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

**Seleção de plantas hospedeiras experimentais para ensaios
de transmissão da estirpe de citros de *Xylella fastidiosa***

Mariana Bossi Esteves

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração:
Entomologia

**Piracicaba
2014**

Mariana Bossi Esteves
Licenciada em Ciências Biológicas

**Seleção de plantas hospedeiras experimentais para ensaios de
transmissão da estirpe de citros de *Xylella fastidiosa***

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

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração:
Entomologia

Piracicaba
2014

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

Esteves, Mariana Bossi

Seleção de plantas hospedeiras experimentais para ensaios de transmissão da estirpe de citros de *Xylella fastidiosa* / Mariana Bossi Esteves. - - Piracicaba, 2014.
76 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2014.

1. Clorose variegada dos citros 2. Bactéria fastidiosa 3. Cigarrinha vetora 4. Plantas-teste
5. Adequação hospedeira I. Título

CDD 632.752
E79s

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

**A Deus que me proporcionou a vida!!
A minha mãe Inês e ao meu namorado Eduardo por tudo o que
fizeram e fazem por mim, pelo amor carinho e confiança!**

Dedico

**Ofereço a todos os amigos e familiares que me ajudaram
diretamente ou indiretamente durante essa caminhada!!!**

Ofereço

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida e por me fazer mais forte a cada obstáculo vencido.

Ao professor Dr. João Lopes pela oportunidade primeiramente de estágio e posterior mestrado, por todos os ensinamentos durante esses 4 anos no laboratório, pela amizade, paciência e suporte para o desenvolvimento do projeto, além da grande contribuição para o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Ao Dr. Helvécio Della Coletta-Filho, pesquisador do Centro de Citricultura Sylvio Moreira pelo auxílio com metodologias moleculares, fundamentais para o desenvolvimento dessa pesquisa e pelos isolados de *X. fastiosa* gentilmente cedidos.

Aos demais membros do Centro de citricultura principalmente a Dra. Alessandra Alves de Souza e as alunas de pós-graduação Carol, Bárbara e Raquel pela ajuda e esclarecimentos.

Agradeço imensamente a Dra. Simone Prado por todos ensinamentos sobre a técnica de isolamento para detecção de *X. fastidiosa*, além de todo o auxílio com a interpretação dos resultados desse trabalho.

A professora Dra. Sônia Maria de Stefano Piedade por todo o auxílio com as análises estatísticas e por todo o tempo que dedicou com os meus dados.

Aos companheiros e amigos de trabalho Arthur, Anderson, Carla, Karina, Karen, Nathalie, Juliana Balbinote, Juliana Veríssimo, Tiago, Javier, Gerane, Maria Cristina, Thiago, Willis, Lemuel, Taciana, Luiza, Danilo, Ricardo e Maria Isabel, os quais me ajudaram de alguma forma na execução desta pesquisa.

Agradeço em especial ao Arthur por ter me ajudado com esse trabalho de diversas formas, e principalmente pela paciência que teve em tirar todas as dúvidas que eu tive.

Ao Odimar Zanardi aluno de doutorado do programa de pós-graduação, que também me auxiliou com as análises estatísticas.

Aos estagiários: Thiago, Willis, Lemuel, Carla e Juliana pelas incansáveis coletas de cigarrinhas.

Aos colegas de pós-graduação pela harmoniosa convivência durante as disciplinas, e pelos momentos de descontração.

Aos professores do Departamento de Entomologia e Acarologia, os quais contribuíram imensamente para o meu aprendizado.

Aos funcionários do Departamento de Entomologia e Acarologia sempre muito atenciosos.

A toda minha família em especial a minha mãe Inês por todo amor, carinho, dedicação e por acreditar nos meus sonhos e me ajudar a realizá-los.

Agradeço imensamente o meu amado namorado Eduardo pelo amor, carinho, compreensão, companheirismo e paciência durante a realização deste projeto. Além de namorado foi meu “estagiário” durante os fins de semana me ajudando nas mais variadas atividades.

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	13
2 DESENVOLVIMENTO	17
2.1 Revisão bibliográfica	17
2.1.1 A citricultura no Brasil e a clorose variegada dos citros (CVC)	17
2.1.2 O fitopatógeno <i>Xylella fastidiosa</i> Wells et al., as doenças ocasionadas e sua distribuição geográfica	19
2.1.3 Estirpes de <i>Xylella fastidiosa</i> e os principais mecanismos de patogenicidade	20
2.1.4 Insetos vetores e mecanismos de transmissão de <i>Xylella fastidiosa</i>	21
2.1.5 Plantas hospedeiras da bactéria <i>Xylella fastidiosa</i>	24
2.2 Material e Métodos.....	27
2.2.1 Obtenção das plantas, cigarrinhas e isolados de <i>Xylella fastidiosa</i>	27
2.2.2 Identificação de espécies herbáceas que permitam multiplicação e colonização sistêmica de <i>Xylella fastidiosa</i>	29
2.2.3 Detecção de <i>Xylella fastidiosa</i> em plantas	31
2.2.3.1 Isolamento primário de plantas em meio de cultura sólido.....	31
2.2.3.2 Extração de DNA das plantas para teste de PCR	32
2.2.3.3 Metodologia de PCR para detecção de <i>Xylella fastidiosa</i> em colônias e extratos de DNA de plantas, insetos e <i>honeydew</i>	33
2.2.4 Adequação de plantas hospedeiras de <i>Xylella fastidiosa</i> para alimentação e sobrevivência do inseto vetor e aquisição bacteriana	34
2.2.4.1 Extração de DNA das cigarrinhas para posterior análise de PCR.....	38
2.2.4.2 Extração de DNA do <i>honeydew</i> para detecção bacteriana através de PCR	39
2.2.5 Seleção de herbáceas hospedeiras como indicadoras da infecção após a inoculação do patógeno pelas cigarrinhas	39
2.2.6 Análise estatística	40
2.3 Resultados e Discussão.....	41
2.3.1 Identificação de espécies herbáceas que permitam multiplicação e colonização sistêmica de <i>Xylella fastidiosa</i>	41

2.3.2 Adequação de plantas hospedeiras de <i>Xylella fastidiosa</i> para alimentação e sobrevivência do inseto vetor e aquisição bacteriana.....	50
2.3.3. Seleção de herbáceas hospedeiras como boas indicadoras da infecção após a inoculação do patógeno pelas cigarrinhas.....	60
3 CONCLUSÕES.....	65
REFERÊNCIAS	67

RESUMO

Seleção de plantas hospedeiras experimentais para ensaios de transmissão da estirpe de citros de *Xylella fastidiosa*

A clorose variegada dos citros (CVC) é uma das principais doenças que afeta a citricultura brasileira, causada pela bactéria *Xylella fastidiosa* (Wells), que coloniza o xilema de culturas de interesse econômico, além de plantas ornamentais e daninhas, sendo transmitida por cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae: Cicadellinae). A compreensão do patossistema CVC é fundamental para planejar táticas eficazes de controle da doença. Entretanto, as pesquisas sobre interações patógeno-planta-vetores são escassas, devido à falta de plantas hospedeiras adequadas para ensaios de transmissão da bactéria, visto que citros não é um bom hospedeiro experimental. Assim, nesta pesquisa objetivou-se identificar espécies herbáceas que permitam a colonização sistêmica da estirpe de *X. fastidiosa* de citros, e avaliar seu uso como plantas-fonte e plantas-teste (indicadoras) em testes de transmissão por *Bucephalogonia xanthophis* (Berg). Para tal foram escolhidas as plantas *Bidens pilosa* L., *Catharanthus roseus* L., *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, *Medicago sativa* L., *Nicotiana tabacum* L., *Ocimum basilicum* L., *Parthenium hysterophorus* L., *Phaseolus vulgaris* L., *Sida rhombifolia* L. e *Solanum americanum* Mill, que foram inoculadas mecanicamente com isolados de *X. fastidiosa* de citros e posteriormente avaliadas quanto à infecção por isolamento primário e reação de cadeia da polimerase (PCR). As espécies que permitiram colonização bacteriana foram posteriormente avaliadas em experimentos de transmissão por *B. xanthophis*, sendo divididos em duas etapas. Na primeira delas, variaram-se as espécies de plantas-fonte para aquisição da bactéria e fixou-se *C. roseus* como planta-teste para inoculação. Na segunda etapa, fixou-se *C. roseus* como planta-fonte e variaram-se as espécies de planta-teste. Durante os experimentos de transmissão, foram avaliados dois parâmetros biológicos de *B. xanthophis*: mortalidade (%) e volume de *honeydew* excretado (medida indireta de ingestão). Entre 30 a 90 dias após a inoculação, as plantas-testes foram analisadas quanto à infecção bacteriana por meio de PCR e isolamento. As inoculações mecânicas mostraram colonização sistêmica e multiplicação de *X. fastidiosa* em sete espécies vegetais (*B. pilosa*, *C. roseus*, *C. sinensis*, *M. sativa*, *N. tabacum*, *O. basilicum* e *S. americanum*), com maiores taxas de infecção e populações bacterianas em *C. roseus* e *N. tabacum*. As espécies *C. roseus*, *M. sativa* e *O. basilicum*, quando usadas como plantas-fonte de *X. fastidiosa*, propiciaram maiores volumes de excreção e menores taxas de mortalidade (15, 20 e 20%) da cigarrinha após 48 h de acesso à aquisição da bactéria. No experimento de transmissão com variação de espécies de plantas-teste, detectou-se a inoculação pelo vetor em *C. roseus*, *M. sativa*, *O. basilicum* e *S. americanum*, com maior proporção de plantas positivas (cerca de 20%) para as duas primeiras. Dentre essas espécies, *C. roseus* e *M. sativa* são as indicadoras mais adequadas para ensaios de transmissão de *X. fastidiosa* por *B. xanthophis*, sendo a primeira também adequada como planta-fonte.

Palavras-chave: Clorose variegada dos citros; Bactéria fastidiosa; Cigarrinha vetora; Plantas-teste; Adequação hospedeira

ABSTRACT

Selection of experimental host plants for transmission tests of citrus strain of *Xylella fastidiosa*

Citrus variegated chlorosis (CVC) is a major disease that affects the Brazilian citrus industry, caused by the xylem-limited bacterium *Xylella fastidiosa* (Wells), which colonizes several crop plants, ornamentals and weeds, and is transmitted by sharpshooter leafhoppers (Hemiptera: Cicadellidae: Cicadellinae). A better understanding of the CVC pathosystem is critical for developing effective tactics to control the disease. However, research on the relationships among pathogen strains, host plants and insect vectors associated with CVC is scarce, partly because of the lack of adequate host plants for transmission assays, since citrus is not a suitable experimental host for this purpose. Thus, the present study aimed to identify herbaceous plants that allow systemic colonization of citrus strains of *X. fastidiosa*, and evaluate them as source and test (indicator) plants in transmission assays by the sharpshooter *Bucephalogonia xanthophis* (Berg). Ten plant species, *Bidens pilosa* L., *Catharanthus roseus* L., *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, *Medicago sativa* L., *Nicotiana tabacum* L., *Ocimum basilicum* L., *Parthenium hysterophorus* L., *Phaseolus vulgaris* L., *Sida rhombifolia* L. and *Solanum americanum* Mill were mechanically inoculated with citrus isolates of *X. fastidiosa* and then evaluated for bacterial infection by primary isolation in culture medium and polymerase chain reaction (PCR). Those plant species that allowed bacterial colonization were later evaluated in two transmission experiments by *B. xanthophis*. In the first experiment, different plant species were tested as source plants for bacterial acquisition and transmission to *C. roseus* (test plant). In the second one, *C. roseus* was used as a source plant and different plant species were evaluated as test (indicator) plants for bacterial inoculation. During the transmission experiments, two biological parameters of *B. xanthophis* were evaluated: mortality rate (%) and honeydew excretion (as an indirect measure of ingestion). Between 30 and 90 days after inoculation, the test plants were analyzed for *X. fastidiosa* infection by PCR and culturing. The mechanical inoculation experiments showed systemic colonization and multiplication of *X. fastidiosa* in seven plant species (*B. pilosa*, *C. roseus*, *C. sinensis*, *M. sativa*, *N. tabacum*, *O. basilicum* and *S. americanum*), with higher rates of infection and bacterial populations of *C. roseus* and *N. tabacum*. The species *C. roseus*, *M. sativa* and *O. basilicum*, when used as source plants of *X. fastidiosa*, allowed higher ingestion (honeydew excretion) rates and lower mortality (15, 20 and 20%) of *B. xanthophis* during the 48-h acquisition access period. In the transmission experiment with different species of test plants, *X. fastidiosa* inoculation by the vector was detected in *C. roseus*, *M. sativa*, *O. basilicum* and *S. americanum*, with a higher rate of infected plants (about 20%) in the former two species. Among the herbaceous plant species evaluated in this research, *C. roseus* and *M. sativa* are the most appropriate indicator hosts of *X. fastidiosa* infection for transmission assays by *B. xanthophis*, whereas the former species is also suitable as a source plant.

Keywords: Citrus variegated chlorosis; Fastidious bacterium; Sharpshooter vector; Test plants; Host plant suitability

1 INTRODUÇÃO

A citricultura brasileira exerce um papel fundamental no crescimento socioeconômico do país, o qual se destaca como o maior produtor mundial, sendo responsável por 34% da produção (NEVES, 2011; UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE - USDA, 2014). Contudo, essa produção de grande destaque no Brasil vem enfrentando algumas dificuldades nos últimos tempos, devido a longos períodos de estiagem e principalmente ao aparecimento de doenças nesta cultura.

Dentre as diversas doenças que causam prejuízos à citricultura brasileira, pode-se destacar a clorose variegada dos citros (CVC), popularmente conhecida como “amarelinho”. Esta doença foi detectada pela primeira vez no Brasil em 1987 no município de Colina-SP e desde então vem se espalhando rapidamente pelas principais regiões citrícolas do país, afetando todas as variedades de laranja doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] (MACHADO et al., 1994; ROSSETTI; De NEGRI, 2011). As perdas de produção associadas a gestão da CVC no Brasil, são estimadas em 120 milhões de dólares por ano (BOVÉ; AYRES, 2007). Como sintomas característicos da CVC, destaca-se a presença de folhas com manchas cloróticas e aspectos de deficiência hídrica, além de frutos endurecidos e com tamanho reduzido, o que torna inviável seu consumo *in natura* ou processamento pela indústria de suco (MACHADO et al., 1994; LARANJEIRA et al., 2003).

A CVC é causada pela bactéria *Xylella fastidiosa* (CHANG et al, 1993; LEE et al, 1993) que além dos citros, coloniza o xilema de outras culturas de interesse econômico, tais como amendoeira, ameixeira, cafeeiro, pessegueiro, videira, além de diversas espécies de plantas ornamentais, lenhosas, herbáceas e daninhas (HOPKINS; PURCELL, 2002). Nas culturas agrícolas suscetíveis, a colonização dessa bactéria é extremamente prejudicial, ocasionando uma série de doenças que geram grandes perdas de produção. Entretanto, em muitas plantas infectadas por essa bactéria não há manifestação de nenhum tipo de sintoma. Algumas plantas hospedeiras de *X. fastidiosa*, cultivadas ou não, podem atuar como fontes de inóculo do patógeno para infecção das culturas suscetíveis (HOPKINS, 1989; LOPES et al., 2003). Atualmente *X. fastidiosa* encontra-se dividida em cinco subespécies que diferem geneticamente e biologicamente, sendo que cada subespécie é responsável por doenças em grupos de hospedeiros distintos. No Brasil a CVC é causada pela subsp. *pauca* desta bactéria (SCHAAD et al., 2004; JANCE; OBRADOVIC, 2010).

A disseminação natural de *X. fastidiosa* em pomares cítricos ocorre por meio de cigarrinhas pertencentes à subfamília Cicadellinae (Hemiptera: Cicadellidae), que se alimentam em vasos do xilema de plantas. Até o momento já foram identificadas 13 espécies de cigarrinhas como vetoras, porém a eficiência de transmissão entre elas é variável (REDAK et al., 2004; YAMAMOTO et al., 2007; LOPES; KRUGNER, 2014). Algumas espécies de cigarrinhas vetoras são frequentemente encontradas na vegetação de cobertura dos pomares (PAIVA et al., 1996) sendo que *X. fastidiosa* já foi detectada por testes moleculares em várias espécies herbáceas que constituem essa vegetação (LOPES et al., 2003).

Táticas de controle para a CVC focam principalmente no plantio de mudas sadias, erradicação ou poda de plantas sintomáticas e controle químico do inseto vetor (LOPES, 1999). Porém, esse conjunto de medidas pode ser insuficiente ou de difícil implementação pelos produtores, visto que a incidência da doença se manteve elevada em algumas regiões do Estado de São Paulo (FUNDECITRUS, 2006)

Estudos detalhados das interações patógeno-planta-vetor são escassos para o patossistema CVC, o que limita a sua compreensão e dificulta o desenvolvimento e utilização de medidas mais eficazes de controle da doença. Uma das causas da carência de pesquisas na área é a falta de um hospedeiro experimental adequado do patógeno para ensaios de transmissão por insetos vetores. Embora seja usual utilizar laranja doce como planta-fonte e planta-teste na maioria dos estudos realizados até o momento, esta espécie vegetal não se mostra uma boa hospedeira de multiplicação de *X. fastidiosa*, pois quando infectada permite baixo título bacteriano, fato que dificulta uma aquisição eficiente do patógeno pelo inseto vetor (ALMEIDA et al., 2001). Além do mais, plantas cítricas demoram vários meses para mostrar os primeiros sintomas de CVC após a inoculação por vetores (LOPES et al. 1996). Desta forma, plantas cítricas não são consideradas as mais adequadas para testes de transmissão (LOPES et al., 2000).

Para uma planta ser considerada uma boa indicadora de infecção e uma hospedeira experimental adequada para estudos com *X. fastidiosa*, ela deve propiciar rápida multiplicação e altos níveis de população bacteriana, além de permitir a colonização sistêmica pela bactéria visando uma aquisição mais eficiente pelo vetor, o que resulta em maiores taxas de transmissão (HILL; PURCELL, 1997). Dessa forma, parece clara a necessidade de se identificar plantas hospedeiras da estirpe de citros de *X. fastidiosa* que proporcionem uma rápida multiplicação do patógeno, permitindo

altas concentrações bacterianas nos tecidos vegetais, o que resulta em uma aquisição mais eficiente pelas cigarrinhas vetoras, assim como a manifestação de sintomas em um período menor de tempo que na cultura de citros.

Visando otimizar os ensaios envolvendo transmissão de *X. fastidiosa* de citros por cigarrinhas, esse trabalho teve como objetivos: a) identificar espécies vegetais herbáceas que permitam rápida multiplicação bacteriana e colonização sistêmica pela estirpe de citros de *X. fastidiosa*; b) avaliar a adequação dessas plantas para alimentação, sobrevivência e aquisição bacteriana pela cigarrinha vetora *Bucephalagonia xanthophis* (Berg) e c) selecionar plantas herbáceas hospedeiras de *X. fastidiosa* que sejam boas indicadoras de infecção bacteriana após inoculação pelo vetor.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão bibliográfica

2.1.1 A citricultura no Brasil e a clorose variegada dos citros (CVC)

O Brasil é líder no cultivo de laranja, sendo responsável por 34% da produção mundial, seguido pela China e Estados Unidos com 15 e 13%, respectivamente (USDA, 2014). Mais da metade de todo o suco de laranja consumido no mundo é produzido em indústrias brasileiras e estima-se que a cada cinco copos de sucos de laranja consumidos, três deles são originários do Brasil. As exportações de suco concentrado já alcançam quase 90 países e geram cerca de US\$ 1,5 bilhão a 2,5 US\$ bilhões por ano ao país, além do mais representam o destino de 70% da safra anual. Mais de 200 mil empregos diretos e indiretos são gerados em torno da produção (GRIZOTTO; SILVA; BERGANTINI MIGUEL, 2011; NEVES et al, 2011).

