylella fastidiosa*. In other crops, the pathogen is transmitted by several leafhoppers belonging to the subfamily Cicadellinae. Experiments were carried out to identify if sharpshooters are vectors of the bacterium in plum orchards. Additionally, this study aimed at searching suitable host plants to maintain non-infectious sharpshooter laboratory colonies in order to conduct transmission studies. Sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) was suitable for rearing the sharpshooters *Macugonalia leucomelas* (Walker) and *Sibovia sagata* (Signoret), whereas *Vernonia condensata* Baker was suitable for rearing *Macugonalia cavifrons* (Stål). Mechanically-inoculated *O. basilicum*, *V. condensata* and *Pentas lanceolata*

(Forssk.) deflers using *X. fastidiosa* isolated from plum (137amx) did not support bacterial colonization, which is desirable for maintaining non-infectious sharpshooter colonies. Transmission tests were carried out by allowing *M. cavifrons*, *M. leucomelas* and *S. sagata* to feed for 72h (*Prunus domestica* L., cv. Reubennel) on infected plum (isolate 137amx) followed by an inoculation access period of 96h on healthy plum (cv. Reubennel). For each sharpshooter species, 10-20 test plants were inoculated using four insects per plant. Test plants were assayed for bacterial infection by polymerase chain reaction (PCR) and culturing for 7 months after inoculation. The three sharpshooter species transmitted *X. fastidiosa* to plum with transmission rates by single vector ranging from 12-21%. This is the first report of sharpshooter vectors of *X. fastidiosa* in plum since the original description of PLS in 1934.

Keywords: Plum Leaf Scald; Phytopathogenic bacterium; Transmission: Sharpshooter vectors; Rearing hosts

3.1 Introdução

Xylella fastidiosa é uma bactéria gram negativa que coloniza uma ampla gama de espécies vegetais, incluindo pelo menos 30 famílias de mono e dicotiledôneas (SHERALD; KOSTKA, 1992). Desde sua descrição, várias doenças em culturas de importância econômica em diferentes países têm sido atribuídas a esta bactéria como agente causal. No Brasil, é responsável pela Clorose Variegada dos Citros (CVC), Atrofia dos Ramos do Cafeeiro (ARC) e Escaldadura das Folhas da Ameixeira (EFA), sendo que a última doença tem inviabilizado e limitado a expansão da cultura da ameixa (CASTRO; NAKASU; PEREIRA, 2008).

X. fastidiosa é transmitida em condições naturais por cigarrinhas, principalmente cicadélíneos (Hemiptera: Cicadellidae: Cicadellinae), que se alimentam nos vasos do xilema de plantas, que são colonizados pela bactéria (REDAK et al., 2004).

Embora a EFA seja a doença de maior importância em ameixeira no Brasil, e ter sido detectada já em 1935 na Argentina (FERNANDEZ-VALIELA; BAKARCIC, 1954) ainda não são conhecidas as espécies de cicadélíneos que atuam como vetores de *X. fastidiosa* nesta cultura. A bactéria já foi constatada por meio de teste ELISA em alguns cicadélídeos capturados em pomares de ameixeira, tais como *Plesiommata corniculata* Young, *Hortensia similis* (Walker), *Haldorus* sp., *Exitianus obscurinervis* (Stål) e *Balclutha hebe* (Kirkaldy), no Estado de Santa Catarina (HICKEL et al., 2001) e *Homalodisca coagulata* (Say), *Oncometopia orbona* (Fabricius) e *Paralaucizes irrorata* (Fabricius), nos Estados Unidos (HOPKINS, 1977; YOUNCE; CHANG, 1987). Porém, ainda não foram realizados estudos visando

comprovar a capacidade de transmissão de estirpes de *X. fastidiosa* que causam EFA pelas principais espécies de cigarrinhas associadas à cultura.

Estudos faunísticos de cicadelídeos em pomares de ameixeira e de videira na Serra Gaúcha, uma das principais regiões de cultivo dessas frutíferas no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil, indicou a presença de diversas espécies da subfamília Cicadellinae, que são potenciais vetoras de *X. fastidiosa* (LOPES et al., 2008; RINGENBERG et al., 2010). Diante disso, o principal objetivo do presente estudo foi verificar a transmissão de uma estirpe de *X. fastidiosa* que causa EFA por espécies de Cicadellinae comumente encontradas em ameixeira, procurando-se identificar cigarrinhas vetoras envolvidas na disseminação da doença. Por outro lado, estudos de transmissão requerem a disponibilidade de plantas hospedeiras das cigarrinhas e não da bactéria, que sejam adequadas para a criação dos insetos em laboratório e obtenção de indivíduos livres do fitopatógeno. Assim, um segundo objetivo foi avaliar a capacidade de colonização de *X. fastidiosa* de ameixeira em três espécies vegetais hospedeiras das cigarrinhas, buscando-se selecionar aquelas que não são hospedeiras do patógeno para a criação de insetos vetores sadios em estudos de transmissão.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Espécies de cigarrinhas

Três espécies de cicadelíneos da tribo Cicadellini, previamente reportadas em ameixeira (MÜLLER, 2008), foram avaliadas como vetoras de *X. fastidiosa*: *Sibovia sagata* (Signoret), *Macugonalia cavifrons* (Stål) e *Macugonalia leucomelas* (Walker). As duas primeiras espécies destacam-se como dominantes e/ou comuns em pomares de ameixeira na região da Serra Gaúcha (LOPES et al., 2008), sendo que as três podem ser criadas em hospedeiros herbáceos e/ou arbustivos, permitindo sua multiplicação em laboratório para execução dos ensaios. Adultos das cigarrinhas foram coletados em arbustos da mata ciliar do Rio Piracicamirim, em Piracicaba, SP e confinados sobre plantas de cada espécie vegetal avaliada, no interior de gaiolas teladas, em casa de vegetação. Após 4 a 8 semanas, as plantas foram avaliadas quanto à presença de ninfas em desenvolvimento e emergência de novos adultos.

3.2.2 Plantas hospedeiras

Três espécies de plantas foram avaliadas como hospedeiras para criação dessas cigarrinhas: alfavaca (*Ocimum basilicum* L., Lamiaceae), falso-boldo (*Vernonia condensata* Baker, Asteraceae) e show-de-estrelas [*Pentas lanceolata* (Forssk.) Defflers, Rubiaceae]. A escolha dessas espécies vegetais baseou-se na observação prévia em ambiente natural da presença de cicadélíneos sobre as mesmas e também a facilidade de propagação e manutenção dessas plantas em casa de vegetação, uma vez que para utilizar uma espécie como hospedeira em criação de insetos, torna-se necessário um grande número de plantas.

3.2.3 Isolado de *X. fastidiosa*

O isolado bacteriano utilizado nos estudos, denominado 137amx, foi obtido de ramo com sintomas de EFA em um pomar de ameixeira cv. Reubennel, no município de Jarinú, SP, em 2008. O isolamento foi feito em meio sólido 'Periwinkle wilt gelrite' (PWG) (HILL; PURCELL, 1995) pelo método de extravazamento direto da seiva do ramo, com auxílio de alicate, em contato com o meio de cultura, conforme descrito por Leite et al. (1999). As placas nas quais foi realizado o isolamento foram mantidas em câmara escura à temperatura de 28°C para crescimento das colônias. O isolado foi purificado por tríplice clonagem, também em meio PWG. Após a tríplice clonagem, o inóculo bacteriano foi multiplicado em meio de cultura de mesmo tipo, e as colônias obtidas nesta fase foram preservadas a -80°C em meio de cultura 'Periwinkle wilt' (PW) (sem agente geleificante) com adição de 30% de glicerol, em tubos criogênicos. Este isolado foi caracterizado como pertencente ao grupo genético predominante em ameixeira (H. D. Colleta-Filho, Centro APTA Citros "Sylvio Moreira", Cordeirópolis, SP, Brasil, informação pessoal).

3.2.4 Avaliação da capacidade de colonização de *X. fastidiosa* em plantas hospedeiras das cigarrinhas

As três espécies de plantas (*O. basilicum*, *V. condensata* e *P. lanceolata*) avaliadas como hospedeiras das cigarrinhas foram inoculadas mecanicamente com o isolado 137amx de *X. fastidiosa* de ameixeira, com o objetivo de avaliar a capacidade de colonização das mesmas pela bactéria. Neste ensaio também foram inoculadas mudas de ameixeira (*Prunus domestica* L.) cv. 'Reubennel' e duas espécies sabidamente hospedeiras da estirpe de citros de *X. fastidiosa*: vinca

[*Catharanthus roseus* (L.) G. Don] (MONTEIRO et al., 2001) e fumo (*Nicotiana tabacum* L.) (LOPES et al., 2000). As espécies vegetais foram obtidas por meio de sementes, com exceção do falso-boldo, que foi produzido por estaquia a partir de planta previamente identificada como sadia, e da ameixeira, que foi obtida por enxertia de borbulhas sadias sobre pessegueiro (*Punus persica* (L.) Batsch) cv. 'Okynawa'. As mudas de ameixeira foram produzidas no Núcleo de Produção de Mudas de Itaberá (Unidade da Coordenadoria de Assistência Técnica Integral do Governo de São Paulo – CATI/SP), a partir de borbulheiras sadias e protegidas em telados, isentas de EFA. Durante todo o estudo, as plantas foram mantidas em estufa telada à prova de insetos vetores, acondicionadas em sacos plásticos de 2 L contendo substrato a base de casca de pínus, vermiculita expandida e carvão moído) (Rendimax, Eucatex - Itapetininga, SP), recebendo semanalmente adubação foliar com macro e micronutrientes.

3.2.4.1 Inoculação mecânica

O isolado 137amx de *X. fastidiosa*, preservado a -80C, foi recuperado em meio de cultura sólido PWG e repicado por uma vez neste meio. Em câmara de fluxo-laminar preparou-se o inóculo por meio da raspagem das colônias bacterianas obtidas na repicagem, com auxílio de alça de platina, e homogeneização destas em tampão fosfato salino (*Phosphate buffer saline* - PBS), até a obtenção de uma suspensão turbida, com concentração da ordem de 10^{12} unidades formadoras de colônia (UFC)/mL. A quantificação bacteriana nessa suspensão de inóculo foi feita logo após a homogeneização, pelo método de diluições em série e plaqueamento em meio de cultura sólido PWG (ALMEIDA et al., 2001).

Para cada espécie vegetal, foram inoculadas 30 plantas com a suspensão bacteriana, e seis plantas apenas com tampão PBS (controle negativo). No caso da ameixeira, foram inoculadas apenas 12 plantas com a suspensão bacteriana e cinco foram mantidas como controle negativo. A inoculação foi feita pelo método de agulhas ("pin-pricking") (HOPKINS, 1985) em três pontos distintos na haste de cada planta, depositando-se uma gota de $5\mu\text{l}$ da suspensão bacteriana em cada ponto e perfurando-se o local 5 vezes com um alfinete entomológico No. 0. Esta prática foi realizada em dia de alta luminosidade e calor, favorecendo a absorção pelas plantas.

Após a inoculação, as plantas inoculadas permaneceram em casa de vegetação até o momento da avaliação.

3.2.4.2 Detecção bacteriana nas plantas

A avaliação da infecção da bactéria nas plantas foi realizada aos 20, 40 e 60 dias após a inoculação, por meio de dois métodos diagnósticos: isolamento primário em meio de cultura e reação de polimerase em cadeia ('polymerase chain reaction' – PCR). As ameixeiras foram avaliadas somente aos 150 dias após a inoculação devido à pré-testes realizados demonstrarem um tempo maior do que 60 dias para recuperação de células viáveis das plantas por meio da metodologia utilizada.

O isolamento primário foi realizado conforme procedimento descrito por Hill e Purcell (1995a) e adaptado por Almeida et al. (2001). Para isso, foram coletadas aleatoriamente seis folhas de cada planta, distribuídas aleatoriamente, das quais foram descartados os limbos foliares, mantendo apenas 0,10 a 0,12 g de pecíolos por amostra (1 planta = 1 amostra). Em câmara de fluxo laminar, estas amostras foram esterilizadas superficialmente em banhos sucessivos de 2 min em recipientes contendo álcool (92,8%) (uma passagem), hipoclorito de sódio (2%) (uma passagem) e água destilada estéril (três passagens), sendo manuseadas por materiais esterilizados. Em seguida, as amostras foram cortadas em pedaços menores sobre papel filtro e transferidas individualmente para tubos de vidro contendo 2 mL de PBS autoclavado, onde foram trituradas com auxílio de homogeneizador de tecidos com haste giratória (Turrax MA102, Marconi, Piracicaba, SP) a 20.000 rpm por 15 s, devidamente esterilizada com álcool 92,8 % e lavada com água estéril no intervalo entre cada amostra. Após trituração, a suspensão obtida de cada amostra foi diluída 10X, e duas alíquotas de 20 µL desta diluição foram plaqueadas em meio sólido PWG. As placas foram mantidas em incubadora a 28° C para o crescimento bacteriano pelo período de até 30 dias, considerando-se que o crescimento desta estirpe é mais lento quando comparado com estirpes de *X. fastidiosa* de citros e cafeeiro. Amostras de colônias recuperadas no meio de cultura foram submetidas à extração de DNA e PCR com oligonucleotídeos específicos para *X. fastidiosa* (MINSAVAGE et al., 1994), para confirmação de sua identidade.

Tendo em vista o teste de PCR, realizou-se extração de DNA com amostras de pecíolos foliares de seis folhas por planta, conforme protocolo desenvolvido por Minsavage et al. (1994) e adaptado por Pinto e Leite (1999). Posteriormente,

alíquotas de DNA extraído foram submetidas à PCR, utilizando-se os oligonucleotídeos HL5 e HL6 (FANCIS et al., 2006), que amplificam fragmento de aproximadamente 120 pares de bases; utilizaram-se os demais reagentes e condições de amplificação descritos pelos respectivos autores. Ao produto da amplificação de cada amostra foi adicionado cerca de 2µL de corante (0,25% azul de bromofenol, 40% de sacarose). As amostras foram submetidas então a eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE (89mM Tris; 89 mM Ácido Bórico e 2 mM de EDTA; pH8,0), suplementado com 0,5 µg/mL de brometo de etídio. Os fragmentos foram visualizados sob luz UV e registrados por fotodocumentador Eagle Eye II (Stratagene, CA 92037, EUA).

A cada avaliação foram analisadas 12 plantas distintas (amostras independentes), sendo 10 inoculadas com a suspensão bacteriana e duas do controle negativo. No caso específico da ameixeira, as plantas foram avaliadas uma única vez, aos 150 dias após a inoculação.

3.2.5 Verificação da transmissão de *X. fastidiosa* por cigarrinhas em ameixeira

3.2.5.1 Criação de cigarrinhas sadias

Duas espécies vegetais identificadas como não hospedeiras da estirpe de *X. fastidiosa* de ameixeira e adequadas para oviposição e desenvolvimento completo de ninfas das cigarrinhas. O falso-boldo (*V. Condensata*) foi usado para a criação indivíduos sadios de *M. cavifrons*, e *O. basilicum* (alfavaca) para a criação de *M. leucomelas* e *S. sagata*. A criação das cigarrinhas foi conduzida em gaiolas teladas no interior de casa- de-vegetação com sistema de resfriamento (temperaturas variando de 18 a 32° C), utilizando-se gaiolas e procedimentos descritos por Marucci et al. (2003).

3.2.5.2 Obtenção de plantas-fonte e plantas-teste

Como plantas-fonte para aquisição do patógeno pelo vetor, foram usadas mudas de ameixeira 'Reubennel' inoculadas mecanicamente com o isolado 137 amx de *X. fastidiosa* no experimento anterior, e cuja população bacteriana foi estimada pelo método de isolamento primário em meio de cultura, conforme descrito por Almeida et al. (2001). Tais plantas foram usadas no experimento de transmissão

com aproximadamente 5 meses após a inoculação, e população bacteriana na ordem de 10^8 unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de tecido.

Como plantas-teste foram utilizadas mudas sadias de ameixeira cv. 'Reubennel' enxertadas sobre pessegueiro cv. 'Okynawa', produzidas em viveiro telado no Núcleo de Produção de Mudas de Itaberá (CATI/SP). As mudas foram podadas a uma altura de 10 cm acima do ponto de enxertia, de modo a padronizar o comprimento dos brotos em, aproximadamente, 40 cm no momento da inoculação. Amostras de folhas de cada planta-teste foram previamente analisadas por PCR com os primers HL5 e HL6, conforme Francis et al. (2006), para comprovação de que as plantas estavam livres de *X. fastidiosa*.

3.2.5.3 Testes de transmissão

Grupos de 70 cigarrinhas adultas de cada espécie, com 1-3 semanas de idade, foram confinadas em uma gaiola telada contendo três plantas-fontes, por um período de acesso à aquisição (PAA) da bactéria de 72 h. Em seguida, os adultos foram transferidos para as plantas-teste para um período de acesso à inoculação (PAI) de 96 horas, confinando-se grupos de quatro indivíduos por planta, em gaiolas de tecido tule. Realizou-se um teste de transmissão no caso de *M. cavifrons* e dois testes para *M. leucomelas* e *S. sagata*, usando-se insetos distintos no segundo teste. Foram inoculadas 10 plantas-teste por espécie de cigarrinha em cada teste de transmissão. Antes do PAA em cada um dos testes de transmissão, os insetos de cada espécie foram previamente confinados conjuntamente sobre 5 plantas-teste sadias por um período de 48 h. Essas plantas, denominadas de "pré-teste", foram mantidas como controle negativo do experimento, sendo posteriormente avaliadas quanto à transmissão da bactéria, juntamente com as plantas-teste inoculadas após o PAA.

Após o PAI, todas as plantas-teste inoculadas foram transferidas para casa de vegetação com tela à prova de cigarrinhas, mantidas em sacos de 4 L com substrato, e fertirrigadas semanalmente com macro e micronutrientes. A avaliação da transmissão foi realizada 7 meses após a inoculação, verificando-se a infecção por *X. fastidiosa* nas plantas-teste por meio de testes de isolamento primário em meio de cultura e técnica de PCR, realizados conforme descrito no experimento anterior.

Considerando-se que as plantas-teste foram inoculadas por grupos de insetos, a eficiência de transmissão de *X. fastidiosa* por cada espécie de cigarrinha foi estimada baseando-se na probabilidade de transmissão por um único indivíduo (P), conforme a fórmula: $P = 1 - (1-I)^{1/k}$, onde I corresponde à proporção de plantas-teste infectadas e k , ao número de insetos confinados por planta-teste durante o PAI (SWALLOW, 1985).

Com o objetivo de fornecer dados que auxiliem no delineamento de experimentos futuros de transmissão em ameixeira, avaliou-se o percentual de mortalidade das espécies de cigarrinhas durante o PAA em plantas de ameixeira infectadas, ou durante o PAI em plantas sadias. Os dados obtidos foram transformados em $[(n+0,5)/100]^{0,5}$ pelo teste de Hartley ao nível de 5% de probabilidade de erro, sendo n = dado amostrado.

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Identificação de espécies não hospedeiras de *X. fastidiosa* para manutenção de colônias sadias de cigarrinhas

Baseando-se nas observações de desenvolvimento de ninfas e adultos emergidos das cigarrinhas sobre as plantas em gaiolas teladas, verificou-se uma melhor adequação de *V. condensata* (falso-boldo) para o desenvolvimento da cigarrinha *M. cavifrons* e de *O. basilicum* (alfavaca) para *S. sagata*. A cigarrinha *M. leucomelas* multiplicou-se bem em ambos hospedeiros, mas atingiu populações mais elevadas em *O. basilicum*. O falso-boldo já foi descrito como hospedeiro adequado para criação de outros cicadelineos, tais como *Bucephalogonia xanthophis* (Berg) (MARUCCI et al., 2003), *Dilobopterus costalimai* Young e *Oncometopia facialis* (Signoret) (MILANEZ et al. 2001), enquanto que a alfavaca vem sendo usada para criar as cigarrinhas *Graphocephala atropunctata* (Signoret) e *Draeculacephala minerva* Ball (LOPES; DAUGHERTY; ALMEIDA, 2009; DAUGHERTY; LOPES; ALMEIDA, 2010).