O estado de São Paulo é o principal produtor de citros no país, responsável por 73% da produção, seguido pelos estados da Bahia e Paraná com 6% cada (USDA, 2014). Segundo levantamento feito pela Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB (2013), apenas na região de São Paulo a safra 2013/2014 teve a participação de 10.100 citricultores, cujos pomares totalizaram 170,6 milhões de plantas em uma área de 37,3 mil hectares, resultando em uma produção de 268,6 milhões de caixas de laranja com 40,8 kg cada. Calcula-se que 80% da produção comercial anual é destinada às indústrias processadoras de suco e 20% são encaminhadas para o consumo *in natura*.

Apesar de todo o destaque da produção citrícola brasileira, existe uma série de patógenos e pragas que atingem a cultura e podem comprometer os pomares, além de acarretar na diminuição da produtividade e aumento do valor gasto com a produção. Dentre as doenças que atacam os pomares cítricos, merecem destaque: cancro cítrico, huanglongbing (HLB) ou greening, pinta preta, leprose, morte súbita e a clorose variegada dos citros (CVC) (FUNDECITRUS, 2014).

A CVC foi constatada pela primeira vez no Brasil no ano de 1987 em pomares no município de Colina em São Paulo, sendo, no próximo ano, detectada em Macauba, região também pertencente ao estado (TUBELIS; BARROS; LEITE, 1993). Após o primeiro relato, a doença disseminou-se rapidamente, sendo que no ano de

1992 foi detectada acometendo 2 milhões de laranjeiras, e dez anos depois já estava distribuída em mais de um terço dos pomares brasileiros (HOPKINS; PURCELL, 2002). Atualmente, a CVC encontra-se difundida em praticamente todas as áreas citrícolas do país sob diferentes intensidades, atacando quase todas as variedades comerciais de laranja doce independentemente do porta enxerto utilizado (LARANJEIRA et al., 2005; ROSSETTI; De NEGRI, 2011). As estimativas dos danos econômicos ocasionados pela CVC, tanto no que diz respeito as perdas de produção como ao controle do inseto vetor, são de 120 milhões de dólares anuais (BOVÉ; AYRES, 2007). Deste modo, a CVC é considerada uma das mais importantes doenças da citricultura dos últimos tempos.

Os sintomas da CVC surgem inicialmente nas folhas, as quais apresentam manchas amareladas e irregulares, o que dá origem ao nome popular da doença (amarelinho). Posteriormente as manchas evoluem para áreas cloróticas na parte superior e lesões de coloração castanho claro na parte inferior (TEIXEIRA et al., 2004). Os frutos ficam endurecidos e com tamanho drasticamente reduzido, além de uma forte alteração na acidez o que torna inviável seu consumo *in natura* ou para processamento pela indústria de suco (MACHADO et al., 1994; LARANJEIRA; POMPEU JUNIOR, 2002). Em plantas com estágio avançado de infecção é possível notar frequentemente a presença de galhos salientes na parte superior da copa, com folhas e frutos miúdos e uma pequena desfolha nos ponteiros (ROSETTI; De NEGRI, 1990).

Embora a CVC não cause a morte das plantas cítricas doentes, a produção das mesmas é severamente afetada, sendo que há redução de 67% a 80% do rendimento destas plantas na maioria dos casos, podendo chegar aos 90% em variedades altamente susceptíveis como ‘Lima’, ‘Pêra’ e ‘Rubi’ (LARANJEIRA; POMPEU JUNIOR, 2002).

A CVC é causada pela bactéria *Xylella fastidiosa*, a qual pode ser transmitida através de mudas e borbulhas contaminadas, inoculação mecânica por meio de agulhas (método experimental), além de insetos vetores, sendo esta última a principal forma de disseminação do patógeno no campo (HE et al., 2000). Esta bactéria coloniza os vasos de xilema de diversas plantas causando a obstrução dos mesmos, dificultando e/ou bloqueando o transporte de água e nutrientes realizado por esse vaso condutor, e como consequência há o aparecimento de sintomas de deficiência hídrica, principalmente nas folhas (WENDLAND et al., 2003; MACHADO et al., 2007).

Os sintomas de estresse hídrico são mais evidentes no verão, em que as temperaturas mais altas exigem maior demanda de água pela planta (McELRONE; SHERALD; FORSETH, 2001).

As medidas que envolvem o manejo da CVC atualmente são a produção de mudas saudáveis, podas de ramos doentes, eliminação de plantas severamente atacadas e o controle dos insetos vetores (LOPES, 1999). Para a obtenção de mudas saudáveis, a sua produção deve necessariamente ser feita em casas de vegetação revestidas com telas apropriadas, evitando a entrada do vetor e a possível introdução do patógeno. Quando a doença já encontra-se difundida pelos pomares de uma plantação, recomenda-se a eliminação de plantas cítricas com menos de quatro anos de idade, pois nessa fase elas estão mais vulneráveis à CVC. A poda de ramos afetados é recomendada em plantas mais velhas e costuma ter bons resultados. O controle do vetor é feito normalmente com a aplicação de inseticidas químicos sistêmicos devido ao hábito alimentar desses insetos. Entretanto para obter resultados mais eficazes essas medidas de controle devem ser adotadas conjuntamente como uma forma de manejo (GARCIA JÚNIOR et al., 1995; FUNDECITRUS, 2006).

2.1.2 O fitopatógeno *Xylella fastidiosa* Wells et al., as doenças ocasionadas e sua distribuição geográfica

Xylella fastidiosa (Xanthomonadales: Xanthomonadaceae) é uma bactéria baciliforme gram-negativa estritamente aeróbia, não apresenta motilidade nem flagelos. Seu tamanho é variável, medindo cerca de 0,25 a 0,35 µm de diâmetro e 0,9 a 3,5 µm de comprimento. Sua principal característica é um crescimento lento em meio de cultura com temperaturas adequadas entre 26° C a 28° C e pH ótimo de 6,5 a 6,9 (WELLS et al., 1987). Os meios de cultura para o cultivo desta bactéria necessitam ser complexos, pois ela exige vários aminoácidos além de macro e micronutrientes para o seu crescimento (HOPKINS, 1989). As colônias crescidas nos meios apresentam-se de forma discretas, opacas e circulares medindo 0,6 mm de diâmetro com 10 dias e 1,5 mm depois de 30 dias de crescimento (WELLS et al., 1987).

Esse fitopatógeno é encontrado colonizando o xilema de diversas plantas, sendo responsável por uma série de doenças como a doença de Pierce (PD) em videira, a clorose variegada dos citros (CVC), a atrofia dos ramos do cafeeiro (ARC), a escaldadura das folhas da ameixeira (EFA), a queima das folhas da amendoeira

(ALS), carvalho (OLS) e pêra (PS), a murcha em vinca (PW) o nanismo em alfafa (AD) e a síndrome do declínio rápido em oliveiras (DAVIS, 1978; DAVIS, 1980; WELLS; RAJU, 1983; CHANG et al., 1993; HOPKINS; PURCELL, 2002; LIMA et al., 1998; PRADO et al., 2008; LOPES; LANDA; FERERES, 2014; SAPONARI et al., 2014). Muitas dessas plantas são culturas de interesse econômico, nas quais *X. fastidiosa* causa grandes perdas para a produção todos os anos.

A bactéria *X. fastidiosa* é originária da América do Norte tendo seu primeiro relato nas culturas de videiras e alfafa na região sudeste dos Estados Unidos. Na década de 70 acreditava-se que o agente causal das doenças conhecidas como “*Pierce’s disease*” em videiras e “*alfalfa dwarf*” em alfafas eram bactérias pertencentes à família Rickettsiaceae devido à similaridade morfológica e estrutural (GOHEEN; NYLAND; LOWE, 1973; HOPKINS; MOLLENHAUER, 1973). Posteriormente, estudos envolvendo serologia, ultraestrutura, composição de DNA, proporção guanina + citosina além da composição celular de ácidos graxos e lipídeos, mostraram que ambas bactérias são pertencentes a grupos taxonômicos distintos (WELLS; RAJU, 1984; RAJU; WELLS, 1986).

Atualmente *X. fastidiosa* encontra-se amplamente distribuída também na América do Sul, em países como: Argentina, Brasil, Costa Rica e Paraguai (HOPKINS; PURCELL, 2002). Considerava-se que esse fitopatógeno estava restrito às Américas, porém na década de 90 foi relatada sua ocorrência no Taiwan, na cultura de pêra, causando a doença conhecida como ‘*pear leaf scorch*’ (LEU; SU, 1993). Recentemente também foi detectada no continente europeu, especificamente em oliveiras no sul da Itália. Sua detecção nessas árvores está sendo feita através de análises moleculares e por microscopia, nas quais os resultados indicam que a bactéria *X. fastidiosa* é o agente causal da nova doença que vem comprometendo a produção das oliveiras no local (SAPONARI, et al., 2014).

2.1.3 Estirpes de *Xylella fastidiosa* e os principais mecanismos de patogenicidade

Devido à alta variabilidade genética e fenotípica dentro dessa espécie de fitopatógeno, e da especificidade das estirpes com seus hospedeiros, *X. fastidiosa* encontra-se dividida atualmente em cinco subespécies distintas: *X. fastidiosa* subsp.

fastidiosa ou *piercei* (compreende linhagens de videira e alfafa); *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* (linhagens de pessegueiro, ameixeira e amendoeira); *X. fastidiosa* subsp. *pauca* (incluiu isolados de café e citros); *X. fastidiosa* subsp. *sandyi* (linhagens de espiroleira, magnólia e jacarandá) e *X. fastidiosa* subsp. *tashke* (tem como hospedeiro a planta ornamental chitalpa (SCHAAD et al., 2004; SCHUENZEL et al., 2005; HERNANDEZ-MARTINEZ et al., 2007; RANDALL et al., 2009; JANSE; OBRADOVIC, 2010).

Xylella fastidiosa foi a primeira espécie de fitopatógeno que teve seu genoma completo sequenciado utilizando a linhagem 9a5c da subsp. *pauca* para o estudo. Com isso pode-se observar os mecanismos de patogenicidade desta bactéria, os quais envolvem diversas estratégias, dentre elas a síntese de hemolisinas, proteínas responsáveis por detoxificação, além de toxinas pertencentes a família RTX, as quais são importantes fatores de virulência em bactérias gram-negativas. A presença de genes codificadores de proteínas de adesão também foi constatada no genoma (KUHNERT, 1997; SIMPSON et al., 2000). Entretanto, segundo De Souza (2003) o principal mecanismo de patogenicidade de *X. fastidiosa* está relacionado à capacidade de oclusão dos vasos do xilema através da formação do biofilme, que seria uma matriz fechada de populações microbianas que se aderem umas às outras e às superfícies ou interfaces possuindo um ciclo de desenvolvimento coordenado, o qual é formado tanto no xilema da planta quanto no inseto vetor.

Esta forma de colonização proporciona vantagens adaptativas à colônia, pois confere a ela uma maior adesão ao substrato, assim como célula-célula, ocorrendo também um aumento considerável na resistência a compostos microbianos, detergentes e também às respostas de defesa da planta, facilitando a extração de nutrientes do meio pelas células (DAVIES et al., 1993). Além do mais, a colonização sob a forma de biofilme é fundamental para a sobrevivência da colônia em ambientes turbulentos e sujeitos a alta pressão, como é o caso do lúmen do canal alimentar das cigarrinhas vetoras e os vasos xilemáticos das plantas hospedeiras (HOPKINS, 1989).

2.1.4 Insetos vetores e mecanismos de transmissão de *Xylella fastidiosa*

Os insetos vetores de *X. fastidiosa* estão restritos a grupos taxonômicos que têm alimentação exclusiva no xilema das plantas. A alimentação nesse vaso condutor só é possível porque esses insetos apresentam a região do cibário (parte anterior do

estomodeu) modificada em uma câmara de sucção bem desenvolvida, o que possibilita a ingestão de líquidos sob forte pressão negativa (LOPES, 1996). A baixa concentração de aminoácidos proporcionada pela alimentação no xilema é compensada pela grande quantidade de líquido ingerido, e pela existência de uma câmara filtro (uma adaptação do sistema digestório desses insetos) que permite que o líquido sugado passe diretamente do estomodeu para o proctodeu, sendo aproveitado apenas um suco alimentar concentrado e de fácil absorção, com o excesso de líquido sendo eliminado sob a forma de gotículas açucaradas (*honeydew*) (BRODBECK; MIZELL III; ANDERSEN, 1993; GALLO et al., 2002; GULLAN; CRANSTON, 2012).

Os vetores da bactéria *X. fastidiosa* que possuem essas características são insetos pertencentes a Ordem Hemiptera, Subordem Auchenorrhyncha, famílias Cicadellidae e Cercopidae (REDAK et al., 2004). A maioria das cigarrinhas vetoras são cicadelídeos, entretanto, os cercopídeos, ultimamente tem ganhado destaque, devido a sua associação com a doença conhecida como “olive quick decline syndrome” em oliveiras na Itália (ELBEAINO et al., 2014; SAPONARI et al., 2014).

Para a cultura de citros foi comprovado através de experimentos clássicos de transmissão que apenas a família Cicadellidae possui representantes que são vetores da CVC, sendo atualmente conhecidas 13 espécies: *Acrogonia citrina* Marucci & Cavichioli, 2002, *Acrogonia virescens* (Metcalf, 1949), *Bucephalogonia xanthophis* (Berg, 1879), *Dilobopterus costalimai* Young, 1977, *Ferrariana trivittata* (Signoret, 1851), *Fingeriana dubia* Cavichioli, 2003, *Homalodisca ignorata* Melichar, 1924, *Macugonalia leucomelas* (Walker, 1851), *Oncometopia facialis* (Signoret, 1854), *Oragua discuidula* (Osborn, 1926), *Parathona gratiosa* (Blanchard, 1840), *Plesiommatia corniculata* Young, 1977 e *Sonesimia grossa* (Signoret, 1854) (REDAK et al., 2004; YAMAMOTO et al., 2007; LOPES; KRUGNER, 2014).

A espécie *B. xanthophis* possui destaque por ser frequentemente encontrada em viveiros abertos (ROBERTO et al., 2000) e pomares cítricos em formação (YAMAMOTO et al., 2001), além do fato de apresentar uma taxa de eficiência de transmissão de 12%, uma das mais altas entre as espécies vetoras da CVC (KRUGNER et al., 1998).

A importância de uma espécie como vetora não depende exclusivamente da sua eficiência de transmissão, estando relacionada também com as características ecológicas do inseto, tais como: abundância, mobilidade, local de alimentação entre

as plantas hospedeiras, além da sua distribuição espacial e temporal em relação as fontes de inóculo e estágios suscetíveis da cultura afetada (PURCELL, 1985; ALMEIDA et al., 2005). Dessa forma uma espécie com baixa eficiência de transmissão e alta abundância é tão relevante como vetora quando comparada a uma espécie com maior eficiência de transmissão e menor abundância (MULLER, 2013).

No que diz respeito ao mecanismo de transmissão de *X. fastidiosa* por cigarrinhas, a grande maioria dos trabalhos referem-se ao patossistema associado a doença de Pierce em videira; no entanto acredita-se que o mecanismo seja o mesmo nas demais culturas (LOPES, 1999). Desse modo, sabe-se que *X. fastidiosa* é transmitida de modo propagativo não circulativo durante a alimentação desses insetos (PURCELL, 1989; BACKUS; MORGAN, 2011).

No processo de alimentação as cigarrinhas conseguem penetrar os vasos xilemáticos sem danificá-los, o que é possível, devido ao fato de apresentarem estiletes muito finos (MARUCCI; CAVICHIOLI; ZUCCHI, 2002). Durante a alimentação em uma planta infectada, o inseto vetor adquire juntamente com a seiva, a bactéria que é de ocorrência restrita ao xilema, a qual se desprende da parede dos vasos devido a força de sucção exercida pelo inseto. O processo de aquisição é relativamente rápido, entretanto, sabe-se que períodos mais longos de aquisição resultam em uma transmissão mais eficiente (LOPES, 1996). Após a aquisição, as bactérias se aderem às paredes internas do canal alimentar anterior (estomodeu) do inseto, principalmente na região do cibário (ou câmara de sucção) e precibário, formando um biofilme na superfície cuticular. Estudos tem demonstrado, que a formação de biofilme no inseto vetor, está intimamente relacionada com os polissacarídeos (quitina) presentes no forro cuticular, desta forma, a bactéria interage com esses polissacarídeos de modo a utilizá-los como fonte de carbono para obtenção de nutrientes (KILLINY; PRADO; ALMEIDA, 2010). Trabalhos evidenciam que não é imprescindível que a bactéria inicie sua propagação no estomodeu para que haja a inoculação, e que são necessárias poucas células bacterianas para que a transmissão ocorra. Todavia quanto maior for o título bacteriano presente no inseto vetor maior será a sua eficiência de transmissão (HILL; PURCELL, 1995; ALMEIDA et al., 2005; CHATTERJEE; ALMEIDA; LINDOW, 2008). Não há um período latente mensurável entre a aquisição e a inoculação da bactéria, ou seja, a bactéria pode ser inoculada via egestão durante a próxima alimentação da cigarrinha, o que resulta na rápida disseminação deste fitopatógeno (PURCELL; FINLAY, 1979; LOPES, 1996).

Cigarrinhas que adquirem a bactéria na fase ninfal perdem a infectividade com a ecdise, pois o estomodeu, onde a bactéria encontra-se aderida é de origem ectodérmica e é trocado para dar origem a um novo forro cuticular. Por outro lado cigarrinhas que adquirem o patógeno na fase adulta podem transmiti-lo durante toda a vida, sendo que quanto mais tempo se passa após aquisição, maiores serão as populações bacterianas dentro do inseto, devido a multiplicação do patógeno (HILL; PULCELL, 1995). Embora haja propagação do patógeno no corpo do vetor, não há evidências de transmissão transovariana de *X. fastidiosa* para a progênie (FREITAG, 1951).

2.1.5 Plantas hospedeiras da bactéria *Xylella fastidiosa*

O fitopatógeno *X. fastidiosa* é generalista e possui uma alta diversidade de hospedeiros, incluindo desde plantas cultivadas, lenhosas até espécies ornamentais e daninhas. Muitas dessas plantas não apresentam sintomas de infecção na presença da bactéria, como é o caso de várias espécies de plantas daninhas que ficam próximas aos pomares das grandes culturas, as quais podem atuar como fonte de inóculo para a disseminação de doenças no campo. A susceptibilidade de cada planta ao patógeno é muito variável, o que talvez explique a ausência de sintomas em muitos dos hospedeiros (McELRONE; SHERALD; POOLER, 1999; PURCELL; SAUNDERS, 1999; HOPKINS; PURCELL, 2002; COSTA et al., 2004; WISTROM; PURCELL, 2005; McGAHA et al., 2007).

Na Califórnia, vinhedos com a doença de Pierce são observados com maior frequência perto de rios, pastagens e campos de alfafa, os quais agem como reservatórios para os insetos vetores, e no caso da alfafa, atuam também como fonte de inóculo da bactéria, exercendo um papel fundamental na disseminação primária da bactéria para o vinhedo (SISTERSON et al., 2010).

Para a cultura de citros no Brasil, estudos têm sido realizados e comprovam que muitas plantas infestantes presentes nos pomares, dentre elas: *Vernonia polysphaera* Baker. (assa-peixe), *Eclipta alba* (L.) Hassk (agrião-do-brejo), *Commelina benghalensis* L. (trapoeraba), *Digitaria insularis* (L.) Feddle (capim amargoso) e *Cenchrus echinatus* L. (capim carrapicho), servem de reservatório natural da bactéria, contribuindo para a infecção das plantas cítricas (TRAVERNSOLO; LEITE, 1996).

É fundamental um conhecimento mais abrangente a respeito dos hospedeiros desta espécie de fitobactéria, pois com isso é possível determinar quais espécies são competentes para servirem como reservatório natural do agente patogênico, podendo assim determinar táticas que impeçam a disseminação da doença através desses hospedeiros (LOPES; DAUGHERTY; ALMEIDA, 2009).

Estudos têm mostrado que espécies de plantas que aceitam altas taxas bacterianas, como também permitem uma infecção sistêmica, são mais importantes na epidemiologia da doença. Plantas com essas características, podem servir como boas fontes de propagação da bactéria e ainda proporcionar uma aquisição mais eficiente por vetores, pois havendo maior população bacteriana nos vasos xilemáticos os insetos tem mais chances de adquirir o patógeno durante o processo de alimentação (HILL; PURCELL, 1997).

Segundo Wistrom e Purcell (2005) para uma espécie de planta ser considerada uma boa hospedeira com importância epidemiológica, ela precisa reunir determinadas características. Primeiramente ela necessita ser constantemente visitada por insetos vetores, sendo utilizada por eles como fonte de alimentação. Em segundo lugar, quando inoculada com o patógeno por insetos vetores infecciosos ela necessariamente tem de permitir a infecção, a qual se dá através da multiplicação bacteriana. Finalmente, é necessário ocorrer a circulação sistêmica do patógeno por toda a planta.

Deste modo, o conhecimento de bons hospedeiros é imprescindível em estudos de epidemiologia assim como de transmissão, os quais visam o entendimento das relações patógeno-vetor-planta, procurando auxiliar nas propostas de manejo da doença no campo. Um grande obstáculo encontrado nessas áreas de pesquisa é a falta de hospedeiros experimentais adequados, pois até o momento pouco se tem investigado sobre plantas hospedeiras alternativas que possam ser utilizadas com eficiência em testes experimentais (LOPES, 2000; FRANCIS et al., 2008).

A maioria dos estudos são realizados com hospedeiros da estirpe de *X. fastidiosa* de videira e amendoeira, sendo que grande parte deles se limitam apenas a encontrar hospedeiros infectados no campo. Alguns até utilizam-se da inoculação mecânica das plantas para determinar bons hospedeiros, mas pouquíssimos vão a níveis de transmissão envolvendo ensaios de aquisição e inoculação por insetos vetores (COSTA et al., 2004).

Um estudo envolvendo inoculação mecânica e inoculação via inseto vetor de *X. fastidiosa* foi realizado por Wistrom e Purcell (2005) com a estirpe de videira deste fitopatógeno. Esse estudo objetivou-se em avaliar populações bacterianas de diferentes plantas hospedeiras, assim como o movimento da bactéria além do local de inoculação na planta. Como resultado os autores observaram que das 29 espécies hospedeiras escolhidas apenas cinco delas mostraram resultados satisfatórios em relação à infecção pela bactéria e movimento sistêmico *Conium maculatum* L., *Vicia faba* (L.), *Lactuca serriola* L., *Helianthus Annuus* L. e *Xanthium stumarium* L. Deste modo, os autores demonstraram que estas espécies têm características importantes que tornam essas plantas importantes reservatórios epidemiológicos de *X. fastidiosa*, e potenciais hospedeiros experimentais.

Estudo semelhante foi realizado por Lopes et al. (2003), envolvendo isolados de ameixeira, cafeeiro e citros. No que diz respeito ao isolado de citros, foram inoculadas várias espécies daninhas típicas de ocorrência nos pomares, com os resultados obtidos, pode-se observar que as espécies *Medicago sativa* L. (alfafa), *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv (capitua) *Brachiaria decumbens* Staff (braquiarinha), *Digitaria horizontalis* Wills (capim-de-roça), *Brachiaria plantaginina* (Link) Hitchc (capim-marmelada), *Solanum americanum* Mill (maria-pretinha) e *Bidens pilosa* L. (picão-preto), permitiram a infecção bacteriana após a inoculação mecânica. Entretanto quando foram realizados os testes de transmissão utilizando a espécie de cigarrinha vetora *F. trivittata*, passando pelo período de acesso à aquisição em plantas cítricas com sintomas de CVC e posteriormente o período de inoculação nas diferentes plantas daninhas, não foi obtido nenhum resultado positivo, indicando que não houve a transmissão do patógeno pelo inseto.

Para a estirpe da bactéria de citros no Brasil pouco tem sido os estudos que procuram conhecer bons hospedeiros experimentais para serem utilizados em bioensaios laboratoriais. Alguns trabalhos foram feitos com as espécies *Catharanthus roseus* L. (vinca) e *Nicotiana tabacum* L. (tabaco) as quais proporcionaram alta multiplicação bacteriana após a inoculação mecânica, além de mostrarem-se boas indicadoras da infecção apresentando sintomas em menor tempo que as plantas cítricas. Porém não foram realizados testes de transmissão envolvendo insetos vetores nesses trabalhos (LOPES et al., 2000; MONTEIRO et al., 2001). Entretanto testes de transmissão utilizando *C. roseus* foram realizados com a estirpe de oliveira

desta bactéria, os quais demonstraram que esta espécie é capaz de indicar a infecção bacteriana após a inoculação por *Philaenus spumarius* (L.) (SAPONARI et al., 2014).

Sendo assim, além de se conhecer boas hospedeiras da bactéria é extremamente importante a realização de ensaios de transmissão envolvendo essas plantas e espécies de cigarrinhas vetoras. A adequação desses tipos de testes é muito importante em estudos de patogenicidade e epidemiologia da doença, além de ser essencial para o melhor entendimento das relações patógeno – vetor – planta hospedeira, onde a melhor compreensão desses fatores é fundamental para auxiliar nas táticas de controle.

2.2 Material e Métodos

Os experimentos foram executados no período de maio de 2013 até outubro de 2014 no Laboratório de Insetos Vetores de Fitopatógenos e casas de vegetação do Departamento de Entomologia e Acarologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP), em Piracicaba, SP.

2.2.1 Obtenção das plantas, cigarrinhas e isolados de *Xylella fastidiosa*

Para a realização dos experimentos foram produzidas mudas sadias das espécies vegetais: *Bidens pilosa* L. (picão-preto), *Catharanthus roseus* L. (vinca), *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (laranja-doce), *Medicago sativa* L. (alfafa), *Nicotiana tabacum* L. (tabaco), *Ocimum basilium* L. (alfavaca), *Parthenium hysterophorus* L. (losna-branca), *Phaseolus vulgaris* L. (feijão), *Sida rhombifolia* L. (guanxuma) e *Solanum americanum* Mill. (maria-pretinha).

No caso de laranja-doce, utilizaram-se pés-francos (*seedlings*) sadios da variedade ‘Caipira’ cedidos por viveiro de mudas certificadas. A espécie *C. roseus* foi adquirida em floriculturas, sendo as demais espécies de plantas obtidas a partir de sementes coletadas na vegetação rasteira do campus da ESALQ/USP.

Após a coleta, as sementes de cada espécie foram semeadas em bandejas de isopor com substrato comercial da marca Tropstrato HT/hortaliças (Vida Verde, Mogi mirim, SP, CEP 13803-350), constituído a base de casca de pinus, vermiculita, superfosfato simples e nitrato de potássio. Quando as mudas atingiram aproximadamente 10 cm, foram transplantadas individualmente para vasos com 15

cm x 33 cm (altura x largura), contendo solo, esterco bovino e areia nas proporções de 3:2:1. O plantio e transplante foram realizados quinzenalmente para que houvesse sempre disponibilidade de plantas com tamanho adequado (10 cm) para montagem dos experimentos. Os *seedlings* também eram podados regularmente, para que existisse sempre a presença de ramos novos. Durante todo o estudo as plantas foram mantidas em casa de vegetação telada, a prova de insetos vetores.

A metodologia de criação das cigarrinhas da espécie *B. xanthophis* (Figura 1) foi adaptada do trabalho de Marucci et al. (2003). Cigarrinhas adultas desta espécie foram colocadas em gaiolas com estrutura de alumínio (32x32x50 cm) revestidas com tela anti-afídica e vedadas com espuma nas portas para evitar a fuga dos insetos. Cada gaiola continha uma planta de *Vernonia condensata* Baker (falso-boldo) (Figura 2) e cerca de 40 insetos, os quais permaneciam na gaiola para alimentação, reprodução e oviposição. Semanalmente essas gaiolas eram trocadas, sendo os adultos transferidos com auxílio de sugador para outras gaiolas com plantas novas para que recomeçassem as posturas. As plantas de falso boldo que ficaram em contato com esses insetos eram transferidas para gaiolas maiores (55x55x32 cm), onde permaneciam por aproximadamente 40 dias, até a eclosão e desenvolvimento das ninfas e posterior emergência dos adultos, sendo estes utilizados para a montagem de novas gaiolas de postura, dando assim continuidade a criação. A criação de cigarrinhas foi mantida em casa de vegetação equipada com sistema de resfriamento do tipo 'pad-fan' e aquecedor acionados por termostato, para o controle da temperatura, que variou de 18° C a 32° C. Periodicamente novos indivíduos foram coletados no campo (áreas agrícolas e urbanas), principalmente em plantas de *Lagerstroemia indica* L. (resedá) e *Duranta repens* L. (pingo-de-ouro), para manutenção da criação e aumento da variabilidade genética dentro da colônia.

Figura 1 - Cigarrinha da espécie *Bucephalogonia xanthophis*, utilizada nos experimentos

Figura 2 – Gaiola com estrutura de alumínio revestida com tela anti-afídica, contendo a espécie vegetal *Vernonia condensata*, a qual foi utilizada para a criação das cigarrinhas

Dois isolados representativos de *X. fastidiosa* subsp. *pauca* coletados em citros, U24D (isolado da variedade ‘Baianinha Piracicaba’ em Ubarana, SP) e 9a5c (SIMPSON et al., 2000), foram selecionados da coleção de bactérias do Centro de Citricultura Sylvio Moreira – IAC, em Cordeirópolis, SP, para os experimentos de inoculação mecânica e avaliação das plantas como hospedeiras deste fitopatógeno. Esses isolados foram preservados em ultra-freezer a -80°C e recuperados em meio de cultura sólido *Periwinkle wilt gelrite* (PWG) (HILL; PURCEL, 1995) para multiplicação, sendo repicados 1–2 vezes neste mesmo meio de cultivo, antes de serem utilizados para inoculação das espécies vegetais.

2.2.2 Identificação de espécies herbáceas que permitam multiplicação e colonização sistêmica de *Xylella fastidiosa*

O experimento de identificação de espécies herbáceas com aptidão para multiplicação e colonização sistêmica de *X. fastidiosa* proveniente de citros foi conduzido em duas etapas, na primeira foram realizadas inoculações utilizando dois isolados de *X. fastidiosa* (9a5c e U24D), com o intuito de selecionar o melhor isolado para ser utilizado na segunda etapa.

O primeiro experimento consistiu de cinco inoculações com os isolados de citros citados acima, nas espécies de plantas: *B. pilosa*, *C. roseus*, *C. sinensis*, *N.*

tabacum, *P. hystrophorus*, *S. americanum* e *S. rhombifolia*. O isolado 9a5c foi testado em três inoculações (II, III e IV) nos dias 30/07/2013, 02/09/2013 e 27/09/2013, respectivamente, enquanto que o isolado U24D foi avaliado em duas inoculações (I e V) em 17/05/2013 e 11/12/2013, respectivamente

No segundo experimento, utilizou-se apenas o isolado U24D em quatro inoculações (VI, VII, VIII e IX) nos dias 22/01/14, 21/03/14, 01/04/14 e 11/04/14, respectivamente, e que incluíram as espécies vegetais *B. pilosa*, *C. roseus*, *C. sinensis*, *M. sativa*, *N. tabacum*, *O. basilium* e *P. vulgaris*.

As suspensões bacterianas para as inoculações foram preparadas em câmara de fluxo laminar (Mod. VLFS-09, Veco, Campinas, SP), onde primeiramente as colônias foram raspadas do meio de cultura sólido com o auxílio de alça de platina e ressuspendidas em microtubo contendo tampão fosfato salino autoclavado (*phosphate buffer saline* - PBS) até a obtenção de uma suspensão túrbida. Dessa suspensão foi retirada uma alíquota de 20 µl que foi utilizada para as diluições em série e plaqueamento em meio de cultura PWG (ALMEIDA et al., 2001). As placas foram acondicionadas em estufa com temperatura de 28° C, onde ficaram por aproximadamente 15 dias até a contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC) viáveis e determinação da concentração inicial do inóculo, que variou de $1,7 \times 10^6$ a $7,25 \times 10^{11}$ UFC/mL.

As inoculações foram realizadas em casa de vegetação nos horários mais quentes do dia, entre 11:00 e 14:00 h. Padronizou-se a quantidade de 10 plantas de cada espécie vegetal por inoculação, sendo que sete delas foram inoculadas com um dos isolados de *X. fastidiosa* e as outras três foram inoculadas apenas com tampão PBS, sendo essas utilizadas como controle negativo para os testes diagnósticos e avaliação de sintomas. Cada planta recebeu em sua haste uma gota de 7 µl (suspensão bacteriana ou PBS), a qual foi absorvida pela planta com o auxílio de pequenos furos que foram feitos com alfinete entomológico (método de agulhas ou *pin-pricking*) (HOPKINS, 1985). Para cada lote de plantas testadas, inocularam-se conjuntamente 10 plantas de *C. sinensis* (sete com as mesmas suspensões bacterianas e três com PBS), sendo essas utilizadas como controle do experimento. Após as inoculações, todas as plantas foram mantidas em casa-de-vegetação com tela antiafídica e livre de insetos vetores. Nos dois experimentos, as avaliações de infecção das plantas por *X. fastidiosa* foram feitas com 30, 60 e 90 dias após a inoculação (DAI), usando-se a técnica de isolamento primário em meio de cultura

(2.2.3.1), e aos 90 DAI por meio do teste de reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR) (item 2.2.3.3). Utilizaram-se dados de proporções de plantas infectadas e de concentração bacteriana nas plantas infectadas, nos três períodos de avaliação, para comparação das espécies vegetais como hospedeiras de *X. fastidiosa*.

2.2.3 Detecção de *Xylella fastidiosa* em plantas

2.2.3.1 Isolamento primário de plantas em meio de cultura sólido

A técnica de isolamento primário foi realizada conforme procedimento descrito por Hill e Purcell (1995) e adaptado por Almeida et al. (2001). Para isso foram coletadas cinco folhas de cada planta, localizadas a pelo menos 3 cm abaixo e acima do ponto de inoculação, a fim de verificar se houve colonização sistêmica da bactéria na planta. As folhas foram levadas para o laboratório, onde passaram pela primeira higienização superficial, que se deu através de passagens de algodão embebido em álcool 70%, posteriormente foram extraídos os pecíolos foliares com o auxílio de uma lâmina, sendo em seguida pesados em balança semi-analítica, mantendo-se uma quantidade de 0,10 a 0,20 g de pecíolos por amostra.

O processo de assepsia das amostras teve continuidade na câmara de fluxo laminar, com materiais devidamente autoclavados. Dentro da câmara as amostras passaram por banhos de 2 min em recipientes contendo, na seguinte ordem: hipoclorito de sódio (2%), álcool (92,8%) e água destilada autoclavada, sendo que em água foram três banhos sucessivos em recipientes distintos. Após a esterilização superficial, as amostras de pecíolos foram colocadas sobre pedaços de papeis-filtro autoclavados, e cortadas com lâmina esterilizada em lamparina em pequenos pedaços de, aproximadamente, 1 a 2 mm, sendo em seguida transferidas para tubos de ensaio (16 mm de diâmetro) contendo 2 ml de PBS autoclavado. As amostras foram então homogeneizadas em um triturador com haste giratória (Turrax modelo MA 102, Marconi Equipamentos para Laboratórios S. A., Piracicaba, SP, CEP 13405-970) a 20.000 rpm por 30 s. No intervalo entre a trituração de amostras distintas, a haste do aparelho foi desinfetada por imersão em recipientes contendo água destilada autoclavada, álcool 92,8 e novamente água destilada autoclavada, por 5, 15 e 5 s, respectivamente. Após a homogeneização das amostras, as suspensões resultantes

foram diluídas 10X em câmara de fluxo laminar, transferindo-se 200 µl da suspensão para um novo tubo de ensaio contendo 1,8 ml de tampão PBS autoclavado. Em seguida, uma alíquota de 20 µl de cada amostra diluída foi plaqueada em meio sólido PWG, com o deslizamento da gota sobre o meio ocorrendo através da inclinação da placa. As placas foram incubadas em estufa com temperatura de 28° C, por cerca de 15 dias, para permitir o crescimento, visualização e contagem das colônias bacterianas, entretanto, no oitavo dia já foi possível observar o crescimento de algumas colônias.

Para quantificação da população bacteriana nas amostras de pecíolos foliares, realizou-se contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) sob microscópio estereoscópico, com aumento de 4X. A concentração bacteriana (C), medida em número de UFC/g de tecido vegetal, foi estimada baseando-se no peso inicial das amostras e diluição, segundo a fórmula: $C = 100 \times (1/p) \times n^{\circ} \text{ UFC} \times (10)^n$, onde: n = fator de diluição e p = peso da amostra. A certificação da identidade das colônias foi feita pelo método de PCR, para o qual primeiramente as colônias foram raspadas das placas com auxílio de uma alça de platina e ressuspendidas em um microtubo contendo 200 µl de tampão TE (10 mM de Tris HCl; 1 mM EDTA), sendo posteriormente submetidas à PCR (item 2.2.3.3), utilizando-se dos oligonucleotídeos RST31 e RST33 (MINSAVAGE et al., 1994), que amplificam um fragmento de 733 pares de bases (pb) de várias estirpes de *X. fastidiosa*.