No experimento de inoculação mecânica, com o isolado 137amx de *X. fastidiosa*, avaliou-se a capacidade de colonização e persistência da infecção dessa bactéria nas plantas hospedeiras de cigarrinhas testadas. Neste ensaio, as plantas-controle foram diagnosticadas como negativas para a presença de *X. fastidiosa* em

todas as avaliações realizadas. Na avaliação realizada 20 dias após a inoculação (DAI), observou-se crescimento de colônias da bactéria em uma amostra de isolamento primário de *C. roseus* e uma amostra de *V. condensata* foi positiva apenas por PCR (Tabela 1). Na segunda avaliação, realizada 40 DAI, duas amostras de *N. tabacum* foram positivas para a bactéria por PCR, porém foram negativas por isolamento em meio de cultura. O mesmo ocorreu com uma amostra de *P. lanceolata* na terceira avaliação realizada aos 60 DAI (Tabela 1). As plantas de ameixeira que foram avaliadas aos 150 DAI foram todas positivas por PCR, recuperando-se colônias da maioria delas (80%) por isolamento primário.

Tabela 1 – Percentual de detecção do isolado 137amx de *X. fastidiosa* em diferentes espécies vegetais (n = 10 plantas por espécie) por meio de teste de PCR e isolamento em meio de cultura, em diferentes períodos após a inoculação mecânica

Espécie	DAI ^a	Percentual de plantas infectadas	
		PCR	Isolamento em meio de cultura
<i>Catharanthus roseus</i> (vinca)	20	0	10 (4,3) ^b
	40	0	0
	60	0	0
<i>Nicotina tabacum</i> (fumo)	20	0	0
	40	20	0
	60	0	0
<i>Oscimum basilicum</i> (alfavaca)	20	0	0
	40	0	0
	60	0	0
<i>Pentas lanceolata</i> (show de estrelas)	20	0	0
	40	0	0
	60	10	0
<i>Veronia condensata</i> (falso boldo)	20	10	0
	40	0	0
	60	0	0
<i>Prunus domestica</i> (ameixeira)	150	10/10	80 (5,2 ± 0,1)

^a Dias após a inoculação.

^b Valor entre parênteses representa a população média de *X. fastidiosa* em plantas infectadas, expressa em Log do número de unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de tecido vegetal.

Marucci et al. (2003) avaliaram espécies como hospedeiras de estirpes de *X. fastidiosa* de café e citros, as quais são geneticamente diferentes da estirpe predominante em ameixeira (COLLETA-FILHO, dados não publicados). Para aquelas estirpes, *V. condensata* se apresentou sadia em todas as avaliações. No presente estudo, o isolado 137amx foi detectado por PCR em uma planta de *V. condensata*, mas com apenas 20 DAI, não sendo reisolado da mesma, o que indica a não adequação de *V. condensata* como hospedeira de *X. fastidiosa*, validando seu uso para a criação de cigarrinhas sadias.

Também não houve reisolamento da bactéria das plantas de *N. tabacum*, *O. basilicum* e *P. lanceolata*, indicando que o isolado 137amx de ameixeira não coloniza essas espécies. Estes resultados ampliam o número de espécies vegetais que podem ser utilizadas em criações possibilitando a manutenção de colônias sadias de cigarrinhas ao longo do ano.

Como *C. roseus* apresentou colonização pela bactéria, evidenciada pelo isolamento primário em meio de cultura, esta não deve ser utilizada para manutenção de colônias sadias. Esta espécie também foi comprovada como hospedeira para dois isolados de *X. fastidiosa* provenientes de citros, embora com maior proporção de plantas do que a obtida neste estudo (MONTEIRO et al., 2001), provavelmente, devido à especificidade entre estirpe e espécie hospedeira.

A ocorrência de amostras positivas por PCR e negativas por isolamento se deve ao fato da técnica de isolamento detectar somente células viáveis da bactéria enquanto que por PCR é detectada a presença do DNA bacteriano. Ou seja, pode ter sido detectada a presença do DNA de células que foram inoculadas, porém não obtiveram sucesso na colonização dos tecidos da planta. Este fato também foi verificado por Almeida et al. (2001), ao trabalhar com isolados de *X. fastidiosa* de citros.

3.3.2 Mortalidade de cigarrinhas durante o período de acesso à aquisição (PAA) e período de acesso a inoculação (PAI) em ameixeira

A mortalidade média das cigarrinhas foi $\leq 22\%$ e não diferiu significativamente entre o PAA e PAI para as três espécies de cigarrinhas, indicando que a metodologia utilizada no trabalho foi adequada para os testes de transmissão (Tabela 2).

Tabela 2 – Mortalidade média (%) (\pm EPM) de cigarrinhas durante o período de acesso à aquisição (PAA) e período de acesso à inoculação (PAI) de *Xylella fastidiosa* em ameixeira

Espécie de cigarrinha	PAA	PAI
<i>Sibovia sagata</i>	19,2 \pm 2,7 a	14,0 \pm 2,3 a
<i>Macugonalia cavifrons</i>	10,8 \pm 1,9 a	22,0 \pm 2,3 a
<i>Macugonalia leucomelas</i>	17,7 \pm 2,6 a	14,0 \pm 2,2 a
Média geral	16,9	15,6

* médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si ($P < 0.005$) por meio de teste de Hartley.

Provavelmente a mortalidade das cigarrinhas está relacionada com a preferência da espécie pela planta hospedeira, assim, varia entre espécies de cigarrinhas, ou em uma mesma espécie para diferentes hospedeiros. *Bucephalagonia xanthophis* apresentou maior mortalidade em citros (14.3%) do que em cafeeiro (7.4%) durante o PAA, enquanto que *D. costalimai* e *O. facialis* não diferiram nos percentuais entre estes dois hospedeiros no PAA e PAI (MARUCCI; LOPES; CAVICHIOLI, 2008). Os mesmos autores observaram para *Homalodisca ignorata* Melichar uma menor mortalidade em citros (0%) em relação ao cafeeiro (10%) durante o PAI.

Embora a mortalidade possa ser influenciada pelo estado fisiológico da planta, os percentuais observados no presente estudo apresentam-se acima daqueles observados em estudos com citros e café (MARUCCI; LOPES; CAVICHIOLI, 2008). Essas informações serão úteis para o planejamento de novos estudos de transmissão com essas cigarrinhas em ameixeira; considerando-se a mortalidade média acumulada no PAA e PAI, o número de insetos a serem utilizados no início de um PAA deve ser 25-30% maior do que o número de insetos que se deseja avaliar quanto à capacidade de transmissão.

3.3.3 Verificação da transmissão de *X. fastidiosa* por cigarrinhas em ameixeira

Verificou-se a transmissão do isolado 137amx de *X. fastidiosa* para ameixeira pelas três espécies cigarrinhas testadas, baseando-se na detecção da bactéria em

plantas-teste pelos testes de PCR e isolamento primário em meio de cultura (Tabela 3). A maioria das plantas positivas para o PCR também mostraram sintomas de EFA. Nenhuma das plantas “pré-teste” expostas aos insetos antes do PAA em plantas-fonte do patógeno apresentaram-se infectadas por *X. fastidiosa*, demonstrando que os insetos e plantas-teste utilizados nos experimentos estavam previamente saudáveis.

As proporções de plantas positivas para *X. fastidiosa* detectadas por PCR foram mais elevadas do que aquelas obtidas por isolamento primário em meio de cultura. Este fato pode ser explicado por alguns fatores como amostragem, considerando que embora próximas, as folhas retiradas para cada uma das técnicas foram diferentes e também pela diferença de sensibilidade de detecção entre os métodos. Embora o isolamento primário permita detectar células viáveis, fator que indica a condição biológica da bactéria no interior do hospedeiro, este método apresenta limite de detecção $\geq 10^3$ UFC/g de tecido (ALMEIDA et al., 2001), sendo, portanto, menos sensível do que o teste de PCR, que detecta a presença da bactéria a partir de 10 células bacterianas contidas na amostra (MINSAVAGE et al., 1994).

Tabela 3 – Taxas de transmissão de *Xylella fastidiosa* em ameixeira por cigarrinhas em dois experimentos, baseando-se na detecção da bactéria em plantas-teste pelos testes de PCR e isolamento primário em meio de cultura, após 7 meses da inoculação

Exp.	Espécie de cigarrinha	Proporção de plantas infectadas ^a		Probabilidade de transmissão ($P=0,071$) ^b	
		PCR	Isolam. primário	PCR	Isolam. primário
I	<i>Macugonalia cavifrons</i>	5/10	2/10	0,160	0.054
	<i>M. leucomelas</i>	5/10	2/10	0,160	
	<i>Sibovia sagata</i>	6/10	4/10		
II	<i>M. leucomelas</i>	4/10	3/10		0.089
	<i>S. sagata</i>	5/10	3/10		0,089

^aProporção de plantas infectadas sobre o total de plantas inoculadas, utilizando-se quatro insetos por planta-teste durante a inoculação.

^bProbabilidade de transmissão por um único inseto estimada pela fórmula de Swallow (1985), $P = 1 - (1-I)^{1/k}$, onde I é a proporção de plantas infectadas e k é o número de insetos por planta-teste.

As três espécies testadas são as primeiras confirmadas como vetoras de *X. fastidiosa* na cultura da ameixeira. *M. leucomelas* já foi comprovada como vetora da bactéria em citros, com eficiência de transmissão por indivíduo de 17,3% (KRÜGNER et al., 2000), semelhante àquela obtida por PCR neste estudo (12-16%) (Tabela 3). Variações em eficiência de transmissão de *X. fastidiosa* são frequentemente relatadas, estando relacionadas com outros fatores além da espécie vetora, como por exemplo, a estirpe da bactéria, a planta hospedeira e a população bacteriana presente na planta-fonte (ALMEIDA et al., 2001, 2005; LOPES; DAUGHERTY; ALMEIDA, 2009).

Para *M. cavifrons* e *S. sagata* este é o primeiro estudo comprovando a sua capacidade de transmitir *X. fastidiosa*, com eficiência de transmissão por indivíduo de 16 e 16-21%, respectivamente (Tabela 3). Essas duas espécies ocorrem em pomares de ameixeira, e em análise faunística realizada em pomares da Serra Gaúcha, região produtora de ameixas no Rio Grande do Sul, ambas as espécies apresentaram elevados índices de constância, abundância e frequência, sendo

classificadas como cicadélíneos dominantes naquela região (MÜLLER, 2008). Juntamente com *M. leucomelas*, essas espécies apresentam ampla distribuição geográfica no país, tendo sido registradas em pomares cítricos no estado de São Paulo (YAMAMOTO; GRAVENA, 2000), e em videira no Rio Grande do Sul (RINGENBERG et al., 2010). *M. cavifrons* e *M. leucomelas* também foram registradas em pomares cítricos do Paraná e Rio Grande do Sul (NUNES et al., 2008; OTT et al., 2006), e em cafezais do estado de São Paulo (GIUSTOLIN et al., 2009). Estudos anteriores de infectividade natural comprovaram a presença de *X. fastidiosa* pelo teste de ELISA em outras espécies de cicadélíneos, tais como *Ferrariana trivitatta* Signoret, *Hortensia similis* (Walker) e *Plesiommata corniculata* Young, que foram coletadas em pomares de ameixeira no estado de Santa Catarina (HICKEL et al., 2001) e por PCR em *Bucephalogonia xanthophis*, coletada em pomares de ameixeira no Rio Grande do Sul (Müller et al., dados não publicados). A ocorrência de indivíduos infectivos em várias cigarrinhas presentes nessa cultura sugere que a EFA possua uma ampla gama de espécies vetoras, como já demonstrado para a CVC (REDAK et al., 2004) e ARC (MARUCCI; LOPES; CAVICHIOLI, 2008). No entanto, embora a infectividade natural seja um indicativo de que uma espécie de cigarrinha atue como vetora em um patossistema, apenas por meio de testes de transmissão a comprovação se faz possível. Nos Estados Unidos da América, alguns trabalhos anteriores se referem aos cicadélíneos *H. coagulata*, *O. orbona* e *P. irrorata* como vetores em ameixeira, porém os autores Hopkins (1977) e Younce e Chang (1987) apenas comprovaram a presença da bactéria em insetos coletados em plantas infectadas a campo.

A confirmação de *S. sagata*, *M. cavifrons* e *M. leucomelas* como vetoras de *X. fastidiosa* em ameixeira no presente estudo, com taxas de transmissão variando de 12 a 21%, associada à frequência, abundância e constância com que tais espécies ocorrem em pomares de ameixeira no Rio Grande do Sul (MÜLLER, 2008), indicam que as mesmas sejam relevantes para a disseminação da EFA naquela região, sendo recomendável a adoção de medidas de manejo dessas cigarrinhas em pomares para conter o avanço da doença.

3.4 Conclusões

Ocimum basilicum, *Pentas lanceolata* e *Vernonia condensata* não são hospedeiras da estirpe de *Xylella fastidiosa* de ameixeira, podendo ser utilizadas para obtenção de colônias sadias de cigarrinhas, visando estudos de transmissão desse patógeno.

Macugonalia cavifrons, *Sibovia sagata* e *Macugonalia leucomelas* são vetoras de *Xylella fastidiosa* em ameixeira.

Referências

ALMEIDA, R.P.P.; BLUA, M.J.; LOPES, J.R.S.; PURCELL, A.H. Vector transmission of *Xylella fastidiosa*: Applying fundamental knowledge to generate disease management strategies. **Annals of the Entomological Society of America**, Lanham, v. 98 p. 775-786, 2005.

ALMEIDA, R.P.P.; PEREIRA, E.F.; PURCELL, A.H.; LOPES, J.R.S. Multiplication and movement of a citrus strain of *Xylella fastidiosa* within sweet orange. **Plant Disease**, Washington, v. 85, n. 45, p. 382-382, 2001.

CASTRO, L.A.S.; NAKASU, B.H.; PEREIRA, J.F.M. **Ameixeira: histórico e perspectivas do cultivo**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2008. 10 p. (Circular Técnica, 70).

DAUGHERTY, M.P.; LOPES, J.; ALMEIDA, R.P.P. Vector within-host feeding preference mediates transmission of a heterogeneously distributed pathogen. **Ecological Entomology**, Lanham, v. 35, p. 360-366, 2010.

FERNANDEZ-VALIELA, M.V.; BAKARCIC, M. Nuevas enfermedades del ciruelo en el delta del Paraná, Argentina. **Informativo Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria**, Buenos Aires, n. 84, p. 2-6, 1954.

FRANCIS, M.; LIN, H.; CABRERA-LA ROSA, J.; DODDAPANENI, H.; CIVEROLO, E.L. Genome-based PCR primers for specific and sensitive detection and quantification of *Xylella fastidiosa*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 115, p. 203-213, 2006.

HICKEL, E.R.; DUCROQUET, J.P.H.J.; LEITE Jr, R.P.; LEITE, R.M.V.B.C. Fauna de Homoptera: Auchenorrhyncha em pomares de ameixeira de Santa Catarina. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, p. 725-729, 2001.

HILL, B.L.; PURCELL, A.H. Multiplication and movement of *Xylella fastidiosa* within grapevine and four other plants. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 85, n. 11, p. 1368-1372, 1995.

HOPKINS, D.L. Diseases caused by leafhopper-borne rickettsia-like bacteria. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 17, p. 277-294, 1977.

_____. Physiological and pathological characteristics of virulent and avirulent strains of the bacterium that causes Pierce's disease of grapevine. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 75, p. 713-717, 1985.

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

LOPES, J.R.S., DAUGHERTY, M.P., ALMEIDA, R.P.P. Context-dependent transmission of a generalist plant pathogen: host species and pathogen strain mediate insect vector competence. **Entomology Experimentalis at Applicata**, Washington, v. 131, p. 216–224, 2009.

LOPES, S.A.; RIBEIRO, D.M.; ROBERTO, P.G.; FRANÇA, S.C.; SANTOS, A.C. *Nicotiana tabacum* as an experimental host for the study of plant-*Xylella fastidiosa* interactions. **Plant Disease**, Washington, v. 84, p. 827-830, 2000.

MARUCCI, R.C.; LOPES, J.R.S.; CAVICHIOLI, R.R. Transmission efficiency of *Xylella fastidiosa* by sharpshooters (Hemiptera: Cicadellidae) in coffee and citrus. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 101, p. 1114-1121, 2008.

MARUCCI, R.C., GIUSTOLIN, T.A., MIRANDA, M.P., MIQUELOTE, H., ALMEIDA, R.P.P., LOPES, J.R.S. Identification of a non-host plant of *Xylella fastidiosa* to rear healthy sharpshooter vectors. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 60, n. 4, p. 669-675, 2003.

MILANEZ, J.M.; PARRA, J.R.P.; MAGRI, D.C. Alternation of host plants as a survival mechanism of leafhoppers *Dilobopterus costalimai* and *Oncometopia facialis* (Hemiptera: cicadellidae), vectors of the citrus variegated chlorosis (CVC). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 58, p. 699-702, 2001.

MINSAVAGE, G.V.; THOMPSON, C.M.; HOPKINS, D.L.; LEITE R.M.V.B.; STALL R.E. Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 84, n. 5, p. 456-461, 1994.

MONTEIRO, P.B.; RENAUDIN, J.; JAGOUEIX-EVEILLARD, S.; AYRES, A.J.; GARNIER, M.; BOVÉ, J.M. *Catharanthus roseus*, an experimental host plant for the citrus strain of *Xylella fastidiosa*. **Plant Disease**, Washington, v. 85, p. 246-251, 2001.

MÜLLER, C. **Análise faunística e flutuação populacional de cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae) potenciais vetoras de *Xylella fastidiosa* em pomares de ameixeira nos estados do Rio Grande do Sul e São Paulo.** 2008. 67 p.

Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2008.

NUNES, W.M.C.; MOLINA, R.O.; ALBUQUERQUE, F.A.; CORAZZA-NUNES, M.J.; ZANUTO, A.; MACHADO, M.A. Flutuacao populacional de cigarrinhas vetoras de *Xylella fastidiosa* Wells et al. em pomares de citros no noroeste do Paraná. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 36, n. 2, p. 254-260, 2008.

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, n. 4, p. 425-429, 2006.

PINTO, F.G.S.; LEITE JUNIOR, R.P. Detecção de *Xylella fastidiosa* em *Coffea* spp através da técnica de PCR. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, p. 254, 1999.

REDAK, R.A.; PURCELL, A.H.; LOPES, J.R.S.; BLUA, M.J.; MIZELL III, R.F.; ANDERSEN, P.C. The biology of xylem fluid-feeding insect vectors of *Xylella fastidiosa* and their relation to disease epidemiology. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 49, p. 243-270, 2004.

RINGEMBERG, R.; LOPES, J.R.S.; BOTTON, M.; AZEVEDO-FILHO, W.S.; CHAVICHOLI, R.R. Análise faunística de cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae) na cultura da videira no Rio Grande do Sul. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 39, n. 2, p. 187-193, 2010.

SHERALD, J.L.; KOSTKA, S.J. Bacterial leaf scorch of landscape trees caused by *Xylella fastidiosa*. **Journal Arboric**, New York, v. 18, n. 2, p. 57-63, 1992.

SWALLOW, W.H. Group testing for estimating infection rates and probabilities of disease transmission. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 75, n. 8, p. 882-889, 1985.

WELLS, J.M.; RAJU, B.C.; HUNG, H.Y.; WEINSBERG, W.G.; MANDELCO PAUL, L.; BREINNER, D.J. *Xylella fastidiosa* gen. nov. sp. nov.: gram-negative, sylem-limited fastidiosa bacteria related to *Xanthomonas* spp. **International Journal Systematic Bacteriology**, Washington, v. 37, p. 136-143, 1987.

YOUNCE, C.E.; CHANG, C.J. Detection of xylem-limited bacteria from sharpshooter leafhoppers and their feeding hosts in peach environs monitored by culture isolations and ELISA techniques. **Environmental Entomology**, College Park, v. 16, n. 1, p. 68-71, 1987.