2.2.3.2 Extração de DNA das plantas para teste de PCR

A extração de DNA das amostras foliares seguiu o protocolo baseado em Murray e Thompson (1980). Primeiramente foram coletadas cinco folhas aleatoriamente de cada planta, as quais foram limpas com algodão embebido com álcool 92,8%. Posteriormente, com o auxílio de uma lâmina, os pecíolos foram retirados e fatiados em pedaços de 1 a 2 mm, sendo em seguida colocados em almofariz contendo 800 µl do tampão (Tris - HCl pH 7,5 1 M, EDTA 0,5 M, NaCl 5 M e água deionizada) para a maceração. As amostras maceradas foram colocadas em microtubos de 2 ml, adicionando-se 600 µl do tampão de extração (CTAB 5% - brometo de cetiltrimetilamônio, sarcosyl 10%, PVP 1% e mercaptoetanol 140 mM) por amostra. Após as adições os tubos foram mantidos em banho-maria a 60° C por 30

min. Em seguida ao banho, os tubos foram levados para centrifuga (Hettich – mikro 220R), onde foram submetidos a uma centrifugação de 4000 rpm durante 5 min. Posteriormente, transferiu-se 700 µl do sobrenadante para um novo microtubo, após foi adicionado 70 µl de CTAB 10% (10% CTAB, NaCl 5 M e água deionizada) e 700 µl de CIA (24:1 clorofórmio / álcool isoamílico). Posteriormente os microtubos foram invertidos com as mãos por cerca de 1 min, e em seguida centrifugados a 12000 rpm durante 8 min. Após a centrifugação o sobrenadante foi novamente transferido para um novo tubo, Adicionando-se a ele 600 µl de tampão de precipitação CTAB (1% CTAB, Tris HCl pH 7,5 1 M, EDTA 0,5 M e água deionizada). Na sequência as amostras permaneceram por 15 min de repouso em temperatura ambiente, sendo logo depois submetidas a centrifugação de 4 min a 10000 rpm. O sobrenadante foi descartado e em seguida foi adicionado 400 µl de TE alto sal (Tris - HCl pH 7,5 1 M, EDTA 0,5 M, NaCl 5 M e água deionizada). Logo após os microtubos foram colocados em banho-maria a 60° C por 5 min. Posteriormente o DNA foi precipitado adicionando-se 800 µl de etanol absoluto gelado, e em seguida as amostras foram levadas para o freezer -20° C, onde permaneceram por cerca de 24 h. Depois desse período as amostras foram retiradas do freezer e passaram por centrifugação de 10 min a 12000 rpm. Em seguida removeu-se o sobrenadante e adicionou-se 700 µl de álcool etílico 70%. Para finalizar centrifugou-se novamente as amostras por 5 min a 12000 rpm, e na sequência o sobrenadante foi removido e o pellet obtido foi seco a 55° C por aproximadamente 15 min. Após a secagem do pellet, o mesmo foi suspenso em 400 µl de TE 1/10 (Tris HCl pH 7,5 1 M, EDTA 0,5 M e água deionizada) + RNase (2 µl por ml de TE), sendo em seguida colocados em banho com temperatura de 37° C por 30 min para ação de enzima. Após o procedimento de extração de DNA, as amostras ficaram acondicionadas em ultra-freezer -80° C até a aplicação da técnica de PCR.

2.2.3.3 Metodologia de PCR para detecção de *Xylella fastidiosa* em colônias e extratos de DNA de plantas, insetos e *honeydew*

Para a reação de PCR tanto no que diz respeito às colônias de bactérias oriundas do isolamento primário, como do DNA extraído das plantas, insetos e *honeydew*, utilizou-se a seguinte mistura para a amplificação do DNA: 6,5 µl de 'Dream Taq PCR Master Mix' (Thermo Scientific), 1 µl de cada primer RST31 (5'-

GCGTTATTCGAAGTGATTGCGATTGC-3') e RST33 (5'- CACCATTCGTATCCCGGTG-3') (MINSAVAGE et al., 1994), 2,5 µl de água milli-Q e 2 µl do DNA por amostra. Cada reação continha dois controles positivos (DNA de plantas ou insetos que já haviam sido diagnosticados como positivos em PCRs anteriores) e dois controles negativos, sendo um representado por água milli-Q e o outro pelo DNA de uma planta ou inseto sadio. A amplificação foi realizada em um termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc., Watertown, MA 02172, EUA) programado com as seguintes condições: 1 ciclo inicial de 94° C por 3 min; 35 ciclos de desnaturação a 94° C por 30 seg, anelamento a 55° C por 30 seg, e extensão a 72° C por 45 seg; em seguida 1 ciclo de 72° C por 10 min, por fim estabilizando em 20° C por tempo indeterminado.

Após a amplificação, foi adicionado cerca de 2 µl de corante (0,25% azul de bromofenol, 40% de sacarose) por amostra e visualizou-se o produto da reação do PCR através de eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE (Tris 89 mM; ácido bórico 89 mM e 2 mM EDTA; pH 8,0), suplementado com 4 µl de brometo de etídio. Os fragmentos amplificados foram visualizados sob luz UV e documentados no sistema Eagle Eye II (Stratagene, La Jolla, CA 92037, EUA).

2.2.4 Adequação de plantas hospedeiras de *Xylella fastidiosa* para alimentação e sobrevivência do inseto vetor e aquisição bacteriana

Para verificar se as plantas hospedeiras de multiplicação e colonização sistêmica de *X. fastidiosa* identificadas em 2.2.2 são adequadas como fontes de inóculo para aquisição pelas cigarrinhas e observar se as mesmas permitem a alimentação apropriada e baixa mortalidade para a espécie *B. xanthophis*, foram realizados experimentos de transmissão, os quais consistiram de um período de acesso à aquisição da bactéria em diferentes espécies de plantas-fonte (PAA) seguido por um período de acesso à inoculação da bactéria (PAI) em plantas-teste (sadias) de *C. roseus*.

Previamente à montagem dos experimentos de transmissão, os adultos da espécie *B. xanthophis* oriundos da criação do laboratório, foram confinados por um período de 24 h em plantas de *C. roseus* sadias (pré-teste), como uma forma de certificar que as cigarrinhas que seriam utilizadas no experimento estavam livres de *X. fastidiosa* antes de entrarem em contato com a planta-fonte. As plantas pré-teste

foram avaliadas por isolamento (2.2.3.1) e PCR (2.2.3.3) concomitantemente com as plantas-teste utilizadas no PAI.

Inicialmente havia poucas espécies vegetais que se mostraram positivas quanto à infecção bacteriana após a inoculação mecânica do isolado U24D, sendo assim optou-se por realizar um primeiro experimento com aquelas que apresentaram maior porcentagem de plantas infectadas até a inoculação V do experimento descrito em 2.2.2. Nesse caso as primeiras plantas avaliadas como fonte de aquisição de *X. fastidiosa* por *B. xanthophis* foram *C. roseus*, *C. sinensis* e *N. tabacum*. Posteriormente às avaliações de 90 DAI, foram selecionadas três plantas de cada espécie que mostraram as maiores concentrações de *X. fastidiosa* por isolamento e quantificação em meio de cultura. Tais concentrações, medidas em log do número de UFC/g de pecíolo foliar, variaram de 4,7-5,8 para *C. sinensis*, 6,5-7,4 para *C. roseus* e 6,2-7,5 para *N. tabacum*.

A montagem do experimento seguiu o delineamento experimental inteiramente casualizado, contendo três tratamentos e 18 repetições. Cada repetição foi constituída de uma gaiola contendo cinco cigarrinhas da espécie *B. xanthophis* em seu interior, sendo que em cada planta (tratamento) foram colocadas seis gaiolas (tubo falcon de 50 ml) acopladas a um reservatório graduado na parte inferior (falcon de 15 ml) (Figura 3.A), para o recolhimento e quantificação do *honeydew* dos insetos que ficaram confinados para o PAA de 48 h nessas plantas. As gaiolas foram posicionadas sobre os ramos de forma a favorecer o escoamento do *honeydew* para a parte graduada do tubo falcon. Ao final das 48 h foi possível avaliar a porcentagem de mortalidade das cigarrinhas e quantidade de *honeydew* (ml) excretado em cada gaiola, sendo este último parâmetro, uma forma indireta de avaliar o volume de líquidos (presumivelmente seiva do xilema) ingerido por esses insetos. O *honeydew* acumulado nesse período foi armazenado em microtubos com o intuito de detectar indiretamente a presença do patógeno através da excreção das cigarrinhas, para isso o *honeydew* foi submetido à extração de DNA (2.2.4.2) e análise de PCR (2.2.3.3).

As cigarrinhas que sobreviveram ao PAA em plantas-fonte foram confinadas em plantas-teste de *C. roseus*, em número de três indivíduos por planta, no interior de gaiolas plásticas com formato retangular (10x5x3 cm), para um período de acesso à inoculação da bactéria (PAI) de 72 h (figura 3B). As plantas-teste que receberam as cigarrinhas foram devidamente identificadas quanto à espécie vegetal usada como fonte para aquisição. Passados os três dias do PAI, os insetos foram

individualizados e colocados em microtubos contendo álcool etílico absoluto para posterior avaliação da infectividade por meio da extração de DNA (2.2.4.1) seguida pela análise de PCR (2.2.3.3). Já as plantas-teste receberam uma fita para marcação do local de confinamento das cigarrinhas, para posterior coleta de folhas que ficaram em contato direto com esses insetos, ou o mais próximo possível, para as análises de isolamento primário em meio de cultura e PCR (descritas nos itens 2.2.3.1 e 2.2.3.3 respectivamente), as quais foram realizadas aos 40 e 80 DAI. Até as datas das avaliações, as plantas ficaram acondicionadas em casa de vegetação com tela anti-afídica.

Posteriormente, com mais resultados de plantas que permitiram a infecção bacteriana após as inoculações mecânicas do isolado U24D em 2.2.2, foi possível avaliar outras espécies como plantas-fonte para a aquisição do patógeno. Portanto, aos três meses após as inoculações mecânicas em 2.2.2, foram selecionadas as espécies vegetais que permitiram a infecção bacteriana em ao menos uma das avaliações realizadas. Sendo assim foram avaliadas como planta-fonte em um segundo experimento de transmissão por *B. xanthophis*, as seguintes espécies: *C. roseus*, *M. sativa*, *N. tabacum*, *O. basilicum* e *S. americanum*, além de *C. sinensis* (controle). *Bidens pilosa* também permitiu a propagação da bactéria no estudo 2.2.2, porém essa espécie não foi utilizada no referido experimento devido a sua rápida senescência.

Cada tratamento deste segundo experimento foi composto por uma espécie de planta-fonte, sendo a repetição representada por uma planta infectada de *C. roseus*, *C. sinensis*, *M. sativa*, *N. tabacum*, *O. basilicum*, *S. americanum*, sobre a qual foram confinadas cinco cigarrinhas da espécie *B. xanthophis*, totalizando oito repetições por tratamento. As cigarrinhas foram confinadas para o PAA de 48 h nas hastes das plantas por meio de gaiolas de tubos falcon para coleta de *honeydew* (Figura 3A), como descrito anteriormente; porém neste segundo experimento os parâmetros porcentagem de mortalidade e excreção de *honeydew* (µl) foram avaliados após 24 e 48 h de confinamento. Após o PAA, o *honeydew* também foi armazenado em microtubos para extração de DNA (2.2.4.2) e PCR (2.2.3.3), como já relatado.

As cigarrinhas que sobreviveram ao PAA em plantas-fonte neste experimento foram confinadas sobre plantas-teste de *C. roseus* para o PAI de 72 h, em número de três insetos por planta, da mesma forma que o experimento precedente. Neste ensaio

também foi observada a mortalidade das cigarrinhas nas plantas-teste a cada 24 h de PAI. Após o PAI foram adotados os mesmos procedimentos de avaliação nas plantas-teste e cigarrinhas descritos anteriormente.

Figura 3 – Gaiolas utilizadas no experimento de transmissão: A. gaiola de tubos falcon graduada na parte inferior para quantificação e coleta do *honeydew* durante o período de acesso à aquisição (PAA); B. gaiola plástica de formato retangular usada para confinar as cigarrinhas no período de acesso à inoculação (PAI) em plantas-teste

2.2.4.1 Extração de DNA das cigarrinhas para posterior análise de PCR

A extração de DNA dos insetos seguiu a metodologia de Rogers e Bendich (1988), porém com algumas modificações. Primeiramente com o auxílio de uma lamina de bisturi foram retiradas as asas e pernas das cigarrinhas, a fim minimizar a presença de inibidores. Em seguida as cigarrinhas foram individualizadas e colocadas em tubos de 2 ml com fundo arredondado contendo tampão (Tris-HCl, EDTA, NaCl 5 M, mercaptoetanol e água deionizada) juntamente com 'beads' de granulometria de 3 mm para serem trituradas no equipamento '*TissueLyser LT Qiagen*' por 5 min. Após a trituração foi adicionado em cada amostra 60 µl de CTAB 10% (10% CTAB, NaCl 5 M e água deionizada), sendo que em seguida os tubos ficaram mantidos em banho maria a 65° C por 5 min. Posteriormente as amostras foram mantidas em temperatura ambiente, onde receberam o acréscimo de 3 µl de proteinase K na concentração de 10 mg/ml. Após esta adição os microtubos foram acondicionados novamente em temperatura de 65° C, agora por 40 min. Depois os tubos passaram por uma centrifugação de 15 min a 14.000 rpm, e em seguida houve a retirada do sobrenadante, o qual foi transferindo para tubos novos de 1,5 ml, e imediatamente a seguir foi adicionado 250 µl de CIA (24:1 Clorofórmio / álcool isoamílico). Posteriormente os microtubos foram invertidos com as mãos por cerca de 1 min, na sequência, foram submetidos a centrifugação de 15 min a 14.000 rpm. Em seguida foi retirada a fase superior ($\pm$ 200 µl) e transferida para tubos novos, nos quais também foram adicionados 200 e 90 µl de álcool isopropanol gelado e acetato de amônia respectivamente. Os microtubos foram levados ao freezer com temperatura de -20° C, onde permaneceram de 2 a 24 horas. Após esse período as amostras passaram por centrifugação de 14.000 rpm por 15 min, e em seguida o sobrenadante foi descartado, sendo o pellet lavado com 300 µl de álcool 70% gelado. Novamente os tubos foram colocados em centrifuga nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi descartado sobrando apenas o pellet no fundo dos tubos, o qual foi seco em estufa durante 15 min a 55° C. Por fim, foi adicionado ao pellet seco, 100 µl da solução de TE (10 mM de Tris HCl; 1 mM EDTA) + RNase (5 mg/ ml), sendo posteriormente levados para a temperatura de 37° C para ação da enzima. Após a reação, as amostras de DNA ficaram mantidas a -80° C até a realização do PCR.

2.2.4.2 Extração de DNA do *honeydew* para detecção bacteriana através de PCR

Os volumes de *honeydew* coletados durante a alimentação das cigarrinhas nas diferentes espécies de plantas-fontes foram centrifugados por 5 min a 12.000 rpm, com o intuito de concentrar as possíveis células bacterianas no fundo dos microtubos. Em seguida foi descartado o sobrenadante de cada amostra, sendo as mesmas posteriormente submetidas à extração de DNA utilizando o 'Kit DNeasy Blood and Tissue' (Qiagen), conforme indicação do fabricante. Depois da extração, o extrato de DNA ficou mantido em freezer a -80° C até a aplicação da técnica de PCR (item 2.2.3.3).

2.2.5 Seleção de plantas herbáceas indicadoras da infecção após a inoculação de *Xylella fastidiosa* pelas cigarrinhas

Como forma de selecionar dentre as plantas hospedeiras de *X. fastidiosa*, quais poderiam ser utilizadas como planta-teste (ou indicadoras) em ensaios de transmissão, apresentando indícios da infecção seja pela expressão de sintomas e/ou detecção bacteriana por PCR e/ou isolamento, após a inoculação pelo inseto vetor, foram avaliadas as espécies herbáceas que apresentaram resultados positivos no experimento de inoculação mecânica (2.2.2), além das plantas cítricas.

Realizou-se um experimento de transmissão com o isolado U24D, no qual padronizou-se a espécie *C. roseus* como planta-fonte para a aquisição da bactéria pelas cigarrinhas, variando-se as plantas-testes utilizadas, as quais foram representadas pelas espécies: *B. pilosa*, *C. roseus*, *C. sinensis*, *M. sativa*, *N. tabacum*, *O. basilicum* e *S. americanum*. Devido ao grande número de plantas-teste a serem inoculadas simultaneamente e número reduzido de cigarrinhas disponíveis na criação do laboratório, o experimento foi repetido três vezes no tempo, usando-se diferentes indivíduos de *B. xanthophis* e plantas infectadas de *C. roseus* para a aquisição bacteriana em cada repetição. Uma exceção foi *M. sativa*, que foi avaliada como planta-teste em apenas duas das repetições. Em cada repetição do experimento, 105 cigarrinhas adultas foram confinadas em gaiolas (32x32x50 cm) revestidas com tela anti-afídica juntamente com uma planta de *C. roseus* infectada por *X. fastidiosa*, com populações bacterianas variando de 10^6 a 10^7 UFC/g de tecido vegetal. As cigarrinhas permaneceram em contato com a plantas-fonte durante um PAA de 48 h. Após esse

período os insetos foram transferidos em grupos de três por planta-teste das diferentes espécies vegetais, para o PAI de 72 h no interior de gaiolas plásticas com formato retangular (10x5x3 cm) (Figura 3.B). Inocularam-se cinco plantas-teste por espécie vegetal, totalizando 15 indivíduos nas três repetições do experimento. Além das cinco plantas inoculadas, três plantas de cada espécie vegetal foram mantidas como controle negativo, sem exposição aos insetos.

Durante o PAI foi avaliada a cada 24 horas a mortalidade das cigarrinhas nas diferentes espécies de plantas-teste. Após o PAI, os insetos foram retirados das plantas-teste e colocados em microtubos contendo álcool etílico absoluto e mantidos em -80° C até a extração de DNA (2.2.4.1) e análise por PCR (2.2.3.3), nesse experimento os insetos foram avaliados por PCR em grupos de três indivíduos por amostra. As plantas-teste receberam uma marcação, a qual se deu através de fita colorida, para evidenciar o local do confinamento dos insetos e posteriormente coletar as folhas mais próximas. Em seguida as plantas-teste foram levadas para casa de vegetação, sendo avaliadas quanto à infecção por *X. fastidiosa* aos 60 e 90 dias após a inoculação (DAI), por isolamento primário em meio de cultura (2.2.3.1) e PCR (2.2.3.3).

2.2.6 Análise estatística

Os dados de porcentagem de mortalidade e volume de *honeydew* obtidos nos diferentes tratamentos foram analisados por meio de modelos lineares generalizados (GLM) (NELDER; WEDDERBURN, 1972), assumindo uma distribuição dos tipos quase-binomial e gaussiana, respectivamente. A verificação da qualidade do ajuste foi feita com base no gráfico meio-normal de probabilidades com envelope de simulação (DEMÉTRIO; HINDE 1997; HINDE; DEMÉTRIO, 1998). Quando houve diferença significativa pela análise de variância, múltiplas comparações (teste de Tukey, $P < 0,05$) foram feitas com a função `glht` do pacote `multcomp`, com ajuste dos valores de P . Todas as análises foram realizadas no software estatístico “R”, versão 2.15.1 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2012).

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Identificação de espécies herbáceas que permitam multiplicação e colonização sistêmica de *Xylella fastidiosa*

Os resultados da primeira etapa das inoculações mecânicas em diferentes espécies vegetais com os isolados U24D e 9a5c de *X. fastidiosa* estão apresentados na tabela 1. Nela se encontram os dados de proporção de plantas positivas para *X. fastidiosa* detectadas por isolamento em meio de cultura com 30, 60 e 90 dias após a inoculação (DAI) mecânica, e por PCR aos 90 dias após a inoculação. Na inoculação I com o isolado U24D, aos 90 DAI observaram-se 40 e 28,6% de plantas de *B. pilosa* e *C. sinensis* positivas para *X. fastidiosa*, respectivamente. Nas inoculações II, III e IV com o isolado 9a5c, observaram-se taxas de infecção de até 8,3, 28,6, 9,5, 28,6 e 5,2%, respectivamente, em plantas de *B. pilosa*, *C. roseus*, *C. sinensis*, *N. tabacum* e *S. americanum*, aos 90 DAI. Já na inoculação V com o isolado U24D, detectou-se *X. fastidiosa* aos 90 DAI em 100, 42,8 e 85,7% das plantas de *C. roseus*, *C. sinensis*, *N. tabacum*, respectivamente. Nenhuma das plantas de *P. hysterothorus* e *S. rhombifolia* mostrou-se infectada por *X. fastidiosa* nas inoculações realizadas.