4 IDENTIFICAÇÃO DE PLANTAS HOSPEDEIRAS DE *X. fastidiosa* PRESENTES NA VEGETAÇÃO DE COBERTURA DE POMARES DE AMEIXEIRA

Resumo

Xylella fastidiosa é uma bactéria fitopatogênica que ataca diversos cultivos de importância econômica nas Américas, entre os quais se destaca a ameixeira, devido a agressividade da doença Escaldadura das Folhas (EFA), causada por essa bactéria. Transmitida no campo por insetos vetores, *X. fastidiosa* infecta uma ampla gama de plantas hospedeiras, que podem servir como fonte de inóculo para novas infecções em diferentes culturas. O objetivo do trabalho foi identificar possíveis hospedeiros alternativos de *X. fastidiosa*, presentes em vegetação de cobertura em pomares de ameixeira no Brasil. Para isso foram amostrados cinco pomares com elevada incidência de EFA (acima de 60% de plantas sintomáticas), sendo dois no município de Videira – SC e três no município de Jarinú – SP. Em cada pomar foram coletadas amostras de raízes e folhas de cerca de 10 exemplares de espécies herbáceas predominantes nas entrelinhas. De um total de 12 espécies coletadas nos cinco pomares, nove delas (*Bidens pilosa*, *Lepidium ruderale*, *Lolium multiflorum*, *Plantago major*, *Parthenium hysterophorus*, *Raphanus sativus*, *Rumex* sp., *Solanum americanum* e *Vernonia* sp.) foram positivas para *X. fastidiosa* em folhas e/ou raízes, pelo teste de reação de polimerase em cadeia (PCR). Em casa-de-vegetação, realizou-se inoculação mecânica de três isolados representativos de *X. fastidiosa* de ameixeira (8amx, 35amx e 327amx), em mudas saudáveis (10 por isolado) de quatro das espécies nas quais a bactéria foi detectada em pomares: *B. pilosa*, *L. ruderale*, *R. sativus* e *S. americanum*. Após 45 dias da inoculação, os isolados foram recuperados de *B. pilosa* e *L. ruderale* por isolamento primário em meio de cultura 'Periwinkle wilt gelrite', e das quatro espécies por PCR, comprovando a capacidade de colonização de *X. fastidiosa* de ameixeira nessas plantas. Além disso, as plantas infectadas de *R. sativus* mostraram-se sintomáticas, com significativa redução de altura em relação plantas saudáveis. Os resultados indicam que várias plantas na entrelinha dos pomares de ameixeira hospedam *X. fastidiosa*.

Palavras-chave: Escaldadura das folhas da ameixeira; *Xylella fastidiosa*; Plantas daninhas hospedeiras; Pomares de ameixeira; *Prunus domestica*

Abstract

Xylella fastidiosa is a plant pathogen that attacks many economically important crops in the Americas, among which stands out the plum due to aggressiveness of Plum Leaf Scald (PLS) caused by this bacterium. As an insect-borne disease, *X. fastidiosa* infects a wide host range, which can serve as an inoculum source of new infections to different crops. The aim of this study was to identify alternative plant hosts of *X. fastidiosa* from the vegetation cover of plum orchards in Brazil. Five orchards with high incidence of PLS (over 60% of

symptomatic plants) were sampled, being two located at Videira - SC and three at Jarinu - SP. From each orchard, around 10 samples of the prevailing herbaceous species were collected. A total of 12 species collected in orchards, being nine of them (*Bidens pilosa*, *Lepidium ruderale*, *Lolium multiflorum*, *Plantago major*, *Parthenium hysterophorus*, *Raphanus sativus*, *Rumex* sp., *Solanum americanum* and *Vernonia* sp.) positive for *X. fastidiosa* according to Polymerase Chain Reaction (PCR) test. Mechanical inoculations, in greenhouse, were performed testing three plum isolates of *X. fastidiosa* (8amx, 35amx and 327amx) in healthy seedlings (10 per isolate) of four species which were positive for the bacteria in orchards: *B. pilosa*, *L. ruderale*, *R. sativus* and *S. americanum*. After 45 days from inoculation, bacterium isolates were recovered from *B. pilosa* and *L. ruderale* plants, by primary isolation of bacteria in 'Periwinkle wilt gelrite' culture medium, and from all species through PCR, revealing the high colonization capability of plum strain of *X. fastidiosa* in these species. Furthermore, *R. Sativus* infected plants were symptomatic; particularly its height was significantly reduced compared to healthy ones. These results indicate that several plant species within plum orchards host *X. fastidiosa*.

Keywords: Plum leaf scald; *Xylella fastidiosa*; Weed hosts; Plum orchards; *Prunus domestica*

4.1 Introdução

Xylella fastidiosa é uma bactéria fitopatogênica identificada como agente causal de várias doenças em culturas de importância econômica nas Américas, incluindo videira, citros, café e ameixeira (HOPKINS; PURCELL, 2002). Em ameixeira, causa a doença conhecida como Escaldadura das Folhas, registrada nos Estados Unidos, Paraguai e considerado fator fitossanitário limitante para a cultura no Brasil (FRENCH; KITAJIMA, 1978; RAJU et al., 1982; LEITE; LEITE JUNIOR; CERESINI, 1997; FERNANDEZ-VALIELA; BAKARCIC, 1954).

A bactéria, limitada ao xilema das plantas, é transmitida por diversas espécies de cigarrinhas que se alimentam neste tipo de vaso (Hemiptera: Cicadellidae: Cicadellinae), consideradas polípagas (REDAK et al., 2004; ALMEIDA et al., 2005). A polifagia desses insetos colabora para aumentar a gama de hospedeiros da bactéria, a medida que esta seja capaz a habitar as plantas visitadas. No entanto, mesmo para uma mesma espécie de cigarrinha, a eficiência de transmissão da bactéria difere entre plantas e é considerada resultante da especificidade entre espécie vetora – planta hospedeira – estirpe da bactéria (ALMEIDA et al., 2005, LOPES; DAUGHERTY; ALMEIDA, 2009).

Além de culturas de importância econômica, muitas outras espécies visitadas por cigarrinhas têm sido relatadas como hospedeiras de *X. fastidiosa*, porém nem sempre com manifestação de sintomas de doença (PURCELL; SOUNDERS, 1999). Além disso, pode haver preferência entre plantas sintomáticas, assintomáticas e sadias para a alimentação de diferentes espécies de cigarrinhas (DAUGHERTY; LOPES; ALMEIDA, 2010; MARUCCI et al., 2003). A relação entre espécie vegetal hospedeira e estirpe da bactéria também define o comportamento do patógeno na planta, podendo ocorrer multiplicação e/ou movimentação (PURCELL; SOUNDERS, 1999).

Estirpes de *X. fastidiosa* são agrupadas principalmente por cultura hospedeira na qual causa doença, e muitas estirpes não causam doenças em outros hospedeiros. Estirpes de citros, por exemplo, são capazes de colonizar café, enquanto que o contrário não ocorre (PRADO et al., 2008); estirpes de carvalho e videira apesar de serem monofiléticas, não são capazes de colonizar o hospedeiro em inoculações cruzadas (PURCELL; SOUNDERS, 1999). O mesmo pode ocorrer com hospedeiros alternativos, ou seja, aqueles presentes na entrelinha ou áreas adjacentes aos cultivos que podem abrigar a bactéria. Cada estirpe pode possuir uma gama própria de hospedeiros, ou ainda, a importância de uma determinada espécie vegetal como hospedeira pode diferir entre patossistemas que incluem a mesma bactéria.

Dentro de patossistemas que incluem *X. fastidiosa*, plantas hospedeiras alternativas da bactéria podem exercer papel fundamental na disseminação da doença, pois são potenciais fontes de inóculo para disseminação primária e podem permitir sobrevivência do patógeno em períodos desfavoráveis na cultura atacada, como por exemplo durante a fase de dormência de ameixeira.

Além disso, a relação espécie hospedeira x patógeno representa um importante fator para ocorrência de recombinação gênica e aumento de diversidade do patógeno (COLETTA-FILHO; BITTLESTON; ALMEIDA, 2011). Porém, considerando a relação estirpe do patógeno - espécie hospedeira – espécie vetora, podem ser considerados como hospedeiros alternativos de importância epidemiológica aqueles de ocorrência freqüente no pomar, nos quais a bactéria possa se multiplicar e se deslocar, e que ainda, sejam visitados freqüentemente por espécies vetoras.

Pomares de ameixeira no Brasil são cultivados em regiões com condições climáticas bem definidas, devido à exigência de frio da cultura, ou seja, geralmente distantes de áreas com cultivos de café e citros. Porém, é comum o cultivo de ameixeira em áreas próximas à videira, na qual *X. fastidiosa* é responsável pela doença conhecida como Mal de Pierce. Essa doença ainda não é registrada no país, mas é de grande importância na região sul dos Estados Unidos (HOPKINS; PURCELL, 2002). Ainda, de forma geral, as espécies de plantas espontâneas que ocorrem em pomares de ameixeira possuem frequência semelhante em vinhedos.

A despeito da importância da Escaldura das folhas em ameixeira (EFA), informações sobre esse patossistema são escassas e inviabilizam sua compreensão epidemiológica, dificultando o estabelecimento de medidas de controle. Neste sentido, estudos ecológicos e epidemiológicos abordando EFA permitiriam a construção de uma proposta de manejo dessa doença no campo, e forneceria subsídios para entender a relação de EFA com outras doenças causadas pelo mesmo patógeno, possibilitando a adoção de medidas pró-ativas para evitar que estirpes de *X. fastidiosa* de ameixa venham infectar videira.

Neste trabalho, avaliou-se a ocorrência de infecção natural por *X. fastidiosa* em espécies vegetais presentes na entrelinha de pomares de ameixeira, assim como a capacidade de colonização dessas espécies por estirpes de *X. fastidiosa* de ameixeira, procurando-se identificar plantas que possam contribuir para a compreensão epidemiológica do patossistema e para o manejo da doença por meio do planejamento das espécies utilizadas como cobertura de solo.

4.2 Material e Métodos

Para a coleta de plantas presentes em pomares, foram selecionados cinco pomares de ameixeira (*Prunus domestica* L.) cv. Reubennel, com incidência de EFA acima de 60%, sendo dois no município de Videira, Estado de Santa Catarina (SC), com idades de 9 (Pomar 4) e 5 anos (Pomar 5) e três no município de Jarinú, Estado de São Paulo (SP), com idades de seis (Pomar 1 e 3) e sete anos (Pomar 2).

Em cada pomar foram identificadas as espécies vegetais predominantes na entrelinha. Coletaram-se pelo menos 10 exemplares de cada espécie por pomar, para análise da presença de *X. fastidiosa*.

Para identificação das espécies vegetais, excicatas de cada morfotipo foram comparadas morfológicamente com exemplares do Herbário do Departamento de Ciências Biológicas da ESALQ/USP.

4.2.1 Avaliação de infecção natural de *X. fastidiosa* em plantas da vegetação espontânea de pomares de ameixeira

As plantas coletadas foram retiradas íntegras e levadas ao laboratório. De cada planta foi retirada uma amostra da parte aérea (consistindo em cinco pecíolos de folhas retiradas aleatoriamente) e outra de raízes (pedaços de três diferentes pontos), permitindo identificar as partes (aérea/subterrânea) da planta com presença/ausência da bactéria. A extração de DNA total foi procedida segundo método adaptado de Sunnucks e Hales (1996). Cada amostra de tecido vegetal foi macerada em 50 µl de tampão STE (NaCl 0,1 M; Tris – HCl 0,5 M; EDTA 0,01 M pH 8,0). Após, foram adicionados 15 µl de SDS (Succinato de Sódio 20%) e 2 µl de Proteinase K (20 mg/ml) e em seguida foram incubadas por 1 hora em temperatura de 55° C. Após retiradas e mantidas a temperatura ambiente por 5 minutos, foi adicionado 150 µl de NaCl 5 M sendo ao final invertidas continuamente por 5 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 30 minutos em rotação de 14.000 rpm e temperatura de 15° C para decantação da fase sólida. Após este processo foram retirados 120 µl da fase líquida e transferidos para um novo tubo. A esta fase foi adicionado isopropanol (5° C), sendo o tubo invertido por 5 min e então incubado por 2 horas a temperatura de -20° C. Passado esse período as amostras foram submetidas a centrifugação por 30 minutos a 4° C e rotação de 14.000 rpm, para decantação das cadeias de DNA ao fundo do tubo. Em seguida o conteúdo foi lavado com etanol 100% (100 µl) e centrifugados novamente nas mesmas condições porém por um período de 2 minutos. Após centrifugadas o etanol foi retirado por meio de micropipeta e em seguida colocado em estufa com ventilação e temperatura de 55° C para que ocorresse a evaporação total do álcool. Uma eliminado o álcool as cadeias de DNA foram reidratadas com 20 µl de água Miliq.

Após a extração, uma alíquota de 2 µl de cada amostra de DNA foi utilizada para reação de polimerase em cadeia ('Polimerase Chain Reaction'–PCR), com os oligonucleotídeos HL5 e HL6 que amplificam um fragmento de aproximadamente 120 pares de bases, conforme descrito por Francis et al. (2006). Ao produto da amplificação de cada amostra foi adicionado cerca de 2µL de corante (0,25% azul de

bromofenol, 40% de sacarose). As amostras foram submetidas então à eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE (89mM Tris; 89 mM Ácido Bórico e 2 mM de EDTA; pH8,0), suplementado com 0,5 µg/mL de brometo de etídio. Os fragmentos foram visualizados sob luz UV e registrados por fotodocumentador Eagle Eye II (Stratagene, CA 92037, EUA).

4.2.2 Avaliação da capacidade de colonização de espécies vegetais por estirpes de *X. fastidiosa* de ameixeira

Um segundo ensaio foi realizado com o objetivo de avaliar a capacidade de colonização de estirpes de *X. fastidiosa* de ameixeira em quatro espécies de plantas que mostraram infecção natural pela bactéria nos pomares avaliados anteriormente. Para tal, essas espécies foram produzidas a partir de sementes em casa de vegetação e transplantadas individualmente para vasos de 1,5 litros contendo substrato Rendmax (composto a base de casca de pínus, vermiculita expandida e carvão moído) com adubação de base com N-P-K 10:20:20 (aproximadamente 5 g/vaso).

Quando as plantas atingiram aproximadamente 10 cm de altura, realizou-se inoculação de isolados de *X. fastidiosa* de ameixeira por meio da técnica de perfuração com alfinete ('pin-pricking') desenvolvida por Hopkins (1985) e adaptada por Almeida et al. (2001). Inocularam-se três isolados representativos de grupos genéticos distintos, identificados anteriormente por meio da técnica de Multi Locus Sequence Typing (MLST), sendo 35amx representante do grupo predominante que ocorre em ameixeira, e 327amx e 8amx representantes de grupos genéticos de ocorrência mais rara (Colleta Filho, dados não publicados).

Os isolados foram recuperados de estoque mantido em ultrafreezer e plaqueados em meio sólido 'Periwinkle wilt gelrite' - PWG (HILL; PURCELL, 1995), para multiplicação. Colônias resultantes foram retiradas das placas com alça bacteriológica e adicionadas em 1 mL de tampão fosfato salino (PBS) até a obtenção de uma suspensão túrgida. Uma alíquota foi retirada para diluições em série, que foram plaqueadas em meio de cultura, permitindo a contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC) viáveis na suspensão, conforme descrito por Almeida et al. (2001).

Os isolados foram inoculados em 10 plantas de cada espécie vegetal, depositando-se uma gota de 5 µl da suspensão bacteriana em um ponto da haste de

cada planta, e perfurando-se o ponto 5-7 vezes com alfinete entomológico No. 0 para que ocorresse absorção da suspensão. Como controle negativo, 10 plantas de cada espécie foram inoculadas somente com tampão PBS. Após a inoculação, as plantas permaneceram em casa de vegetação por um período de 30-45 dias, ocasião na qual foram avaliadas quanto à presença/ausência de *X. fastidiosa*.

A avaliação foi realizada por meio de PCR com oligonucleotídeos ('primers') específicos para *X. fastidiosa*, conforme descrito anteriormente, e por meio de isolamento primário em meio de cultura sólido PWG (HILL; PURCELL, 1995). Para isolamento primário foram utilizadas amostras de 0,10 a 0,12 g de tecido vegetal (pecíolos) que passaram inicialmente por esterilização superficial por meio de banhos sucessivos de 2 min em soluções de álcool (92,8% - 1 vez), hipoclorito (2% - 1 vez) e água esterilizada (3 vezes). Em seguida, as amostras foram maceradas em 2 mL de tampão PBS, usando-se homogeneizador tipo Turrax (modelo MA102, Marconi) por 10 a 15 s. Entre uma trituração e outra, a haste foi desinfetada por imersão em recipientes contendo água destilada autoclavada (5 s), álcool 92,8% (15 s) e novamente água destilada autoclavada (5 s). A suspensão homogeneizada foi diluída 10 e 100x em PBS autoclavado. Após a diluição, uma alíquota de 20 µl de cada diluição foi plaqueada em meio PWG. As placas foram acondicionadas em estufa à temperatura de 28°C, sendo avaliadas sob microscópio estereoscópico aos 14, 21 e 30 dias do plaqueamento, quanto ao número de UFC na alíquota. A concentração bacteriana (C), medida em número de UFC por grama de tecido vegetal (UFC/g) foi calculada com base no peso inicial das amostras foliares e nas diluições do material vegetal em tampão PBS, utilizando-se a fórmula: $C = 100 \cdot (1/p) \cdot \text{UFC} \cdot (10)^n$, em que n é o fator de diluição e p, peso da amostra foliar (g). Amostras de colônias recuperadas no meio de cultura foram submetidas ao teste de PCR com oligonucleotídeos específicos para *X. fastidiosa*, com o objetivo de confirmar sua identidade.

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Detecção de *X. fastidiosa* em plantas coletadas na entrelinha de pomares de ameixeira

A composição vegetal predominante na entrelinha diferiu entre os pomares, especialmente entre as duas regiões estudadas. Avaliou-se um total de 12 espécies

herbáceas distribuídas em seis famílias botânicas (Tabela 1), principalmente espécies de porte médio-elevado, considerando-se que tais plantas apresentariam uma maior probabilidade de serem visitadas por espécies de cigarrinhas arborícolas, que possivelmente se alimentam de ameixeira e seriam potenciais vetoras de *X. fastidiosa* nessa cultura .

Tabela 1 – Espécies vegetais amostradas em entrelinha de pomares de ameixeira nos municípios de Jarinu (SP) e Videira (SC)

Família	Espécie	Nome comum	Localidade
Asteraceae	<i>Parthenium hysterophorus</i> L.	Losna-branca	Jarinu
	<i>Emilia sonchifolia</i> L.	Falsa-serralha	Videira
	<i>Sonchus asper</i> (L.) Hill	Serralha-de-espinho	Jarinu
	<i>Bidens pilosa</i> L.	Picão-preto	Jarinu
	<i>Arctium minus</i> (Hill) Bernh	Bardana	Jarinu
	<i>Vernonia</i> sp.	Mata-campo	Videira
Brassicaceae	<i>Lepidium ruderale</i> L.	Mastruço	Jarinu
	<i>Raphanus sativus</i> L.	Nabo-forrageiro	Videira
Plantaginaceae	<i>Plantago major</i> L.	Tansagem	Videira
Poaceae	<i>Lolium multiflorum</i> L.	Azevém	Videira
Polygonaceae	<i>Rumex</i> sp. L.	Língua-de-vaca	Jarinu e
			Videira
Solanaceae	<i>Solanum americanum</i> Mill	Maria-pretinha	Jarinu

Das sete espécies amostradas em pomares de Jarinu (SP), seis apresentaram-se positivas para a presença de *X. fastidiosa* por meio de Teste de PCR (Tabela 2). *Bidens pilosa* L. e *Sonchus asper* (L.) Hill foram predominantes nos três pomares amostrados, e *S. americanum* em dois, indicando serem plantas comumente encontradas nessa região, e potencialmente relevantes no patossistema da EFA.

Embora tenha sido coletada em todos os pomares de Jarinu (SP), nenhuma de um total de 30 amostras de *S. asper* mostrou-se infectada por *X. fastidiosa*. Hipoteticamente, esta planta pode não ser uma hospedeira procurada pelas cigarrinhas ou adequada para a alimentação e inoculação bacteriana, porém não existem estudos na literatura abordando a associação de cigarrinhas com a mesma. Outra hipótese que poderia explicar a ausência de *X. fastidiosa* em amostras de *S. asper* seria uma possível incapacidade da bactéria para infecção e/ou colonização

de tecidos vegetais desta planta, mesmo ocorrendo a inoculação por cigarrinhas, o que a caracterizaria como uma planta não hospedeira de *X. fastidiosa*. Da mesma forma, *Arctium minus* (Hill) Bernh não apresentou nenhuma amostra positiva, embora coletada em apenas um pomar. Entretanto, o número de amostras avaliadas, embora significativo, não é suficientemente elevado para descartar a ocorrência de infecção natural por *X. fastidiosa* nessas espécies vegetais.

Por outro lado, *B. pilosa* e *Solanum americanum* Mill apresentaram percentuais elevados de plantas diagnosticadas como positivas para a presença da bactéria. A proporção de plantas infectadas de *B. pilosa* variou entre os pomares, porém em todos eles foi constatada a presença da bactéria tanto na parte aérea como em raiz, chegando a 83% de amostras de parte aérea positivas no Pomar 2 (Tabela 2). Diagnóstico semelhante foi obtido para *S. americanum* com muitas amostras positivas tanto em raiz como em parte aérea, e percentuais variando entre 20 e 75%. De ocorrência menos frequente, *Lepidium ruderale* L. foi encontrada apenas no pomar 1 de Jarinu (SP), porém com elevada proporção de plantas infectadas pela bactéria (70 - 90%) (Tabela 2).

Exemplares de *B. pilosa* já haviam sido identificados com infecção natural por *X. fastidiosa* em estudo anterior, porém, em coletas realizadas em pomares de citros (LOPES et al., 2003), o que indica que essa espécie invasora, muito comum na entrelinha de pomares, pode hospedar diferentes estirpes da bactéria. Leite et al. (1997) avaliaram plantas de *B. pilosa* coletadas em pomares de ameixeira em dois municípios do estado do Paraná, e das 17 amostras avaliadas, em nenhuma foi detectada a presença de *X. fastidiosa*. No entanto, além de cada pomar ser considerado como um ecossistema particular a ser avaliado, no estudo realizado pelos últimos autores não foram utilizadas as mesmas técnicas de diagnóstico, sendo que a técnica de PCR adotada neste estudo é considerada mais sensível para detecção de *X. fastidiosa* quando comparada ao teste de ELISA, utilizada por aqueles autores.

Tabela 2 – Proporção e percentual (%) de detecção de *Xylella fastidiosa* por PCR em amostras de raízes e folhas de plantas herbáceas coletadas na entrelinha de pomares de ameixeira no município de Jarinú (SP). Outubro/2010

Espécie vegetal	Pomar 1		Pomar 2		Pomar 3	
	Raiz	Folha	Raiz	Folha	Raiz	Folha
<i>Arctium minus</i>	- ^a	-	0/10 (0) ^b	0/10 (0)	-	-
<i>Bidens pilosa</i>	2/14 (14)	0/14 (0)	4/6 (66)	5/6 (83)	1/8 (12,5)	2/8 (25)
<i>Lepidium ruderale</i>	7/10 (70)	9/10 (90)	-	-	-	-
<i>Parthenium hysterosphorus</i>	-	-	4/10 (40)	0/10 (0)	-	-
<i>Rumex sp.</i>	0/5 (0)	1/5 (20)	-	-	-	-
<i>Sonchus asper</i>	0/10 (0)	0/10 (0)	0/10 (0)	0/10 (0)	0/10 (0)	0/10 (0)
<i>Solanum americanum</i>	-	-	3/4 (75)	3/4 (75)	2/10 (20)	6/10 (60)

^a -: espécie não foi amostrada no referido pomar.

^b Número de amostras positivas para *X. fastidiosa* sobre o total de amostras coletadas. O percentual de amostras contendo a bactéria está apresentado entre parênteses.

Nos pomares localizados em Videira – SC (Pomar 4 e 5) a composição vegetal da entrelinha foi bastante similar, sendo possível a coleta das mesmas espécies nos dois pomares (Tabela 3).

Entre as plantas avaliadas, *Lolium multiflorum* L. (azevém) e *Raphanus sativus* L. (nabo forrageiro) são utilizadas comumente pelos produtores da região como cobertura de solo nos pomares. As demais espécies são consideradas plantas invasoras e de forma geral são manejadas por meio de poda. Em amostras de ambas as espécies, tanto em parte aérea quanto em raiz, foi detectada a presença da bactéria. Azevém apresentou taxa de infecção de 100% em plantas amostradas no Pomar 5 (Tabela 2), sendo detectada a presença da bactéria apenas em amostras da parte aérea. Já no Pomar 4 apenas em uma amostra foi detectada a presença da bactéria, sendo essa, amostra de raiz. Leite et al. (1997) também obtiveram 100% de amostras positivas de azevém coletado em pomar com EFA.

Estes dados demonstram que azevém pode hospedar a bactéria, e possivelmente atue como fonte de inóculo para infecções de plantas nos pomares. Embora os 'primers' utilizados no teste de PCR não sejam específicos para estirpes

de ameixeira, todos os pomares amostrados eram circundados por outros pomares de ameixeira e pessegueiro ou áreas de mata, ou seja, não havia nas proximidades cultivos de citros ou de cafeeiro, plantas que poderiam hospedar outras estirpes da bactéria. Desta forma, mesmo considerando a possibilidade de estirpes silvestres, a probabilidade de a bactéria detectada ser de estirpes que infectam ameixeira é significativa.

Azevém é uma das espécies mais utilizadas na entrelinha dos pomares como cobertura de solo na região sul, e os dados obtidos neste estudo colaboram no sentido de auxiliar na escolha das espécies a serem utilizadas na cobertura do solo, visando diminuir a gama de hospedeiros alternativos do patógeno que possam contribuir para a disseminação da doença em ameixeira.

Das seis espécies coletadas em pomares no município de Videira (SC), apenas *Emilia sonchifolia* L. (falsa-serralha) não apresentou amostras infectadas por *X. fastidiosa* (Tabela 3). Além do azevém, *Vernonia* sp. (mata-campo) e *Rumex* sp. (língua-de-vaca) também se destacaram pela frequência de amostras infectadas. *Rumex* sp. já é conhecida como hospedeira de insetos que são pragas em várias culturas (SCOTT; SAGLIOCO, 1991). Embora este seja o primeiro relato de mata-campo como hospedeiro de *X. fastidiosa*, observou-se que essa é uma planta bastante visitada por cigarrinhas vetoras. Durante a coleta das amostras vegetais em Videira (SC) foram observados espécimes das cigarrinhas *Macugonalia leucomelas* (Walker) e *Sibovia sagata* (Signoret) (Hemiptera: Cicadellidae: Cicadellinae) em hastes e folhas de todas as plantas amostradas do Pomar 5 mas não no Pomar 4, que no entanto apresentava incidência de plantas com EFA (aproximadamente 85%) superior à observada no pomar 5 (60%). Ambas as espécies de cigarrinhas foram comprovadas experimentalmente como vetoras de *X. fastidiosa* em ameixeira (Capítulo 1).

A proporção de plantas diagnosticadas como positivas diferiu entre os pomares, possivelmente devido a diferenças na composição de espécies de cigarrinhas presente em cada um dos pomares. Cicadelineos vetores de *X. fastidiosa*, embora sejam majoritariamente polífagas, mostram diferenças quanto à preferência por plantas hospedeiras e/ou locais de alimentação nas plantas, o que pode influenciar significativamente a sua competência como vetores (LOPES; DAUGHERTY; ALMEIDA, 2009; DAUGHERTY; LOPES; ALMEIDA, 2010). Assim, é

plausível que a preferência alimentar de cigarrinhas por determinadas espécies vegetais possa determinar a taxa de infecção natural de *X. fastidiosa* em diferentes plantas hospedeiras. Portanto, sugere-se que em novos estudos dessa natureza, seja também avaliada a comunidade de espécies de cicadélíneos vetores da bactéria na vegetação estudada.

Considerando que a maior parte das espécies vegetais amostradas nos pomares se propagam por sementes, e que a transmissão de *X. fastidiosa* por sementes é pouco frequente (LARANJEIRA et al., 2005), supõe-se que infecção natural dessas plantas tenha ocorrido via inoculação por cigarrinhas que se alimentam na parte aérea (hastes e/ou folhas jovens) dessas espécies vegetais. Desta forma, a presença de *X. fastidiosa* nas raízes indica a movimentação da bactéria de forma sistêmica nas plantas.

Tabela 3 – Percentual (%) de detecção de *Xylella fastidiosa* por PCR em 10 amostras da parte aérea e de raízes de plantas herbáceas coletadas na entrelinha de pomares de ameixeira em Videira (SC). Maio/2010

Espécie	Pomar 4		Pomar 5	
	Raiz	Aérea	Raiz	Aérea
<i>Plantago major</i>	0	10	10	20
<i>Lolium multiflorum</i>	10	0	0	100
<i>Rumex</i> sp.	20	30	0	20
<i>Emilia sonchifolia</i>	0	0	0	0
<i>Raphanus sativus</i>	10	10	0	0
<i>Vernonia</i> sp.	70	60	0	0

4.3.2 Capacidade de colonização de plantas por estirpes de *X. fastidiosa* de ameixeira

Quatro espécies de plantas foram avaliadas no estudo de infecção e colonização por três isolados de *X. fastidiosa* proveniente de ameixeira, mediante inoculação mecânica em casa-de-vegetação. *B. pilosa*, *S. americanum*, *R. sativus* e *L. ruderales*. Dessas, apenas *L. ruderales* e *B. pilosa* apresentaram colonização bacteriana detectada por isolamento primário em meio de cultura; no entanto, a

presença das bactérias foi detectada nas quatro espécies por meio de PCR (Tabela 4). Como controle foram inoculadas 10 plantas de cada espécie apenas com o tampão PS.

Tabela 4 – Percentual (%) de plantas positivas (n = 10 plantas testadas por espécie vegetal) para *Xylella fastidiosa* por meio de isolamento primário (IP) e reação de polimerase em cadeia (PCR), após 45 dias da inoculação mecânica de três isolados desta bactéria provenientes de ameixeira

Espécie vegetal	Isolado 8amx			Isolado 327amx			Isolado 35amx		
	IP	População ^a	PCR	IP	População ^a	PCR	IP	População ^a	PCR
<i>Bidens pilosa</i>	10	3,6 x 10 ⁵	20	10	12,4 x 10 ⁵	90	10	7,2 x 10 ⁴	50
<i>Lepidium ruderale</i>	10	2,3 x 10 ⁵	30	60	3,7 x 10 ⁶	100	30	3,9 x 10 ⁶	100
<i>Raphanus sativus</i>	nd ^b	nd	80	nd	nd	80	nd	nd	100
<i>Solanum americanum</i>	0	-	50	0	-	60	0	-	50

^a Mediana do número de unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de tecido vegetal.

^bnd: não determinado devido à alta taxa de microrganismos contaminantes no isolamento primário.

A análise feita por PCR foi realizada com folhas das plantas destacadas entre 8-10 cm acima do ponto de inoculação. Desta forma, o DNA detectado nas plantas não seriam resíduos de bactérias inoculadas que poderiam ter vindo a morrer na planta, mas de células bacterianas que estabeleceram infecção, deslocando-se a uma distância de pelo menos 8 cm do ponto de inoculação. As menores taxas de detecção de *X. fastidiosa* por meio de isolamento primário provavelmente se devem à ocorrência de baixas populações bacterianas nas plantas infectadas, com concentrações de células inferiores ao limiar mínimo detectável por esta técnica (10³-10⁴ células por g de tecido vegetal).

As populações encontradas nas amostras foram da ordem de 10⁴ a 10⁶ UFC por grama de tecido vegetal, com pouca variação entre os isolados. No entanto 60% das amostras de *L. ruderale* apresentaram crescimento de colônias da bactéria quando inoculadas com o isolado 327 amx, demonstrando a habilidade desse isolado em colonizar esta espécie vegetal, apresentando populações na ordem de 10⁶ UFC/g tecido nas seis plantas infectadas (dados não apresentados).

Uma das dificuldades para isolamento primário de *X. fastidiosa* em amostras de *R. sativus* foi o crescimento rápido de outros organismos contaminantes em meio de cultura em diluições na ordem de 10⁻¹ e 10⁻². O crescimento rápido de fungos e leveduras impediu a avaliação do crescimento de *X. fastidiosa*, uma vez que as

primeiras colônias só puderam ser observadas em outras amostras 15 dias após o isolamento primário. Porém, por meio da técnica de PCR pôde-se observar um percentual extremamente elevado (80-100%) de plantas positivas para a presença da bactéria (Tabela 4). Além disso, em casa de vegetação foi possível observar redução de porte nas plantas inoculadas, como um possível sintoma da colonização da bactéria nos vasos de xilema desta planta (Figura 1). A altura média das plantas de *R. sativus* do controle negativo ($55,4 \pm 5,2$ cm) foi superior à altura das plantas inoculadas com os isolados 8amx ($33,1 + 8,7$ cm), 327amx ($42,6 + 4,3$ cm) e 35amx ($37,4 + 6,1$ cm) (Tukey, $P < 0.05$).



Figura 1 – Plantas de *Raphanus sativus* (nabo-forrageiro) inoculadas por diferentes isolados de *Xylella fastidiosa* de ameixeira, mostrando redução na altura em relação à testemunha não inoculada (controle negativo)

Sintomas relacionados à diminuição da altura de plantas também são observados em outros hospedeiros colonizados por *X. fastidiosa*, como por exemplo em plantas de alfafa colonizadas por estirpes de *X. fastidiosa* de videira e amendoeira (LOPES; DAUGHERTY; ALMEIDA, 2010).

A infecção da bactéria em *S. americanum* (maria-pretinha) foi comprovada apenas por meio de PCR no presente estudo; porém, Lopes et al. (2003) obtiveram crescimento bacteriano a partir de isolamento primário de amostras de plantas inoculadas mecanicamente com estirpes de *X. fastidiosa* de citros e cafeeiro, reforçando a identificação desta espécie invasora como hospedeira da bactéria. Por outro lado, Lopes et al. (2003) não observaram colonização de *B. pilosa* por um isolado de *X. fastidiosa* de ameixeira inoculado mecanicamente, enquanto que no presente estudo os três isolados de *X. fastidiosa* de ameixeira inoculados nessa planta puderam ser recuperados por isolamento primário em meio de cultura,

confirmando que *B. pilosa* permite a multiplicação bacteriana, podendo atuar como hospedeira do patógeno. O mastruço, *L. ruderales*, foi a planta que possibilitou maior taxa de recuperação desses isolados (Tabela 4).

Desta forma, os dados demonstram que as espécies vegetais inoculadas mecanicamente são hospedeiras de estirpes de *X. fastidiosa* de ameixeira, e potenciais fontes de inóculo para disseminação primária do patógeno, devendo ser eliminadas das áreas produtoras. Neste contexto, torna-se importante a continuidade deste estudo de forma a identificar plantas não hospedeiras da bactéria que possam ser usadas como cobertura de solo, sem riscos de contribuírem para o avanço de epidemias de EFA.

4.4 Conclusão

Infecções naturais de *X. fastidiosa* foram detectadas por meio de PCR em *Bidens pilosa*, *Lepidium ruderales*, *Lolium multiflorum*, *Plantago major*, *Parthenium hysterophorus*, *Raphanus sativus*, *Rumex* sp., *Solanum americanum* e *Vernonia* sp., em amostras de parte aérea e de raízes coletadas em pomares, demonstrando a capacidade de movimentação da bactéria nestas plantas.

Isolados representativos de *Xylella fastidiosa* de ameixeira são capazes de colonizar 'seedlings' de *B. pilosa*, *L. ruderales*, *R. sativus* e *S. americanum*, após inoculação mecânica em casa de vegetação.

R. sativus apresenta redução na altura quando infectado por isolados de *X. fastidiosa* de ameixeira.

Referências

ALMEIDA, R.P.P.; BLUA, M.J.; LOPES, J.R.S.; PURCELL, A.H. Vector transmission of *Xylella fastidiosa*: applying fundamental knowledge to generate disease management strategies. **Annals of the Entomological Society of America**, Lanham, v. 98, p. 775-786, 2005.

ALMEIDA, R.P.P.; PEREIRA, E.F.; PURCELL, A.H.; LOPES, J.R.S. Multiplication and movement of a citrus strain of *Xylella fastidiosa* within sweet orange. **Plant Disease**, Washington, v. 85, n. 45, p. 382-382, 2001.

COLETTA-FILHO, H.D.; BITTLESTON, S.; ALMEIDA, R.P.P. Spatial genetic structure of a vector-borne generalist pathogen. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 77, p. 2596-2601, 2011.

DAUGHERTY, M.P.; LOPES, J.; ALMEIDA, R.P.P. Vector within-host feeding preference mediates transmission of a heterogeneously distributed pathogen. **Ecological Entomology**, Lanham, v. 35, p. 360-366, 2010.

FERNANDEZ-VALIELA, M.V.; BAKARCIC, M. Nuevas enfermedades del ciruelo en el delta del Paraná, Argentina. **Informativo Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria**, Buenos Aires, n. 84, p. 2-6, 1954.

FRANCIS, M.; LIN, H.; CABRERA-LA ROSA, J.; DODDAPANENI, H.; CIVEROLO, E.L. Genome-based PCR primers for specific and sensitive detection and quantification of *Xylella fastidiosa*. **European Journal of Plant Pathology**, Droevendaal, v. 115, p. 203-213, 2006.

FRENCH, W.J.; KITAJIMA, E.W. Occurrence of plum leaf scald in Brazil and Paraguay. **Plant Disease Reporter**, Washington, v. 62, p. 1035-1038, 1978.

HILL, B.L.; PURCELL, A.H. Multiplication and movement of *Xylella fastidiosa* within grapevine and four other plants. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 85, n. 11, p. 1368-1372, 1995.

HOPKINS, D.L. Physiological and pathological characteristics of virulent and avirulent strains of the bacterium that causes Pierce's disease of grapevine. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 75, p. 713-717, 1985.

HOPKINS, D.L.; PURCELL, A.H. *Xylella fastidiosa*: cause of Pierce's disease of grapevine and other emergent diseases. **Plant Disease**, Washington, v. 86, n. 10, p. 1056-1066, 2002.

LARANJEIRA, F.F.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; COLETTA FILHO, H.D. Fungos, procaríotos e doenças abióticas. In: MATTOS JÚNIOR, D.; DeNEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JÚNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico de Campinas; FUNDAG, 2005. p. 509-566.

LEITE, R.M.V.B.C.; LEITE JUNIOR, R.P.; CERESINI, P.C. Hospedeiros alternativos de *Xylella fastidiosa* entre plantas invasoras de pomares de ameixeira com escaldadura da folha. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 1, p. 54-57, 1997.

LOPES, J.R.S.; DAUGHERTY, M.P.; ALMEIDA, R.P.P. Context-dependent transmission of a generalist plant pathogen: host species and pathogen strain mediate insect vector competence. **Entomology Experimentalis at Applicata**, Washington, v. 131, p. 216-224, 2009.

_____. Strain origin drives virulence and persistence of *Xylella fastidiosa* in alfalfa. **Plant Pathology**, Malden, v. 59, p. 963-971, 2010.

LOPES, S.A.; MARCUCCI, S.; TORRES, S.C.Z.; SOUZA, V.; FAGAN, C.; FRANÇA, S.C. Weeds as alternative host of the citrus, coffee and plum strains of *Xylella fastidiosa* in Brazil. **Plant Disease**, Washington, v. 87, n. 5, p. 544-549, 2003.