Todas as amostras vegetais que proporcionaram o crescimento das colônias de *X. fastidiosa* após o isolamento em meio de cultura, tiveram a identidade bacteriana confirmada por PCR.

De um modo geral, verificaram-se maiores percentuais de plantas infectadas pela bactéria *X. fastidiosa*, tanto por isolamento em meio de cultura como por PCR, nas inoculações com o isolado U24D em relação ao isolado 9a5c. O penúltimo isolado também mostrou um crescimento mais vigoroso em meio de cultura quando comparado com o 9a5c, propiciando maior quantidade de inóculo. Esses dados indicam uma maior efetividade do isolado U24D para experimentos envolvendo inoculação mecânica de plantas. Em estudos comparativos de isolados bacterianos provenientes da estirpe de citros realizados por Silva (2014), observou-se que o isolado U24D é mais agressivo e virulento que os demais isolados estudados, inclusive o 9a5c.

Tabela 1 – Detecção de dois isolados de *Xylella fastidiosa* em diferentes espécies vegetais aos 30, 60 e 90 dias após inoculações (DAI) mecânicas realizadas em ocasiões distintas

Inoculações (data)	Espécie de planta	Isolado de <i>X. fastidiosa</i> (UFC/mL) ^a	Proporção de plantas positivas por isolamento (mín-máx Log UFC/g de tecido) ^b			Proporção de plantas positivas por PCR ^c
			30 DAI	60 DAI	90 DAI	90 DAI
I (17/05/13)	<i>Bidens pilosa</i>	U24D	... ^d	1/7 (5,3)	2/5 (5,5-5,8)	2/5
	<i>Citrus sinensis</i>	(1,7x10 ⁶)	...	0/7	2/7 (5,4-6,2)	2/7
II (30/07/13)	<i>Bidens pilosa</i>	9a5c (4,9x10 ⁷)	...	0/7	0/7	0/7
	<i>Citrus sinensis</i>		...	0/7	1/7 (4,2)	1/7
	<i>Solanum americanum</i>		...	1/7 (6,1)	1/6 (6)	1/6
III (02/09/13)	<i>Bidens pilosa</i>	9a5c (3,8x10 ⁷)	...	1/5 (3,3)	1/5 (4,2)	1/5
	<i>Citrus sinensis</i>		...	1/7 (5,3)	1/7 (5,4)	1/7
	<i>Nicotiana tabacum</i>		...	2/7 (6,2-6,5)	2/7 (6-6,7)	2/7
	<i>Solanum americanum</i>		...	0/7	0/7	0/7
IV (27/09/13)	<i>Catharanthus roseus</i>	9a5c (8,5x10 ⁷)	...	2/7 (5,2-6,9)	2/7 (5,8-6,3)	1/7
	<i>Citrus sinensis</i>		...	0/7	0/7	0/7
	<i>Parthenium hysterophorus</i>		...	0/4	0/4	0/3
	<i>Sida rhombifolia</i>		...	0/7	0/5	0/5
	<i>Solanum americanum</i>		...	0/7	0/6	0/6
V (11/11/13)	<i>Catharanthus roseus</i>	U24D (1,0x10 ¹⁰)	7/7 (4,2-6,8)	7/7 (6,7-7,4)	7/7 (5,7-6,5)	6/7
	<i>Citrus sinensis</i>		0/7	1/7 (5,2)	3/7 (4,7-5,8)	2/7
	<i>Nicotiana tabacum</i>		0/7	5/7 (6,2-7,5)	6/7 (4,8-6,9)	4/7
	<i>Sida rhombifolia</i>		0/7	0/7	0/6	0/6

^a Número em parênteses representa a concentração da suspensão bacteriana (unidades formadoras de colônias/ml) inoculada nas plantas;

^b Número de plantas positivas para *X. fastidiosa* sobre o total de plantas inoculadas, detectadas por isolamento primário em meio de cultura. Valores entre parênteses representam o intervalo de variação de estimativas de concentração bacteriana (log de UFC/g de tecido) em plantas infectadas;

^c Número de plantas positivas para *X. fastidiosa* sobre o total de plantas inoculadas, detectadas pela técnica de PCR;

^d Não houve avaliação.

Devido às razões apresentadas acima, utilizou-se apenas o isolado U24D para a 2ª. etapa do experimento de inoculação mecânica, no qual foram incluídas plantas que permitiram a colonização por *X. fastidiosa* na 1ª. etapa (*B. pilosa*, *C. roseus*, *C. sinensis*, *N. tabacum* e *S. americanum*), além das espécies *M. sativa*, *O. basilicum*, *P. vulgaris*, que são herbáceas de crescimento rápido. A 2ª. etapa compreendeu quatro inoculações (VI a IX) com suspensões bacterianas que variaram de $1,7 \times 10^7$ UFC/ml a $7,25 \times 10^{11}$ UFC/ml, e as plantas foram avaliadas aos 30, 60 e 90 DAI por isolamento em meio de cultura e aos 90 DAI por PCR.

Baseando-se nas avaliações de 90 DAI por meio de isolamento primário, o percentual de plantas infectadas por *X. fastidiosa* nas inoculações VI a IX variou de 57,1 a 71,4% para *C. roseus*, 28,6 a 33,3% para *O. basilicum*, 28,6% para *N. tabacum*, 14,3 a 28,6% para *C. sinensis* e *M. sativa*, 0 a 28,6% para *S. americanum* e 0 a 25% para *B. pilosa* (Tabela 2). Aos 30 DAI, as taxas de infecção variaram de 28,6% a 71,4% para *C. roseus*, 14,3 a 28,6% para *C. sinensis*, 0 a 14,3% para *M. sativa*, 0 a 28,6% para *S. americanum* e 0 a 14,3% para *B. pilosa*, não havendo detecção em *O. basilicum* e *N. tabacum*. Para as duas últimas espécies vegetais, as primeiras detecções por isolamento foram aos 60 DAI, em 14,3% e 14,3 a 28,6% das plantas, respectivamente.

Houve variação considerável nas estimativas de população de *X. fastidiosa* nas plantas que foram positivas por isolamento primário nas quatro inoculações (VI a IX) da 2ª. etapa do experimento. As maiores concentrações bacterianas, medidas em UFC/g de tecido vegetal aos 90 DAI, foram observadas em *C. roseus* (5,4-7,2), seguidas de *O. basilicum* (5,7-6,9), *N. tabacum* (4,7-6,7), *C. sinensis* (4,1-6,3), *B. pilosa* (5,2), *S. americanum* (4,5-4,9) e *M. sativa* (4-4,6) (Tabela 2).

Na avaliação por PCR, as taxas máximas de infecção aos 90 DAI foram mais elevadas em relação às detectadas por isolamento para *C. roseus* (85,7%), *N. tabacum* (85,7%), *C. sinensis* (71,4%) e *M. sativa* (42,5%). Porém, o teste de PCR não aumentou as taxas de detecção de *X. fastidiosa* em *B. pilosa*, *O. basilicum* e *S. americanum*, que variaram de 0 a 25%, 14,3 a 16,7% e 0 a 14,3%, respectivamente. A bactéria não foi detectada por PCR ou isolamento em nenhuma das plantas de *P. vulgaris* até os 90 DAI (Tabela 2). No que diz respeito aos controles negativos das inoculações, ou seja, as três plantas de cada espécie inoculadas apenas com o tampão PBS, todas apresentaram resultados negativos para a detecção de *X. fastidiosa* tanto por PCR como por isolamento.

Tabela 2 – Detecção do isolado U24D de *Xylella fastidiosa* em diferentes espécies vegetais aos 30, 60 e 90 dias após inoculações (DAI) mecânicas realizadas em ocasiões distintas

Inoculações (Datas)	Espécie de planta	Isolado de <i>X. fastidiosa</i> (UFC/mL) ^a	Proporção de plantas positivas por isolamento (mín-máx Log UFC/g de tecido) ^b			Proporção de plantas positivas por PCR ^c
			30 DAI	60 DAI	90 DAI	90 DAI
VI (22/01/14)	<i>Catharanthus roseus</i>	U24D (1,25x10 ¹¹)	5/7 (4,7-6,4)	5/7 (5,3-6,9)	5/7 (5,4-6,5)	6/7
	<i>Citrus sinensis</i>		1/7 (5,2)	2/7 (4-5,8)	2/7 (4,1-5,6)	5/7
	<i>Medicago sativa</i>		0/7	0/7	1/7 (4,4)	1/7
	<i>Nicotiana tabacum</i>		0/7	1/7 (5,1)	2/7 (6,2-6,7)	6/7
	<i>Ocimum basilicum</i>		0/7	1/7 (5,8)	2/7 (6,1-6,9)	1/7
VII (21/03/14)	<i>Bidens pilosa</i>	U24D (7,25x10 ¹¹)	0/7	0/7	0/5	0/5
	<i>Catharanthus roseus</i>		5/7 (5,7-6,5)	5/7 (5,7-6)	5/7 (5,9-6,8)	6/7
	<i>Citrus sinensis</i>		2/7 (5-6)	2/7 (5,9-6,9)	2/7 (5,6-6)	3/7
	<i>Medicago sativa</i>		1/7 (4,8)	1/7 (4,6)	2/7 (4-4,6)	3/7
	<i>Nicotiana tabacum</i>		0/7	1/7 (5,6)	2/7 (5,4-6,2)	2/7
	<i>Ocimum basilicum</i>		0/7	1/7 (5,9)	2/6 (5,7-5,9)	1/6
	<i>Phaseolus vulgaris</i>		0/7	0/5	0/4	0/4
VIII (01/04/14)	<i>Solanum americanum</i>	U24D (1,7x10 ⁷)	1/7 (4,8)	1/7 (4,7)	1/7 (4,9)	0/7
	<i>Bidens pilosa</i>		0/7	0/6	1/4 (5,2)	1/4
	<i>Catharanthus roseus</i>		3/7 (6,1-6,6)	5/7 (6,2-6,8)	5/7 (6,6-7,2)	5/7
	<i>Citrus sinensis</i>		1/7 (4,5)	2/7 (6-6,7)	2/7 (5,9-6,3)	2/7
IX (11/04/14)	<i>Solanum americanum</i>	U24D (5,1x10 ⁹)	0/7	0/7	0/7	0/7
	<i>Bidens pilosa</i>		1/7 (4,2)	1/7 (4,5)	1/7 (4,7)	0/7
	<i>Catharanthus roseus</i>		2/7 (5,4-6,2)	4/7 (5-6,5)	4/7 (6,3-6,8)	5/7
	<i>Citrus sinensis</i>		0/7	0/7	1/7 (4,9)	4/7
	<i>Nicotiana tabacum</i>		0/7	2/7 (4,6-5,2)	2/7 (4,7-5,3)	2/7
	<i>Solanum americanum</i>		2/7 (4,1-4,5)	2/7 (4,3-4,9)	2/7 (4,5-4,6)	1/7

^a Número em parênteses representa a concentração da suspensão bacteriana (unidades formadoras de colônias/ml) inoculada nas plantas;

^b Número de plantas positivas para *X. fastidiosa* sobre o total de plantas inoculadas, detectadas por isolamento primário em meio de cultura. Valores entre parênteses representam o intervalo de variação de estimativas de concentração bacteriana (log de UFC/g de tecido) em plantas infectadas;

^c Número de plantas positivas para *X. fastidiosa* sobre o total de plantas inoculadas, detectadas pela técnica de PCR.

Apesar de *X. fastidiosa* ter sido detectada em sete das oito espécies vegetais inoculadas, não foi possível observar a presença de sintomas da infecção em nenhuma das plantas positivas por PCR e/ou isolamento, até o término das avaliações do experimento (90 DAI).

De uma forma geral, os resultados de isolamento primário e PCR das várias inoculações mecânicas nas duas etapas deste experimento mostraram maiores percentuais de plantas infectadas e populações bacterianas (log UFC/g tecido variou de 5 a 7) para as espécies *C. roseus* e *N. tabacum* (Tabelas 1 e 2), que já foram indicadas como plantas-modelo para ensaios biológicos com *X. fastidiosa* (LOPES et al., 2000, MONTEIRO et al., 2001). A planta-controle do presente estudo, representada pela espécie *C. sinensis*, apresentou proporções de plantas infectadas e populações bacterianas (log UFC/g de tecido variou de 4 a 6) mais baixas, porém superior a de outras espécies hospedeiras, tais como *B. pilosa* e *S. americanum*. Já *O. basilicum* e *M. sativa* mostraram frequências intermediárias de infecção. É interessante salientar que a concentração bacteriana em *O. basilicum* foi relativamente alta (log UFC/g de tecido vegetal variou de 5 a 6), o que sugere uma possível adequação desta espécie como planta-fonte ou planta-teste de *X. fastidiosa* para estudos de transmissão, considerando-se que também é uma boa hospedeira de certas espécies de cigarrinhas vetoras da bactéria (MULLER, 2013).

Algumas das espécies que se mostraram hospedeiras nesse estudo, tais como *S. americanum* e *M. sativa*, já haviam sido diagnosticadas como hospedeiras de um isolado de *X. fastidiosa* proveniente de citros, em testes de inoculação mecânica realizados por Lopes et al. (2003). Ao comparar a frequência de infecção por *X. fastidiosa* após a inoculação mecânica em *C. sinensis* e sete espécies de plantas daninhas, dentre elas *B. pilosa* e *S. americanum*, Lopes et al. (2003) observaram uma maior proporção de plantas positivas para *C. sinensis*. Muller (2013) observou infecção natural por *X. fastidiosa* em plantas de *B. pilosa* e *S. americanum* coletadas nas entrelinhas de pomares de ameixeira, sugerindo que essas espécies vegetais também possam ser hospedeiras da estirpe de *X. fastidiosa* associada à escaldadura das folhas da ameixeira. Já a espécie *M. sativa*, além de hospedar estirpes de *X. fastidiosa* de cafeeiro e citros (LOPES et al., 2003), também é conhecida como hospedeira das estirpes de amendoeira e videira (HOPKINS, 1989; LOPES et al., 2010).

A espécie *O. basilicum*, que apresentou indivíduos infectados com o isolado U24D de citros no presente estudo, é frequentemente utilizada para a criação de algumas espécies de cigarrinhas vetoras da cepa de videira, dentre elas *Draeculacephala minerva* Ball e *Graphocephala atropunctata* (Signoret), porém uma série de cuidados são tomados com o uso desta espécie, para que elas permaneçam livre da *X. fastidiosa* (LOPES; DAUGHERTY; ALMEIDA, 2009; DAUGHERTY; LOPES; ALMEIDA, 2010). Em estudos de inoculação mecânica realizados por Muller (2013), verificou-se que *O. basilicum* (alfavaca) não permite a infecção bacteriana da estirpe de ameixeira. Sendo assim, Muller (2013) sugere o uso da alfavaca para a criação de três cigarrinhas vetoras desta cepa da bactéria, *Sibovia sagata* (Signoret), *Macugonalia cavifrons* (Stal) e *M. leucomelas*, porém esta última espécie também é relatada na literatura como sendo vetora de *X. fastidiosa* da estirpe de citros (REDAK et al., 2004). Assim, recomenda-se cautela no uso de alfavaca para a criação de cigarrinhas da espécie *M. leucomelas*, assim como de outras espécies vetoras em citros, pois os resultados da presente pesquisa mostram que essa espécie vegetal permite a infecção por um isolado de *X. fastidiosa* que causa CVC, fato que pode dificultar a obtenção de cigarrinhas sadias.

Catharanthus roseus e *N. tabacum* já foram testadas como plantas hospedeiras experimentais de outros isolados de *X. fastidiosa* da estirpe de citros em estudos realizados por Monteiro et al. (2001) e Lopes et al. (2000) respectivamente. Em ambos os trabalhos foi possível detectar a infecção bacteriana nessas espécies por isolamento e análise de PCR, assim como por meio da observação de sintomas nas plantas. Considerando-se que *C. roseus* e *N. tabacum* foram previamente relatadas como boas hospedeiras desta estirpe bacteriana, aliado ao fato de terem apresentado indivíduos positivos em todas as vezes que foram inoculadas com o isolado U24D no presente estudo (Tabelas 1 e 2), procurou-se avaliar qual o melhor período para detecção bacteriana nessas espécies após a inoculação mecânica (30, 60 ou 90 DAi) (Figura 4). Analisaram-se, também, as variações na população bacteriana nas diferentes datas em que foram realizados os isolamentos, com o intuito de determinar quanto tempo após a inoculação mecânica, *X. fastidiosa* atinge seu ponto máximo de multiplicação (Figura 5). Para estas análises foram utilizados somente os dados das inoculações V, VI, VII e IX, nas quais plantas de *C. roseus*, *N. tabacum* e *C. sinensis* (controle) foram inoculadas concomitantemente.

Figura 4 – Porcentagem de plantas de *Catharanthus roseus*, *Citrus sinensis* e *Nicotiana tabacum* positivas para *Xylella fastidiosa* por isolamento em meio de cultura aos 30, 60 e 90 dias após à inoculação (DAI) mecânica do isolado U24D. As figuras A, B, C e D compreendem às inoculações V, VI, VII, IX, respectivamente

As plantas de *C. roseus* apresentaram, em três das quatro inoculações, a mesma porcentagem de infecção por *X. fastidiosa* durante os 30, 60 e 90 DAI (Figura 4); apenas na inoculação IX houve um aumento entre as avaliações de 30 para 60 dias. Apesar de Monteiro et al. (2001) terem mostrado sintomas de infecção bacteriana nas plantas de *C. roseus* com 2 meses após a inoculação mecânica, a detecção de *X. fastidiosa* por isolamento em meio de cultura só foi realizada quatro meses depois da inoculação. Sendo assim, o presente trabalho mostra que é possível detectar altas porcentagens de infecção bacteriana nessa espécie a partir dos 30 DAI, sendo que a quantidade de plantas infectadas se altera minimamente nos próximos 30 DAI, permanecendo estável até os 90 DAI.

Com relação à *N. tabacum*, a infecção foi detectada somente a partir dos 60 DAI (Figura 4), sendo que na maioria das inoculações a proporção de plantas positivas teve um aumento dos 60 aos 90 DAI. Estes resultados corroboram com Lopes et al. (2000), que isolaram *X. fastidiosa* dessa espécie vegetal aos 60 DAI.

Já *C. sinensis* mostrou plantas positivas para *X. fastidiosa* por isolamento com 30 DAI em duas (VI e VII) de quatro inoculações (Figura 4). Na inoculação VI houve um aumento da porcentagem de infecção aos 60 dias, permanecendo estável até os 90 DAI, enquanto que na inoculação VII a porcentagem de infecção permaneceu a mesma dos 30 aos 90 DAI. Nas inoculações V e IX, a presença de *X. fastidiosa* somente foi detectada aos 60 e 90 dias, respectivamente. Na literatura, trabalhos envolvendo períodos de detecção de *X. fastidiosa* em plantas cítricas são conflitantes. Chang et al. (1993) isolou a bactéria seis meses após a inoculação mecânica, enquanto que Prado et al. (2008) relataram isolamento da bactéria a partir de *C. sinensis* com dois meses após à inoculação, quando cerca de 50% das plantas apresentaram infecção, sendo que aos quatro meses foi possível detectar o máximo de plantas doentes. Almeida et al. (2001) isolou *X. fastidiosa* a partir de uma semana após à inoculação em plantas cítricas, detectando maiores populações bacterianas após oito semanas da inoculação mecânica.