MARUCCI, R.C.; LOPES, J.R.S.; VENDRAMIN, J.D.; CORRENTE, J.E. Influence of *Xylella fastidiosa* infection of citrus on host selection by leafhopper vectors. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Midlothian, v. 117, p. 95-103, 2005.

NEWMAN, K.L.; ALMEIDA, R.P.; PURCELL, A.S.; LINDOW, S.E. Cell-cell signaling controls *Xylella fastidiosa* interactions with both insects and plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 101, n. 6, p. 1737-1742, 2004.

PRADO, S.S.; LOPES, J.R.S.; DEMETRIO, C.G.B.; BORGATTO A.F.; ALMEIDA, R.P.P. Host colonization differences between citrus and coffee isolates of *Xylella fastidiosa* in reciprocal inoculation. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 65, p. 251-258, 2008.

PURCELL, A.H.; SAUNDERS, S.R. Fate of Pierce's disease strains of *Xylella fastidiosa* in common riparian plants in California. **Plant Disease**, Washington, v. 83, n. 9, p. 825-830, 1999.

RAJU, B.C.; WELLS, J.M.; NYLAND, G.; BRLANSKY, R.H.; LOWE, S.K. Plum leaf scald isolation culture and pathogenicity of the causal agent. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 72, p. 1460-1466, 1982.

REDAK, R.A.; PURCELL, A.H.; LOPES, J.R.S.; BLUA, M.J.; MIZELL III, R.F.; ANDERSEN, P.C. The biology of xylem fluid-feeding insect vectors of *Xylella fastidiosa* and their relation to disease epidemiology. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 49, p. 243-270, 2004.

SCOTT, J.; SAGLIOCCO, J. Host-specificity of a root borer *Bembecia chrysidiformis* (Lep.: Sesiidae) a potential control agent for *Rumex* spp. in Australia. **BioControl**, Dordrecht, v. 36, n. 2, p. 235-244, 1991.

SUNNUCKS, P.; HALES, D.F. Numerous transposed sequences of mitochondrial cytochrome oxidase i-ii in aphids of the *Genus sitobion* (Hemiptera: Aphididae), **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 13, n. 3, p. 510-524, 1996.

5 ASPECTOS BIOLÓGICOS DAS ESTIRPES DE AMEIXEIRA, CITROS E CAFEIRO DE *Xylella fastidiosa* EM PLANTAS HOSPEDEIRAS

Resumo

No presente trabalho foram comparadas possíveis diferenças nos aspectos biológicos dos diferentes isolados de *X. fastidiosa* avaliando comparativamente a capacidade de infecção, multiplicação e/ou patogenicidade de isolados de *X. fastidiosa* de ameixeira, citros e cafeeiro nas respectivas plantas hospedeiras em combinações homologas e heterólogas. Dois isolados da estirpe de ameixeira (327amx e 66amx), três da estirpe de citros (124D, CV21 e 9a5c) e três da estirpe de cafeeiro (33, 6756, 3124) foram inoculados nas 3 plantas hospedeiras (ameixeira, citros e cafeeiro) em concentrações variando entre 10^8 a 10^{14} unidades formadoras de colônias/mL. As plantas foram avaliadas após 4 e 8 meses da inoculação por isolamento em meio de cultura e após 1 ano da inoculação por "polymerase chain reaction" (PCR). O isolado da estirpe de ameixeira de *X. fastidiosa* 327 amx infectou uma proporção maior de plantas de ameixeira, mas também infectou citros e cafeeiro. Os isolados de citros infectaram uma proporção maior de plantas de citros quando comparado com as outras combinações homólogas e também recuperou uma população bacteriana maior. Nas combinações heterólogas as estirpes de citros e cafeeiro colonizaram ambas plantas hospedeiras, no entanto ambas estirpes nunca colonizaram plantas de ameixeira.

Palavras-chave: Inoculação cruzada; Combinação heteróloga; População bacteriana; Colonização

Abstract

In this study we compared possible differences in the biological aspects of different strains of *X. fastidiosa* comparatively evaluating the ability of infection, proliferation and/or pathogenicity of plum, citrus and coffee strains of *X. fastidiosa* in their host plants in homologous and heterologous combinations. Two isolated of plum strain (327amx and 66amx), three of citrus strain (124D, CV21 and, 9a5c) and three of coffee strain (33, 6756 and, 3124) were inoculated in three host plants (plum, citrus and coffee) at concentrations ranging from 10^8 to 10^{14} colony forming units/mL. Plants were assessed 4 and 8 months after inoculation by isolation in culture medium and 1 year after inoculation by "polymerase chain reaction" (PCR). The plum strain 327amx of *X. fastidiosa* infected higher proportion of plum plants, but also infected citrus and coffee. The citrus strains infected a higher proportion of citrus plants when compared with other homologous combinations and also recovered a higher bacterial population. In heterologous combinations both of citrus and coffee strains colonized both host plants, however both strains never colonized plum plants.

Keywords: Cross inoculation; Heterologous combinations; Bacterial population; Colonization

5.1 Introdução

A “Escaldadura das folhas da ameixeira” (EFA) é uma doença causada pela bactéria *Xylella fastidiosa* (WELLS et al., 1987), que coloniza exclusivamente os vasos do xilema da planta (RAJU et al., 1982). No Brasil, a ameixeira se destaca tanto pela relevância econômica quanto social, ou seja, proporciona elevada rentabilidade por área e necessita de intensa mão-de-obra para seu cultivo (DUCROQUET; ANDRADE; HICKEL, 2001). Embora o Brasil apresente condições edafoclimáticas adequadas para a ameixeira, a EFA tem limitado a expansão da cultura ou até inviabilizado o seu cultivo em regiões de alta incidência (CASTRO; NAKASU; PEREIRA, 2008).

X. fastidiosa causa outras doenças de importância no Brasil, tais como a Clorose variegada dos citros (CVC) e a Atrofia dos ramos do cafeeiro (ARC). Esta bactéria possui uma ampla gama de plantas hospedeiras; além de plantas cultivadas, coloniza diversas espécies silvestres e plantas daninhas, que apresentam-se, na maioria das vezes, assintomáticas, podendo atuar como fontes de inóculo (MCELTRONE; SHERALD; POOLER, 1999; LOPES et al., 2003). O principal modo de transmissão de *X. fastidiosa* é por insetos vetores, que são cigarrinhas da subfamília Cicadellinae (Hemiptera: Cicadellidae: Cicadellinae), e se alimentam nos vasos do xilema das plantas (REDAK et al., 2004). Os insetos vetores asseguram a disseminação de *X. fastidiosa* no campo e as plantas hospedeiras servem como reservatórios naturais da bactéria. A presença de múltiplas espécies de cigarrinhas vetoras, aliada à polifagia e mobilidade desses insetos parece contribuir para a ocorrência da bactéria em habitats variados e a colonização de diversas espécies vegetais. Por outro lado, a diversidade de condições ambientais e plantas hospedeiras a que esta bactéria tem sido exposta pode ter propiciado a evolução de grupos genéticos distintos, que diferem em certos aspectos biológicos, como por exemplo, na capacidade de colonização e patogenicidade a determinadas plantas hospedeiras.

Com base nos estudos genéticos, características de crescimento em meio de cultura e resistência a antibióticos, as estirpes de *X. fastidiosa* foram agrupadas em quatro subespécies (SHAAD et al., 2004, SCHUENZEL et al., 2005). A subsp. *multiplex* inclui estirpes patogênicas a hospedeiros como pessegueiro, ameixeira, amendoeira entre outras. A subsp. *Pauca* agrupa as

estirpes patogênicas de citros e cafeeiro da América do Sul. A subsp. *fastidiosa* reúne as estirpes de *X. fastidiosa* que causam doença em videira, alfafa, amendoeira e plátanos (SHAAD et al., 2004), enquanto que a subsp. *sandyi* agrupa as estirpes da bactéria que causam doença em espirradeira e magnólia (SCHUENZEL et al., 2005).

Considerando-se a variabilidade genética existente em *X. fastidiosa*, inclusive dentro de um mesmo grupo genético (ALMEIDA et al., 2008; COLLETA-FILHO et al., 2011) e ocorrência simpátrica de grupos distintos em uma região, torna-se importante conhecer suas características biológicas, especialmente suas relações com diferentes plantas cultivadas e vetores. Estudos genéticos e biológicos comparando-se estirpes de *X. fastidiosa* podem prover informações relevantes para a compreensão de possíveis relações entre as doenças causadas pela bactéria em culturas agrícolas associadas, assim como, para indicar possíveis medidas de manejo dessas doenças. No presente estudo comparou-se a capacidade de infecção e multiplicação de isolados de *X. fastidiosa* provenientes de ameixeira, citros e cafeeiro, em inoculações recíprocas.

5.2 Material e Métodos

5.2.1 Plantas e isolados de *X. fastidiosa* utilizados

Mudas sadias de citros e cafeeiro foram obtidas por meio de sementes e as de ameixeira foram adquiridas após propagação vegetativa por meio de enxertia de gemas provenientes de plantas sadias. Antes das inoculações mecânicas, as plantas de propagação vegetativa foram avaliadas quanto à sanidade através do teste de PCR, utilizando-se primers específico para *X. fastidiosa*. Foram utilizadas mudas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) cv. Catuaí Vermelho (clone 144), de laranja doce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) cv. Caipira e de ameixa (*Prunus domestica* L.) cv. Reubennel. Para padronização do tamanho de mudas de cada hospedeiro, estas foram submetidas à poda drástica 30 dias antes da inoculação bacteriana.

A inoculação bacteriana foi realizada na haste das plantas, a uma altura de 3 a 5 cm acima da base da brotação, em ponto próximo à inserção de pecíolos. Cada planta foi individualmente etiquetada para posterior avaliação taxa de infecção. Após a inoculação, todas as plantas foram mantidas constantemente em

estufa telada, à prova de insetos vetores, em sacos plásticos com capacidade de 4L, contendo substrato comercial (Rendimax, Eucatex, Piratininga – SP) com irrigação e adubação adequadas ao seu desenvolvimento. A cada 3 semanas, as plantas foram tratadas preventivamente com inseticidas e acaricidas para impedir a ocorrência de pragas.

Foram utilizados dois isolados de *X. fastidiosa* provenientes de ameixeira com EFA (66amx e 327amx), representativos de grupos geneticamente distintos com base em análise de ‘multilocus sequence typing’ (MLST) (H. DELLA COLETTA-FILHO, informação pessoal); três isolados da estirpe de citros (124D, CV21 e 9a5c); e três da estirpe de cafeeiro (33cf, 6756cf e 3124cf) os quais já haviam sido utilizados em outro estudo (COLLETA-FILHO et al., dados não publicados; PRADO et al., 2008; ALMEIDA et al., 2008).

5.2.2 Inoculação bacteriana

Os isolados foram retirados do estoque de bactéria mantido em ultra freezer (-80°C) e foram plaqueados em meio de cultura sólido (‘periwinkle wilt gelrite’ - PWG), para crescimento e multiplicação das colônias bacterianas a 28°C. As colônias recuperadas foram retiradas das placas com uma alça bacteriológica, em câmara de fluxo laminar, e ressuspensas em 1 ml de solução de tampão fosfato salino (PBS) até a obtenção de uma suspensão concentrada. Uma alíquota da suspensão resultante foi retirada para diluições em série e subsequente plaqueamento em meio de cultura ‘Periwinkle wilt gelrite’ (PWG) (HILL; PURCELL, 1995), para contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC), permitindo assim uma estimativa da concentração de células viáveis no inóculo bacteriano. As plantas-teste foram inoculadas mecanicamente com suspensões cuja concentração bacteriana variou entre 10^8 a 10^{14} UFC/mL, dependendo do isolado (Tabela 1), em um período de tempo total de 14 a 25 min.

Para inoculação bacteriana nas plantas, utilizou-se a técnica de perfuração com alfinete (‘pin-pricking’) descrita por Hopkins (1985). Para isso, uma gota de 5 μ L da suspensão bacteriana foi pipetada em um ponto da haste de cada planta, perfurando-se de 5-7 vezes o ponto com alfinete entomológico n° 0, para que ocorresse absorção da suspensão. Os isolados das três estirpes de *X. fastidiosa* foram mecanicamente inoculados em 30 plantas de cada espécie hospedeira (3

repetições de 10 plantas para cada hospedeiro). Como controle negativo para os testes de diagnóstico, 5 plantas de cada espécie hospedeira foi inoculada somente com tampão fosfato salino (PBS). As inoculações foram realizadas em dias ensolarados e com temperatura elevada (>28C), de forma a favorecer a rápida absorção da suspensão bacteriana pela planta.

Tabela 1 - Origem dos isolados de *Xylella fastidiosa* e concentração das suspensões bacterianas que foram inoculadas mecanicamente nas plantas

Isolados	Planta de origem	Log UFC/ml de SB ¹
327amx	Ameixeira	9,66
66amx	Ameixeira	12,94
124D	Citros	8,93
CV 21	Citros	13,85
9a5c	Citros	8,66
33	Cafeeiro	11,97
6756	Cafeeiro	14,88
3124	Cafeeiro	9,57

¹Log do número de unidades formadoras de colônias (UFC) por ml de suspensão bacteriana (SB)

5.2.3 Testes e avaliações de isolados de *X. fastidiosa*

5.2.3.1 Inibição de crescimento de *X. fastidiosa* por macerados vegetais em isolamento primário

Devido à possível presença de compostos inibidores de crescimento bacteriano em macerados de plantas hospedeiras, antes da instalação e avaliação dos experimentos de inoculação recíproca, foi realizado um teste de inibição de crescimento bacteriano em cada um dos três macerados vegetais (ameixeira, citros, cafeeiro), para isolados representativos das três estirpes de *X. fastidiosa* em estudo, ou seja, de ameixeira (isolado 66), citros (isolado 124 D) e cafeeiro (isolado 6756). O objetivo do teste foi avaliar a adequação do método de isolamento primário em meio de cultura PWG para quantificação da população dos isolados de *X. fastidiosa* nas

três espécies vegetais, já que o referido método envolve homogeneização de tecidos em triturador de haste giratória, com liberação de possíveis compostos inibidores.

Assim, comparou-se o crescimento dos isolados em meio de cultura, após o plaqueamento de suspensões bacterianas acrescidas (ou não) de macerados vegetais das plantas de citros, cafeeiro e ameixeira, nos seguintes tratamentos: A) Suspensão bacteriana (SB) de isolado de *X. fastidiosa* de ameixeira homogeneizada em tampão fosfato salino (PBS) na presença de pecíolos de ameixeira; B) SB de isolado de citros homogeneizada em tampão PBS na presença de pecíolos de ameixeira; C) SB de isolado de cafeeiro homogeneizada em PBS na presença de pecíolos de ameixeira; D) SB de isolados de ameixeira homogeneizada apenas com tampão PBS (controle positivo); E) SB de isolados de citros homogeneizada apenas com tampão PBS (controle positivo); F) SB de isolados de cafeeiro homogeneizada apenas com tampão PBS (controle positivo); G) Apenas tampão PBS utilizado na homogeneização dos pecíolos (controle negativo).

Os isolados purificados, preservados em freezer, foram recuperados em meio de cultura PWG, e após 8 dias de crescimento, as colônias bacterianas foram raspadas com alça de platina e misturadas em solução de PBS para a produção das suspensões bacterianas (SB) a serem usadas como inóculo nos diversos tratamentos. Após pesagem (aproximadamente 0,15 g por amostra), os pecíolos foram esterilizados superficialmente em câmara de fluxo em uma sequência de banhos de 2 min de duração em soluções de hipoclorito, álcool 70% e água autoclavada. Em seguida, os pecíolos foram seccionados em pequenos pedaços com lâmina estéril sobre papel filtro autoclavado, e colocados no tampão PBS para constituir os tratamentos A-F. As amostras foram homogeneizadas em triturador de tecidos modelo Turrax (Marconi, Piracicaba, SP). Foram constituídas cinco amostras (repetições) por tratamento, plaqueando-se em meio PWG as diluições de 10, 100 e 1000X em PBS, de cada amostra homogeneizada. Após o plaqueamento, as placas foram mantidas no escuro em estufa a 28°C. Decorridos 10 dias, realizou-se a contagem do número de UFC nas placas de cada amostra e diluição. Os dados de UFC obtidos foram transformados para Log UFC e submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo Teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade com a ajuda do pacote estatístico SAS 6.12.

5.2.3.2 Infecção e colonização de *X. fastidiosa* em diferentes hospedeiros após inoculação

A avaliação de infecção e multiplicação dos isolados de *X. fastidiosa* nas plantas de ameixa, citros e café foram realizadas aos 4 e 8 meses após a inoculação (MAI) mecânica das plantas, por meio do isolamento primário em meio de cultura sólido PWG, conforme descrito por Almeida et al. (2001). Após 1 ano da inoculação, o método de isolamento em meio de cultura não recuperou nenhuma bactéria; assim, na avaliação de 12 MAI foi utilizado o método de reação da polimerase em cadeia (PCR) para a detecção de *X. fastidiosa* nas plantas. Segundo Pooler e Hartung (1995), o teste de PCR permite a detecção de 10^2 bactérias por reação de amplificação, apresentando, assim, um nível de sensibilidade maior na detecção de *X. fastidiosa*.

Para efetuar amostragens não repetitivas, em cada uma das três avaliações (4, 8 e 12 meses) foram amostradas folhas coletadas de dez plantas diferentes. Para o isolamento em meio de cultura, uma amostra de cada planta foi composta de 0,1 - 0,2g do pecíolo e da nervura central de três folhas localizadas de 5 a 15 cm acima dos pontos de inoculação. Diariamente as placas foram observadas quanto ao aparecimento de contaminantes e de colônias semelhantes às de *X. fastidiosa*. Após 20 a 30 dias do isolamento em meio de cultura as unidades formadoras de colônias (UFC) foram contadas e levando-se em consideração as diluições, as populações de UFC por grama de tecido foram calculadas, transformadas para Log UFC e comparadas estatisticamente utilizando-se o teste Tukey ($\alpha < 0,05$) do programa estatístico SAS 6.12. Amostras das colônias recuperadas em meio PWG foram coletadas para extração de DNA e teste de PCR com primers específicos para *X. fastidiosa* (FRANCIS et al., 2006), para confirmação de sua identidade.

Para a detecção de *X. fastidiosa* por PCR nas plantas, realizou-se extração de DNA total das amostras conforme o protocolo desenvolvido por Minsavage et al. (1994); no caso de cafeeiro, realizou-se a modificação proposta por Pinto e Leite (1999), com alteração na concentração de ácido ascórbico para 0,1 M e diluição de extrato em 1:100. Cada amostra utilizada para a extração de DNA constituiu-se da junção do pecíolo de seis folhas coletadas ao acaso em cada uma das planta hospedeiras. A amplificação do DNA foi realizada utilizando-se os oligonucleotídeos ("primers") HL5 e HL6, que são específicos para *X. fastidiosa* e amplificam um fragmento de aproximadamente 120 pb, conforme descrito por Francis et al. (2006).

O produto da PCR foi visualizado por meio de eletroforese em gel de agarose (1%)k, contendo 0,5µg/mL de brometo de etídio e fotodocumentado pelo programa 'Eagle Eye II' (Stratagene, La Jolla, CA 92037, EUA).

Adicionalmente, as plantas foram avaliadas aos 4, 8 e 12 meses após a inoculação quanto à patogenicidade dos isolados, ou seja, as plantas foram checadas visualmente quanto à ocorrência de possíveis sintomas de EFA, CVC e ARC, comparando-se com as plantas do controle negativo (10 plantas de cada hospedeiro), inoculadas apenas com tampão PBS.

5.3 Resultados e Discussão

5.3.1 Inibição de crescimento de *X. fastidiosa* por macerados vegetais

A população bacteriana recuperada em meio de cultura PWG após a maceração de suspensões de isolados de *X. fastidiosa* conjuntamente com tecidos de ameixeira, citros ou cafeeiro, foi superior à população recuperada das suspensões homogeneizadas sem adição dos respectivos macerados vegetais ($F = 7,21$; $P = 0,02$) (Tabela 2).