Com relação à população bacteriana, verificou-se uma tendência de aumento na concentração de *X. fastidiosa* em *C. roseus*, expressa pela mediana do número de UFC/g de tecido vegetal, entre 30 e 60 DAI, exceto na inoculação VII (Figura 5). Nas inoculações V e VI, a mediana da concentração bacteriana em *C. roseus* atingiu seu valor máximo aos 60 dias, enquanto que nas inoculações VII e IX isso ocorreu aos 90 dias. Em todas as inoculações, no entanto, os valores de mediana foram $\geq 10^6$ UFC/g de tecido aos 60 DAI.

Para *N. tabacum* só foi possível comparar a população bacteriana de 60 e 90 DAI, pois, como já relatado anteriormente, não houve plantas positivas para *X. fastidiosa* por isolamento com 30 dias após à inoculação. Com exceção da inoculação VI, em que houve aumento de cerca de 10X na população bacteriana aos 90 DAI, não ocorreu grande variação dos 60 aos 90 DAI (Figura 5). Na inoculação V, a maior densidade populacional foi observada aos 60 dias DAI. Para *C. sinensis* o maior valor de população bacteriana foi observado na inoculação VII, durante a avaliação de 60 DAI; nas inoculações V e VI, não houve variações significativas de populações bacterianas nesta espécie nos diferentes períodos de avaliação, e na inoculação IX a bactéria foi detectada apenas aos 90 DAI.

Figura 5 – Mediana ($\pm$ EPM) de concentração de *Xylella fastidiosa* expressa em número de unidades formadoras de colônias (UFC)/grama de tecido foliar de *Catharanthus roseus*, *Citrus sinensis* e *Nicotiana tabacum*, aos 30, 60 e 90 dias após à inoculação (DAI) mecânica do isolado U24D. As figuras A, B, C e D representam as inoculações V, VI, VII e IX, respectivamente

Baseando-se nos dados de proporção de plantas infectadas (Figura 4) e população bacteriana (Figura 5) para as três espécies vegetais (*C. roseus*, *C. sinensis* e *N. tabacum*), é possível inferir que para *C. roseus* o melhor período de detecção, assim como de multiplicação bacteriana é com 60 DAI. Já para as espécies *C. sinensis* e *N. tabacum*, o melhor período para se detectar um maior número de plantas infectadas e constatar a multiplicação de *X. fastidiosa* é aos 90 DAI. Neste sentido, postula-se que a partir de 60 DAI seja um período ideal para oferecer plantas de *C. roseus* a aquisição da bactéria por insetos vetores, pois nesse momento a *X. fastidiosa* atinge populações bacterianas mais elevadas (medianas $\geq 10^6$ UFC/g de tecido) nesta espécie vegetal. Para *C. sinensis* e *N. tabacum* o processo de infecção bacteriana mostrou ser mais lento, estimando-se, assim, que o melhor período para se usar essas espécies como plantas-fonte em estudos de transmissão seja a partir de 90 DAI.

Hill e Purcell (1997) afirmam que há diferenças no período de incubação de *X. fastidiosa* entre as espécies de plantas hospedeiras, provavelmente devido à grande variabilidade de características dos vasos do xilema apresentada por essas plantas, fato que interfere no sucesso da colonização e multiplicação bacteriana. Esses autores relatam que, para haver a aquisição da bactéria pelas cigarrinhas, a planta-fonte de inóculo tem que atingir um “limiar” de multiplicação de *X. fastidiosa*, ou seja, alcançar uma densidade populacional mínima da bactéria que foi estimada em 10^4 UFC/g de tecido vegetal. Entretanto, Hill e Purcell (1997) verificaram aquisição mais eficiente por cigarrinhas em plantas com maiores populações bacterianas.

2.3.2 Adequação de plantas hospedeiras de *Xylella fastidiosa* para alimentação e sobrevivência do inseto vetor e aquisição bacteriana

Os resultados referentes à porcentagem de mortalidade e volume de *honeydew* (ml) da cigarrinha *B. xanthophis* obtidos nas 48 h de PAA do primeiro experimento, em que foram utilizadas apenas as espécies *C. roseus*, *C. sinensis* e *N. tabacum* como plantas-fonte, estão representados nas figuras 6 e 7, respectivamente. As cigarrinhas confinadas na planta-fonte *N. tabacum* apresentaram a maior taxa de mortalidade (86%), diferindo estatisticamente das médias de mortalidade observadas sobre *C. roseus* (13,3%) e *C. sinensis* (31,1%). Apesar de não ter existido diferença estatística entre *C. roseus* e *C. sinensis*, as taxas médias de mortalidade observadas sobre as duas espécies vegetais são contrastantes (Figura 6).

A mortalidade das cigarrinhas sobre *C. sinensis* nesse trabalho foi relativamente alta, se comparada com um estudo realizado por Marucci, Lopes e Cavichioli (2008), no qual se observou cerca de 14% de mortalidade de *B. xanthophis* durante o PAA de dois dias em plantas cítricas infectadas com um outro isolado de *X. fastidiosa*. Lopes et al. (2003) também encontraram uma alta mortalidade de cigarrinhas da espécie *F. trivittata*, quando confinadas por um PAA de 48 h em plantas de tabaco. Assim, o fato de *N. tabacum* permitir altas taxas de infecção por *X. fastidiosa*, não faz da mesma uma boa hospedeira experimental para testes de transmissão, pois a elevada mortalidade apresentada por diferentes espécies vetorais da CVC, quando em contato com a essa espécie vegetal, torna-a inviável para ser utilizada nesses estudos.

Figura 6 – Porcentagem média ($\pm$ EPM) de mortalidade de *Bucephalogonia xanthophis* nas diferentes plantas-fonte de *Xylella fastidiosa*, após o período de acesso à aquisição (PAA) de *Xylella fastidiosa* de 48 h. Médias com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,01$; $F = 7,23$; G.L.=2)

Figura 7 – Volume médio ($\pm$ EPM) de *honeydew* excretado por *Bucephalogonia xanthophis* durante 48 h do período de acesso à aquisição (PAA) em diferentes plantas-fontes de *Xylella fastidiosa*. Médias com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,01$; $F = 7,23$; G.L.=2)

No que diz respeito à quantidade de *honeydew* excretado pelas cigarrinhas durante o PAA de 48 h, observou-se uma relação inversa com os dados de mortalidade, ou seja, a espécie *C. roseus* que mostrou menor porcentagem de mortalidade das cigarrinhas, apresentou a maior média de excreção com 0,764 ml, já *C. sinensis*, na qual foi observada uma mortalidade intermediária, proporcionou 0,327

ml de excreção, enquanto que nenhuma excreção foi registrada na espécie vegetal com maior mortalidade (*N. tabacum*) (Figuras 6 e 7). Apesar das cigarrinhas que ficaram durante o PAA em *N. tabacum* não terem apresentado nenhum volume de *honeydew*, esse tratamento assemelhou-se estatisticamente com a planta cítrica, o que pode ser explicado, pela grande variação nos dados de volume de *honeydew* excretado entre os indivíduos confinados em *C. sinensis*. Também não houve diferença estatística significativa entre o volume excretado durante o confinamento em *C. roseus* e *C. sinensis*, fato que pode ser igualmente entendido pela variabilidade dos dados obtidos com a excreção em ambos os tratamentos (Figura 7), porém observa-se que o volume médio excretado sobre *C. roseus* é mais que o dobro do registrado em *C. sinensis*.

Catharanthus roseus já havia sido utilizada em um estudo semelhante de taxa de excreção por vetores de *X. fastidiosa*. Neste trabalho, Brodbeck, Mizell III e Andersen (1993) confinaram cigarrinhas das espécies *Homalodisca insolita* (Walker), *Homalodisca coagulata* (Say) e *Cuerna costalis* (F.) em plantas de *C. roseus* durante 24 h, e quantificaram um volume médio de excreção para as três espécies de cigarrinhas de aproximadamente, 2 ml por indivíduo. No presente estudo, o volume médio de excreção de *B. xanthophis* nessa espécie vegetal (0,764 ml em 48 h, por grupos de cinco indivíduos), foi bem mais baixo, porém isso pode ser explicado pelo menor tamanho de *B. xanthophis* (cerca de 5 mm) em relação às três espécies de cigarrinhas (aproximadamente 9 a 12 mm) (NIELSON, 1968) avaliadas por Brodbeck, Mizell III e Andersen (1993).

Apesar de ocorrer excreção e, portanto alimentação de *B. xanthophis* sobre citros, a taxa de excreção sobre essa espécie vegetal foi baixa (0,327 ml por grupo de cinco cigarrinhas) (Figura 7), talvez pelo fato das plantas estarem debilitadas pela infecção por *X. fastidiosa*, o que pode afetar a alimentação de cigarrinhas e, inclusive, a escolha da planta hospedeira por esses insetos (MARUCCI et al., 2004; DAUGHERTY et al., 2011). Comparando-se a taxa de excreção de cigarrinhas das espécies *D. costalimai* e *O. facialis* em plantas cítricas sadias vs. Infectadas por *X. fastidiosa* das variedades 'Pera' e 'Valência', Montesino et al. (2006) observaram um menor volume de *honeydew* sobre plantas infectadas.

Com os resultados desde teste primeiro experimento de variação de plantas-fonte, pode-se observar que, embora não tenha havido diferença estatística entre *C. roseus* e *C. sinensis*, nos dois parâmetros avaliados (volume de *honeydew* e

porcentagem de mortalidade), há uma clara tendência de maior taxa de alimentação e maior sobrevivência de *B. xanthophis* sobre a primeira espécie vegetal. Sendo assim, *C. roseus* é a mais indicada, entre as três espécies avaliadas, como planta-fonte em testes de transmissão.

Com relação às plantas de *C. roseus* utilizadas neste experimento como pré-teste antes do PAA e planta-teste para o período de acesso à inoculação da bactéria pelas cigarrinhas, não foi possível realizar as avaliações quanto à infecção bacteriana nas mesmas, devido a um problema que ocorreu na casa de vegetação ocasionado pelo fungo *Oidium sp.*, o qual foi responsável pela morte precoce das plantas, antes mesmo das primeiras avaliações.

Os dados de porcentagem de mortalidade e excreção de *honeydew* (μ l) referentes ao segundo experimento de variação de plantas-fonte, em que foram utilizadas para o PAA de 48 horas as espécies *C. roseus*, *C. sinensis*, *M. sativa*, *N. tabacum*, *O. basilicum* e *S. americanum* estão representados nas figuras 8 e 9 respectivamente.

Figura 8 – Porcentagem média ($\pm$ EPM) de mortalidade de *Bucephalagonia xanthophis* durante 24 e 48 h do período de acesso à aquisição (PAA) de *Xylella fastidiosa* em diferentes plantas-fonte (*Catharanthus roseus*, *Citrus sinensis*, *Medicago sativa*, *Nicotiana tabacum*, *Ocimum basilicum* e *Solanum americanum*). Médias com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey [$P < 0,05$; G.L=5; $F = 4,90$ (24 h); $F = 8,21$ (48 h)]

Assim como já relatado no experimento anterior, a taxa de mortalidade das cigarrinhas em 48 h de PAA foi maior em plantas de *N. tabacum* (70%), seguidas de *C. sinensis* (58%) e *S. americanum* (35%). As menores porcentagens de mortalidade

das cigarrinhas foram observadas em *M. sativa* com (15%), seguida por *C. roseus* e *O. basilicum* ambas com (20%). Durante as primeiras 24 h de PAA, não houve diferença estatística entre os tratamentos. Porém na avaliação de 48 h, a média de mortalidade obtida em *N. tabacum*, assemelhou-se apenas à média apresentada em *C. sinensis*, diferindo estatisticamente das demais plantas-fonte. Já *C. sinensis* não diferiu de *N. tabacum* e de *S. americanum* quanto à mortalidade das cigarrinhas.

Figura 9 – Volume ($\pm$ EPM) médio de *honeydew* excretado por grupos de cinco adultos de *Bucephalogonia xanthophis* durante as 24 e 48 h do período de acesso à aquisição (PAA) de *Xylella fastidiosa* em diferentes plantas-fontes (*Catharanthus roseus*, *Citrus sinensis*, *Medicago sativa*, *Nicotiana tabacum*, *Ocimum basilicum* e *Solanum americanum*). Médias com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey [($P < 0,05$; G.L=5; $F = 5,43$ (24 h); $F = 4,91$ (48 h)]

Observou-se que a quantidade de *honeydew* excretado quando os insetos ficaram confinados em *O. basilicum* foi superior às dos demais tratamentos desde as primeiras 24 h de PAA (1421 μ l), sendo que na observação de 48 h o volume excretado nesta planta foi quase triplicado (cerca de 3950 μ l) (Figura 9). Apesar de não existir diferença estatística entre os demais tratamentos, possivelmente devido à variabilidade nos resultados de excreção, notou-se que *M. sativa* e *C. roseus* foram as plantas que proporcionaram maior taxa de excreção depois de *O. basilicum*, com volumes médios de excreção de 766 e 498 μ l respectivamente, com 48 h de PAA. Já *S. americanum* e *C. sinensis* mostraram valores médios de excreção em torno de 179 e 146 μ l, respectivamente, enquanto que em *N. tabacum* registrou-se apenas 3 μ l em 48 h.

Neste segundo experimento de variação de plantas-fonte, assim como no primeiro, observou-se uma relação inversa entre mortalidade e excreção, ou seja, as plantas com maior porcentagem de mortalidade das cigarrinhas, tais como *N. tabacum*, *C. sinensis* e *S. americanum* proporcionaram menor taxa de excreção, o que as tornam pouco adequadas para o uso como fontes de *X. fastidiosa* por *B. xanthophis*, pois o fato da alimentação do inseto vetor ser muito baixa sobre as mesmas, deve reduzir a eficiência de aquisição do patógeno. Em contraste, considera-se que as espécies *C. roseus*, *M. sativa* e *O. basilicum* sejam mais adequadas como plantas-fonte, pois além de permitirem maior alimentação e possivelmente maior probabilidade de aquisição da bactéria, proporcionam maior sobrevivência do inseto vetor durante o seu confinamento sobre as mesmas.

Os resultados de transmissão da bactéria para as plantas-teste de *C. roseus* estão relatados na tabela 3. Não houve nenhuma planta positiva para *X. fastidiosa* pelas técnicas de isolamento e PCR realizadas aos 40 e 80 dias após à inoculação.

Tabela 3 – Experimento de transmissão de *Xylella fastidiosa* por *Bucephalogonia xanthophis* para plantas-teste de *Catharanthus roseus* após um período de acesso à aquisição de 48 h em diferentes espécies de plantas-fonte

Planta-fonte (mín-máx Log UFC/grama)	Proporção de plantas- teste de <i>C. roseus</i> positivas por isolamento		Proporção de plantas- teste de <i>C. roseus</i> positivas por PCR ^c	
	40 DAI ^a	80 DAI	40 DAI	80 DAI
<i>Catharanthus roseus</i> (5,4 - 6,8) ^b	0/9	0/9	0/9	0/9
<i>Citrus sinensis</i> (4,5 - 6,7)	0/4	0/4	0/4	0/4
<i>Medicago sativa</i> (4,0 - 4,8)	0/8	0/8	0/8	0/8
<i>Nicotiana tabacum</i> (5,6 - 6,2)	0/3	0/3	0/3	0/3
<i>Ocimum basilicum</i> (5,7 - 6,9)	0/10	0/10	0/10	0/10
<i>Solanum americanum</i> (4,1 - 4,9)	0/8	0/8	0/8	0/8

^a Número de dias após a inoculação em que as plantas foram avaliadas;

^b Valores entre parênteses representam o intervalo de variação na concentração de *Xylella fastidiosa* em plantas-fonte, expressa em log do número de unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de tecido vegetal;

^c As plantas-teste foram submetidas a um período de acesso à inoculação de 72 h, confinando-se três cigarrinhas em cada uma.

Vários são os fatores que podem ter determinado a não ocorrência de transmissão neste experimento, tais como a baixa população bacteriana presente em algumas plantas-fonte, o local de confinamento das cigarrinhas na planta-fonte, o baixo número de insetos usados na inoculação de plantas-teste, o curto período após a inoculação pelo vetor em que as plantas-teste foram avaliadas e a baixa eficiência de transmissão da bactéria pelo vetor.

Várias plantas utilizadas neste experimento como fonte de inóculo apresentaram uma população bacteriana relativamente baixa, variando de 10^4 e 10^5 UFC/grama de tecido (Tabela 3). Segundo Hill e Purcell (1997), a eficiência de aquisição de *X. fastidiosa* por cigarrinhas em videira e em outras plantas hospedeiras está diretamente relacionada com a concentração bacteriana presente na planta, constatando que populações menores que 10^6 UFC/g de tecido resultam na diminuição da eficiência de transmissão.

O local de confinamento dos insetos nas plantas-fonte para o PAA, em porção restrita de alguns ramos, também pode ter influenciado os resultados. Daugherty, Lopes e Almeida (2010) relataram que quando as cigarrinhas das espécies *D. minerva* e *G. atropunctata* foram confinadas na parte basal de plantas de *M. sativa*, onde há maior população bacteriana, houve um aumento de até 50% na eficiência de aquisição, quando comparado com o confinamento na parte mediana e apical dessas plantas. A distribuição desuniforme desta bactéria ao longo dos vasos xilemáticos também pode influenciar a probabilidade de aquisição (HOPKINS, 1989). Sendo assim, mesmo confinando-se os insetos nos ramos em que foi inoculada a bactéria, as cigarrinhas podem ter se alimentado de vasos não colonizados e consequentemente não terem adquirido a bactéria.

Outro fator determinante foi o pequeno número de insetos disponíveis para inoculação das plantas-teste. Devido à alta mortalidade dos mesmos em algumas das espécies de plantas-fonte durante o PAA, sobraram poucos indivíduos para serem utilizados na inoculação em plantas-teste, reduzindo-se, portanto, a probabilidade de transmissão da bactéria. Sabe-se que a transmissão da estirpe de citros de *X. fastidiosa* é ineficiente (REDAK et al., 2004; MARUCCI; LOPES; CAVICHIOLI, 2008), podendo não ser detectada quando são testados poucos indivíduos. Desta forma, faz-se necessário para os próximos testes de transmissão, utilizar um maior número de indivíduos de *B. xanthophis*, que deve ser estimado levando-se em consideração a

taxa de mortalidade das cigarrinhas durante o PAA na espécie de planta-fonte a ser utilizada.

O tempo após a inoculação pelo inseto em que as plantas-teste foram avaliadas (40 e 80 dias) pode ter sido insuficiente para detectar a presença de *X. fastidiosa*, pois é possível que as cigarrinhas vetoras inoculem um pequeno número de células bacterianas nas plantas; além disso, muitas das células inoculadas podem morrer antes mesmo de estabelecer infecção bacteriana nas plantas hospedeiras (ALMEIDA et al., 2005). Assim, as poucas células de *X. fastidiosa* que eventualmente foram inoculadas e conseguiram estabelecer a infecção nas plantas, podem não ter atingido níveis populacionais detectáveis pelas técnicas utilizadas neste trabalho, em até 80 DAI.

Devido à variabilidade de resultados obtidos e dificuldades envolvidas na utilização de diferentes espécies de plantas como fontes de inóculo para aquisição de *X. fastidiosa* em ensaios de transmissão por insetos, Killiny e Almeida (2009) desenvolveram um sistema de dieta artificial para a aquisição bacteriana *in vitro*, utilizando a estirpe de videira para o estudo. Com esse método, é possível substituir as plantas-fonte por uma dieta artificial com alta concentração de células bacterianas contida em um sachê feito de membranas de Parafilm, no qual os insetos ingerem grandes quantidades de células bacterianas, podendo, em seguida, transmitir o patógeno de forma eficiente. Esse sistema de aquisição em dieta artificial foi testado recentemente para a estirpe de *X. fastidiosa* de citros no Brasil (Silva, 2014), obtendo-se até 40% de eficiência de aquisição dessa bactéria por *B. xanthophis*; porém, a transmissão para plantas-teste após a aquisição *in vitro* ainda não foi testada para essa estirpe, de modo a verificar se de fato ocorre um aumento na eficiência de transmissão.