Purcell e Sanders (1999) mostraram que a homogeneização de suspensões de *X. fastidiosa* com o macerado de certas plantas liberaram inibidores de crescimento de *X. fastidiosa*. No presente estudo, entretanto, a presença de macerados de citros, cafeeiro ou ameixeira não inibiu o crescimento de três isolados de *X. fastidiosa*, pertencentes a grupos genéticos distintos. Ao contrário, a homogeneização com esses macerados promoveu maior crescimento bacteriano, possivelmente devido à presença de certos componentes dos tecidos vegetais, que possam ter favorecido nutricionalmente a bactéria. Atualmente sabe-se que *X. fastidiosa* utiliza polissacarídeos de plantas, e tem sua formação de biofilme e transmissibilidade por vetores favorecida em meios contendo pectina vegetal (KILLINY; ALMEIDA, 2009)

Os resultados do presente estudo corroboram os dados apresentados por outros autores, onde a presença de macerados de plantas de citros estimulou o crescimento de *X. fastidiosa* em meio de cultura (HARTUNG;; BERETTA; BRLANSKY, 1994; ALMEIDA et al., 2001). *X. fastidiosa* também não teve seu crescimento inibido na presença de macerados de folhas de *Vernonia condensata* Baker e *Aloysia virgata* (Ruiz & Pavan) (MARUCCI et al., 2003), e na presença de

macerados de plantas de cafeeiro (PRADO et al., 2008). Considerando-se a diversidade de isolados e macerados de plantas já avaliados até o momento neste tipo de teste, parece claro que a ocorrência de inibição de crescimento bacteriano seja uma característica peculiar de certas espécies vegetais. Assim, seria interessante investigar os compostos químicos envolvidos na inibição relatada por Purcell e Saunders (1999), para a identificação de possíveis mecanismos de defesa usados por essas espécies vegetais.

Estes dados validam a técnica de isolamento primário e quantificação de *X. fastidiosa* em meio PWG para estudos de colonização de estirpes de *X. fastidiosa* em plantas de citros, cafeeiro e ameixeira.

Tabela 2 - Populações de unidades formadoras de colônias (UFC) recuperadas de suspensões bacterianas (SB) que foram homogeneizadas com ou sem macerados de pecíolos de ameixeira, citros ou cafeeiro, e posteriormente plaqueadas em meio de cultura PWG

<i>Isolado de X. fastidiosa</i> (origem)	Apenas SB	SB+macerado de ameixeira	SB+macerado de citros	SB+macerado de cafeeiro
66 (ameixeira)	4,96 ± 0,01b ¹	5,20 ± 0,01a	5,22 ± 0,02 ^a	5,24 ± 0,01a
124 D (citros)	3,74 ± 0,04b	4,45 ± 0,01a	4,38 ± 0,04 ^a	4,88 ± 0,03a
6746 (cafeeiro)	4,58 ± 0,12b	5,71 ± 0,02a	5,72 ± 0,02 ^a	5,72 ± 0,01a

¹Log do número médio de UFC/ml ± EPM (erro padrão da média). Médias seguidas de mesma letra, na linha, não diferem estatisticamente pelo teste Tukey ($\alpha < 0,05$).

5.3.2 Avaliação da infecção e colonização das estirpes de ameixeira, citros e cafeeiro de *X. fastidiosa* em inoculações cruzadas

No geral, aos 4 meses após as inoculações pelo menos um dos isolados de cada uma das estirpes de ameixeira, citros e cafeeiro de *X. fastidiosa* infectou e colonizou os respectivos hospedeiros de ameixa, citros e cafeeiro em suas combinações homólogas (Tabela 3). Entre os dois isolados de ameixeira inoculados, o 327 amx colonizou uma proporção maior de plantas (33,3%) quando comparado ao isolado 66 amx (20%) em sua combinação homóloga. Dentre todas as

combinações homólogas os isolados de citros infectaram uma proporção maior de plantas, se destacando os isolados 124D e 9a5c, ambos infectando 90% das plantas de citros avaliadas. Entre os 3 isolados de cafeeiro inoculados, somente o isolado 6756 infectou 50% das plantas em sua combinação homóloga. Nas combinações heterólogas, um dos isolados de ameixeira (327 amx) infectou 30% das plantas de citros. Os isolados de citros 124D, CV21 e 9a5c infectaram 22,2%, 10% e 12,5% respectivamente as plantas de cafeeiro. Por outro lado, dois isolados de cafeeiro, 6756 e 3124 infectaram 22,2% e 10% respectivamente as plantas de citros.

Aos 8 meses após a inoculação a proporção de plantas infectadas no geral aumentou nas combinações homólogas, principalmente para os isolado de ameixeira 327amx, que infectou 50% das plantas e, os de cafeeiro 33 e 3124, que infectaram 20% e 40% das plantas respectivamente. Exceção ocorreu com os isolados de citros que diminuíram a proporção de plantas infectadas de 60%, 10% e 66,7% respectivamente para os isolados 124D, CV21 e 9a5c. Nas combinações heterólogas, o isolado de ameixeira infectou uma proporção maior de plantas de citros (60%) e pela primeira vez o isolamento recuperou bactéria em uma planta de cafeeiro (12,5%).

Após 1 ano da inoculação das plantas os resultados foram semelhante aos resultados obtidos 8 meses após a inoculação, com exceção de que o isolado de ameixeira 327amx, que havia sido recuperado 8 meses após a inoculação de uma planta de cafeeiro (combinação heteróloga) não foi detectado. Na combinação heteróloga, somente os isolados de citros (124D e 9a5c) infectaram plantas de cafeeiro, e o isolado de cafeeiro 6756 infectou uma planta de citros.

Tabela 3 – Taxas de infecção e populações bacterianas de isolados de *Xylella fastidiosa* em plantas de ameixa, citros e cafeeiro em diferentes períodos após inoculação mecânica

Isolado (hospedeiro de origem)	4 MAI ^a			8 MAI			12 MAI		
	Ameixeira	Citros	Café	Ameixeira	Citros	Café	Ameixeira	Citros	Café
327amx (ameixeira)	5,1 ± 0,4 (3/9) ^b	4,6 ± 0,3 (3/10)	(0/10)	4,5 ± 0,2 (5/10)	4,4 ± 0,2 (6/10)	3,8 (1/8)	(4/10) ^c	(2/10)	(0/10)
66amx (ameixeira)	4,8 ± 0,1 (2/10)	(0/10)	(0/10)	4,9 (1/9)	(0/10)	(0/10)	(3/10)	(0/10)	(0/10)
124 D (citros)	(0/10)	6,2 ± 0,3 (9/10)	4,8 ± 0,7 (2/9)	(0/8)	6,9 ± 0,3 (6/10)	4,4 ± 0,4 (2/10)	(0/10)	(6/10)	(2/10)
CV 21 (citros)	(0/9)	3,7 ± 0,6 (2/9)	5,8 (1/10)	(0/10)	5,6 (1/10)	(0/10)	(0/10)	(3/10)	(0/10)
Ga 5C (citros)	(0/10)	6,2 ± 0,4 (9/10)	4,5 (1/8)	(0/10)	6,2 ± 0,1 (6/9)	4,9 ± 0,4 (3/9)	(0/10)	(7/10)	(1/10)
33 (cafeeiro)	(0/10)	(0/10)	(0/10)	(0/10)	(0/10)	4,7 ± 0,1 (2/10)	(0/10)	(0/10)	(2/10)
6756 (cafeeiro)	(0/10)	5,4 ± 0,6 (2/9)	6,0 ± 0,2 (5/10)	(0/10)	4,4 (1/9)	5,4 ± 0,4 (4/10)	(0/10)	(1/10)	(5/10)
3124 (cafeeiro)	(0/10)	4,8 (1/10)	(0/10)	(0/10)	(0/10)	4,5 ± 0,3 (4/10)	(0/10)	(0/10)	(5/10)
Testemunhas	(0/10)	(0/10)	(0/10)	(0/10)	(0/10)	(0/10)	(0/10)	(0/10)	(0/10)

^aMAI: meses após a inoculação.

^bNúmero médio (±EPM) de unidades formadoras de colônias por g de tecido vegetal. Valores entre parênteses representam a taxa de infecção, ou seja, a proporção do número de plantas positivas para *X. fastidiosa* sobre o total de plantas inoculadas, determinada pelo método de cultura.

^cProporção do número de plantas positivas para *X. fastidiosa* sobre o total de plantas inoculadas, determinada pelo método de PCR.

Tabela 4 – Proporção de plantas com sintomas de Escaldadura das Folhas (ameixeira), Atrofia dos Ramos (cafeeiro) e Clorose Variegada dos Citros (citros) em diferentes períodos após inoculação mecânica

Isolado	4 MAI ^a			240 DAI			360 DAI		
	Ameixa	Citros	Café	Ameixa	Citros	Café	Ameixa	Citros	Café
327 amx	8/30	0	0	21/30	2/30	0	24/30	0	0
66 amx	5/30	0	0	14/30	0/30	0	19/30	0	0
124 D	0	4/30	0	8/30	13/30	0	13/30	14/30	0
CV 21	0	2/30	0	6/30	6/30	0	17/30	5/30	0
Ga 5C	0	6/30	0	11/30	14/30	0	22/30	12/30	0
33	0	0	0	12/30	0	0	16/30	0	0
6756	0	0	0	9/30	2/30	0	13/30	1	0
3124	0	0	0	18/30	0	0	12/30	2	0
Testemunha	2/10	0	0	6/10	0	0	8/10	0	0

^aMAI: meses após a inoculação.

Alem da proporção de plantas infectadas aos 4 e 8 MAI, o método de isolamento em meio de cultura também avaliou a população bacteriana de *X. fastidiosa* presente nas plantas. As maiores concentrações de inóculo foram as dos isolados 66 amx, CV21 e 6756 (12,94; 13,85 e 14,88 UFC/g de tecido), entretanto, com exceção do isolado de cafeeiro 6756, os outros além de infectarem um numero menor de plantas, a população bacteriana recuperada também foi menor.

Quando consideradas as capacidades de colonização de cada isolado de *X. fastidiosa* pode ser comprovada a capacidade do isolado 327amx (proveniente de ameixeira) em colonizar o próprio hospedeiro de origem e ainda citros e cafeeiro, sendo o primeiro em maior proporção que o segundo. Enquanto que, o isolado 66 amx também proveniente de ameixeira não demonstrou essa capacidade. Esses resultados evidenciam que ha diferenças genéticas entre os isolados e que estas podem se refletir em diferenças biológicas (COLLETA-FILHO et al., dados não publicados). Já os isolados de citros e de cafeeiro colonizaram ambos hospedeiros, mas foram incapazes de colonizar plantas de ameixeira.

A maior população bacteriana detectada tanto aos 4 quanto aos 8 meses após a inoculação foi a da estirpe de citros infectando plantas de citros (combinação homóloga) (Tabela 3). Também na combinação homóloga da estirpe de cafeeiro (6756) a população bacteriana recuperada das plantas de cafeeiro foi maior, mas neste caso a concentração do inóculo deste isolado, que foi utilizada para infectar as plantas foi mais alta que a concentração dos demais isolados.

Na avaliação de sintomas após 4 meses da inoculação somente nas combinações homólogas das estirpes de ameixeira (327amx e 66 amx) e citros (124D, CV21 e 9a5c) as plantas apresentaram sintomas, ou seja, de ameixeira inoculadas como os isolados de ameixeira e as plantas de citros inoculadas com isolados de citros (Tabela 4). Após 8 meses da inoculação a maior parte das plantas de ameixeira apresentaram sintomas de EFA, mesmo inoculadas com estirpes de *X. fastidiosa* originaria de diferente hospedeiros. Entretanto, não se pode afirmar que os sintomas observados nas plantas de ameixeira sejam exclusivamente da presença de *X. fastidiosa*, ou uma mistura do estresse causado pela presença da bactéria em condições de clima elevado, sendo que ate então esta doença e sua sintomatologia somente havia sido observado em regiões de clima ameno. Plantas de citrus colonizadas por isolados de cafeeiro mostraram sintomas típicos de CVC, embora em proporção menor do que o número de plantas colonizadas e as plantas

de cafeeiro não apresentaram sintomas para nenhum isolado das 3 estirpes de *X. fastidiosa*.

De um modo geral, a reduzida colonização em combinações heterólogas ocorreu, provavelmente, devido a limitações da translocação de *X. fastidiosa* nos vasos dos xilema, resultando numa possível perda de virulência. Ou também, *X. fastidiosa* de origem hospedeira diferente inicialmente pode até apresentar uma taxa de multiplicação inicial semelhante a das estirpes virulentas e, no entanto, após atingir um máximo entraria em declínio, chegando a atingir níveis não detectáveis (HOPKINS, 1985).

Vale ressaltar que os trabalhos de caracterização genética têm contribuído não apenas para identificar funções gênicas das estirpes, como também para evidenciar diferenças entre isolados de mesma estirpe e de estirpes em diferentes hospedeiros. Hedson et al. (2001) por meio de diversas técnicas moleculares de análise, registraram a formação de dois distintos grupos em isolados de *X. fastidiosa* de castanha, enquanto que outros se agruparam com isolados de *X. fastidiosa* de videira, que por fim se diferenciaram de isolados da bactéria provenientes de oleander, pêssigo e carvalho. Chen et al. (2002) avaliando a relação filogenética de isolados de *X. fastidiosa* provenientes de videira, citros, cafeeiro e amoreira utilizando isolados de ameixeira, carvalho e pessegueiro como grupos externos de comparação identificaram a formação de dois grupos filogenéticos distintos. O primeiro grupo consistindo basicamente dos isolados de citros e cafeeiro e o segundo grupo consistindo dos isolados de videira e amoreira, distanciados por sua vez dos isolados de ameixeira.

Li et al. (2001), inocularam mecanicamente um isolado da estirpe de citros de *X. fastidiosa* em plantas de cafeeiro e verificaram que *X. fastidiosa* induziu sintomas semelhantes ao de um isolado da estirpe de cafeeiro. Almeida e Purcell (2003), verificaram que estirpes de videira e de castanha são capazes de causar doença em castanha, após inoculação mecânica em campo. Este mesmo fato ocorreu em condições de casa de vegetação, porém apenas isolados de videira foram hábeis a causar doença em videira. Isolados de castanha infectaram videira, porém desenvolveram populações em médias 10x menores do que isolados de videira, e ainda, não causaram sintomas. Em semelhante trabalho de inoculação cruzada, mas realizada em casa de vegetação, Prado et al. (2008) demonstrou que a estirpe de citros infectou tanto plantas de citros quanto de café, porém a população bacteriana

foi mais baixa nas plantas de cafeeiro, exigindo uma concentração de inóculo 10x mais alta que a necessária para obter uma taxa de infecção semelhante (25%) em citros. Por outro lado, a estirpe cafeeiro não colonizou a plantas de citros.

Um número expressivo de isolados de *X. fastidiosa* coletados no Brasil foram avaliados por Almeida et al. (2009), utilizando a técnica de Multi Locus Sequence Typing –MLST, verificaram a presença de dois grupos genéticos distintos entre os isolados de citros e cinco grupos distintos entre os isolados de cafeeiro, contudo, diferenças genéticas podem ou não implicar em diferenças fenotípicas. Porém, quando estas ocorrem, pequenas diferenças genéticas podem alterar características de patogenicidade e conferir particularidades ainda maiores aos patossistemas compostos pela mesma espécie de *X. fastidiosa*, porém, de grupos genéticos diferentes.

No caso de isolados de ameixeira, estes haviam sido utilizados apenas como outgroups em trabalhos anteriores, porém, Della Coletta Filho et al. (dados não publicados) avaliaram diversos isolados de *X. fastidiosa* provenientes de diferentes regiões produtoras de ameixa do Brasil por meio de Multi Locus Sequence Typing, e detectaram a ocorrência de dois grupos genéticos, sendo um grupo predominante e outro de ocorrência rara.

5.4 Conclusão

Macerados vegetais de cafeeiro, ameixeira e citrus não inibem o crescimento de *Xylella fastidiosa* em meio de cultura, validando a técnica de isolamento primário como metodologia estudos de avaliação da bactéria nessas espécies vegetais.

Estirpes de *Xylella fastidiosa* de citros e cafeeiro não colonizam plantas de ameixeira.

Isolado de ameixeira é capaz de colonizar plantas de citros em proporção significativa e também plantas de cafeeiro, porém com baixas taxas de sucesso.

Isolados de *Xylella fastidiosa* de citros são capazes de colonizar plantas de cafeeiro.

Referencias

- ALMEIDA, R.P.P.; PURCELL, A.H. Biological traits of *Xylella fastidiosa* strains from grapes and almonds. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 7447–7452, 2003.
- ALMEIDA, R.P.P., NASCIMENTO, F.E., CHAU, J., PRADO, S.S., TSAI, C.W., LOPES, S.A.; LOPES, J.R.S. Genetic structure and biology of *Xylella fastidiosa* causing disease in citrus and coffee in Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, p. 3690-3701, 2008.
- CASTRO, L.A.S.; NAKASU, B.H.; PEREIRA, J.F.M. **Ameixeira: histórico e perspectivas do cultivo**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2008. 10 p. (Circular Técnica, 70).
- DUCROQUET, J-P.H.J; ANDRADE, E.R.; HICKEL, E.R. **A escaldadura das folhas da ameixeira em Santa Catarina**. Florianópolis: EPAGRI, 2001. 55 p. (EPAGRI. Boletim Técnico, 118).
- FRANCIS, M.; LIN, H.; CABRERA-LA ROSA, J.; DODDAPANENI, H.; CIVEROLO, E.L. Genome-based PCR primers for specific and sensitive detection and quantification of *Xylella fastidiosa*. **European Journal of Plant Pathology**, Droevendaals, v. 115, p. 203-213, 2006.
- HARTUNG, J.S.; BERETTA, M.J.G.; BRLANSKY, R.H. Citrus variegated chlorosis bacterium: axenic culture, pathogenicity, and serological relationships with other strains of *Xylella fastidiosa*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 84, n. 6, p. 591-597, 1994.
- HILL, B.L.; PURCELL, A.H. Multiplication and movement of *Xylella fastidiosa* within grapevine and four other plants. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 85, n. 11, p. 1368-1372, 1995.
- HOPKINS, D.L. Physiological and pathological characteristics of virulent and avirulent strains of the bacterium that causes Pierce's disease of grapevine. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 75, p. 713-717, 1985.
- LOPES, S. A.; MARCUCCI, S.; TORRES, S. C. Z.; SOUZA, V.; FAGAN, C.; FRANÇA, S.C. Weeds as alternative host of the citrus, coffee and plum strains of *Xylella fastidiosa* in Brazil. **Plant Disease**, Washington, v. 87, n. 5, p. 544-549, 2003.
- MARUCCI, R.C., GIUSTOLIN, T.A., MIRANDA, M.P., MIQUELOTE, H., ALMEIDA, R.P.P., LOPES, J.R.S. Identification of a non-host plant of *Xylella fastidiosa* to rear healthy sarpshooter vectors. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 60, n. 4, p. 669-675, 2003.
- MCELTRONE, J.A.; SHERALD, J.L.; POOLER, M. R. Identification of alternative hosts of *Xylella fastidiosa* in the Washington, D.C., area using nested polymerase chain reaction. **Journal of Arboriculture**, Midlan, v. 25, n. 5, p. 258-263, 1999.

MINSAVAGE, G.V.; THOMPSON, C.M.; HOPKINS, D.L.; LEITE R.M.V.B.; STALL R.E. Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. **Phytopatology**, Saint Paul, v. 84, n. 5, p. 456-461, 1994.

PINTO, F.G.S.; LEITE JUNIOR, R.P. Detecção de *Xylella fastidiosa* em Coffea spp através da técnica de PCR. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, p. 254, 1999.

POOLER, M.; HARTUNG, J.S. Genetic relationship among strains of *Xylella fastidiosa* based on RAPD-PCR data. **Current Microbiology**, New York, v. 31, p. 134-137, 1995.

PRADO, S.S.; LOPES, J.R.S.; DEMETRIO, C.G.B.; BORGATTO A.F.; ALMEIDA, R.P.P. Host colonization differences between citrus and coffee isolates of *Xylella fastidiosa* in reciprocal inoculation. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 65, p. 251-258, 2008.

PURCELL, A.H.; SAUNDERS, S.R. Fate of Pierce's disease strains of *Xylella fastidiosa* in common riparian plants in California. **Plant Disease**, Washington, v. 83, n. 9, p. 825-830, 1999.

REDAK, R.A.; PURCELL, A.H.; LOPES, J.R.S.; BLUA, M.J.; MIZELL III, R.F.; ANDERSEN, P.C. The biology of xylem fluid-feeding insect vectors of *Xylella fastidiosa* and their relation to disease epidemiology. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 49, p. 243-270, 2004.

SCHAAD, N.W.; POSTNIKOVA, E.; LACY, G.; FATMI, M.; CHANG, C.J. *Xylella fastidiosa* subspecies: *X. fastidiosa* subsp. *piercei*, subsp. nov., *X. fastidiosa* subsp. *multiplex*, subsp. nov., and *X. fastidiosa* subsp. *pauca*, subsp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 27, p. 290-300, 2004.

SCHUENZEL, E.L.; SCALLY, M.; STOUTHAMER, R.; NUNNEY, L. A Multigene phylogenetic study of clonal diversity and divergence in North American strains of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 7, p. 3832-3839, 2005.

WELLS, J.M.; RAJU, B.C.; HUNG, H.Y.; WEINSBERG, W.G.; MANDELCO PAUL, L.; BREINNER, D.J. *Xylella fastidiosa* gen. nov. sp. nov.: gram-negative, xylem-limited fastidious bacteria related to *Xanthomonas* spp. **International Journal Systematic Bacteriology**, Washington, v. 37, p. 136-143, 1987.

6 CAPACIDADE DE INFECÇÃO E COLONIZAÇÃO DE *Xylella fastidiosa* EM DIFERENTES CULTIVARES DE AMEIXEIRA

Resumo

A doença conhecida como Escaldadura das Folhas da Ameixeira (EFA), representa um entrave para a produção da fruta no país, embora o Brasil disponha de condições edafoclimáticas e de mercado favoráveis à expansão da cultura. A doença é causada pela bactéria *Xylella fastidiosa* e ocorre em todos estados produtores da fruta. A resistência genética de cultivares pode representar uma das principais alternativas para o controle da doença, porém, os atuais programas de melhoramento dependem de avaliações de sintomas de EFA e de produtividade em campo, que tornam o processo longo. O presente estudo foi desenvolvido em Videira, estado de Santa Catarina, com o objetivo de conhecer a capacidade de colonização de isolados de *X. fastidiosa* em diferentes cultivares de ameixeira (*Prunus salicina*), bem como avaliar a aplicabilidade da metodologia de inoculação mecânica da bactéria para estudos de resistência ao patógeno. Os isolados 327amx e 66amx, provenientes de ameixeira e pertencentes a subgrupos genéticos distintos, foram inoculados com agulhas em mudas de *P. salicina* de aproximadamente 1 ano de idade, das cultivares ‘Santa Rosa’, ‘Reubenel’ e ‘Letícia’, previamente classificadas em avaliações de campo como altamente suscetível, moderadamente resistente e altamente resistente, respectivamente. A inoculação foi realizada em janeiro de 2010 e após o procedimento as plantas permaneceram em telado à prova de insetos vetores, com oportunidade de enraizamento no solo. A avaliação de infecção e colonização de *X. fastidiosa* foi realizada 120 e 240 dias após a inoculação, por meio de isolamento primário em meio de cultura ‘Periwinkle wilt gelrite’ (PWG). Para ambos isolados, detectou-se uma maior frequência de plantas infectadas na cultivar Santa Rosa, evidenciando sua maior suscetibilidade. Os resultados corroboram as classificações de resistência/suscetibilidade à EFA pré-estabelecidas em ensaios de infecção natural no campo, e validam a técnica de inoculação mecânica para ‘screening’ inicial de novas cultivares quanto à resistência ao patógeno em telados.

Palavras-chaves: Melhoramento de plantas; Bactéria; Cultivares

Abstract

The disease known by Plum Leaf Scald (PLS) represents a serious threat for plum yield in the country, although Brazil has great potential in terms of environmental conditions and market for expanding the crop. The disease is caused by the bacterium *Xylella fastidiosa* and it occurs in all fruit producing States. Genetic resistance of plum cultivars can represent the main alternative for the disease control/management, however, the current breeding programs depend on PLS symptom assessment and field yield, what turns a long term process. This study was conducted in Videira, Santa Catarina State, in order to evaluate the colonizing ability of *X. fastidiosa* isolates from plum in different plum (*Prunus salicina*) cultivars, as well as validate the method of bacterial mechanical inoculation for studies of plants resistance against the pathogen. The isolates 327 amx and 66 amx from plum plants belonging to distinct genetic subgroups were inoculated with needles in one-year-old

P. salicina nursery trees 'Santa Rosa', 'Reubenel' and 'Letícia' and cultivars, which were previously classified in field tests as highly susceptible, moderately resistant and highly resistant, respectively. The inoculation was performed on January 2010 and plants were kept in insect-free greenhouse during the whole period, with chance of rooting in the soil. Bacterial infection and colonizing was evaluated at 120 and 240 days after inoculation by means of primary isolation in PWG culture medium. Considering both isolates, the cultivar Santa Rosa showed a higher frequency of infected plants, demonstrating greater susceptibility. The results corroborate with the ratings of resistance/susceptibility to PLS pre-established in field assays of natural infection and they also validate the method of mechanical inoculation for initial screening of new cultivars in terms of pathogen resistance.

Keywords: Breeding plants; Bacterium; Cultivars

6.1 Introdução

A ameixeira é uma das frutíferas de cultivo mais antigo no Brasil, não havendo informações precisas sobre quando foi introduzida (CASTRO; CAMPOS, 2003; CASTRO; NAKASU; PEREIRA, 2008). Pertence a família das Rosáceas (subfamília Prunoideae) e ao gênero *Prunus* (L.) (SIMÃO, 1971), sendo *Prunus salicina* Lindl. e *Prunus domestica* L. as espécies de maior importância econômica (GRELLMANN; SIMONETTO, 1996). A maioria das cultivares cultivadas no país é oriunda de *P. salicina*, destacando-se a Amarelinha, América, Irati, Gulf Blaze, Letícia, Reubennel e Picktone (MARODIN; ZANINI, 2005).

O cultivo dessa fruta apresenta boas perspectivas de exploração econômica no país, com preços elevados da fruta, possibilidade de negociação direta dos produtores com o mercado consumidor, alta rusticidade da planta, boa conservação de frutos e grande variabilidade de cultivares, o que a torna uma frutífera de boa aceitação pelos agricultores (CASTRO; NAKASU; PEREIRA, 2008). Porém, apesar do longo tempo em que essa fruteira foi introduzida no Brasil, e das condições adequadas ao seu cultivo, entraves fitossanitários têm dificultado o desenvolvimento da atividade fazendo com que plantações de ameixeiras sejam substituídas por outras culturas como o pessegueiro, por exemplo (FAO, 2011; FACHINELLO et al., 2011). O principal entrave é a doença conhecida como "Escaldadura das Folhas da Ameixeira" (EFA), que tem dizimado pomares em diferentes regiões e condiciona o país à posição de importador da fruta (FAO, 2011). A doença é causada pela bactéria *Xylella fastidiosa*, que coloniza os vasos do xilema das plantas provocando sintomas severos, tais como

seca de ramos e morte de plantas (RAJU et al., 1982; DUCROQUET; ANDRADE; HICKEL, 2001). Esta doença foi responsável pelo grande declínio ocorrido nos pomares, principalmente na década de 70 (CASTRO, 2008; FACHINELLO et al., 2011).

Desde o início do cultivo da ameixeira no Brasil, e de forma mais intensificada na década de 80, a área de melhoramento genético buscou cultivares adaptadas às várias regiões brasileiras, com potencial para a produção e resistência à EFA, que comprometia a expansão dos pomares (CASTRO; NAKASU; PEREIRA, 2008).

Entretanto, o trabalho de desenvolvimento de cultivares resistentes apresenta-se como um processo demorado, uma vez que se trata de uma doença causada por uma bactéria de difícil cultivo e crescimento lento em meio de cultura, e a seleção de materiais é feita basicamente tomando como parâmetro a manifestação de sintomas em plantas testadas em condição de campo, plantadas em meio a pomares infectados (DALBÓ et al., 2010). Porém, a manifestação inicial dos sintomas da doença, caracterizados como uma necrose do limbo foliar (RAJU et al., 1982; DUCROQUET; ANDRADE; HICKEL, 2001), que confere o aspecto de queimadura nas folhas, é resultante de uma combinação de fatores como cultivar, população bacteriana presente nos vasos colonizados, idade e condição nutricional da planta e da estirpe da bactéria, entre outros (LOPES; DAUGHERTY; ALMEIDA, 2009; DAUGHERTY et al., 2010, CHATTERJEE; ALMEIDA; LINDOW, 2008) o que torna este parâmetro altamente variável para ser usado isoladamente como meio de seleção de materiais vegetais.

No Brasil, há outras estirpes de *X. fastidiosa* que infectam plantas de citros, causando a doença conhecida como “Clorose Variegada dos Citros” (CVC) (ROSSETI et al., 1990) e cafeeiro, causando a “Atrofia dos Ramos do Cafeeiro” ou “Requeima das Folhas do Cafeeiro” (PARADELA-FILHO; SUGIMORI; RIBEIRO, 1995). Em outros países, particularmente nos Estados Unidos da América (EUA), *X. fastidiosa* causa doenças em várias culturas de importância econômica, tais como videira, alfafa, amendoeira e pessegueiro, bem como em espécies arbóreas e ornamentais (PURCELL; FEIL, 2001; HOPKINS, 1989; HOPKINS; PURCELL, 2002; PURCELL; HOPKINS, 1996).

A CVC foi considerada durante muitos anos como a principal doença da citricultura paulista (LOPES, 2004) e, devido a isso, tem sido objeto de vários

estudos relacionados à busca de cultivares resistentes ou tolerantes ao patógeno, uma vez que apenas utilização de mudas sadias e outras medidas profiláticas de manejo não garantem um pomar isento da doença. Em campo, a bactéria é transmitida entre plantas pela ação de insetos vetores (cigarrinhas) pertencentes às famílias Cicadellidae (subfamília Cicadellinae), Cercopidae e Cicadidae (LOPES, 1996; ROBERTO et al., 1996). Desta forma, mesmo pomares formados a partir de mudas sadias estão expostos à ação desses insetos.

Estudos genéticos dessa espécie de bactéria mostram que existem diferentes grupos clonais identificados, tanto para estirpes de cafeeiro, quanto de citros e videira, e que, em hipótese, a patogenicidade dos isolados pode variar entre esses grupos (VAN SLUYS et al., 2003; CHANG et al., 1993; SCHAAD et al., 2004; SCHUENZEL et al., 2005; CHEN et al., 2002; COLETTA-FILHO; BITTLESTON; ALMEIDA, 2011). Em um estudo de caracterização genética de isolados de *X. fastidiosa* de ameixeira de diferentes regiões do Brasil, utilizando-se a técnica de 'multilocus sequence typing' (MLST), pelo menos dois complexos clonais de *X. fastidiosa* foram identificados, sendo um deles caracterizado como próximo ao dos isolados de cafeeiro e citros (subespécie. *pauca*), porém de ocorrência rara em ameixeira, e outro caracterizado como pertencente à subespécie *multiplex*, sendo predominante na cultura (H. D. Colleta-Filho, Informação pessoal). Hipoteticamente, diferentes isolados podem apresentar níveis variáveis de patogenicidade. Assim, é importante considerar a identidade dos isolados de *X. fastidiosa* usados na inoculação de plantas de ameixeira em programas de melhoramento, para que os dados de diferentes estudos possam ser comparados entre si.

Estudos da capacidade de colonização da bactéria em plantas, principalmente em citros e cafeeiro no Brasil, e em videira, alfafa e amendoeira nos EUA, têm utilizado métodos de inoculação mecânica por meio de agulhas (LOPES; DAUGHERTY; ALMEIDA, 2010; ALMEIDA et al., 2001; ALMEIDA; PURCELL 2003; PRADO et al., 2008). Este método foi desenvolvido por Hopkins (1985) para trabalhos com videira e adaptado por Almeida et al. (2001) em estudos com citros. A técnica consiste na deposição de suspensão concentrada da bactéria previamente multiplicada em meio de cultura, sobre partes tenras da planta, com posterior perfuração do local com agulha estéril ou alfinete entomológico, de forma a atingir os

vasos do xilema, cuja tensão é negativa, possibilitando a absorção da suspensão bacteriana para o interior desses vasos.

Considerando-se as potenciais contribuições da técnica de inoculação mecânica de *X. fastidiosa* em programas de melhoramento, o presente estudo teve por objetivo avaliar a sua aplicabilidade como método de avaliação de resistência de cultivares de ameixeira a diferentes grupos genéticos de *X. fastidiosa*, bem como para determinar a capacidade de isolados desses diferentes grupos em colonizar diferentes cultivares de ameixeira.

6.2 Material e Métodos

O estudo foi conduzido na sede da EPAGRI, em Videira - SC, por ser uma região de clima frio, e produtora de ameixas. Diferentes cultivares de ameixeira foram inoculados mecanicamente com dois isolados representativos dos principais grupos genéticos de *X. fastidiosa* encontrados em ameixeira.

Isolados de *X. fastidiosa*. Foram inoculados os isolados 66amx e 327amx, provenientes de ramos sintomáticos de ameixeira com EFA, coletados em Jarinú-SP e Veranópolis- RS, respectivamente. O primeiro isolado foi caracterizado geneticamente como pertencente à subespécie *multiplex* de *X. fastidiosa*, que é predominante em ameixeira, e o segundo é representante de um grupo geneticamente mais próximo da subespécie *pauca*, de ocorrência rara em ameixeira, conforme análise por 'multilocus Sequence Typing (Della Colleta Filho, dados não publicados).

Obtenção de plantas. Mudas sadias de ameixeira (*P. salicina*) das cultivares 'Santa Rosa' (considerada suscetível), 'Reubennel' (cultivar padrão) e 'Letícia' (considerada resistente) foram obtidas por meio de enxertia de gemas provenientes de árvores sadias, mantidas constantemente em viveiros telados à prova de insetos vetores. Como porta-enxerto foi utilizado pessegueiro (*Prunus persica* (L) Batsch) da variedade 'Okinawa'. Antes das inoculações, as plantas propagadas vegetativamente foram avaliadas quanto à sanidade por meio de teste de PCR específico para *X. fastidiosa*. Para homogeneização do tamanho de mudas de cada hospedeiro, estas foram podadas a uma altura de 35 cm acima do ponto de enxertia, 70 dias antes da inoculação.

Inoculação bacteriana. Os isolados utilizados para o estudo foram retirados do estoque mantido em ultrafreezer (-80°C) e plaqueados em meio sólido 'Periwinkle

wilt gelrite' - PWG (HILL; PURCELL, 1995) para multiplicação. Colônias resultantes do primeiro repique, com 15 dias de crescimento em meio PWG, foram retiradas das placas com alça bacteriológica e adicionadas em 1 ml de tampão 'phosphate buffered saline' (PBS) até a obtenção de uma suspensão túrgida, da qual foi retirada uma alíquota para diluições em série e plaqueamento em meio de cultura, permitindo o cálculo da concentração de células viáveis na mesma.

Os isolados foram inoculados mecanicamente em 30 plantas de cada cultivar por meio da técnica de agulha. Para isso, foi depositada uma gota de 5 µl da suspensão bacteriana sobre três pontos da parte mais tenra da haste de cada planta, perfurando-se os pontos 5-7 vezes com alfinete entomológico No. 0, para que ocorresse absorção da suspensão. A localização dos pontos foi padronizada, sendo um ponto em cada terço da haste (basal, mediano e superior). Como controle negativo para os testes diagnósticos e avaliação de sintomas, 10 plantas de cada cultivar foram inoculadas somente com tampão PBS. A inoculação foi realizada em 10/01/2010, quando as mudas apresentavam, aproximadamente, 1 m de altura.

Após a inoculação, todas as plantas foram mantidas em estufa com tela à prova de insetos vetores, em vasos plásticos com capacidade de 4 L, contendo substrato comercial (Rendimax, Eucatex, Itapetininga, SP) misturado com solo na proporção 2:1, com irrigação e adubação adequadas ao seu desenvolvimento. A base do vaso foi perfurada de forma a permitir o desenvolvimento das raízes junto ao solo. A cada 3 semanas, as plantas foram tratadas preventivamente com inseticidas e acaricidas para impedir a ocorrência de pragas.

Avaliação da colonização bacteriana. A infecção e a multiplicação por *X. fastidiosa* foram avaliadas aos 120 e 240 dias após inoculação, por meio de isolamento primário em meio de cultura. Para isso, foram coletadas de cada planta uma amostra composta de 0,1- 0,2 g do pecíolo e da nervura central de três folhas (uma em cada ponto de inoculação) localizadas logo acima dos pontos de inoculação.

O isolamento primário e quantificação da concentração bacteriana no tecido vegetal foram realizados em meio sólido PWG, seguido a metodologia de Hill e Purcell (1995). Após pesagem e esterilização superficial, as amostras foram maceradas em 2 mL de tampão PBS, usando-se homogeneizador tipo Turrax (modelo MA102, Marconi, Piracicaba, SP) por 10 a 15 s, com uma rotação da lâmina da haste giratória de, aproximadamente, 20.000 rpm. Entre uma trituração e outra, a

haste foi desinfetada por imersão em recipientes contendo água destilada autoclavada (5 s), álcool 92,8% (15 s) e novamente água destilada autoclavada (5 s). A suspensão homogeneizada foi diluída 10 e 100x em PBS autoclavado. Após a diluição, uma alíquota de 20 µl de cada diluição foi plaqueada em meio PWG. As placas foram acondicionadas em estufa à temperatura de 28°C, sendo avaliadas sob microscópio estereoscópico aos 14, 21 e 30 dias do plaqueamento, quanto ao número de unidades formadoras de colônias (UFC) nas alíquotas. A concentração bacteriana (C), medida em número de UFC por grama de tecido vegetal (UFC/g) foi calculada com base no peso inicial das amostras foliares e nas diluições do material vegetal em tampão PBS, utilizando-se a fórmula: $C = 100 \cdot (1/p) \cdot \text{UFC} \cdot (10)^n$, onde n é o fator de diluição e p, peso da amostra foliar (g), de acordo com Hopkins (1985).

Para avaliação da patogenicidade, as plantas inoculadas foram analisadas a cada 60 dias quanto à ocorrência de possíveis sintomas de EFA, em relação aos controles negativos (10 plantas) da mesma espécie vegetal.

6.3 Resultados e Discussão

As suspensões bacterianas inoculadas apresentaram concentração de $2,3 \times 10^8$ e $1,9 \times 10^9$ UFC/ml, respectivamente, para os isolados 66amx e 327amx. Almeida et al. (2001) obteve taxa de infecção acima de 80% quando inoculou suspensões de *X. fastidiosa* com concentração de 10^8 UFC/ml em 'seedlings' de citros pelo método de agulha. Assim, embora a taxa de infecção possa variar em função do hospedeiro e do isolado utilizado, pode-se considerar que as concentrações de inóculo utilizadas no presente estudo foram adequadas para obtenção de uma taxa de infecção representativa.

Nas duas avaliações de colonização bacteriana, aos 120 e 240 dias após a inoculação, nenhuma planta do tratamento testemunha (inoculadas apenas com o tampão) apresentou amostras com crescimento bacteriano em meio de cultura, demonstrando que as plantas utilizadas eram saudáveis.