Com os resultados negativos de transmissão obtidos neste experimento, não é possível inferir qual espécie vegetal usada como fonte de inóculo proporciona aquisição mais eficiente de *X. fastidiosa* pelo inseto vetor. Supõe-se que *C. roseus*, *M. sativa* e *O. basilicum* propiciem maior eficiência de aquisição, devido às menores taxas de mortalidade e maiores índices de excreção de *B. xanthophis* observadas sobre as mesmas.

Todavia, ao selecionar espécies vegetais como fonte de *X. fastidiosa* para aquisição por cigarrinhas, deve-se levar em conta também a efetividade da inoculação mecânica da bactéria em cada uma delas, já que este é o principal método para

obtenção das plantas-fonte. Neste sentido, comparando-se os dados de detecção de *X. fastidiosa* por isolamento primário em meio de cultura, que permite a quantificação de células bacterianas viáveis e cultiváveis, verificou-se uma maior porcentagem média de plantas infectadas (66,7%) e população bacteriana (log UFC/grama de tecido foliar variando de 4,2 a 7,4) em *C. roseus*, seguida de *O. basilicum* com 30,8% de plantas infectadas, as quais apresentaram populações bacterianas que variaram entre 5,7 a 6,9 (log UFC/grama de tecido vegetal) (Tabela 2). Já *M. sativa* mostrou menor efetividade de inoculação mecânica, com 21,4% de plantas positivas para *X. fastidiosa* e concentração bacteriana de apenas 4 a 4,8 (log UFC/grama de tecido).

Recomenda-se que *M. sativa* seja avaliada como hospedeira experimental de um maior número de isolados de *X. fastidiosa* de citros em novos estudos, pois em experimentos realizados por Lopes, Daugherty e Almeida (2010), esta planta mostrou-se excelente hospedeira de multiplicação de estirpes de *X. fastidiosa* de videira e amendoeira (subespécies *fastidiosa* e *multiplex*, respectivamente), permitindo populações bacterianas de 6 a 9 (log UFC/grama de tecido). Hill e Purcell (1997) demonstraram que *M. sativa* proporciona alimentação e aquisição eficiente de *X. fastidiosa* pelas cigarrinhas *G. atropunctata* e *D. minerva*. Mais recentemente, Daugherty, Lopes e Almeida (2010) mostraram que ao utilizar *M. sativa* como planta-fonte de aquisição é necessário confinar as cigarrinhas na parte basal da planta, onde há maior concentração bacteriana.

Já a espécie *O. basilicum* é uma ótima hospedeira de diversas espécies de cigarrinhas, sendo por isso frequentemente utilizada para a criação desses insetos (LOPES; DAUGHERTY; ALMEIDA, 2009; MULLER, 2013). Assim, mais estudos de inoculação mecânica com estirpes de *X. fastidiosa* seriam necessários para concluir se esta espécie é uma boa fonte de inóculo para aquisição da bactéria por cigarrinhas.

A adequação de *C. roseus* para a alimentação de cigarrinhas já foi relatada anteriormente para três espécies vetoras de outras estirpes de *X. fastidiosa* nos EUA (BRODBECK; MIZELL III; ANDERSEN, 1993). Desde modo, os resultados do presente trabalho mostram que *C. roseus* também pode ser utilizada na alimentação da cigarrinha *B. xanthophis*, fato que viabiliza o uso dessa planta hospedeira de *X. fastidiosa* em ensaios de transmissão da estirpe de citros no Brasil, por esse vetor.

A porcentagem de mortalidade durante o PAI em plantas-teste de *C. roseus* também foi observada e contabilizada a cada 24 h (Figura 10), com o intuito de observar se a exposição prévia a diferentes espécies de plantas-fonte durante o PAA

pode ter alguma influência sobre a sobrevivência posterior dos insetos durante o PAI. Agrupando-se os dados de insetos provenientes de todas as plantas-fonte, a mortalidade média geral foi de 29,4% ao final do PAI de 72 h em *C. roseus*, ou seja, 70,6% das cigarrinhas sobreviveram ao PAI. A maior mortalidade foi observada para as cigarrinhas que vieram da planta-fonte *C. sinensis* (66,7%), diferindo estatisticamente das cigarrinhas oriundas de plantas-fonte de *O. basilicum* (apenas 10%). Assim, observa-se que as cigarrinhas que ficaram no PAA em *C. sinensis* e depois passaram para o PAI em plantas de *C. roseus*, continuaram apresentando altas taxas de mortalidade. Portanto, a escolha da planta-fonte pode ter influência significativa sobre a sobrevivência dos insetos vetores durante o PAI, mesmo que este ocorra sobre uma planta adequada ao inseto, como *C. roseus*.

Figura 10 – Porcentagem média ($\pm$ EPM) de mortalidade de *Bucephalogonia xanthophis* durante 24, 48 e 72 h do período de acesso à inoculação (PAI) em plantas-teste de *Catharanthus roseus*, após um período de acesso à aquisição de *X. fastidiosa* por 48 h em diferentes plantas-fontes (*C. roseus*, *Citrus sinensis*, *Medicago sativa*, *Nicotiana tabacum*, *Ocimum basilicum* e *Solanum americanum*). Médias com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, para um mesmo período de avaliação [$P < 0,05$; G.L=5; $F=3,66$ (24 h); $F=2,50$ (48 h); $F=3,30$; (72 h)]

No que diz respeito aos resultados obtidos por PCR convencional com amostras de DNA extraído dos insetos utilizados em todos os experimentos de transmissão, assim como de DNA extraído do *honeydew* coletado no final das 48 h de PAA em plantas-fonte, não foi detectada nenhuma amostra positiva para *X. fastidiosa* pela referida técnica. O PCR empregado neste trabalho é mais sensível que testes sorológicos como DIBA (“dot immubinding assay”), ELISA (“enzyme linked

immunosorbent assay”) e o “*Western-blot*”, pois possibilita a detecção de 10 a 100 células bacterianas por reação (COLETTA-FILHO; MACHADO, 2001). Entretanto os métodos de extração utilizados podem ter influenciado a análise. Poller e Hartung (1995) sugerem que vários métodos de extração de DNA interferem na detecção do patógeno, pois muitos deles liberam inibidores de reação que geram falsos negativos.

2.3.3. Seleção de plantas herbáceas indicadoras de infecção após a inoculação de *Xylella fastidiosa* pelas cigarrinhas

Baseando-se nas avaliações realizadas com 60 e 90 DAI por isolamento primário em meio de cultura e PCR, verificou-se que as espécies utilizadas como plantas-teste *C. roseus*, *M. sativa*, *O. basilicum* e *S. americanum* apresentaram resultados positivos quanto à presença de *X. fastidiosa* após a inoculação pelo vetor, *B. xanthophis* (Tabela 4). Verificou-se maior número de plantas-teste positivas para *X. fastidiosa* na repetição III do experimento, cuja planta-fonte apresentou população bacteriana mais elevada. Não se detectou *X. fastidiosa* em nenhuma das plantas utilizadas como controle negativo nas três repetições do experimento.

Na repetição I, detectou-se *X. fastidiosa* apenas em uma planta de *O. basilicum* aos 90 DAI, pelo teste de PCR (Tabela 4). Na repetição II foi possível detectar um exemplar de *C. roseus* positivo por isolamento aos 60 DAI, com população bacteriana em torno de 10^4 UFC/grama de tecido. Na repetição III, detectaram-se duas plantas de *M. sativa* infectadas por *X. fastidiosa* aos 60 e 90 DAI, pelas técnicas de PCR e isolamento, com concentração bacteriana de 4,1 e 5,7 log UFC/grama de tecido. Ainda na repetição III, duas plantas de *C. roseus* foram positivas por ambas as técnicas aos 60 e 90 DAI, com população bacteriana de 5-6,9 log UFC/grama, e um indivíduo positivo de *S. americanum* foi detectado aos 90 DAI por PCR. Até o término das avaliações de 90 DAI, não foi observada a presença de sintomas em nenhuma das plantas-teste positivas para *X. fastidiosa*.

As plantas de *O. basilicum* e *S. americanum* que se mostraram infectadas provavelmente apresentaram baixos níveis de população bacteriana, pois foram positivas apenas por PCR. Já *C. roseus* e *M. sativa* apresentaram densidades populacionais superiores a 10^4 UFC/ grama de tecido, que é o limiar para detecção por isolamento primário nas condições do presente estudo.

Tabela 4 – Experimento de transmissão de *Xylella fastidiosa* por *Bucephalogonia xanthophis* para diferentes espécies de plantas-teste, usando-se *Catharanthus roseus* como planta-fonte

Repetição	Planta-fonte (UFC/grama de tecido)	Planta-teste	Número de plantas-teste infectadas sobre o total de plantas inoculadas ^a				Porcentagem total de plantas infectadas	
			Isolamento		PCR		Isolamento	PCR
			60 DAI ^b	90 DAI	60 DAI	90 DAI		
I	<i>Catharanthus roseus</i> 1,2x10 ⁶	<i>Bidens pilosa</i>	0/5	0/5	0/5	0/5	0	0
		<i>Catharanthus roseus</i>	0/5	0/5	0/5	0/5	0	0
		<i>Citrus sinensis</i>	0/5	0/5	0/5	0/5	0	0
		<i>Nicotiana tabacum</i>	0/5	0/5	0/5	0/5	0	0
		<i>Ocimum basilicum</i>	0/5	0/5	0/5	1/5	0	20
		<i>Solanum americanum</i>	0/5	0/5	0/5	0/5	0	0
II	<i>Catharanthus roseus</i> 2,7x10 ⁷	<i>Bidens pilosa</i>	0/5	0/5	0/5	0/5	0	0
		<i>Catharanthus roseus</i>	1/5 (4,5) ^c	1/5 (4,3)	1/5	1/5	20	20
		<i>Citrus sinensis</i>	0/5	0/5	0/5	0/5	0	0
		<i>Medicago sativa</i>	0/5	0/5	0/5	0/5	0	0
		<i>Nicotiana tabacum</i>	0/5	0/5	0/5	0/5	0	0
		<i>Ocimum basilicum</i>	0/5	0/5	0/5	0/5	0	0
III	<i>Catharanthus roseus</i> 4,5x10 ⁷	<i>Solanum americanum</i>	0/5	0/5	0/5	0/5	0	0
		<i>Bidens pilosa</i>	0/5	0/5	0/5	0/5	0	0
		<i>Catharanthus roseus</i>	2/5 (5-6,3)	2/5 (6,9)	2/5	2/5	40	40
		<i>Citrus sinensis</i>	0/5	0/5	0/5	0/5	0	0
		<i>Medicago sativa</i>	2/5 (4,8-5,6)	2/5 (4,1-5,7)	0/5	1/5	40	20
		<i>Nicotiana tabacum</i>	0/5	0/5	0/5	0/5	0	0
		<i>Ocimum basilicum</i>	0/5	0/5	0/5	0/5	0	0
		<i>Solanum americanum</i>	0/5	0/5	0/5	1/5	0	20

^a Após um período de acesso à aquisição de *X. fastidiosa* de 48 h na planta-fonte, os insetos foram transferidos em número de três indivíduos para planta-teste para um período de acesso à inoculação de 72 h;

^b Dias após a inoculação (DAI);

^c Valor entre parênteses apresenta 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 detectada por isolamento primário em meio de cultura.

Solanum americanum foi avaliada recentemente como planta-teste em ensaios de transmissão com a estirpe de *X. fastidiosa* de ameixeira, envolvendo a cigarrinha vetora *S. sagata* (Graner, 2014). Nesse trabalho a referida estirpe foi transmitida com baixa eficiência para *S. americanum* (apenas uma planta positiva para *X. fastidiosa* por PCR dentre várias inoculadas), após aquisição em planta de ameixeira infectada. Fato semelhante ocorreu no presente trabalho em que *B. xanthophis* conseguiu transmitir *X. fastidiosa* para apenas uma de 15 plantas inoculadas de *S. americanum*, a partir de uma planta-fonte de *C. roseus*.

Plantas de *C. roseus* foram utilizadas como plantas-teste em experimento de transmissão realizado por Saponari et al. (2014). Tais autores coletaram adultos da cigarrinha *P. spumarius* em oliveiras com sintomas de “Olive quick decline syndrome” e posteriormente confinaram esses insetos em grupos de 8-10 indivíduos sobre plantas de *C. roseus* para um PAI de 96 h. Em apenas um mês após o PAI foi possível detectar por PCR a presença de *X. fastidiosa* em duas de cinco plantas de *C. roseus*. Purcell e Saunders (1999) utilizaram *Vinca major* L., uma espécie ornamental semelhante a *C. roseus* e também pertencente à família Aponacynaceae, como planta-teste, a fim de diagnosticar a infecção bacteriana nessas plantas após à inoculação de *X. fastidiosa* por *G. atropunctata*. Após quatro meses do PAI, os autores comprovaram que essa espécie vegetal permite a colonização sistêmica da bactéria mediante inoculação pelo vetor.

Entretanto, para a estirpe de citros de *X. fastidiosa*, este é o primeiro relato de *C. roseus*, *M. sativa*, *O. basilicum* e *S. americanum* como plantas-teste ou indicadoras da infecção bacteriana após inoculação por inseto vetor. Dentre elas, *C. roseus* e *M. sativa* apresentaram maior efetividade como indicadoras, devido às maiores taxas de detecção de *X. fastidiosa* (até 40% das plantas inoculadas na repetição III) no experimento de transmissão por *B. xanthophis* (Tabela 4).

Com relação ao teste de PCR para detecção de *X. fastidiosa* nas cigarrinhas usadas neste experimento, nenhum resultado positivo foi obtido, nem mesmo nos grupos de três insetos que foram capazes de transmitir a bactéria para as plantas-teste. Esses resultados podem ser compreendidos devido a fatores já mencionados no experimento 2.3.2.

Analisando-se os dados de mortalidade das cigarrinhas durante o PAI de 72 h nas diferentes espécies de planta-teste, percebeu-se que não houve muita variação entre as espécies, com exceção de *N. tabacum*, que apresentou as maiores taxas de

mortalidade nas avaliações de 24 (44%) e 72 h (71%), diferindo estatisticamente das demais espécies (Figura 11). A menor taxa de mortalidade foi observada em plantas de *B. pilosa*, sendo de apenas 4% após 72 h de PAI.

A mortalidade de *B. xanthophis* sobre as espécies de plantas-teste que tiveram resultados positivos para a transmissão de *X. fastidiosa* foi de 9% para *O. basilicum*, 16% para *S. americanum* e 20% para *C. roseus* e *M. sativa*, após 72 h de PAI (Figura 11).

Figura 11 - Porcentagem média de mortalidade ($\pm$ EPM) de *Bucephalogonia xanthophis* durante o período de acesso a inoculação (PAI) de 72 h em sete espécies de plantas-teste (*Bidens pilosa*, *Catharanthus roseus*, *Citrus sinensis*, *Medicago sativa*, *Nicotiana tabacum*, *Ocimum basilicum* e *Solanum americanum*). Médias com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey [$P < 0,05$; G.L.=6; $F = 16,57$ (24 horas); $F = 22,11$ (48 horas); $F = 11,82$ (72 horas)]

3 CONCLUSÕES

- 1) As espécies herbáceas *Bidens pilosa*, *Catharanthus roseus*, *Medicago sativa*, *Nicotiana tabacum*, *Ocimum basilicum* e *Solanum americanum* permitem multiplicação bacteriana e colonização sistêmica pela estirpe de citros de *Xylella fastidiosa*.
- 2) *Catharanthus roseus* e *N. tabacum* apresentam as maiores taxas de sucesso de infecção por *X. fastidiosa* e permitem rápida multiplicação bacteriana após a inoculação mecânica.
- 3) As espécies *C. roseus*, *M. sativa* e *O. basilicum*, quando usadas como plantas-fonte de *X. fastidiosa*, propiciam as maiores taxas de alimentação e de sobrevivência da cigarrinha vetora *Bucephalogonia xanthophis* (Berg) durante períodos de acesso à aquisição da bactéria.
- 4) Quando usadas como planta-teste, *C. roseus*, *M. sativa*, *O. basilicum* e *S. americanum* indicam a infecção pela estirpe de citros de *X. fastidiosa* após a inoculação por *B. xanthophis*. Dentre essas, *C. roseus* e *M. sativa* são mais efetivas, permitindo a detecção de maiores taxas de infecção pela bactéria por isolamento em meio de cultura e PCR.

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**, College Park, v. 98, n. 6, 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**, Saint Paul, v. 85, n. 45, p. 382-382, 2001.
- BACKUS, E.A.; MORGAN, D.J.W. Spatiotemporal colonization of *Xylella fastidiosa* in its vector supports the role of egestion in the inoculation mechanism of foregut-borne plant pathogens. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 101, n. 8, p. 912-922, 2011.
- BOVÉ, J.M.; AYRES, A.J. Etiology of three recent disease of citrus in São Paulo state: suddendeath, variegates chlorosis and huanglongbing. **IUBMB Life**, Philadelphia, v. 59, n. 4, p. 346-354, 2007.
- BRODBECK, B.V.; MIZELL, R.F.; ANDERSEN, P.C. Physiological and behavioral adaptations of three species of leafhoppers in response to dilute nutrient content of xylem fluid. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 39, n. 1, p. 73-81, 1993.
- CHANG, C.J.; GARNIER, M.; ZREIK, L.; ROSSETTI, V.; BOVÉ, J.M. Culture and serological detection of the xylem-limited bacterium causing citrus variegated chlorosis and its identification as a strain of *Xylella fastidiosa*. **Current Microbiology**, New York, v. 27, n. 3, p. 137-142, 1993.
- CHATTERJEE, S.; ALMEIDA, R.P.P.; LINDOW, S. Living in two worlds: the plant and insect lifestyles of *Xylella fastidiosa*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 46, p. 243-271, 2008.
- 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, 2001.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de laranja**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&ordem=produto&Pagina_objcmsconteudos=17#A_objcmsconteudos>. Acesso em: 10 set. 2014.
- COSTA, H.S.; RAETZ, E. PINCKARD, T.R. Plant hosts of *Xylella fastidiosa* in and near Southern California vineyards. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 88, n. 11, p. 1255-1261, 2004.
- DAUGHERTY, M.P.; LOPES, J.R.S.; ALMEIDA, R.P.P. Vector within-host feeding preference mediates transmission of a heterogeneously distributed pathogen. **Ecological Entomology**, London, v. 35, n. 3, 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**, London, v. 36, n. 5, p. 654-622, 2011.

DAVIES, D.G.; CHAKRABARTY, A.M.; GEESEY, G.G. Exopolysaccharide production in biofilms: substratum activation of alginate gene expression by *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington v. 59, n. 4, p. 1181-1186, 1993.

DAVIS, M.J.; PURCELL, A.H.; THOMSON, S.V. Pierce's disease of grapevines: isolation of the causal bacterium. **Science**, Washington, v. 199, n. 4324, p. 75-77, 1978.

DAVIS, M.J.; THOMSON, S.V.; PURCELL, A.H. Etiological role of the xylem-limited bacterium causing Pierce's disease in almond leaf scorch. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 70, n. 6, p. 472-475, 1980.

DE SOUZA, A.A.; TAKITA, M.A.; COLETTA-FILHO, H.D.; CALDANA, C.; GOLDMAN, G.H.; YANAI, G.M.; MUTO, N.H.; COSTA DE OLIVEIRA, R.; NUNES, L.R.; MACHADO, M.A. Analysis of gene expression in two growth states of *Xylella fastidiosa* and its relationship with pathogenicity. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 16, n. 10, p. 867-875, 2003.

DEMÉTRIO, C.G.B.; HINDE, J.P. Half-normal plots and overdispersion. **GLIM Newsletter**, Oxford, v. 27, p. 19-26, 1997.

ELBEAINO, T. YASSEN, T.; VALENTINI, F.; BEN MOUSSA, I.E.; MAZZONI, V.; ONCHIA, A.M. Identification of three potential insect vectors of *Xylella fastidiosa* in southern Italy. **Phytopathologia Mediterranea**, Bologna, v. 53, n. 1, p. 328-332, 2014.

FRANCIS, M.; CIVEROLO, E.L.; BRUENING, G. Improved bioassay of *Xylella fastidiosa* using *Nicotiana tabacum* cultivar SR1. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 92, n. 1, p. 14-20, 2008.

FREITAG, J.H. Host range of the Pierce's disease virus of grapes as determined by insect transmission. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 41, n. 10, p. 920-934, 1951.

FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA. **Manual de CVC**. Araraquara: Centro de Pesquisas Citrícolas, 2006. 11 p.

_____. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/Home/Default.aspx>>. Acesso em: 05 jul. 2014.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BATISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIN, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920 p.

GARCIA JUNIOR, A.; MAGGIONE, C.S.; TEÓFILO SOBRINHO, J.; POMPEU JUNIOR, J.; DE NEGRI, J.D.; QUAGGIO, J.A.; BERETTA, M.J.G.; GRAVENA, S.; RODAS, V.Z. Como conviver com a CVC em São Paulo, **Laranja**, Cordeirópolis, v. 16, n. 2, p. 145-154, 1995.

GOHEEN, A.C.; NYLAND, G.; LOWE, S.K. Association of a rickettsia-like organism with Pierce's disease of grapevines and alfalfa dwarf and heat therapy of the disease in grapevines. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 63, n. 3, p. 341-345, 1973.

GRANER, L.S. **Cigarrinhas potencias vetoras (Hemiptera: Cercopidae e Cicadellidae) e plantas infestantes associadas à epidemiologia da escaldadura das folhas da ameixeira**. 2014. 93 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

GRISOTTO, R.K.; DA SILVA, J.A.A.; MIGUEL, F.B. Impactos de novas tecnologias de cultivo na produção e qualidade da laranja (*Citrus sinensis* O.) 'Valência'. **Pesquisa & Tecnologia**, Campinas, v. 8, n. 2, p. 1-7, 2011.

GULLAN, P.J.; CRANSTON, P.S. **Os insetos**: um resumo de entomologia. 4. ed. São Paulo: Roca, 2012. 480 p.

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**, Saint Paul, v. 84, n. 6, p. 622-626, 2000.

HERNANDEZ-MARTINEZ, R.; DE LA CERDA, K.A.; COSTA, H.S.; COOKSEY, D.A.; WONG, F.P. Phylogenetic relationships of *Xylella fastidiosa* strains isolated from landscape ornamentals in Southern California. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 97, n. 7, p. 857-864, 2007.

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

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

HINDE, J.; DEMÉTRIO, C.G.B. Overdispersion: models and estimation. **Computational Statistics & Data Analyses**, Amsterdam v. 27, n. 2/3, p. 151-170, 1998.

HOPKINS, D.L. Physiological and pathological characteristics of virulent and a virulent strains of the bacterium that causes Pierce's disease of grapevine. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 75, n. 6, p. 713-717, 1985.

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

HOPKINS, D.L.; ADLERZ, W.C. Natural hosts of *Xylella fastidiosa* in Florida. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 72, n. 5, p. 429-431, 1988.

HOPKINS, D.L.; MOLLENHAUER, H.H. Rickettsia-like bacterium associated with Pierce's disease of grapes. **Science**, Washington, v. 179, n. 4070, p. 298-300, 1973.

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

JANSE, J.D.; OBRADOVIC, A. *Xylella fastidiosa*: its biology, diagnosis, control and risks. **Journal of plant pathology**, Pisa, v. 92, n. 1, p. 35-28, 2010.

KILLINY, N.; ALMEIDA, R.P.P. Host structural carbohydrate induces vector transmission of a bacterial pathogen. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 106, n. 52, p. 22416-22420, 2009.

KILLINY, N.; PRADO, S.P.; ALMEIDA, R.P.P. Chitin utilization by the insect-transmitted bacterium *Xylella fastidiosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 76, n. 18, p. 6134-6140, 2010.

KRUGNER, R.; LOPES, M.T.V. de C.; SANTOS, J.S.; BERETTA, M.J.G.; LOPES, J.R.S. Transmission efficiency of *Xylella fastidiosa* to citrus by sharpshooters and identification of two vector species. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 14., 1998, Campinas. **Anais...** Cordeirópolis: Centro de Citricultura Sylvio Moreira, 1998. p. 81.

KUHNERT, P.; HEYBERGER-MEYER, B.; BURNENS, A.P.; NICOLET, J. FREY, J. Detection of a RTX toxin genes in gram negative bacteria with a set of specific probes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 6, p. 2258-2265, 1997.

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

LARANJEIRA, F.F.; POMPEU JUNIOR, J. Comportamento de quinze cultivares de laranja-doce afetadas pela clorose variegada dos citros, **Laranja**, Cordeirópolis, v.23, n. 2, p. 401-411, 2002.

LARANJEIRA, F.F.; BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L.; BERGER, R.; GOTTWALD, T.R. Dinâmica temporal da Clorose Variegada dos Citros em três regiões do Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília. v. 28, n. 5, p. 481-488, 2003.

LEE, R.F.; BERETTA, M.J.G.; HARTUNG, J.H.; HOOKER, M.E.; DERRICK, K.S. Citrus variegated chlorosis: confirmation of a *Xylella fastidiosa* as a causal agent. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 19, n. 2, p.123-125, 1993.

LEU, L.S.; SU, C.C. Isolation, cultivation, and pathogenicity of *Xylella fastidiosa*, the causal bacterium of pear leaf scorch disease in Taiwan. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 77, n. 6, p. 642-646, 1993.

LIMA, J.E.O.; MIRANDA, V.S; HARTUNG, J.S.; COUTINHO, A.; ROBERTO, R.S.; CARLOS, E.F. Coffe leaf schorch bacterium: axenic culture, pathogenicity, and comparison with *Xylella fastidiosa* of citrus. **Plant Disease**, Lanham, v. 88, n. 1, p. 94-97, 1998.

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

_____. 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.; KRUGNER, R. Transmission ecology and epidemiology of the citrus variegated chlorosis strain of *Xylella fastidiosa*. In: BROWN, J.K (Ed.). **Vector-mediated transmission of plant pathogens**, Saint Paul: American Phytopathological Society Press, 2014. In press.

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. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v.13, n. 2, p. 216-224, 2009.

_____. Strain origin drives virulence and persistence of *Xylella fastidiosa* in alfalfa. **Plant Pathology**, Malden, v. 59, n. 5, p. 963-971, 2010.

LOPES, J.R.S.; LANDA, B.B.; FERERES, A. A survey of potential insect vectors of the plant pathogenic bacterium *Xylella fastidiosa* in three regions of Spain. **Spanish Journal of Agricultural Research**, Madrid, v. 12, n. 3, p. 796-800, 2014.

LOPES, S.A.; RIBEIRO, D.M.; ROBERTO, P.G.; FRANÇA, S.C. *Nicotiana tabacum* as an experimental host for the study of plant-*Xylella fastidiosa* interactions. **Plant Disease**. Saint Paul, v. 84, n. 8, p. 827-830, 2000.

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

MACHADO, E.C.; QUAGGIO, J.A.; LAGÔA, A.M.M.A.; TICELLI, M.; FURLANI, P. R. Trocas gasosas e relações hídricas em laranjeiras com clorose variegada dos citros. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 6, n. 1, p. 53-57, 1994.

MACHADO, E.C.; OLIVEIRA, R.F.; RIBEIRO, R.V.; MEDINA, C.L.; STUCHI, E.S.; PAVANI, L.C. Deficiência hídrica agrava os sintomas fisiológicos da clorose variegada dos citros em laranjeira "Natal". **Bragantia**, Campinas, v. 66, n. 3, p. 373-379, 2007.

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 *Agrogonia* Stal. **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v. 46, n. 2, p. 144-164, 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, n. 4, p. 1114-1121, 2008.

MARUCCI, R.C.; LOPES, J.R.S.; 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, n. 6 p. 759-763, 2004.

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.

McELRONE, A.J.; SHERALD, J.L.; FORSETH, I.N. Effects of water stress on symptomatology and growth of *Parthenocissus quinquefolia* infected by *Xylella fastidiosa*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 85, n. 11, p. 1160-1164, 2001.

McELRONE, A.J.; SHERALD, J.L.; POOLER, M.R. Identification of alternative hosts of *Xylella fastidiosa* in the Washington, D.C., area using nested polymerase chain reaction (PCR). **Journal of Arboriculture**, Savoy, v. 25, n. 5, p. 258-263, 1999.

McGAHA, L.A.; JACKSON, B.; BEXTINE, B.; Mc MULLOUGH, D.; MORATO, L. Potential plant reservoirs for *Xylella fastidiosa* in South Texas. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 58, n. 3, p. 398-401, 2007.

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.; JAGOUÉIX-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**, Saint Paul, v. 85, n. 3, p. 246-251, 2001.

MONTESINO, J.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 facialis* e *Dilobopterus costalimai* (Hemiptera: Cicadellidae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 28, n. 2, p. 199-204, 2006.

MULLER, C. ***Xylella fastidiosa* de ameixeira: transmissão por cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae) e colonização de plantas hospedeiras.** 2013. 105 p. Tese (Doutorado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

MURRAY, M.G.; THOMPSON, W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 8, n. 19, p. 4321-4325, 1980.

NELDER, J.A.; WEDDERBURN, R.W.M. Generalized linear models. **Journal of the Royal Statistical Society**, London, v. 135, n. 3, p. 370-384, 1972.

NEVES, M.F.; TOMBIN, V.G.; MILAN, P.; LOPES, F.F.; CRESSONI, F. KALAKI, R. **O retrato da citricultura brasileira**. São Paulo: CitrusBR, 2011. 138 p.

NIELSON, M.W. **The leafhopper vector of phytopathogenic viruses (Homoptera: Cicadellidae) taxonomy, biology, and virus transmission**, Washington: USDA, 1968. 385 p.

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

POOLER, M.R.; HARTUNG, J.S. Specific PCR detection and identification of *Xylella fastidiosa* strains citrus variegated chlorosis. **Current Microbiology**, New York, v. 31, n. 6, p. 377-381, 1995.

PRADO, S.S.; LOPES, J.R.S.; DEMÉTRIO, 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, n. 3, p. 251-258, 2008.

PURCELL, A.H. The ecology of bacterial and mycoplasma plant diseases spread by leafhoppers and plant hoppers. In: NAULT, L.R.; RODRIGUEZ, J.G. **The leaf hoppers and plant hoppers**. New York: John Wiley, 1985. p.351-380.

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

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

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

R CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**. 2012. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>. Acesso em: 01 nov. 2014.

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

RANDALL, J.J.; GOLBERG, N.P.; KEMP, J.D.; RADIONENKO, M.; FRENCH, J.M.; OLSEN, M.W.; HANSON, S.F. Genetic analysis of a novel *Xylella fastidiosa* subspecies found in the Southwestern United States. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 17, p. 5631-5638, 2009.

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.; PRIA JÚNIOR, W.D.; YAMAMOTO, P.T.; FELLIPE, M.R.; FREITAS, E.P. Espécies e flutuação populacional de cigarrinhas em viveiros de citros, em Gavião Peixoto (SP). **Laranja**, Cordeirópolis, v. 21, n. 1, p. 65-79, 2000.

ROGERS, S.O.; BENDICH, A.J. Extractions of DNA from plant tissues. In: GELVIN, S.D.; SCHILPEROORT, R.A.; VERMA, D.P.S (Ed.). **Plant molecular biology manual**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1989. p. 1-10.

ROSSETTI, V.; De NEGRI, J.D. Clorose variegada dos citros – revisão. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 11, p. 1-14, 1990.

_____. Clorose variegada dos citros – revisão. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v. 32, n. 1, p. 61-66, 2011.

SAPONARI, M.; LOCONSOLI, G.; CORNARA, D.; YOKOMI, R.K.; STRADIS, A.; BOSCIA, D.; MARTELLI, G.P.; KRUGNER, R.; PORCELLI, F. Infectivity and transmission of *Xylella fastidiosa* by *Phylaenus spumarius* (Hemiptera: Aphrophoridae) in Apulia Italy. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 107, n. 4, p. 1316-1319, 2014.

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, n. 6, 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, p. 3832-3839, 2005.

SILVA, B.C.N. **Transformação de *Xylella fastidiosa* com GFP, sua colonização em citros e implementação do sistema de dieta artificial para o inseto vetor: novas abordagens no estudo do patossistema da CVC**. 2014, 102p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014.

SIMPSON, A.J.; REINACH, F.C.; ARRUDA, P.; ABREU, F.A.; ACENCIO, M.; ALVARENGA, R.; ALVES, L.M.; ARAYA, J.E.; BAIA, G.S.; BAPTISTA, C.S.; BARROS, M.H.; BONACCORSI, E.D.; BORDIN, S.; BOVÉ, J.M.; BRIONES, M.R.; BUENO, M.R.; CAMARGO, A.A.; CAMARGO, L.E.; CARRARO, D.M.; CARRER, H.; COLAUTO, N.B.; COLOMBO, C.; COSTA, F.F.; COSTA, M.C.; COSTA-NETO, C.M.; COUTINHO, L.L.; CRISTOFANI, M.; DIAS-NETO, E.; DOCENA, C.; EL-DORRY, H.; FACINCANI, A.P.; FERREIRA, A.J.; FERREIRA, V.C.; FERRO, J.A.; FRAGA, J.S.; FRANÇA, S.C.; FRANCO, M.C.; FROHME, M.; FURLAN, L.R.; GARNIER, M.; GOLDMAN, G.H.; GOLDMAN, M.H.; GOMES, S.L.; GRUBER, A.; HO, P.L.; HOHEISEL, J.D.; JUNQUEIRA, M.L.; KEMPER, E.L.; KITAJIMA, J.P.; KRIEGER, J.E.; KURAMAE, E.E.; LAIGRET, F.; LAMBAIS, M.R.; LEITE, L.C.; LEMOS, E.G.; LEMOS, M.V.; LOPES, S.A.; LOPES, C.R.; MACHADO, J.A.; MACHADO, M.A.; MADEIRA, A.M.; MADEIRA, H.M.; MARINO, C.L.; MARQUES, M.V.; MARTINS, E.A.; MARTINS, E.M.; MATSUKUMA, A.Y.; MENCK, C.F.; MIRACCA, E.C.; MIYAKI, C.Y.; MONTERIRO-VITORELLO, C.B.; MOON, D.H.; NAGAI, M.A.; NASCIMENTO, A.L.; NETTO, L.E.; NHANI, A.; NOBREGA, F.G.; NUNES, L.R.; OLIVEIRA, M.A.; DE OLIVEIRA, M.C.; DE OLIVEIRA, R.C.; PALMIERI, D.A.; PARIS, A.; PEIXOTO, B.R.; PEREIRA, G.A.; PEREIRA, H.A.; PESQUERO, J.B.; QUAGGIO, R.B.; ROBERTO, P.G.; RODRIGUES, V.; DE M ROSA, A.J.; DE ROSA, V.E.; DE SÁ, R.G.; SANTELLI, R.V.; SAWASAKI, H.E.; DA SILVA, A.C.; DA SILVA, A.M.; DA SILVA, F.R.; DA SILVA, W.A.; DA SILVEIRA, J.F.; SILVESTRI, M.L.; SIQUEIRA, W.J.; DE SOUZA, A.A.; DE SOUZA, A.P.; TERENCE, M.F.; TRUFFI, D.; TSAI, S.M.; TSUHAKO, M.H.; VALLADA, H.; VAN SLUYS, M.A.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; VETTORE, A.L.; ZAGO, M.A.; ZATZ, M.; MEIDANIS, J.; SETUBAL, J.C. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Nature**, London, v. 406, n. 6792, p. 151-157, 2000.

SISTERSON, M.S.; THAMMIRAJU, S.R.; LYNN-PATTERSON, K.; GROVES, R.L.; DAANE, K.M. Epidemiology of diseases caused by *Xylella fastidiosa* in California: Evaluation of alfalfa as a source of vectors and inocula. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 94, n. 7, p. 827-834, 2010.

TEIXEIRA, D.C.; ROCHA, S.R.P.; SANTOS, M.A.; MARIANO, A.G.; LI, W.B.; MONTEIRO, P.B.A. Suitable *Xylella fastidiosa* CVC strain for post-genome studies. **Current Microbiology**, New York, v. 49, n. 6, p. 396-399, 2004.

TRAVENTSOLO, R.F.; LEITE JÚNIOR, R.P. Hospedeiros de *Xylella fastidiosa* entre plantas invasoras de pomares de citros com Clorose Variegada. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 21, p. 321-448, 1996. Suplemento. Apresentado no CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 39., 1996, Brasília.

TUBELIS, A.; BARROS, J.C.; LEITE, R.M.V.B. Difusão da clorose variegada dos citros em pomares comerciais de laranja no Brasil. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 14, n. 1, p. 239-254, 1993.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/data/citrus-world-markets-and-trade>>. Acesso em: 24 out. 2014.

WELLS, J.M.; RAJU, B.C. Cellular fatty acid composition of six fastidious, gram-negative, xylem-limited bacteria from plants. **Current Microbiology**, New York, v. 10, n. 4, p. 231-236, 1984.

WELLS, J.M.; RAJU, B.C.; NYLAND, G. Isolation, culture, and pathogenicity of the bacterium causing phony disease of peach. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 73, n. 6, p. 859-862, 1983.

WELLS, J.M.; RAJU, B.C.; HUNG, H.-Y.; WEISBERG, W.G.; MANDELCO-PAUL, L.; BRENNER, D.J. *Xylella fastidiosa* gen-nov, sp-nov - gram-negative, xylem-limited, fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. **International Journal of Systematics Bacteriology**, Washington, v. 37, n. 2, p. 136-146, 1987.

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

WISTROM, C.; PURCELL, A.H. The fate of *Xylella fastidiosa* in vineyard weeds and other alternate hosts in California. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 89, n. 9, 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. 266-266, 2007.

YAMAMOTO, P.T.; PRIA JÚNIOR, W.D.; ROBERTO, S.R.; FELLIPE, M.R.; FREITAS, E.P. Flutuação populacional de cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae) em pomar cítrico em formação. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, p. 175-177, 2001.

YAMAMOTO, P.T.; ROBERTO, S.R.; PRIA JÚNIOR, W.D.; FELIPPE, M.R.; MIRANDA, V.S.; TEIXEIRA, D.C.; LOPES, J.R.S. Transmissão de *Xylella fastidiosa* por cigarrinhas *Acrogonia virescens* e *Homalodisca ignorata* (Hemiptera:Cicadellidae) em plantas cítricas. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 28, n. 2, p. 178-181, 2002.