Aos 120 dias após a inoculação, correspondendo ao final do período de temperaturas mais elevadas no local, observou-se que o número de plantas colonizadas pelo isolado 66amx foi menor quando comparado ao 327amx (Tabela 1). Entretanto, não se pode concluir sobre uma maior habilidade de colonização do isolado 327amx, uma vez que sua suspensão bacteriana inoculada foi cerca de 10X

mais concentrada que a do isolado 66amx. Em hipótese, uma maior quantidade de células viáveis pode ter atingido os vasos do xilema, aumentando a probabilidade de sucesso na infecção e colonização das plantas pelo isolado 327amx. Uma relação positiva entre concentração bacteriana no inóculo e taxa de infecção de plantas por *X. fastidiosa* já foi relatada em citros e cafeeiro, quando as plantas foram inoculadas com concentrações variando de 10^4 a 10^8 UFC por grama de tecido vegetal (PRADO et al., 2008).

Tabela 1 – Proporção de plantas infectadas em diferentes cultivares de ameixeira, após 120 e 240 dias da inoculação mecânica de dois isolados de *Xylella fastidiosa* e concentração bacteriana (Unidades Formadoras de Colônia – UFC) em plantas infectadas

Isolado	Cultivar	Proporção e percentual de plantas infectadas		Mediana do No. de UFC/g tecido vegetal aos 120 dias
		120 dias	240 dias	
327amx	Reubennel	1/15 (6,7) ^a	2/15 (13,3)	$8,5 \times 10^3$
	Letícia	3/15 (20,0)	1/15 (6,0)	$1,2 \times 10^6$
	Santa Rosa	3/25 (12,0)	10/15 (66,6)	$2,3 \times 10^6$
	Subtotal	7/55 (12,7)	13/45	$1,2 \times 10^6$
66amx	Reubennel	0/20 (0,0)	2/20 (10,0)	-
	Letícia	0/20 (0,0)	1/20 (5,0)	-
	Santa Rosa	1/22 (4,5)	3/20 (15,0)	$5,4 \times 10^6$
	Subtotal	1/62 (1,6)	5/60 (8,3)	$5,4 \times 10^6$
Total		8/117 (6,8)	19/105 (18,1)	

^aNo. de plantas positivas para *X. fastidiosa* por isolamento primário em meio de cultura sobre o total de plantas inoculadas. Números entre parênteses representam o percentual de plantas infectadas.

Agrupando-se os dados dos dois isolados nas três cultivares de ameixeira, observou-se que o percentual total de amostras infectadas aumentou de 6,8 para 18,1% entre o período de 120 e 240 dias após a inoculação (Tabela 1). Isso evidencia que o processo de colonização em ameixeira pode ser lento, similar ao que acontece em citros e cafeeiro (ALMEIDA et al., 2001; PRADO et al., 2008) e que é necessário um período de vários meses para que a população bacteriana atinja a

concentração mínima de 10^3 UFC/g tecido, detectável pelo método de isolamento primário em meio de cultura.

Para ambos os isolados foi possível observar uma diferente proporção de plantas colonizadas entre as cultivares utilizadas. Aos 240 dias após a inoculação, a cultivar Santa Rosa chegou a apresentar 66% de plantas infectadas pelo isolado 327 amx (Tabela 1). Estes dados corroboram com as informações de melhoramento vegetal de ameixeira, que classificam essa cultivar como altamente suscetível, fator pelo qual foi abandonada pelos produtores nas regiões em que se adaptava ao clima. Já a cultivar Reubennel apresenta-se com resistência moderada em estudos de melhoramento. Da mesma forma, no presente estudo o seu percentual de plantas infectadas é intermediário entre Santa Rosa e Leticia, sendo esta última cultivar considerada de elevada resistência, embora tenha apresentado percentuais de infecção muito próximos aos de Reubennel.

Os percentuais de plantas das diferentes cultivares manifestando sintomas foliares de EFA (Tabela 2) foram, em geral, superiores aos de plantas que se mostraram infectadas pelo teste de isolamento primário em meio de cultura (Tabela 1). Porém, deve-se considerar que os sintomas de EFA são facilmente confundidos com deficiência nutricional (FRY et al., 1990), pelo fato de serem resultantes do entupimento dos vasos colonizados pela bactéria. Esta obstrução ocorre não somente pelo biofilme formado no interior dos vasos do xilema, mas também pelas projeções parenquimáticas da própria planta, conhecidas como tiloses, que se formam como uma forma de defesa da planta ao patógeno. Desta forma, torna-se restrita a passagem dos nutrientes e água para a parte aérea, e essa restrição se manifesta inicialmente nas folhas como sintoma de deficiência nutricional. Com a evolução da doença, os sintomas tornam-se mais severos, ocorrendo seca de ramos e posteriormente morte da planta (DUCROQUET; ANDRADE; HICKEL, 2001).

Tabela 2 - Proporção de plantas de diferentes cultivares de ameixeira com sintomas de Escaldadura das Folhas aos 120 e 240 dias após a inoculação mecânica de dois isolados de *Xylella fastidiosa*

Isolado	Cultivar	Proporção e percentual de plantas com sintomas foliares	
		120 dias	240 dias
327amx	Reubennel	10/30 (33,3) ^a	18/30 (60,0)
	Leticia	8/30 (26,0)	15/30 (50,0)
	Santa Rosa	17/50 (34,0)	31/50 (62,0)
66amx	Reubennel	9/40 (22,5)	12/40 (30,0)
	Leticia	8/40 (20,0)	15/40 (37,5)
	Santa Rosa	26/42 (61,9)	31/42 (73,8)

^aNo. de plantas com um ou mais folhas sintomáticas sobre o total de plantas inoculadas. Números entre parênteses representam o percentual de plantas sintomáticas.

Ainda não é conhecida a população mínima necessária de *X. fastidiosa* nos tecidos de ameixeira para que ocorra a manifestação de sintomas; assim, plantas infectadas, porém com população bacteriana ainda baixa, podem apresentar-se assintomáticas. Em citros, as plantas começam a manifestar sintomas de CVC quando as plantas atingem populações de 10^5 - 10^6 UFC/g de tecido (ALMEIDA et al., 2001). Em videira, sintomas de Mal de Pierce foram observados para isolados de *X. fastidiosa* que desenvolveram populações de 10^7 - 10^8 UFC/g de tecido (ALMEIDA; PURCELL, 2003). Portanto, é importante considerar informações sobre taxas de infecção e colonização bacteriana (principalmente população da bactéria e sua movimentação no tecido vegetal), juntamente com a avaliação de expressão de sintomas da doença, como diagnóstico de resistência/tolerância de cultivares à *X. fastidiosa*, em programas de melhoramento.

Em citros, foi necessário um aperfeiçoamento de metodologias de inoculação e avaliação de resistência à *X. fastidiosa*; as primeiras avaliações de materiais foram realizadas em plantas inoculadas por meio de enxertia, com garfagem lateral de ramos com sintomas típicos de CVC (LI, 1997; JAIMEZ et al., 2002), e a seleção de cultivares baseada na presença/ausência de sintomas. No entanto, incompatibilidade de tecidos vegetais, tecidos pouco infectados utilizados na

garfagem, entre outros aspectos, tornavam a eficiência de infecção baixa (JAIMEZ et al., 2002; MACHADO et al., 1992).

Outro fator a ser considerado quanto à metodologia de avaliação de resistência de plantas a patógenos transmitidas por insetos, é a densidade populacional, comportamento e infectividade desses vetores no campo. O programa hoje estabelecido no país para melhoramento de ameixa conta com ensaios a campo, nos quais novas cultivares são plantadas em meio a pomares altamente contaminados, como forma de induzir a ocorrência da doença. Neste contexto, tais estudos dependem da ocorrência de populações de insetos vetores na área e de sua alimentação e movimentação entre plantas de ameixeira, para que ocorra a transmissão e o subsequente desenvolvimento ou não da doença. Embora Wistrom e Purcell (2005) tenham demonstrado que a taxa de infecção de plantas por *X. fastidiosa* em casa de vegetação é maior quando realizada por meio cigarrinhas vetoras do que por inoculação mecânica, a campo não existe meios de assegurar que todas as plantas foram visitadas e alvo de alimentação por cigarrinhas vetoras em iguais condições. Daugherty et al. (2011) demonstraram que cigarrinhas vetoras de *X. fastidiosa* em videira não diferenciam plantas saudias de plantas infectadas ainda assintomáticas, porém, se orientam preferencialmente a plantas saudias em relação a plantas doentes já sintomáticas. Considerando ainda que diferentes cultivares de ameixeira possuem características anatômicas diferentes (CASTRO et al., 2008), algumas podem ser mais atrativas para a alimentação destes insetos quando comparadas a outras, o que já é observado em outras culturas (MONTESINO et al., 2006; MOLINA et al., 2010) e pode induzir a um maior percentual de plantas infectadas nas cultivares preferidas, sem necessariamente serem mais suscetíveis à doença.

Considerando os aspectos acima discutidos, a inoculação mecânica permite um maior controle sobre fatores que podem interferir nos resultados das comparações entre cultivares, pois permite a quantificação e padronização da dose inoculada nas plantas, e o controle do local (parte da planta), número e a época das inoculações. Em casa de vegetação, pode-se realizar inoculações mecânicas em épocas semelhantes às de picos populacionais de insetos vetores no campo, de modo a sincronizar o início das infecções do experimento com a época e condições climáticas em que as epidemias se desenvolvem no campo. Além disso, as plantas podem ser mantidas em telados ou mesmo receber aplicação de inseticidas para

evitar uma eventual exposição a insetos vetores, garantindo a padronização do procedimento.

Por fim, a técnica de inoculação mecânica e avaliação de colonização bacteriana permite a seleção de materiais em um curto espaço de tempo quando comparada ao processo normal de seleção de cultivares, podendo ser usada, inclusive, para um 'screening' inicial de um grande número de cultivares, antes de um estudo de campo. De acordo com os dados, aos 8 meses após a inoculação já é possível recuperar células viáveis de um número significativo de plantas. Mesmo que o estudo tenha a necessidade de ser repetido por mais de uma vez, ou mesmo estender-se por um período mais longo, o ganho de tempo no programa de melhoramento é de aproximadamente 50%.

6.4 Conclusão

A técnica de inoculação mecânica de *Xylella fastidiosa* e avaliação por meio de isolamento primário são aplicáveis em estudos de avaliação de resistência de plantas de ameixeira à bactéria.

A cultivar 'Santa Rosa' apresenta alta suscetibilidade à colonização por *X. fastidiosa*. As cultivares 'Reubennel' e 'Letícia' apresentam maiores níveis de resistência à *X. fastidiosa* quando comparadas à 'Santa Rosa'.

Referências

ALMEIDA, R.P.P.; PURCELL, A.H. Biological traits of *Xylella fastidiosa* strains from grapes and almonds. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 7447–7452, 2003.

ALMEIDA, R.P.P.; PEREIRA, E.F.; PURCELL; A.H.; LOPES, J.R.S. Multiplication and movement of a citrus strain of *Xylella fastidiosa* within sweet orange. **Plant Disease**, Washington, v. 85, n. 45, p. 382-382, 2001.

CASTRO, L.A.S. Perspectivas de cultivo da ameixeira. **Jornal da Fruta**, Lages, p. 24, 2008.

CASTRO, L.A.S.; NAKASU, B.H.; PEREIRA, J. F.M. **Ameixeira: Histórico e perspectivas do cultivo**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2008, 10 p. (Circular Técnica, 70).

CHANG, C.J.; GARNIER, M.; ZREIK, L.; ROSSETTI, V.; BOVE, J.M. Culture and serological detection of the xylem-limited bacterium causing citrus variegated chlorosis and its identification as a strain of *Xylella fastidiosa*. **Current Microbiology**, New York, v. 27, n. 3, p. 137-142, 1993.

CHATTERJEE, S.; ALMEIDA, R.P.P.; LINDOW, S.E. Living in two worlds: the plant and insect lifestyles of *Xylella fastidiosa*. **Annual Review of Phytopathology**, Washington, v. 46, p. 243-271, 2008.

CHEN, J.; HARTUNG, J.S.; CHANG, C.J.; VIDAVER, A.K. An evolutionary perspective of Pierce's disease of grapevine, citrus variegated chlorosis, and mulberry leaf scorch disease. **Current Microbiology**, New York, v. 45, p. 423-428, 2002.

COLETTA-FILHO, H.D.; BITTLESTON, S.; ALMEIDA, R.P.P. Spatial genetic structure of a vector-borne generalist pathogen. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 77, p. 2596-2601, 2011.

DALBÓ, M.A.; KLABUNDE, G.H.F.; NODARI, R.O.; FERNANDES, D.; BASSO, M.F. Evolution of the response of segregating populations of plums and the association with microsatellite markers of leaf scald. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v. 10, p. 337-344, 2010.

DAUGHERTY, M.P., RASHED, A., ALMEIDA, R.P.P.; PERRING, T.M. Vector preference for hosts differing in infection status: sharpshooter movement and *Xylella fastidiosa* transmission. **Ecological Entomology**, Malden, v. 36, p. 654-662, 2011.

DUCROQUET, J-P.H.J.; ANDRADE, E.R.; HICKEL, E.R. **A escaldadura das folhas da ameixeira em Santa Catarina**. Florianópolis: EPAGRI, 2001. 55 p. (EPAGRI. Boletim Técnico, 118).

FACHINELLO, J.C.; PASA, M. S.S.; SCHMTIZ, J.D.; BETEMPS, D.L. Situação e perspectivas da fruticultura de clima temperado no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. esp., E. 109-120, out. 2011.

FAO. **Production-crops**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>>. Acesso em: 10 jan. 2013.

FRY, S.M.; MILHOLLAND, R.D. Response of resistant tolerant and susceptible grapevine tissues to invasion by the Pierce's disease bacterium *Xylella-fastidiosa*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 80, n. 1, p. 66-69, 1990.

GRELLMANN, E.T.; SIMONETTO, P.R. **A cultura da ameixeira**. Porto Alegre: FEPAGRO, 1996. 32 p. (Boletim FEPAGRO, 4).

HILL, B.L.; PURCELL, A.H. Multiplication and movement of *Xylella fastidiosa* within grapevine and four other plants. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 85, n. 11, p. 1368-1372, 1995.

- HOPKINS, D.L. Physiological and pathological characteristics of virulent and avirulent strains of the bacterium that causes Pierce's disease of grapevine. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 75, p. 713-717, 1985.
- HOPKINS, D.L.; PURCELL, A.H. *Xylella fastidiosa*: cause of Pierce's disease of grapevine and other emergent diseases. **Plant Disease**, Washington, v. 86, p.1056–1066, 2002.
- JAIMEZ, E.P.G.; SOUZA, P.S.; WICKERT, E.; DONADIO, L.C. Avaliação de resistência à *Xylella fastidiosa* em germoplasma de tangerine e híbridos introduzidos da Itália e Córsega. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, p. 579-582, 2002.
- LOPES, J.R.S. Mecanismo de transmissão de *Xylella fastidiosa* por cigarrinhas. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 17, n. 1, p. 79-92, 1996.
- LOPES, J.R.S., DAUGHERTY, M.P., ALMEIDA, R.P.P. Context-dependent transmission of a generalist plant pathogen: host species and pathogen strain mediate insect vector competence. **Entomology Experimentalis at Applicata**, Washington, v. 131, p. 216–224, 2009.
- _____. Strain origin drives virulence and persistence of *Xylella fastidiosa* in alfalfa. **Plant Pathology**, Malden, v. 59, p. 963–971, 2010.
- MACHADO, M.A.; SILVERIO, J.L.; BAPTISTA, C.R.; CRISTÓFANI, M.; TEÓFILO SOBRINHO, J. Avaliação de transmissão e seleção de variedades à clorose variegada dos citros (CVC). **Laranja**, Cordeirópolis, v. 13, p. 515-531, 1992.
- MARODIN, G.B; ZANINI, C.L.D. Situação das frutíferas de caroço no Brasil e no mundo. **Jornal da Fruta**, Lages, v. 13, n. 164, p. 2, 2005.
- MARUCCI, R.C.; LOPES, J.R.S.L.; VENDRAMIN, J.D.; CORRENTE, J. E. Feeding site preference of *Dilobopterus costalimai* young and *Oncometopia facialis* (Signoret) (Hemiptera: Cicadellidae) on citrus plants. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 33, p. 759-768, 2004.
- MOLINA, R.O.; GONÇALVES, A.M.O.; ZANUTTO, C.A.; NUNES, W.N.C. Populational Fluctuation of Vectors of *Xylella fastidiosa*, Wells in Sweet Orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] Varieties of Northwest Paraná State, Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.53, n.3, p.549-554, 2010.
- MONTESIO, L.H.; COELHO, J.H.C.; FELIPPE, M.R.; YAMAMOTO, P.T. Ingestão de seiva do xilema de laranjeiras 'Pêra' e 'Valência' (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) sadias e infectadas por *Xylella fastidiosa*, pelas cigarrinhas vetoras *Oncometopia facialise Dilobopterus costalimai* (Hemiptera: Cicadellidae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.28, n.2; p. 199-204, 2006.
- PARADELA-FILHO, O.; SUGIMORI, M.H.; RIBEIRO, I.J.A. Primeira constatação em cafeeiro no Brasil de *Xylella fastidiosa* causadora da clorose variegada dos citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 16, n. 2, p. 135-136, 1995.

- PRADO, S.S.; LOPES, J.R.S.; DEMETRIO, C.G.B.; BORGATTO A.F.; ALMEIDA, R.P.P. Host colonization differences between citrus and coffee isolates of *Xylella fastidiosa* in reciprocal inoculation. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 65, p. 251-258, 2008.
- PURCELL, A.H.; HOPKINS, D.L. Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 34, p. 131-151, 1996.
- RAJU, B.C.; WELLS, J.M.; NYLAND, G.; BRLANSKY, R.H.; LOWE, S.K. Plum leaf scald isolation culture and pathogenicity of the causal agent. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 72, p. 1460-1466, 1982.
- ROSSETI, V.; GARNIER, M.; BOVÉ, M.J.; BERETTA, J.M.G.; TEIXEIRA, A.R.R.; QUAGGIO, J.A.; DE NEGRI, J.D. Présence de bactéries dans le xylème d'orangers atteints de chlorose variégée, une nouvelle maladie des agrumes au Brésil. **Compte Rendu Academie des Sciences**, Paris, v. 310, p. 345-349, 1990.
- SCHAAD, N.W.; POSTNIKOVA, E.; LACY, G.; FATMI, M.; CHANG, C.J. *Xylella fastidiosa* subspecies: *X. fastidiosa* subsp. *piercei*, subsp. nov., *X. fastidiosa* subsp. *multiplex*, subsp. nov., and *X. fastidiosa* subsp. *pauca*, subsp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 27, p. 290-300, 2004.
- SCHUENZEL, E.L.; SCALLY, M.; STOUTHAMER, R.; NUNNEY, L. A Multigene phylogenetic study of clonal diversity and divergence in North American strains of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 7, p. 3832-3839, 2005.
- SIMÃO, S. **Manual de fruticultura**. São Paulo: Ceres, 1971. 530 p.
- VAN SLUYS, M.A.; OLIVEIRA, M.; MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; MYIAHI, C.Y.; FURLAN, L.R.; CAMARGO; L.E.A; SILVA; A.C.R.; MOON, D.H.; TAKITA, M.A. Comparative analyses of the complete genome sequences of Pierce's disease and citrus variegated chlorosis strains of *Xylella fastidiosa*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 185, p. 1018-1026, 2003.
- WELLS, J.M.; RAJU, B.C.; HUNG, H.Y.; WEINSBERG, W.G.; MANDELCO PAUL, L.; BREINNER, D.J. *Xylella fastidiosa* gen. nov. sp. nov.: gram-negative, xylem-limited fastidious bacteria related to *Xanthomonas* spp. **International Journal Systematic Bacteriology**, Washington, v. 37, p. 136-143, 1987.
- WISTROM, C.; PURCELL, A.H. The fate of *Xylella fastidiosa* in vineyard weeds and other alternative hosts in California. **Plant Disease**, Washington, v. 89, p. 994-999, 2005.